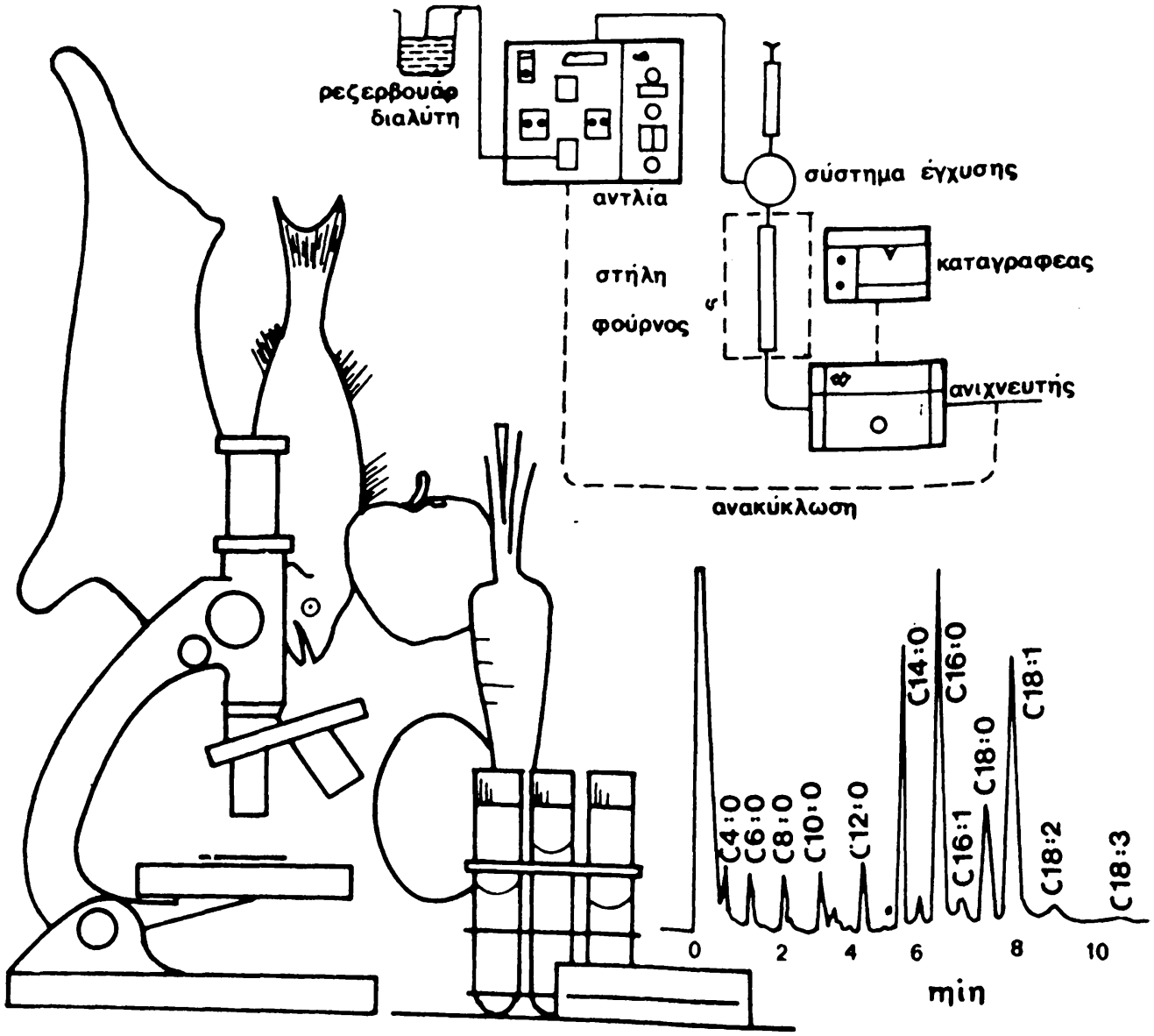
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ανάλυση Τροφίμων: Θεωρία και Εφαρμογές

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Με απόφαση της Ελληνικής Κυβέρνησης τα διδακτικά βιβλία των Α.Ε.Ι.
διανέμονται δωρεάν στους φοιτητές

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ε.Κ. ΒΟΥΔΟΥΡΗ
ΟΜΟΤΙΜΟΥ ΚΑΘΗΓΗΤΗ
ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Μ.Γ. ΚΟΝΤΟΜΗΝΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΗ
ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΕΚΔΟΣΕΩΣ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ
ΑΘΗΝΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Αφιερώνεται με αγάπη, στα μικρά παιδιά
που κρατούνε στο χέρι τους
σαν το μύλο το χάρτινο
τις ελπίδες μας.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η «Ανάλυση Τροφίμων: Θεωρία και εφαρμογές» προορίζεται κυρίως γι' αυτούς που διδάσκονται την ανάλυση των Τροφίμων για πρώτη φορά και αποβλέπει αφ' ενός στο να τους δώσει ένα χρήσιμο βοήθημα για τη μελέτη της σύστασης, των αλλοιώσεων και των νοθεύσεων των Τροφίμων και αφ' ετέρου στην πληρέστερη ενημέρωσή τους πάνω στις μεθόδους και τις τεχνικές προσδιορισμού των συστατικών των τροφίμων. Κατά τη συγγραφή δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην περιγραφή των σύγχρονων μεθόδων ανάλυσης των Τροφίμων όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), η Αέρια Χρωματογραφία (GC), η Φασματοσκοπία μάζης (Mass Spec.), η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), η διαφορική θερμιδομετρία κ.ά., ώστε να καλυφθεί κατά ένα ποσοστό το κενό που υπήρχε στην Ελληνική βιβλιογραφία πάνω στις μεθόδους αυτές.

Μια και πρόκειται για φοιτητικό εγχειρίδιο δεν φιλοδοξεί να αντικαταστήσει τον Κώδικα Τροφίμων δίνοντας λεπτομερείς οδηγίες αναλύσεων αλλά να εξηγήσει τις αρχές πάνω στις οποίες στηρίζονται οι διάφορες μέθοδοι ανάλυσης των Τροφίμων. Στο τέλος κάθε κεφαλαίου δίνονται οι κυριότερες εφαρμογές των μεθόδων ανάλυσης σε συγκεκριμένα τρόφιμα, καθώς και εκτεταμένη ειδική βιβλιογραφία.

Η έκταση κάθε κεφαλαίου είναι συνάρτηση της συχνότητας χρησιμοποίησης των αντίστοιχων μεθόδων και τεχνικών στη σύγχρονη ανάλυση των Τροφίμων.

Επειδή τα τρόφιμα αποτελούν πολύπλοκα μίγματα που περιέχουν ανόργανες και οργανικές χημικές ουσίες, μικροοργανισμούς, ένζυμα κ.ά. συστατικά, είναι προφανές ότι εκτός από τις χημικές και φυσικοχημικές μεθόδους ανάλυσης εφαρμόζονται στο εργαστήριο και άλλες μέθοδοι εξέτασης των τροφίμων, όπως μικροβιολογικές, ενζυματικές κ.λ.π. Αν και το παρόν εγχειρίδιο ασχολείται ουσιαστικά με τις χημικές και φυσικοχημικές μεθόδους, εν τούτοις γίνεται σύντομη αναφορά στις μικροβιολογικές και ενζυματικές μεθόδους επειδή πιστεύουμε πως μόνο η χημική ανάλυση δεν αρκεί για την πλήρη εξέταση των Τροφίμων.

Το βιβλίο χωρίζεται σε τέσσερα μέρη. Στο πρώτο μέρος εξετάζονται η σημασία της ανάλυσης των τροφίμων και η ακολουθούμενη για το σκοπό αυτό διαδικασία. Στο δεύτερο μέρος εξετάζονται οι κυριότερες μέθοδοι ανάλυσης και η σχετική οργανολογία. Στο τρίτο μέρος εξετάζονται αναλυτικά οι προσδιορισμοί συγκεκριμένων συστατικών των τροφίμων όπως οι πρωτεΐνες, τα λιποειδή κ.ο.κ. Τέλος στο τέταρτο μέρος δίνονται οι βασικές αρχές για την εξέταση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, όπως η γεύση, η οσμή, το χρώμα και η υφή.

Τέλος από τη θέση αυτή αισθανόμαστε την ανάγκη να ευχαριστήσουμε όλους όσους συνέβαλαν στην προετοιμασία του βιβλίου αυτού και ιδιαίτερα τους συναδέλφους του εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων καθώς και τους κ.κ. Π. Κύρκο και Π. Παπαδόπουλο για την επιμέλεια των σχημάτων.

Ε.Κ.Β.- Μ.Γ.Κ.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ IX

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

1.1. Σημασία της ανάλυσης των Τροφίμων 3
1.2. Διαδικασία ανάλυσης των Τροφίμων
Α. Δειγματοληψία – Σφάλματα δειγματοληψίας 4
Β. Προετοιμασία, συντήρηση και αποθήκευση δειγμάτων 8
Γ. Επιλογή της μεθόδου ανάλυσης 13
Δ. Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων – Εισαγωγή στις έννοιες της Στατιστικής 14
Ε. Έκφραση αποτελεσμάτων ανάλυσης 19
1.3. Γνωμάτευση 21

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

2.1. Εισαγωγή 25
2.2. Χρωματογραφία προσρόφησης 26
2.3. Χρωματογραφία κατανομής 30
2.4. Χρωματογραφία ιονανταλλαγής 32
2.5. Χρωματογραφία πηκτής 38
2.6. Χρωματογραφία στήλης 43
2.7. Χρωματογραφία χαρτιού και λεπτής στοιβάδας 43
2.8. Αέρια Χρωματογραφία 57
2.9. Υγρή Χρωματογραφία υψηλής πίεσης 78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

3.1. Εισαγωγή 101
3.2. Φασματοφωτομετρία ορατού και υπεριώδους 104
3.3. Φασματοφωτομετρία υπερύθρου 121
3.4. Φθορισμομετρία 129
3.5. Φλογοφωτομετρία/Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης 135
3.6. Φασματοφωτομετρία μαζών 144
3.7. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (N.M.R.) 156

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

4.1. Εισαγωγή 177
4.2. Θεωρία ηλεκτροφόρησης 178
4.3. Τεχνικές ηλεκτροφόρησης
A. Τεχνική Ελευθέρου μετώπου 183
B. Τεχνική Ζώνης 184
4.4. Εφαρμογές 192

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

5.1. Θεωρία Διαφορικής Θερμιδομετρίας/Θερμοσταθμικής ανάλυσης 195
5.2. Οργανολογία 196
5.3. Εφαρμογές 199

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΔΙΑΘΛΑΣΙΜΕΤΡΙΑ

6.1. Θεωρία 203
6.2. Διαθλασίμετρα 205
6.3. Εφαρμογές 208

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ

7.1. Θεωρία 213
7.2. Πολωσίμετρα 216
7.3. Εφαρμογές – Σακχαρομετρία 219

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΑ

8.1. Θεωρία 221
8.2. Πυκνόμετρα, αραιόμετρα, υδρόμετρα 222
8.3. Εφαρμογές 227

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

9.1. Θεωρία και συσκευές εκχύλισης 229
9.2. Εφαρμογές εκχύλισης 234
9.3. Θεωρία φυγοκέντρισης 236
9.4. Οργανολογία 238
9.5. Εφαρμογές φυγοκέντρισης 239

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ

10.1. Εισαγωγή 243
10.2. Μορφές νερού που απαντούν στα τρόφιμα 243

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

10.3. Προσδιορισμός υγρασίας 244
10.4. Σχετική υγρασία και ενεργότητα νερού (aw) 251
10.5. Εφαρμογές 253

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΦΡΑΣ ΚΑΙ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΥΛΩΝ

11.1. Ορισμοί-Γενικά 255
11.2. Είδη και προσδιορισμός τέφρας 256
11.3. Είδη καύσης (αποτέφρωσης) 258
11.4. Προσδιορισμός ανοργάνων υλών 260
11.5. Εφαρμογές

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

12.1. Εισαγωγή 263
12.2. Προετοιμασία δείγματος 264
12.3. Φυσικές και Φυσικοχημικές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεινών 265
12.4. Χημικές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών 269
12.5. Ποιοτική ανάλυση πρωτεϊνών 272
12.6. Χρωστικές αντιδράσεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό
των πρωτεϊνών 274
12.7. Υδρόλυση πρωτεϊνών 275
12.8. Υπολογισμός Βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών 278
12.9. Εφαρμογές 279

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΥΛΩΝ Ή ΛΙΠΙΔΙΩΝ

13. 1. Εισαγωγή 281
13. 2. Παραλαβή του λίπους 281
13. 3. Διαλύτες εκχύλισης 283
13. 4. Καθαρισμός εκχυλισμάτων 283
13. 5. Κλασμάτωση λιπιδίων 284
13. 6. Φυσικές και χημικές μέθοδοι ανάλυσης λιπιδίων 286
13. 7. Χρωστικές αντιδράσεις λιπαρών υλών 297
13. 8. Μέθοδοι προσδιορισμού λίπους 299
13. 9. Διάφοροι προσδιορισμοί 301
13.10. Εφαρμογές 303

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

14.1. Εισαγωγή 307
14.2. Μονο-και ολιγο-σάκχαρα
Α. Εκχύλιση σακχάρων 307
Β. Ανίχνευση σακχάρων 309

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Γ. Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων 314
14.3. Πολυσακχαρίτες 321
14.4. Εφαρμογές 327

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

15.1. Εισαγωγή 331
15.2. Υδατοδιαλυτές βιταμίνες 331
15.3. Λιποδιαλυτές βιταμίνες 337
15.4. Εφαρμογές 340

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΩΝ

16.1. Οξυμετρία 343
16.2. Προσδιορισμός οξέων 346
16.3. Αλκοολομετρία 349
16.4. Προσδιορισμός αλκοολών 350
16.5. Εφαρμογές 352

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΩΝ

17.1. Εισαγωγή 355
17.2. Χημικά συντηρητικά 355
17.3. Χρωστικές 360
17.4. Αντιοξειδωτικά 361
17.5. Διάφορα πρόσθετα 363
17.6. Προσδιορισμός καταλοίπων 366
17.7. Εφαρμογές 366

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18. ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

18.1. Εισαγωγή 369
18.2. Ενζυματική ανάλυση 370
Α. Προσδιορισμός Υποστρώματος 371
Β. Προσδιορισμοί ενεργότητας των ενζύμων 376
18.3. Εφαρμογές 377

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

19.1. Εισαγωγή 381
19.2. Προσδιορισμός συστατικών των τροφίμων με τη βοήθεια μικροοργανισμών 381
19.3. Προσδιορισμός αριθμού μικροοργανισμού 384
19.4. Εφαρμογές 387

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20. ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

20.1. Εισαγωγή 391
20.2. Εξέταση Χρώματος 392
20.3. Εφαρμογές 399
20.4. Εξέταση υφής – Ρεολογία 400
20.5. Εφαρμογές 412
20.6. Εξέταση Γεύσης και Οσμής 416
20.7. Εφαρμογές 426

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Cox.H.E.** and **Pearson D.**, "The Chemical Analysis of Foods", Chemical Publ. Co, London, (1962)
2. **Joslyn M.A.**, "Methods in Food Analysis", 2nd edit, Academic Press, New York (1970)
3. **Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Μέρος Α΄ Τρόφιμα και Ποτά, Αθήνα (1976)
4. **Lees R.**, "Laboratory Handbook of Methods of Food Analysis", Leonard Hill Books, London (1968)
5. Official Methods of Analysis of the Assoc. of Offic. Agric. Chem., 12th edit., Assoc. of Offic. Agric. Chem. Publ., Washington D.C. (1975)
6. **Pearson D.**, "The Chemical Analysis of Foods", J. and A. Churchill Publ., London (1970)
7. **Tribold O.H.** and **Aurand Wil.**, "Food Composition and Analysis", Van Nostrand Publ. Co., Princeton (1963)
8. **Winton L.A.** and **Winton B.K.**; "The Analysis of Foods", John Wiley and Sons, New York (1947)
9. **Χατζηϊωάννου Θ.Π.**, **«Εργαστηριακές ασκήσεις Ποιοτικής Αναλυτικής Χημείας»**, **Αθήνα (1980)**
10. **Βουδούρη Ε.Κ.** και **Κοντομηνά Μ.Κ.**, «Εισαγωγή στην Χημεία των Τροφίμων», Ιωάννινα (1983)
11. **Strobel H.A.**, "Chemical Instrumentation: A Systematic Approach," 2nd edit. Addison Publ. Co., Reading, Mass (1973)
12. **Γαλανού Δ.** και **Βουδούρη Ε.Κ.**, «Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων», Β΄ έκδ., Αθήνα (1980)
13. **Silverstein R.M.**, **Bassler GC** and **Morill T.C.**, "Spectrometic Identification of Organic Compounds", 3th edit, John Wiley and Sons, New York (1974).
14. **Osborne D.R** and **Voogt P.**, "The Analysis of Nutrients in Foods", Academic Press, London (1978)
15. **Heftmann E.** (edit.), "Chromatography", 2nd edit., Reinhold Publ. New York (1967)
16. **Hart F.L.** and **Fisher H.J.**, "Modern Food Analysis", Springer Verlag, New York (1971)
17. **Pearson D.**, "Laboratory Techniques in Food Analysis", Butterworths, London (1973)
18. **McLeod A.J.**, "Instrumental Analysis of Foods", Paul Elek Sci. Books Publ. Ltd., London (1973)
19. **Griswold R.M.**, "The Experimental Study of Foods", Constable Publ., London (1977)
20. **Flavor Chemistry** Symposium Advances in Chem. Series No 56, Amer. Chem. Soc., Washington D.C. (1966)
21. **Macrae R.** (edit.), "HPLC in Food Analysis", Academic Press, London, (1982)
22. Enzymatic Food Analysis pamphlet by Mannheim Boehringer GmbH., Biochemica 68, Germany (1976)
23. **Dilleilo L.R.**, "Methods in Food and Dairy Microbiology", Avi Publ. Co., Westport, Conn. (1982)
24. **Smith I** and **Feinberg J.G.**, "Paper and Thin Layer Chromatography and Electrophoresis", 2nd edit, Longman Publ, London (1965)
25. **Pomeranz Y** and **Meloan C.E**, "Food Analysis: Theory and Practice", AVI. Publ. Co, Westport, Conn. (1971)
26. **Sargent J.R.**, "Methods in Zone Electrophoresis", The British Drug Houses Ltd., Dorset, England (1965.)
27. **Gouw. T.H.** (edit), "Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis", Wiley Interscience, New York (1972)
28. **Taylor R.J.**, "Food Additives", John Wiley and Sons Ltd., Chichester (1980)
29. **Woods AE** and **Aurand L.W.**, "Laboratory Manual in Food Chemistry", AVI Publ. Co., Westport Conn. (1977)
30. **Bennion M.**, "The Science of Food", Harper and Row, San Francisco (1980)
31. **Egan E.**, **Kirk R.S.** and **Sawyer R.**, "Pearsons Chemical Analysis of Foods" 8th edit, Churchill Livingstone, Edinbourgh (1981)
32. **Meloan C.E.** and **Pomeranz Y.**, "Food Analysis Laboratory Experiments", AVI. Publ. Co, Westport Lonn. (1973)
33. **Καραγιάννη Μ.Ι.**, **«Επεξεργασία, Αξιολόγηση και Παρουσίαση Αναλυτικών Δεδομένων»**, **Αθήνα (1976)**
34. **Hanson N.W.** (Ed.), "Official, Standardized and Recommended Methods of Analysis" The Soc. of Anal. Chem., London, (1974)
35. **Stahl E.** (ed.), "Thin Layer Chromatography", Allen and Unwin, London (1967)
36. **Vogel A.I.**, "A Textbook of Quantitative Inorganic Analysis", 3th edit, Longman, Harlow (1962)
37. **Vogel's** "Textbook of Practical Organic Chemistry", Longman, London (1978)
38. **Pecsok RL**, **Shields L.D.** **Cairns T.** and **McWilliam I.G.**, "Modern Methods of Chemical Analysis", 2nd edit. John Wiley and Sons, New York (1980)
39. **Stahl E**, "Thin Layer Chromatography", Academic Press, New York (1965)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

40. **Kirchner JG**, "Thin Layer Chromatography", Interscience Wiley (1967)
41. **Whitaker JR.**, "An Introduction to Enzymology", Processed Publ, Davis, Calif. (1968)
42. **Grob RL**, (edit), "Modern Practice in Gas Chromatography", John Wiley and Sons, New York (1977)
43. **Browning DR** (edit), "Chromatography: Instrumental Methods Series", McCraw-Hill, New York (1969)
44. **Stock R** and **Rice CBF**, "Chromatographic Methods", 2nd edit, Champan and Hall, London (1969)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

UNIVERSITY OF IOANNINA LIBRARY

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

1.1. Σημασία της ανάλυσης των τροφίμων

Για όσους ασχολούνται με τα τρόφιμα, από τον παραγωγό μέχρι τον καταναλωτή, η σημασία της ανάλυσης των τροφίμων είναι εξαιρετικά μεγάλη. Με την ανάλυση ο παραγωγός πληροφορείται για την σύσταση του τροφίμου που παράγει, για τη θρεπτική του αξία, για την καταλληλότητά του να το προσφέρει στην κατανάλωση, για την ύπαρξη τυχόν υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ή κτηνιατρικών φαρμάκων, για την εμπορική του αξία κ.λ.π.

Μετά τον παραγωγό, οι διακινούντες τα τρόφιμα, με την ανάλυσή τους παίρνουν τις ίδιες με τον παραγωγό πληροφορίες και μαθαίνουν ακόμη και για τις μεταβολές που έπαθαν τα τρόφιμα κατά το χρόνο που μεσολάβησε από την παραγωγή τους μέχρις ότου περιέλθουν στην δικαιοδοσία τους.

Οι επεξεργαζόμενοι τα τρόφιμα και εκείνοι που τα χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων τροφίμων, με την ανάλυση μαθαίνουν όλα τα παραπάνω και παίρνουν πληροφορίες: α) για τις επιδράσεις που είχαν στο τρόφιμο οι διάφορες επεξεργασίες και προσθήκες καθώς και για την απόδοση των μεθόδων και εγκαταστάσεων που χρησιμοποίησαν, β) για την σύσταση του τροφίμου στα ενδιάμεσα στάδια της επεξεργασίας και του τελικού προϊόντος και γ) για την καταλληλότητά του να προσφερθεί στην κατανάλωση.

Οι αρμόδιες για τον έλεγχο των τροφίμων κρατικές Υπηρεσίες (Γενικό Χημείο του Κράτους, Κτηνιατρικές Υπηρεσίες) επιδιώκουν με την ανάλυση να προστατεύσουν την υγεία και τα οικονομικά συμφέροντα του καταναλωτή. Το έργο τους είναι μεγάλης σημασίας και εξαιρετικά πολύπλοκο: συνεχής έλεγχος της σύστασης των προσφερόμενων στην κατανάλωση τροφίμων για την διαπίστωση της τυχόν νόθευσης, της αλλοίωσης ή της ενδεχόμενης προσφοράς στην κατανάλωση προϊόντων κατώτερης ποιότητας ως ανώτερης. Έλεγχος για τυχόν ύπαρξη υπολειμμάτων από την κακή χρήση φυτοφαρμάκων, κτηνιατρικών φαρμάκων καθώς και χημικών προσθέτων.

Η ραγδαία αύξηση του πληθυσμού της γης τις τελευταίες δεκαετίες επέβαλε την αύξηση της παραγωγής τροφίμων και τον περιορισμό των απωλειών τους από αλλοιώσεις. Για το σκοπό αυτό έγινε αναγκαία η χρησιμοποίηση των παραπάνω ουσιών, η οποία όμως πρέπει να γίνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες για να περιοριστούν οι κίνδυνοι βλάβης της υγείας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

των καταναλωτών.
Τέλος με το επόμενο αριθμητικό παράδειγμα φαίνεται καθαρά η οικονομική σημασία της ανάλυσης των τροφίμων.
Αν η Ελλάδα εισάγει περίπου 75.000.000 kg ακατέργαστου καφέ ετησίως και ληφθεί υπ' όψιν ότι το προϊόν αυτό περιέχει περίπου 8-12% νερό, προκύπτει ότι η χώρα μας «εισάγει» 7.500.000 kg νερό μόνο μέσω του καφέ ετησίως. Αν η μέση τιμή αγοράς ακατέργαστου καφέ από το εξωτερικό είναι 300 δρχ./kg, η παραπάνω ποσότητα νερού κοστίζει 2.250.000.000 δρχ. Η τιμή πώλησης του καφέ προσαρμόζεται ανάλογα με την περιεχομένη ποσότητα νερού. Αν η μέθοδος ανάλυσης του νερού στον ακατέργαστο καφέ έχει σφάλμα 1,2% με ζητούμενη ακρίβεια 98%, τότε το πιθανό σφάλμα αντιστοιχεί σε 27.000.000 δρχ. Το ποσό αυτό μπορεί να αποβεί καθοριστικό για την συνέχιση υγειούς λειτουργίας μιας βιομηχανίας και κατά συνέπεια για την απασχόληση σημαντικού αριθμού εργαζομένων.

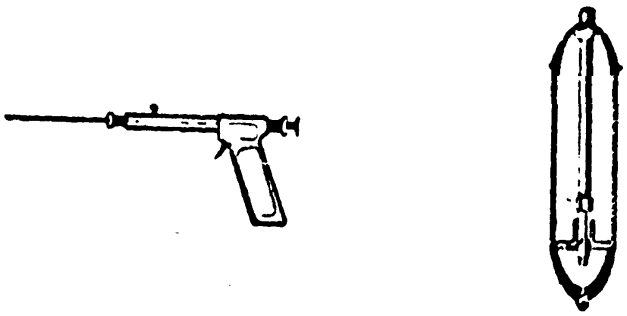
1.2 Διαδικασία της ανάλυσης των τροφίμων

Α. Δειγματοληψία[6, 14]

Η αξιοπιστία και τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης τροφίμων εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες μεταξύ των οποίων πρωταρχική θέση κατέχει ο τρόπος με τον οποίο λαμβάνεται το προς ανάλυση δείγμα. Ο τρόπος λήψης του δείγματος και οι διεργασίες που μεσολαβούν μεταξύ λήψης και ανάλυσης του δείγματος αποτελούν ουσιαστικές πηγές σφαλμάτων στην ανάλυση των τροφίμων.
Σύμφωνα με την IUPAC (Διεθνής Ένωση Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας) σαν δείγμα ορίζεται το τμήμα εκείνο του υλικού που έχει επιλεγεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να κατέχει τη σύσταση και τις χαρακτηριστικές ιδιότητες του υλικού από το οποίο προήλθε. Σαν δειγματοληψία δε ορίζεται η διαδικασία λήψης του δείγματος με τις παραπάνω προδιαγραφές. Στην πράξη ένα δείγμα θεωρείται ικανοποιητικό αν οι υπό εξέταση ιδιότητές του αντιστοιχούν σ' εκείνες του αρχικού υλικού από το οποίο προήλθε, μέσα στα όρια που θέτει η μέθοδος εξέτασης.
Οι παράγοντες που καθορίζουν την επιλογή μιας συγκεκριμένης δειγματοληπτικής διαδικασίας περιλαμβάνουν: (1) τον σκοπό της ανάλυσης (αποδοχή ή απόρριψη του δείγματος, καθορισμός ποσότητας, ομοιομορφίας υλικού κ.τ.λ.) (2) τη φύση της μεθόδου δειγματοληψίας (καταστρεπτική ή μή καταστρεπτική για το δείγμα) κ.τ.λ. (3) τη φύση του προς εξέταση υλικού (κόστος, μέγεθος, έκταση, φυσική κατάσταση, δυνατότητα υποδιαίρεσης του υλικού σε μικρότερα δείγματα) κ.τ.λ. Για παράδειγμα, προκειμένου περί δειγματοληψίας τυριού,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

θα χρησιμοποιηθεί «τυροκλέφτης» (Σχ. 1-1α) με τη βοήθεια του οποίου θα συλλεγούν πολλά μικρά δείγματα από όλο τον όγκο του τυριού, ενώ προκειμένου περί δειγματοληψίας νερού από κάποια δεξαμενή, θα χρησιμοποιηθεί «συλλέκτης υγρών» (Σχ. 1-1β). Ο τελευταίος αποτελείται από κυλινδρικό περίπου δοχείο που στη βάση του φέρει βαλβίδα. Η βαλβίδα μπορεί να ανοίγει ή να κλείνει με τη βοήθεια σύρματος έτσι ώστε να είναι δυνατή η δειγματοληψία σε οποιοδήποτε βάθος της δεξαμενής.



(α) (β)

Σχ. 1-1. Όργανα δειγματοληψίας: (α) τυροκλέφτης (β) συλλέκτης υγρών.

Το δείγμα πρέπει να είναι αρκετό σε ποσότητα για όλους τους σχεδιαζόμενους προσδιορισμούς. Για να συγκεντρωθεί αρκετή ποσότητα δείγματος θα πρέπει να συλλεγούν πολλά επί μέρους δείγματα από όλα τα σημεία του υπό εξέταση υλικού από τα οποία θα προκύψει το τελικό δείγμα με μία από τις τεχνικές που περιγράφονται στη συνέχεια. Τελική ποσότητα δείγματος, ομογενοποιημένου, ίση με 250 g για στερεά υλικά ή 250 ml για υγρά υλικά συνήθως επαρκεί για πλήρη εξέτασή του.

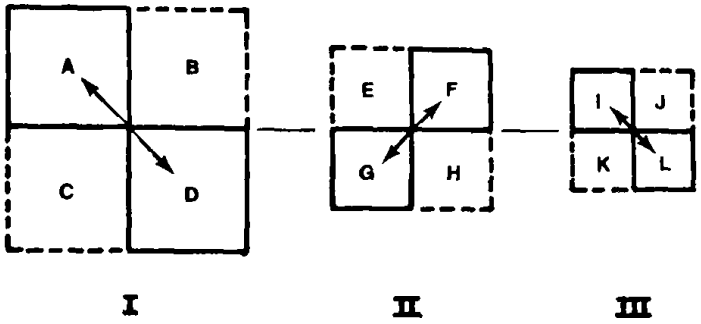
Η δειγματοληψία ανάλογα με τη φύση του δείγματος δυνατόν να γίνει είτε ασυνεχώς με τη μεσολάβηση των χεριών, είτε συνεχώς με τη χρήση ειδικών για κάθε περίπτωση μηχανικών διατάξεων.

1. Ασυνεχής δειγματοληψία

Στην περίπτωση ομογενών υγρών ή λεπτόκοκκων στερεών η ανάμειξη πριν από την δειγματοληψία επιτυγχάνεται με αλλεπάλληλη ανατάραξη του υλικού, μέσα σε κλειστό δοχείο όγκου διπλάσιου τουλάχιστον του όγκου του υλικού ή με διαδοχικές μεταγγίσεις του υλικού μεταξύ δύο ανοικτών δοχείων.

Δείγματα λεπτόκοκκων στερεών λαμβάνονται κατόπιν διαίρεσης της μάζας του αρχικού υλικού σε τέσσερα τεταρτημόρια, απομάκρυνσης των δυο εκ διαμέτρου αντιθέτως τεταρτημορίων, ανάμιξης του υπόλοιπου υλικού και επανάληψης της πιο πάνω διαδικασίας μέχρις ότου ληφθεί η επιθυμητή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 1-2. Λήψη δείγματος στο επιθυμητό μέγεθος σε τρία στάδια.

ποσότητα δείγματος (Σχ. 1–2).

Κρυσταλλωμένα ή στερεοποιημένα υγρά, υγροποιούνται και αναμιγνύονται καλά πριν από τη δειγματοληψία. Γαλακτώματα, όπως δείγματα νωπού βουτύρου, μαργαρίνης ή μαγιονέζες θερμαίνονται στους 35°C και αναμειγνύονται καλά. Θολά δείγματα λαδιών θερμαίνονται ελαφρά και διηθούνται.

Για ετερογενή υλικά η δειγματοληψία γίνεται **γεωμετρικά.** Το προς εξέταση υλικό διαιρείται νοερά σε κανονικά γεωμετρικά σχήματα (κύβους, κυλίνδρους κτλ.) και σειρά επί μέρους δειγμάτων λαμβάνεται από διάφορα σημεία των γεωμετρικών αυτών σχημάτων. Στη συνέχεια τα ξεχωριστά αυτά επί μέρους δείγματα ενώνονται για να δώσουν ένα συνολικό δείγμα, το οποίο ακολούθως ελαττώνεται σε μέγεθος (βλ. κεφ. 1.2 Β) για να δώσει το τελικό προς ανάλυση δείγμα. Παράδειγμα γεωμετρικής δειγματοληψίας αποτελεί η χρήση του τυροκλέφτη για τη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος από ένα ή περισσότερα κεφάλια τυριού. Κλασσικό παράδειγμα ετερογενών υλικών αποτελούν τα φρούτα και τα κηπευτικά, οι ιδιότητες των οποίων παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις από σημείο σε σημείο. Για τη σωστή δειγματοληψία τέτοιων υλικών απαιτείται μεγάλος αριθμός επί μέρους δειγμάτων για τη λήψη του τελικού δείγματος. Για παράδειγμα οι χρωστικές ανθοκυανίνες στα σταφύλια, βρίσκονται εντοπισμένες μόνο στα επιδερμικά κύτταρα του προϊόντος.

2. Συνεχής δειγματοληψία

Τα τελευταία χρόνια, στη βιομηχανία κυρίως, η δειγματοληψία με τη μεσολάβηση των χεριών έχει αντικατασταθεί από μηχανικούς ή συνεχείς δειγματολήπτες. Ο συνηθέστερος τύπος μηχανικού δειγματολήπτη είναι: **ο κατ' ευθείαν γραμμή μηχανικός δειγματολήπτης (straight line sampler).**[13] Η βασική του διάταξη αποτελείται από ειδικό, μεταλλικό συνήθως συλλέκτη δειγμάτων σχήματος τριγωνικού πρίσματος ο οποίος κινείται μηχανικά με σταθερή ταχύτητα μέσα στη ροή του προς δειγματοληψία υλικού και σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα μέσω κατάλληλου ανοίγματος στην

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

επιφάνειά του, συλλέγει δείγματα. Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα του συλλεγόμενου δείγματος περιλαμβάνουν την ταχύτητα του συλλέκτη, το άνοιγμα του συλλέκτη και την συχνότητα δειγματοληψίας. Η συχνότητα δειγματοληψίας είναι συνάρτηση της ομοιογένειας ή της ομοιομορφίας του υλικού. Η διάμετρος του ανοίγματος του συλλέκτη πρέπει να είναι τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερη από το μέγεθος των σωματιδίων του προς δειγματοληψία υλικού.

Η δειγματοληψία διενεργείται στη βιομηχανία ή στο εργαστήριο σε όλα τα στάδια παραγωγής των τροφίμων. Μπορεί να γίνει στις **πρώτες ύλες** για να διαπιστωθεί η ποιότητα της χρησιμοποιούμενης πρώτης ύλης, **στα ενδιάμεσα στάδια επεξεργασίας** για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα των διαφόρων κατεργασιών (ψύξη, θέρμανση) του τροφίμου καθώς και περιοδικά στο **τελικό προϊόν** για να διαπιστωθεί αν και κατά πόσον το επεξεργασμένο τρόφιμο πληροί τους όρους που έχει θεσπίσει η Πολιτεία προκειμένου να διασφαλιστεί η υγεία του καταναλωτή.

3. Σφάλματα στη δειγματοληψία

Τα σφάλματα στη δειγματοληψία μπορεί να οφείλονται: (1) στον ανθρώπινο παράγοντα π.χ. έλλειψη τυχαίας επιλογής των επί μέρους δειγμάτων του προϊόντος που θα αποτελέσουν το τελικό δείγμα, (2) στα χρησιμοποιούμενα όργανα, π.χ. στιγμιαία ή μόνιμη βλάβη δειγματοληπτικής διάταξης και (3) στη φύση της μεθόδου διεγματοληψίας. Επίσης η φύση του υλικού–συνάφεια που τυχόν παρουσιάζει το υλικό με την επιφάνεια του δειγματολήπτη–μπορεί να εισάγει σφάλμα κατά την δειγματοληψία. Σφάλματα μπορεί να προκύψουν και από πιθανή μεταβολή στη σύσταση του υπό ανάλυση τροφίμου (απώλεια ή πρόσληψη νερού, απώλεια πτητικών ουσιών, εγκλωβισμός αερίων, αλλοίωση κυρίως των οπωροκηπευτικών από μηχανική επίδραση-δόνησης ή κραδασμού ή ενζυματική δραστηριότητα κατά τη δειγματοληψία κ.ο.κ.). Τα σημαντικώτερα σφάλματα εντούτοις κατά τη δειγματοληψία προέρχονται από την ετερογένεια των τροφίμων (μακρο-ή μικροετερογένεια) π.χ. το νικοτινικό οξύ και η θειαμίνη βρίσκονται μόνο στη στοιβάδα της αλευρόνης στον κόκκο του σιταριού.

Εκτός όμως από τα μικροσυστατικά, και τα μακροσυστατικά (λίπη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) που είναι άνισα κατανεμημένα στα τρόφιμα, δημιουργούν προβλήματα κατά τη δειγματοληψία, π.χ. η ανομοιόμορφη κατανομή του λίπους στο κρέας, η αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του φλοιού των δημητριακών σε σχέση με το ενδοσπέρμιο κ.α. Τα προβλήματα αυτής της φύσης ξεπερνιούνται συνήθως με άλεση και αλλεπάλληλη ανάμειξη πολλών επί μέρους δειγμάτων από το υλικό.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Β. Προετοιμασία, συντήρηση και αποθήκευση δειγμάτων[15,16]

Αφού ολοκληρωθεί η δειγματοληψία, επιβάλλεται η προετοιμασία και συντήρηση του δείγματος μέχρις ότου υποβληθεί σε ανάλυση. Τα στάδια της ορθής προετοιμασίας, συντήρησης και αποθήκευσης του δείγματος αποτελούν βασική προϋπόθεση για τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων στην ανάλυση. Εαν για οποιονδήποτε λόγο έχει επέλθει αλλοίωση στα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος, όπως π.χ. απώλεια πτητικών συστατικών, οξειδώσεις κ.α. τα αποτελέσματα θα είναι ανακριβή, ανεξάρτητα από την ακρίβεια της οργανολογίας, της μεθόδου και του αναλυτή. Κατά την προετοιμασία του δείγματος τα συνηθέστερα προβλήματα συνίστανται στην:

1) λήψη αληθινά αντιπροσωπευτικού, μικρού σε μέγεθος, δείγματος από το αρχικό μεγάλο δείγμα στην περίπτωση μη ελεγχόμενης διακύμανσης της περιεκτικότητας του υπό εξέταση συστατικού στο δείγμα.
2) απομάκρυνση των ξένων προς το αντικείμενο της ανάλυσης υλικών, κυρίως στην περίπτωση των φυτικής προέλευσης δειγμάτων, χωρίς τη σύγχρονη απομάκρυνση των υπό εξέταση συστατικών του δείγματος.
3) ενζυματική δραστηριότητα του δείγματος πριν και μετά την ανάλυση.
4) πιθανή μεταβολή των συστατικών του δείγματος κατά την ελάττωση μεγέθους του τελευταίου (βλ. κεφ. 1.2 Β1).
5) πιθανές μεταβολές ευπαθών συστατικών του δείγματος, όπως οι χλωροφύλλες, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα κ.τ.λ.

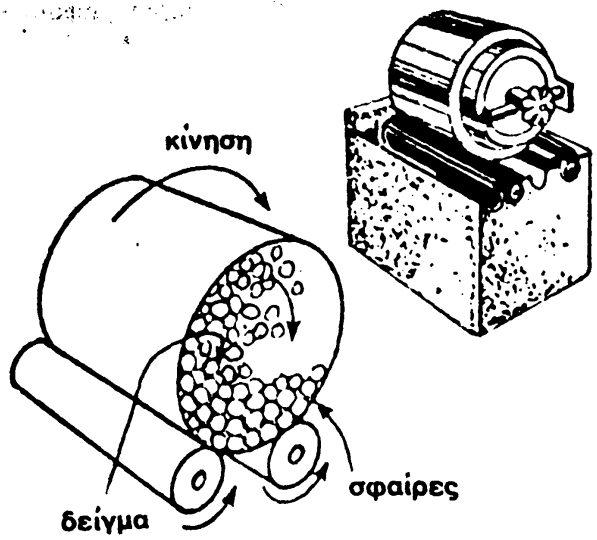
1. Ελάττωση μεγέθους του δείγματος

Μετά τη δειγματοληψία και πριν από την ελάττωση μεγέθους, το δείγμα συνήθως καθαρίζεται με έκπλυση για την απομάκρυνση τυχόν παρεμποδιζουσών ακαθαρσιών. Η ισχυρή έκπλυση πρέπει εν τούτοις να αποφεύγεται γιατί επέρχεται ταυτόχρονη απώλεια διαλυτών συστατικών. Όλα σχεδόν τα προς ανάλυση δείγματα τροφίμων απαιτούν κάποια ελάττωση μεγέθους. Η χρησιμοποιούμενη σε κάθε περίπτωση διάταξη εξαρτάται από: (1) τη φύση του υλικού και (2) από το επιθυμητό τελικό μέγεθος του υλικού. Π.χ. για τον προσδιορισμό της υγρασίας, της συνολικής πρωτεΐνης, της τέφρας κ.ο.κ., τα δείγματα ξηρών τροφίμων αλέθονται έτσι ώστε να περνούν από κόσκινο 20 Mesh (20 ανοίγματα ανά 2,54 cm). Ειδικώτερα για αναλύσεις που περιλαμβάνουν εκχυλίσεις (προσδιορισμός λιπιδίων, υδατανθράκων κ.α.) τα δείγματα αλέθονται ώστε να περνούν από κόσκινο 40 Mesh.

α. Ελάττωση μεγέθους ξηρών υλικών

Τα μηχανικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την ελάττωση μεγέθους ξηρών υλικών ποικίλλουν από το απλό ιγδίο (γουδί), μέχρι τους σύνθετους σφαιρόμυλους προκειμένου να επιτευχθεί λεπτόκοκκο υλικό. (Σχ. 1-3)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



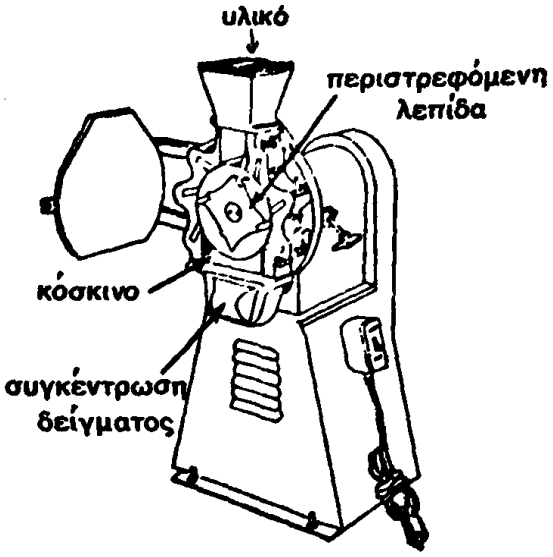
Σχ. 1-3. Σφαιρόμυλος.

Στο σφαιρόμυλο το υλικό αλέθεται σε περιστρεφόμενο κυλινδρικό δοχείο με τη βοήθεια σφαιρών από χάλυβα ή πορσελάνη. Με περιστροφική κίνηση του μύλου οι ανερχόμενες σφαίρες πέφτουν με ορμή στις χαμηλώτερα ευρισκόμενες σφαίρες και συνθλίβουν το μεταξύ τους ευρισκόμενο υλικό. Η άλεση συνεχίζεται μέχρις ότου επιτευχθεί η επιθυμητή κοκκομετρική σύσταση του υλικού. Το μειονέκτημα του σφαιρόμυλου έγκειται στο ότι η άλεση είναι χρονοβόρα διαδικασία. Ο τύπος αυτός του μύλου αντεδείκνυται για τρόφιμα που περιέχουν σημαντικά ποσά υγρασίας επειδή παρατηρείται σημαντική απώλεια της τελευταίας, με σύγχρονη ανάπτυξη θερμότητας που συνοδεύεται από ανεπιθύμητες χημικές μεταβολές στη σύσταση του τροφίμου.
Για την άλεση κατεψυγμένων δειγμάτων τροφίμων, χρησιμοποιείται σφαιρόμυλος με προψυγμένες σφαίρες. Στη χαμηλή αυτή θερμοκρασία της άλεσης, ελαχιστοποιούνται οι ανεπιθύμητες μεταβολές στη σύσταση του τροφίμου (π.χ. αντίδραση Maillard στη θερμοκρασία περιβάλλοντος).
Για την άλεση υλικών σε ενδιάμεσο μέγεθος κόκκων όπως τα όσπρια, τα δημητριακά και γενικά τρόφιμα που δεν περιέχουν υπερβολικά ποσά λίπους, ενδείκνυται η χρήση σφυρόμυλων (hammer mills). Ο πιο διαδομένος τύπος σφυρόμυλου είναι ο μύλος Wiley που φαίνεται στο σχήμα 1-4.
Ο τύπος αυτός του μύλου φέρει ανταλλακτικά κόσκινα μεγέθους π.χ. 20, 40, 60 Mesh για τη λήψη του επιθυμητού μεγέθους του υλικού.

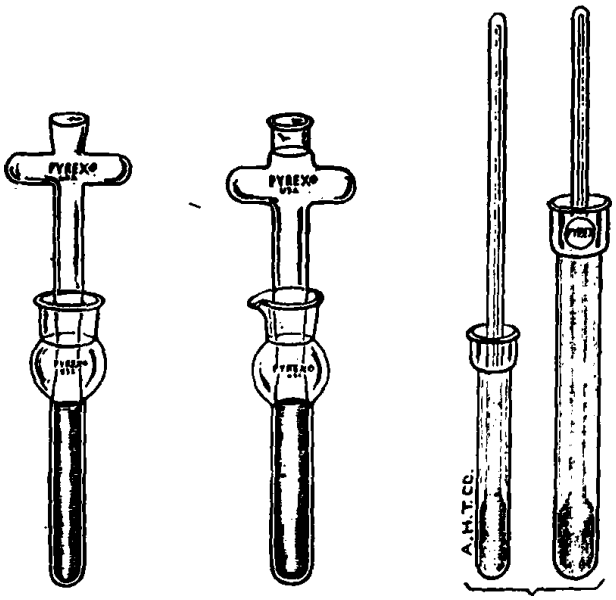
β. Ελάττωση μεγέθους υλικών που περιέχουν υγρασία.

Κι εδώ χρησιμοποιείται σειρά συσκευών που ποικίλλει από το απλό ίγδιο μέχρις των σύνθετων ειδικών αλεστήρων στερεών (tissue grinder) Σχ. 1-5. Στον αλεστήρα του Σχ. 1-5 το δείγμα πιέζεται μεταξύ δύο ομόκεντρων

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 1-4. Μύλος τύπου Wiley



Σχ. 1-5. Διάφοροι τύποι αλεστήρων νωπών στερεών υλικών.
(Από A.H. Thomas Co. ΗΠΑ)

κύλινδρων, ο εξωτερικός των οποίων παραμένει ακίνητος, ενώ ο εσωτερικός κινείται μηχανικά κατά την κατακόρυφο κατεύθυνση. Το δείγμα το οποίο τροφοδοτείται από πάνω, συνθλίβεται μεταξύ των δύο κυλίνδρων και αλέθεται στο επιθυμητό μέγεθος. Για την άλεση πολύ μαλακών τροφίμων καθώς και αιωρημάτων χρησιμοποιείται το γνωστό σε όλους «μπλέντερ» (waring blender) (Σχ. 1-6).

Ο αλεστήρας αυτός αποτελείται από κυλινδρικό ή παραλληλεπίπεδο δοχείο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σχ. 1-6. Μπλέντερ τύπου Waring (ταχύτ. περιστρ.: 17,000-25,000 rpm).
(Από A.H. Thomas Co. ΗΠΑ)

στη βάση του οποίου περιστρέφονται με μεγάλη ταχύτητα σύστημα λεπίδων (10,000-20,000 rpm). Οι λεπίδες αυτές τεμαχίζουν το υλικό στο επιθυμητό μέγεθος. Τέλος για την ελάττωση μεγέθους των αιωρημάτων συνηθίζεται η ανατάραξή του υλικού με άμμο ή σφαιρίδια από γυαλί σε ειδικής κατασκευής μύλο.

Νωπά προϊόντα όπως κρέατα και ψάρια κατ' αρχήν τεμαχίζονται και στη συνέχεια περνούν από κρεατομηχανή είτε από μπλέντερ.

γ. Ελάττωση μεγέθους με ενζυματικά ή χημικά μέσα

Η ελάττωση του μεγέθους των δειγμάτων σε αρκετές περιπτώσεις επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων ή και χημικών μέσων π.χ. οι υδρολάσες και οι πρωτεάσες χρησιμοποιούνται συχνά σε δείγματα τροφίμων για τη διαλυτοποίηση υψηλού μοριακού βάρους συστατικών (πρωτεϊνών). Ακόμη αντιδραστήρια όπως διμεθυλοφορμαμίδιο, ουρία, πυριδίνη, φαινόλη, συνθετικά απορρυπαντικά και αναγωγικά μέσα χρησιμοποιούνται για το σπάσιμο δεσμών και τη διαλυτοποίηση πολλών συστατικών των τροφίμων.

2. Συντήρηση δειγμάτων

α) αδρανοποίηση των ενζύμων του δείγματος

Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα στην ανάλυση των τροφίμων είναι η έγκαιρη αδρανοποίηση των ενζύμων του τροφίμου, ειδικά στις περιπτώσεις όπου πρόκειται να προσδιοριστούν συστατικά ευαίσθητα στη δράση των ενζύμων, όπως πρωτεϊνες, σάκχαρα ή λιπίδια. Η μέθοδος αδρανοποίησης ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος του δείγματος, τη σύσταση, τη σταθερότητα,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

το είδος των ενζύμων που περιέχει και τους συγκεκριμένους προσδιορισμούς που πρόκειται να γίνουν π.χ. οι αμυλάσες που προέρχονται από μύκητες είναι θερμοευαίσθητες και αδρανοποιούνται εύκολα σε χαμηλές σχετικά θερμοκρασίες. Άλλες πάλι βακτηριακές αμυλάσες είναι θερμοανθεκτικές και απαιτούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες (Θ >100 °C).

Γενικά τα περισσότερα ένζυμα αδρανοποιούναι με ξήρανση του δείγματος στους 70-80°C για τρόφιμα που δεν περιέχουν θερμοευαίσθητα ή πηκτικά συστατικά και στους 60°C υπό κενό για τρόφιμα με πηκτικά και θερμοευαίσθητα συστατικά. Με την θέρμανση αυτή πάντοτε επέρχεται κάποια αλλοίωση ή και καταστροφή σε ορισμένα συστατικά του τροφίμου όπως στις βιταμίνες, μερική καραμελοποίηση στα σάκχαρα, μετουσίωση στις πρωτεΐνες κ.α.

Άλλη μέθοδος αδρανοποίησης των ενζύμων είναι η λεγόμενη «δηλητηρίαση» των ενζύμων που προκαλείται κατόπιν επίδρασης ανόργανων ουσιών όπως $(NH_4)_2SO_4$, δραστικής μεταβολής του pH ή επίδρασης συστήματος διαλυτών, όπως 80% CH_3OH ή C_2H_5OH, 5 ή 10% $HClO_4$ ή μίγμα $CH_3OH/CHCl_3/HCOOH$ (12:5:3 V/V).

β) Μεταβολές στα λιπίδια κατά τη συντήρηση

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις λιπαρές ύλες, κατά την προετοιμασία και συντήρηση των δειγμάτων τροφίμων, διότι κατά τις κατεργασίες αυτές μεταβάλλονται σχετικά εύκολα οι αναλογίες των λιπαρών οξέων (π.χ. ακόρεστα προς κορεσμένα) στο δείγμα. Για το λόγο αυτό το δείγμα ψύχεται ταχέως ή καταψύχεται στους -20°C, πριν από την εκχύλιση. Κατά την αποθήκευση των λιπιδίων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα επέρχεται εύκολα οξείδωση των τελευταίων. Η ταχύτητα οξείδωσης είναι συνάρτηση του βαθμού ακορεστότητας της λιπαρής ύλης π.χ. η ταχύτητα οξείδωσης του λινελαϊκού οξέος (Δ.Δ [9,12]) είναι είκοσι φορές μεγαλύτερη εκείνης του ελαϊκού (Δ.Δ [9]). Κάθε πρόσθετος διπλός δεσμός (Δ.Δ.) στο μόριο διπλασιάζει την ταχύτητα οξείδωσης. Δείγματα λιπαρών υλών αποθηκεύονται σε αδρανή ατμόσφαιρα N_2, είτε σε στερεά κατάσταση, είτε κατόπιν διάλυσης σε πετρελαϊκό αιθέρα. Η ταχύτητα οξείδωσης είναι επίσης συνάρτηση της θερμοκρασίας. Στους -20°C η ταχύτητα οξείδωσης ισούται με 1/16 εκείνης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Θ=22°C).

γ) Επίδραση μικροοργανισμών

Τα περισσότερα δείγματα τροφίμων αποτελούν πολύ καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων, μυκήτων και ζυμομυκήτων. Για την προστασία έναντι των μικροοργανισμών τα δείγματα τροφίμων συσκευάζονται σε ερμητικώς κλειστά δοχεία από γυαλί (αποφεύγεται η επαφή με μέταλλα) και ψύχονται στους 4°C ή συσκευάζονται σε πλαστικές μεμβράνες και καταψύχονται στους -20°C (προστασία από την αφυδάτωση). Ακόμη εφαρμόζονται η

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ξήρανση με κατάψυξη (freeze drying) και η χρήση χημικών συντηρητικών. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα χημικά συντηρητικά περιλαμβάνουν το σορβικό οξύ, το βενζοϊκό νάτριο, το σαλικυλικό νάτριο κ.α.
Τέλος τα υγρά τρόφιμα όπως κρασιά, μπύρες, χυμοί φρούτων υποβάλλονται σε διήθηση για την απομάκρυνση αιωρούμενων ουσιών.
Σε τρόφιμα που αποτελούνται από δύο φάσεις όπως π.χ. οι κονσέρβες αποχωρίζονται το υγρό από το στερεό με ειδικά κόσκινα και εξετάζονται το καθένα απ' αυτά χωριστά.

Γ. Επιλογή της μεθόδου ανάλυσης[11,12,18]

Για την επιλογή της μεθόδου ανάλυσης συγκεκριμένου τροφίμου πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί παράγοντες, οι κυριώτεροι από τους οποίους είναι: (1) η ζητούμενη από τη μέθοδο ακρίβεια ή το σφάλμα που δίνει η μέθοδος κατά την εφαρμογή της (2) η ποσότητα του αναλυόμενου τροφίμου. Αν δηλαδή η μέθοδος που θα εφαρμοστεί θα είναι μικρο ή μακρομέθοδος. Συνήθως οι εφαρμοζόμενες, στην ανάλυση των τροφίμων μέθοδοι, είναι μακρομέθοδοι (ποσότητα δείγματος $\geqslant$ 100 mg). (3) Η φύση του πρός ανάλυση δείγματος π.χ. δεν είναι δυνατόν να μετρηθεί το pH υγρού τροφίμου σε ακετονικό διάλυμα επειδή το πεχάμετρο είναι κατασκευασμένο για υδατικά διαλύματα κ.ο.κ.
Η αξιοπιστία μιας αναλυτικής μεθόδου χαρακτηρίζεται από τους ακόλουθους παράγοντες:

1) Ακρίβεια (Accuracy): έχει σχέση με το κατά πόσο η πειραματική τιμή απέχει από την αληθινή τιμή της μετρούμενης παραμέτρου. Η ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθόδου είναι δυνατόν να προσδιοριστεί κατά τρεις τρόπους: (α) με την ανάλυση δείγματος γνωστής σύστασης και σύγκριση των πειραματικών αποτελεσμάτων με τα δοσμένα. Ο τρόπος αυτός δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστεί πάντοτε όπως για παράδειγμα σε πολλές περιπτώσεις φυσικών προϊόντων, όπως τα τρόφιμα (β) με την ανάλυση του δείγματος με άλλη μέθοδο ικανοποιητικής ακρίβειας και σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων (γ) στα υπό ανάλυση δείγματα προστίθενται γνωστές ποσότητες καθαρής ουσίας και μετρείται ή % ανάκτηση της γνωστής ουσίας.

2) Επαναληπτικότητα (Reproducibility): έχει σχέση με το κατά πόσο σε διαδοχικές αναλύσεις λαμβάνεται η ίδια τιμή της μετρούμενης παραμέτρου. Είναι ευνόητο ότι μία αναλυτική μέθοδος μπορεί να έχει (α) υψηλή ακρίβεια και υψηλή επαναληπτικότητα, (β) χαμηλή ακρίβεια και υψηλή επαναληπτικότητα και (γ) χαμηλή ακρίβεια και χαμηλή επεναληπτικότητα, ποτέ όμως υψηλή ακρίβεια και χαμηλή επαναληπτικότητα (Σχ. 1-7).

3) Ευαισθησία (Sensitivity): έχει σχέση με την ελάχιστη ποσότητα της

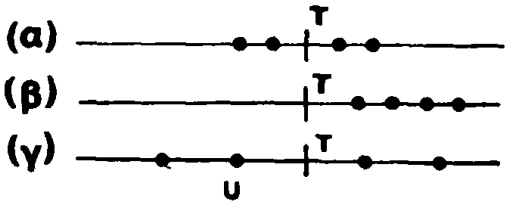
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

μετρούμενης παραμέτρου που η αναλυτική μέθοδος έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει. Ορίζεται σαν το πηλίκον:

$$S = \frac{\Delta R}{\Delta W}$$

όπου:

ΔR= η μετρούμενη μεταβολή στην απόκριση για την ελάχιστη μεταβολή στην ποσότητα της ουσίας (ΔW) που προσδιορίζεται. Η ευαισθησία μιας μεθόδου είναι δυνατόν να βελτιωθεί είτε (α) με αύξηση της απόκρισης ανά μονάδα βάρους ή όγκου της ουσίας που προσδιορίζεται π.χ. στο χρωματομετρικό προσδιόρισμό σακχάρων, με επιλογή αντιδραστηρίων με υψηλή ειδική απορροφητικότητα (βλ. κεφ. 3.2) είτε (β) με βελτίωση της διακριτικής ικανότητας των οργάνων που χρησιμοποιούνται π.χ. στη φασματοσκοπική εξέταση λαδιών με χρήση φωτοπολλαπλασιαστή με μεγάλη μεγεθυντική ισχύ. (βλ. κεφ. 3.2)



Σχ. 1-7. Οι έννοιες της ακρίβειας και επαναληπτικότητας μεθόδου.
(α) υψηλή ακρίβεια και υψηλή επαναληπτικότητα
(β) χαμηλή ακρίβεια και υψηλή επαναληπτικότητα
(γ) χαμηλή ακρίβεια και χαμηλή επαναληπτικότητα
Τ=αληθινή τιμή

Δ. Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων - Εισαγωγή στις έννοιες της Στατιστικής[3,4,5,7,10,19]

1. Στατιστικές παράμετροι

Η από τη φύση ευρεία διακύμανση στη σύσταση των πρώτων υλών και των βασικών συστατικών των τροφίμων καθιστούν απαραίτητη τη χρησιμοποίηση στατιστικών μεθόδων, τόσο για τη σωστή δειγματοληψία, όσο και την ορθή αξιοποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων μιας ανάλυσης.

Στην επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων μιας ανάλυσης τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα στατιστικά μεγέθη είναι τα ακόλουθα:

(α) μέση τιμή ($\bar{x}$) (mean value): είναι η τιμή που αντιπροσωπεύει καλύτερα τον πληθυσμό ενός δείγματος. Αποτελεί το αλγεβρικό άθροισμα όλων των τιμών των μετρήσεων (x_i) διηρημένων δια του αριθμού των μετρήσεων (n)

$$\bar{x} = \frac{x_1+x_2+...+x_i+x_n}{n} = \sum_{i=1}^{i=n} x_i \qquad (1.1)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(β) μέση απόκλιση ($\bar{d}$) (average deviation): είναι ο μέσος όρος των απόλυτων τιμών των αποκλίσεων (d_i)

$$\bar{d} = \frac{|d_1|+|d_2|+...+|d_n|}{n} = \sum \frac{|x_i-x_n|}{n} \qquad (1.2)$$

όπου $d_i = x_i - \bar{x}$

(γ) εύρος μετρήσεων (w) (range): είναι το μέτρο της κατανομής των τιμών μιας ανάλυσης και παριστάνει τη διαφορά μεταξύ της μεγίστης και ελαχίστης πειραματικής τιμής.

$$W = X_{max} - X_{min} \qquad (1.3)$$

(δ) τυπική απόκλιση (σ) (standard deviation): είναι το μέτρο απόκλισης από τη μέση τιμή. Δίνεται από τη σχέση (1.4)

$$\sigma = \left[\sum_{i=1}^{n} \frac{(x_i-\bar{x})^2}{n} \right]^{1/2} \qquad (1.4)$$

και για $n < 10$

$$S = \left[\sum_{i=1}^{n} \frac{(x_i-\bar{x})^2}{n-1} \right]^{1/2} \qquad (1.5)$$

οι μονάδες των σ και S είναι ίδιες με εκείνες του x_i. Συνήθως $S < \sigma$ γιατί προκύπτει από μικρότερο αριθμό μετρήσεων

(ε) τυπικό σφάλμα ($\sigma_{\bar{x}}$) (standard error): στενά συνδεμένο με την τυπική απόκλιση, είναι το τυπικό σφάλμα που δίνεται από την σχέση (1.6)

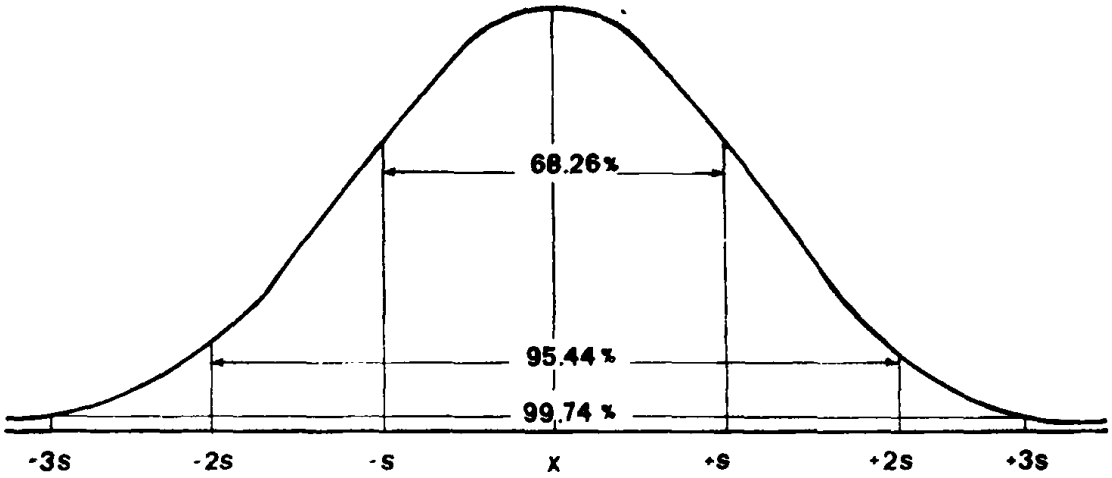
$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{(n)^{1/2}} \quad \text{ή αντίστοιχα} \qquad (1.6)$$

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{(n)^{1/2}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i-\bar{x})^2}{n(n-1)}} \qquad (1.7)$$

2. Όρια αξιοπιστίας ανάλυσης

Συνήθως οι τιμές μετρήσεων σε μια ανάλυση ανήκουν στη λεγόμενη κανονική κατανομή που παρίσταται από την καμπύλη του σχήματος 1-8.
Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη που περικλείεται στο διάστημα μεταξύ -S και +S (συνολικό διάστημα 2S) όπου S η τυπική απόκλιση αντιστοιχεί στο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 1-8. Σχηματική παράσταση κανονικής κατανομής κατά Gauss.

68.3% της συνολικής επιφάνειας κάτω από την καμπύλη. Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη που περικλείεται στο διάστημα μεταξύ -2S και +2S (συνολικό διάστημα 4S) αντιστοιχεί στο 95.5 της συνολικής επιφάνειας κάτω από την καμπύλη και τέλος η επιφάνεια που περικλείεται στο διάστημα μεταξύ -3S και +3S (συνολικό διάστημα 6S) αντιστοιχεί στο 99.7% της συνολικής, κάτω από την καμπύλη επιφάνειας. Τα παραπάνω σημαίνουν πως για όρια αξιοπιστίας της μεθόδου 68.3%, 95.5% καί 99.8% όλες οι πειραματικές τιμές της ανάλυσης θα ευρίσκονται αντίστοιχα στα διαστήματα (-S και +S), (-2S και +2S) και (-3S και +3S). Στην πράξη ο βαθμός αξιοπιστίας ή βαθμός εμπιστοσύνης ίσος προς 95% είναι ικανοποιητικός για τις συνήθεις αναλύσεις.

3. Δοκιμή σημαντικότητας πειραματικών δεδομένων (t-test)

Σε κάθε ανάλυση η αληθινή τιμή (μ) προσεγγίζεται με τον μέσο όρο $\bar{x}$ ενός αριθμού μετρήσεων. Στις πειραματικές μετρήσεις όμως υπάρχει πάντα μια διαφορά ($\mu-\bar{x}$) που πρέπει να ελέγχεται αν είναι στατιστικά σημαντική για να εξακριβωθεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Σύμφωνα με όσα λέχθηκαν παραπάνω σε μια σειρά μετρήσεων, όπου $S \cong \sigma$, η αληθινή τιμή θα βρίσκεται μέσα στο διάστημα τεσσάρων τυπικών αποκλίσεων (-2S έως +2S) για βαθμό εμπιστοσύνης 95%. Στην πράξη όμως ο αριθμός μετρήσεων είναι μικρός ($n < 10$) και συνεπώς η τυπική απόκλιση (S) υπολογίζεται από περιορισμένο αριθμό μετρήσεων. Στην περίπτωση αυτή η αληθινή τιμή θα δίνεται από τη σχέση: (1.8)

$$\mu = \bar{x} \pm t \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (1.8)$$

ή σύμφωνα με τη σχέση (1.7)

$$\mu = \bar{x} \pm t\, S_{\bar{x}} \quad (1.9)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

όπου t είναι παράγοντας (t-factor) που εξαρτάται από τον αριθμό μετρήσεων και το βαθμό αξιοπιστίας του μέσου όρου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.1

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1

Τιμές t για τον υπολογισμό των ορίων αξιοπιστίας των μέσων όρων

n	t για επίπεδο αξιοπιστίας 90%	t για επίπεδο αξιοπιστίας 95%	t για επίπεδο αξιοπιστίας 99%
2	6.30	12.70	63.70
3	2.90	4.30	9.90
4	2.35	3.20	5.80
5	2.13	2.78	4.60
6	2.02	2.57	4.03
7	1.94	2.45	3.71
8	1.90	2.36	3.50
9	1.86	2.31	3.36
10	1.83	2.26	3.25
.	.	.	.
.	.	.	.
∞	1.64	1.96	2.58

Από την εξίσωση (1.9) υπολογίζεται το tπειρ. για τα πειραματικά δεδομένα, που ισούται με $(\mu-\bar{x})$ όταν $S_{\bar{x}}=1$.

Η τιμή του tπειρ που υπολογίζεται με τον τρόπο αυτό δεν πρέπει να υπερβαίνει την αντίστοιχη τιμή του Πίνακα 1.1 για τον ίδιο αριθμό μετρήσεων n, αν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα (βλ. κατωτέρω σφάλματα) στις μετρήσεις. Σε περίπτωση συνεπώς μικρού αριθμού μετρήσεων ο μέσορ όρος $\bar{x}$ και η αληθινή τιμή μ, μπορεί να διαφέρουν, η διαφορά όμως να μη θεωρείται στατιστικά σημαντική. Με την δοκιμή -t (t-test) αποφασίζεται η σημαντικότητα αυτής της διαφοράς.

π.χ. δείγμα τυριού περιέχοντος 41.4% λίπος (αληθινή τιμή) έδωσε κατόπιν 5 διαδοχικών μετρήσεων $\bar{x}$=41.2% λίπος. Η τυπική απόκλιση που υπολογίστηκε από τις πειραματικές τιμές ήταν S=0.31%. Με τα δεδομένα αυτά υπολογίζεται το tπειρ από τη σχέση (1.10)

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{\mu-\bar{x}}{S}\sqrt{n} \qquad (1.10) \qquad \text{ή} \quad \frac{41.4 - 41.2}{0.31}\sqrt{5} = 1.44$$

Η τιμή αυτή του t συγκρίνεται με την αντίστοιχη τιμή του t του Πίνακα 1.1 για

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ορισμένη πιθανότητα π.χ. 95%. Επειδή tπειρ < 2.78, η διαφορά (μ-x̄) δεν είναι στατιστικά σημαντική και επομένως τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μέθοδο που εφαρμόστηκε για την ανάλυση είναι αξιόπιστα.

Όταν η τυπική απόκλιση (σ) δεν υπολογίζεται από περιορισμένο αριθμό μετρήσεων, σαν τιμή σύγκρισης του t στον Πίνακα 1.1 λαμβάνεται αυτή που αντιστοιχεί σε άπειρο αριθμό μετρήσεων ($n=\infty$).

4. Στατιστικά κριτήρια για την απόρριψη πειραματικών τιμών από σειρά μετρήσεων

(i) Κριτήριο 4d

Έστω οι πειραματικές μετρήσεις σε ανάλυση x_1, x_2, x_3, x_i, x_n. Αν μια από αυτές τις μετρήσεις η x_{ii} είναι ύποπτη για να απορριφθεί, θα πρέπει να ισχύει η σχέση 1.11

$$|x_i - \bar{x}| > 4d \qquad (1.11)$$

π.χ. Ανάλυση 5 δειγμάτων οσπρίου για σίδηρο έδωσε τις τιμές: 4.20, 4.21, 4.19, 4.08, 4.22 mgFe/l κατεργ. διαλυμ. Έστω δε 4.08 η ύποπτη τιμή της σειράς.

Η μέση τιμή είναι $\bar{x}=4.20$, ενώ η μέση απόκλιση:

$$d = \frac{0.00+0.01+0.01+0.02}{4} = 0.0075 \text{ mg/l}$$

Με εφαρμογή του τύπου (1.11) προκύπτει: $|4.08-4.20| >; 4 \times 0.0075$ ή $0.12 > 0.03$

άρα η ύποπτη τιμή 4.08 απορρίπτεται

(ii) Κριτήριο Q_n

Γίνεται χρήση του «συντελεστή απόρριψης» Q_n που δίνεται από τη σχέση (1.12).

$$Q_n = \frac{|X_{υποπτο} - X_{πλησιεστ.}|}{W} \qquad (1.12)$$

Τιμές του Q για διαφορετικό αριθμό μετρήσεων (n) και βαθμών αξιοπιστίας, δίνονται στον Πίνακα 1-2.

Εαν το Q_n είναι μεγαλύτερον της τιμής του Πίνακα 1.2 (για τον ίδιο αριθμό μετρήσεων και βαθμό αξιοπιστίας), τότε η ύποπτη τιμή απορρίπτεται. Αν το Q_n είναι μικρότερο της αντίστοιχης τιμής του Πίνακα 1.2, τότε η ύποπτη τιμή διατηρείται.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2

Τιμές Q_n για διαφορετικό n								
Αριθμ. μετρήσεων / Αξιοπιστία	n 3	4	5	6	7	8	9	10
95%	0.98	0.85	0.73	0.64	0.59	0.54	0.51	0.48
99%	0.99	0.93	0.82	0.74	0.68	0.63	0.60	0.57

5. Είδη σφαλμάτων

Τα τυχόν σφάλματα σε μια διαδικασία ανάλυσης, μπορεί να είναι:

(α) τυχαία: Σ' αυτά η τιμή του σφάλματος δεν παραμένει σταθερή, οφείλονται δε στην έλλειψη εμπειρίας του ερευνητή. Συνεπώς τα τυχαία σφάλματα δεν είναι αναπαραγώγιμα, είναι δε θετικά ή αρνητικά. Περιορίζονται μόνο με αύξηση του αριθμού αναλύσεων οπότε και η μέση τιμή ($\bar{x}$) θα τείνει προς την αληθινή τιμή (μ).

(β) καθορισμένα: Τα σφάλματα αυτά έχουν την αυτή φορά κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Διακρίνονται σε:

(i) συστηματικά: είναι αυτά που μπορεί να προσδιοριστούν, γνωστής δηλαδή προέλευσης. Οφείλονται συνήθως σε ατέλειες της οργανολογίας. Περιορίζονται με έλεγχο της οργανολογίας.

(ii) σταθερά: γίνονται πάντα κατά την αυτήν φορά, η δε τιμή τους παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από την ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας. Είναι δυνατόν να υπολογιστούν με τυφλό προσδιορισμό (negative control run)

(iii) αναλογικά: γίνονται πάντα κατά την αυτή φορά η δε τιμή τους εξαρτάται από την ποσότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας. Περιορίζονται με την παράλληλη ανάλυση προς το άγνωστο, γνωστού δείγματος (positive control run) οπότε ισχύει η σχέση:

$$\frac{\text{ποσότητα αγνώστου}}{\text{ποσότητα γνωστού}} = \frac{\text{απόκριση αγνώστου}}{\text{απόκριση γνωστού}}$$

Η ποσοτική έκφραση της ακρίβειας μιας μεθόδου δίνεται από το σφάλμα που είναι:

$$E=\mu-\bar{x} \qquad (1.13)$$

Ε. Έκφραση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης

Συνήθως στις αναλύσεις των συστατικών των τροφίμων προσδιορίζεται η ποσότητα (βάρος) ή η συγκέντρωση των συστατικών του δείγματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τα αποτελέσματα συνήθως εκφράζονται επί τοις εκατόν (%). Βάσεις για την έκφραση των αποτελεσμάτων αποτελούν: (α) το βρώσιμο τμήμα του τροφίμου π.χ. για τις ελιές, ο καρπός εξαιρουμένου του ελαιοπυρήνα, (β) επί ξηρού (γ) ως έχει κ.ο.κ.
Οι συγκεντρώσεις των κυρίων συστατικών των τροφίμων εκφράζονται συνήθως επί τοις εκατόν κατά βάρος (% κ.β.) ή επί τοις εκατόν κατ' όγκον (% κ.ο.) Σε υγρά και ποτά, η έκφραση για συγκεκριμένο συστατικό γίνεται σαν g/100ml ή mg/100 ml ή μg/l.
Η περιεκτικότητα σε βιταμίνες εκφράζεται σαν ΔΜ (Διεθνείς Μονάδες)/100 ml ή /100g.
Τα ιχνοστοιχεία π.χ. μέταλλα όπως ο Cu, Fe, Co, Ni, Hg κ.ο.κ. εκφράζονται σαν μέρη βάρους στοιχείου/10^6 μέρη βάρους δείγματος (ppm) ή μέρη βάρους στοιχείου/10^9 μέρη βάρους δείγματος (ppb).
Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη δίνεται με πολλαπλασιασμό του οργανικού αζώτου (μέθοδος Kjeldahl, βλ. κεφ. 12) επί τον παράγοντα 6.25. Υποτίθεται ότι οι πρωτεΐνες περιέχουν 16% N_2 οπότε ο παράγοντας 6.25 προκύπτει σαν αποτέλεσμα του πηλίκου:

$$\frac{100 \text{ μέρης βάρους πρωτεΐνης}}{16 \text{ μέρη βάρους αζώτου}}$$

Όλες οι ουσίες που ανάγουν το Φελίγκειο υγρό θεωρούνται σαν ανάγοντα σάκχαρα και εκφράζονται σαν ιμβερτοσάκχαρο ή σαν δεξτρόζη.
Στις αναλύσεις λιπαρών υποτίθεται πως το ελαϊκό είναι το κύριο λιπαρό οξύ και η οξύτητα μιας λιπαρής ύλης εκφράζεται σε ελαϊκό οξύ.
Τα ελεύθερα οργανικά οξέα εκφράζονται σαν κιτρικό, γαλακτικό ή οξικό ανάλογα με το ποιό απαντά σε μεγαλύτερη ποσότητα στο τρόφιμο.
Στα μη αλκοολούχα ποτά η ολική οξύτητα εκφράζεται σε κιτρικό, για τα εσπεριδοειδή, σε τρυγικό για τα παράγωγα σταφυλιών, σε μηλικό για τα μήλα.
Στα αλκοολούχα ποτά η ολική οξύτητα εκφράζεται σε τρυγικό, ενώ τα πτητικά οξέα σε οξικό οξύ.
Τα ανόργανα στοιχεία εκφράζονται σαν τέφρα.
Τα αμινοξέα εκφράζονται σαν g αμινοξ/100 g δείγματ. ή / 100 g πρωτεΐνης.
Σημασία έχει ο αριθμός των δεκαδικών ψηφίων που χρησιμοποιούνται κατά την έκφραση των αποτελεσμάτων. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται σημαντικά ψηφία περισσότερα εκείνων που δικαιολογεί η ακρίβεια της μεθόδου. Σημαντικά ψηφία σε μια αριθμητική τιμή είναι τα ψηφία του αριθμού που είναι απαραίτητα για να δειχθεί η επαναληπτικότητα της μέτρησης, από την οποία προέκυψε ο αριθμός. Σε έναν αριθμό το τελευταίο σημαντικό ψηφίο είναι ταυτόχρονα το πρώτο αβέβαιο ψηφίο. **Παράδειγμα 1ο:** Στον αριθμό 55.16%

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

που δίνει την περιεκτικότητα νωπού κρέατος σε νερό, το τελευταίο σημαντικό ψηφίο είναι το 6 που ενέχει αβεβαιότητα ±1 δηλαδή η περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να είναι 55.15% ή 55.17%. **Παράδειγμα 2ο:** Η τιμή της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη ενός τροφίμου δεν πρέπει να έχει περισσότερα από 2 δεκαδικά ψηφία, επειδή η τιμή αυτή προέκυψε από τη χρήση του αριθμού 6.25 του οποίου το δεύτερο δεκαδικό ενέχει ήδη αβεβαιότητα ±1. Οι αριθμοί που υπολογίζονται με αριθμητικές πράξεις από πειραματικά δεδομένα, χρειάζονται συχνά να στρογγυλευτούν, δηλαδή πρέπει να απομακρυνθούν τα περιττά ψηφία τους. Με το στρογγύλεμα ενός αριθμού απομακρύνονται τα αβέβαια ψηφία του έως ότου μείνουν τα βέβαια και το πρώτο αβέβαιο. Για το στρογγύλεμα ενός αριθμού εφαρμόζονται οι ακόλουθοι συμβατικοί κανόνες:

(1) Το τελευταίο σημαντικό ψηφίο που παραμένει αυξάνεται κατά μία μονάδα, όταν το γειτονικό του που παραλείπεται είναι μεγαλύτερο του 5.

(2) μένει αμετάβλητο, όταν το γειτονικό του είναι μικρότερο του 5.

(3) αν το ψηφίο που παραλείπεται είναι 5 ακριβώς, το προηγούμενο του που παραμένει αυξάνεται κατά μία μονάδα, αν είναι περιττός, ενώ μένει αμετάβλητο αν είναι άρτιος αριθμός.

1.3 Γνωμάτευση

Στο τέλος κάθε ανάλυσης ακολουθεί γνωμάτευση για το συγκεκριμένο τρόφιμο που αναλύθηκε. Στην γνωμάτευση δίνεται απάντηση στα συγκεκριμένα ερωτήματα που έθεσε η ανάλυση, ενώ αποφεύγονται γενικεύσεις για την καταλληλότητα ή μη του τροφίμου. Κατά την σύνταξη της γνωμάτευσης λαμβάνονται υπ' όψιν οι διατάξεις του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων[21] και Ποτών. Εάν δεν αναφέρει τις σχετικές διατάξεις ο Ελληνικός Κώδικας τότε για το αναλυόμενο τρόφιμο ίσχυαν μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 80 οι διατάξεις του αντίστοιχου κώδικα των Η.Π.Α. (F.D.A. rules) και από τούδε και στο εξής οι αντίστοιχες διατάξεις της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας (E.E.C. directives).

Η γνωμάτευση πρέπει να βασίζεται μόνο πάνω στους προσδιορισμούς που έγιναν στο εργαστήριο και να συμπεραίνεται αν το δείγμα που εξετάστηκε π.χ. τυρί από πρόβειο γάλα πληροί (ή δεν πληροί) τους όρους των ισχυουσών από τον Κώδικα διατάξεων, χωρίς να αναφέρεται ότι ήταν (ή δεν ήταν) όντως τυρί πρόβειο.

Ειδική Βιβλιογραφία

1. **Joslyn M.A.**(edit): Methods in Food Analysis, Academic Press, New York, (1970)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

2. **Osborne DR** and **Voogt P.**: The Analysis of Nutrients in Foods, Academic Press, London (1978).
3. **Bauer EL**: A Statistical Manual for Chemists, Academic Press, New York, (1960)
4. **Alder H.L.** and **Roessler EB.**: Introduction to Probability and Statistics, 2nd edit, Freeman, San Francisco, Calif. (1962)
5. **Brooks CJ, Beetley IG** and **Loxston M.**: Mathematics and Statistics for Chemists, Wiley, New York (1965)
6. **Cochran W.G.**: Sampling Techniques, 2nd edit. Wiley, New York (1963)
7. **Hill H.M.** and **Brown RH.**: Statistical Methods in Chemistry, Anal. Chem. 40, No 5 376 R—380 R (1968)
8. **Kohn J.P.**: Measurement Problems in Physical Experiments, Instrumentation 15, No 4, 10 (1962)
9. **Kramer A and Twigg BA**: Fundamentals of Quality Control for the Food Industry, 2nd edit, AVI Publ. Co, Westport, Conn (1966)
10. **Nelson B.M.**: Statistical Methods in Chemisty, Anal Chem 34, No5 294-R 298 R(1962)
11. **Waters TF, Smith H. Jr** and **Stillman RC**: Accuracy in the Control Laboratory, J Amer Oil Chem Soc 36, 527 (1959)
12. **Yonden W.J.**9 Accurancy of Analytical Procedures J. Assoc. Offic. Agr. Chem, 45, 169 (1962)
13. **Pomeranz Y** and **Meloan CE**: Food Analysis Theory and Practice, AVI Publ. Co, Westport Conn. (1971)
14. **Johnson W.L.**: Sampling Devices, Food Tehnol 17, 1516 (1963)
15. **Entenman C**: The Preparation of Tissue Lipid Extracts J. Am. Oil Soc 38, 534 (1961)
16. **Grier J.D.**: Preparation of Plant Material for Analysis J. Assoc Offic Anal Chem. 49, 291 (1966)
17. **Paech** and **Tracey MV** (Eds): Modern Methods of Plant Analysis, Springer Verlag, Berlin (1956)
18. **Anastassiades P.A.** and **Common RH** Some Aspects of the Reliability of Chemical Analysis, Anal. Biochem. 22, 409 (1968)
19. **Καραγιάννη Μι**: Επεξεργασία, Αξιολόγηση και Παρουσίαση Αναλυτικών Δεδομένων, Αθήνα (1978)
20. **Χατζηϊωάννου Θ.Π.**: Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα (1980).
21. **Κώδικας Τροφίμων. Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα (1972)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Στο δεύτερο μέρος εξετάζονται οι κυριώτερες σύγχρονοι μέθοδοι ανάλυσης των τροφίμων καθώς επίσης και η σχετική οργανολογία. Σκοπός του μέρους αυτού είναι να δώσει τις βασικές αρχές κάθε μεθόδου ανάλυσης, τη βασική λειτουργία των χρησιμοποιούμενων οργάνων καθώς επίσης και τις πλέον χαρακτηριστικές εφαρμογές των μεθόδων αυτών στην ανάλυση των τροφίμων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

2.1. Εισαγωγή

Η χρωματογραφία είναι σήμερα η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού μιγμάτων στα συστατικά τους επειδή συνδυάζει την απλότητα, την ακρίβεια, την ευαισθησία, τη μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, τη δυνατότητα ανάλυσης μικρών δειγμάτων και το ευρύ φάσμα των εφαρμογών της.

Η διαμόρφωση των αρχών της χρωματογραφίας δεν είναι γνωστό πότε πραγματοποιήθηκε. Πάντως η πρώτη συστηματική μελέτη με χρωματογραφία έγινε από τον Tswett το 1906, ο οποίος διαχώρισε χρωστικές φυτών μέσα σε στήλη που περιείχε $CaCO_3$. Επειδή οι πρώτες αυτές ουσίες ήταν έγχρωμες, η μέθοδος ονομάστηκε **χρωματογραφία**. Στη συνέχεια ο Kuhn χρησιμοποίησε τη χρωματογραφία υγρού-στερεού το 1931 για το διαχωρισμό των ξανθοφυλλών στο λευκό (ασπράδι) του αυγού. Το 1940 ο Tiselius διαμόρφωσε την τεχνική της χρωματογραφίας προσρόφησης. Ο ίδιος το 1941 διαμόρφωσε την υγρή χρωματογραφία. Ταυτόχρονα σχεδόν οι Martin και Synge διαμόρφωσαν την χρωματογραφία υγρού-υγρού. Το 1944 οι Consden, Gordon και Martin διαμόρφωσαν τη χαρτοχρωματογραφία. Το 1951 ο Cremer διαμόρφωσε τη χρωματογραφία αερίου-στερεού, ενώ το 1952 εισήγαγε τη χρωματογραφία στερεού-υγρού. Το 1956 ο Van Deemter διατύπωσε τη θεωρητική επεξεργασία της αέριας χρωματογραφίας (βλ. κεφ. 2.8) και ο Giddings το 1965 ανασκόπησε και συμπλήρωσε τη θεωρία της χρωματογραφίας.

Η χρωματογραφία λοιπόν είναι μία μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία το μίγμα διαχωρίζεται στα συστατικά του, μέσω σειράς εκλεκτικών προσροφήσεων ή κατανομών μεταξύ μιας στατικής φάσης με μεγάλη επιφάνεια και μιας κινούμενης φάσης η οποία έρχεται σε επαφή με την πρώτη. Η χρωματογραφία δεν περιορίζεται εν τούτοις μόνο σε αναλυτικές εφαρμογές. Χρησιμοποιείται εξ ίσου επιτυχώς και για παρασκευαστικούς σκοπούς, τη διερεύνηση δομής στο μοριακό επίπεδο, τον προσδιορισμό φυσικοχημικών σταθερών και θερμοδυναμικών παραμέτρων, όπως ελεύθερη ενέργεια, ενθαλπία και εντροπία, τη μελέτη κινητικής των αντιδράσεων κ.τ.λ.

Η κατάταξη της χρωματογραφίας στα είδη της γίνεται ανάλογα με:

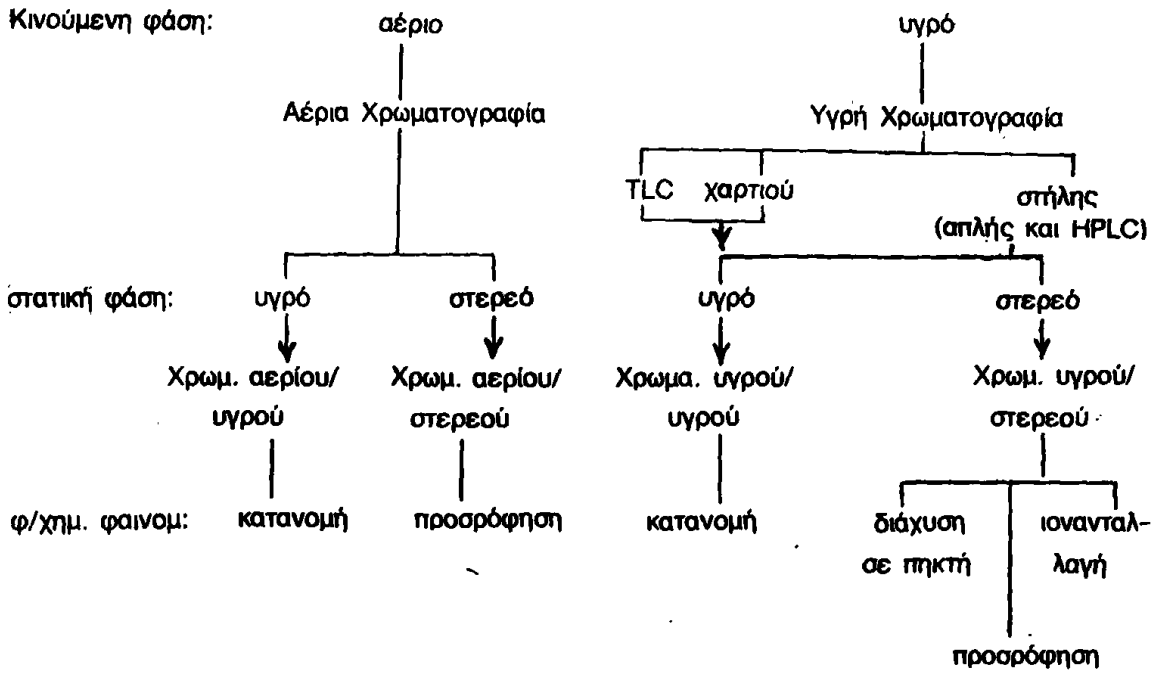
1. τη συσκευή που χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό
2. το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαβαίνει χώρα κατά τον διαχωρισμό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

3. τη φύση της κινούμενης φάσης (υγρή ή αέρια)
Σύμφωνα με τα παραπάνω διακρίνει κανείς τα ακόλουθα είδη χρωματογραφίας (Πιν. 2.1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1

Είδη χρωματογραφίας



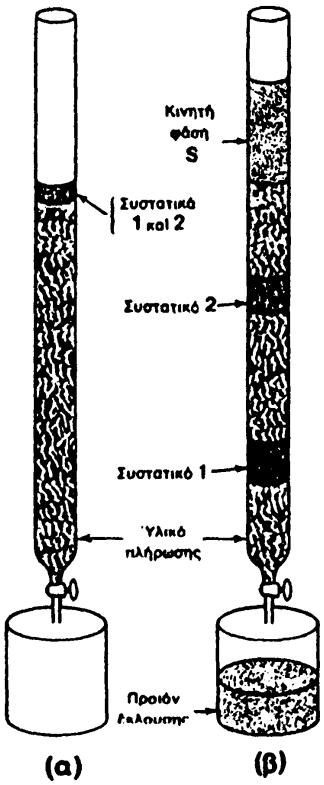
Η ανάπτυξη των διαφόρων ειδών χρωματογραφίας θα γίνει κατ' αρχήν σύμφωνα με το φυσικοχημικό φαινόμενο που χαρακτηρίζει κάθε διαχωρισμό στη συνέχεια δε, σύμφωνα με τη συσκευή που χρησιμοποιείται σε κάθε διαχωρισμό.

2.2. Χρωματογραφία προσρόφησης

Είναι η χρωματογραφική μέθοδος κατά την οποία ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με διαδοχικές εκλεκτικές προσροφήσεις και εκροφήσεις από μια στατική στερεή φάση με τη βοήθεια κινούμενου ρευστού (υγρού ή αερίου). Χρωματογραφία προσρόφησης μπορεί να επιτευχθεί σε λεπτή στοιβάδα ή στήλη (απλή, αέριας χρωματογραφίας ή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης). Για την περιγραφή του φαινομένου της προσρόφησης θα χρησιμοποιηθεί στην προκείμενη περίπτωση η συσκευή της απλής στήλης.
Γυάλινη στήλη διαστάσεων 20–30 cm μήκος × 2cm διαμ. γεμίζεται με το προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μίγμα, που περιέχει έστω τα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συστατικά (1) και (2), προστίθεται διαλυμένο στον κατάλληλο διαλύτη στο επάνω μέρος της στήλης (Σχ. 2-1α)
Έστω ότι και τα δύο συστατικά προσροφούνται από το υλικό πλήρωσης της στήλης, αλλά το (2) προσροφάται πιο ισχυρά απ' ότι το (1). Στο σύστημα προστίθεται ο διαλύτης (S) ο οποίος προσροφάται ισχυρότερα και των δύο συστατικών (1) και (2). Προσροφούμενος ο διαλύτης μετατοπίζει και τα δύο συστατικά κατά μήκος της στήλης, ενώ το συστατικό (2) θα μετατοπίζει το συστατικό (1), έτσι ώστε να προκύπτει η εικόνα που φαίνεται στο Σχ. 2-1β.



Σχ. 2-1. Διαχωρισμός ενός μείγματος δύο συστατικών σε μια απλή χρωματογραφική στήλη: (α) μετά την προσθήκη του δείγματος (β) μετά την μερική έκλουση.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης δεν είναι αδρανές. Λόγω κρυσταλλικών ατελειών, ακαθαρσιών και συγκεκριμένης γεωμετρίας, παρουσιάζει στην επιφάνεια του ορισμένα σημεία με μεγαλύτερη τάση αντίδρασης απ' ότι τα υπόλοιπα. Τα σημεία αυτά ονομάζονται «ενεργά κέντρα» (reactive sites). Όταν προστεθεί το μίγμα (1)+(2) τα πρώτα «ενεργά κέντρα» του προσροφητικού υλικού καταλαμβάνονται από τα μόρια του συστατικού (2) μια και το συστατικό αυτό προσροφάται ισχυρότερα στο υλικό πλήρωσης απ' ότι το συστατικό (1). Το τελευταίο προχωρεί κατά μήκος της στήλης και καταλαμβάνει τα «ενεργά κέντρα» που αντιστοιχούν στο κάτω μέρος της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στήλης τα οποία παραμένουν κενά, μια και το συστατικό (2) έχει ήδη δεσμευτεί στο επάνω μέρος της στήλης. Έτσι συνολικά επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών (1) και (2). Οι ζώνες που λαμβάνονται για τα διάφορα συστατικά δεν είναι σαφώς διαχωρισμένες και παρουσιάζουν μερική αλληλοεπικάλυψη, π.χ. μερικά από τα μόρια του συστατικού (2) έχουν χαμηλότερη ενέργεια δέσμευσης απ' ότι τα περισσότερα, με αποτέλεσμα να συμπαρασύρονται από το διαλύτη χωρίς να προσροφώνται και να διανύουν έτσι μεγαλύτερη συνολικά απόσταση απ' ότι τα λοιπά μόρια του συστατικού (2). Ακόμη, μερικά από τα μόρια του συστατικού (1) έχουν υψηλότερη ενέργεια δέσμευσης έναντι των υπόλοιπων, με αποτέλεσμα να συναγωνίζονται σε δραστικότητα τα μόρια του συστατικού (2) καί πολλές φορές να καταλαμβάνουν τη θέση τους πάνω στο υλικό πλήρωσης.

Ο διαχωρισμός με προσρόφηση είναι στην ουσία ένα σύνολο από «άπειρες» εξισορροπίσεις των προς διαχωρισμόν ουσιών μεταξύ του προσροφητικού μέσου και του κινούμενου διαλύτη. Σε κάθε μια απ' αυτές τις καταστάσεις ισορροπίας ο συντελεστής κατανομής (distribution coefficient, K_d) μιας ουσίας x θα δίνεται από τη σχέση 2.1.

$$K_d = \frac{C_S}{C_M} \qquad (2.1)$$

όπου: C_S = συγκέντρωση ουσίας x στη στατική φάση (προσροφητή)
και C_M = συγκέντρωση ουσίας x στην κινούμενη φάση (διαλύτη)

Αντίστοιχα ο όγκος κατακράτησης (retention volume, V_R) που αντιστοιχεί στον όγκο του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε από την προσθήκη του μέχρι την έκλουση της ουσίας x δίνεται από τη σχέση 2.2.

$$V_R = V_M + A_S K_d \qquad (2.2)$$

όπου: V_M = όγκος του διαλύτη στην κινούμενη φάση
και A_S = επιφάνεια του προσροφητή

Οι δυνάμεις που συγκρατούν τα μόρια των διαχωριζόμενων ουσιών πάνω στο προσροφητικό μέσον είναι τύπου Van der Waals, αλληλεπιδράσεις μεταξύ διπόλων καθώς και δεσμοί υδρογόνου.

Σ' ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό προσρόφησης λαμβάνονται υπ' όψιν οι εξής τρεις παράγοντες:

(Α) το προσροφητικό μέσο
(Β) το διαλυτικό μέσο
(Γ) το προς διαχωρισμόν μίγμα.

(Α) Προσροφητικό μέσο

Τα πιο συνηθισμένα προσροφητικά μέσα είναι το: Silica gel (πυριτικής βάσης)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

και η Alumina (Al_2O_3). Στον Πίνακα 2.2 φαίνονται διάφορα προσροφητικά υλικά κατά σειρά ελαττούμενης προσροφητικότητας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2

Μερικοί συνηθισμένοι προσροφητές κατά σειρά ελαττούμενης προσροφητικής ισχύος

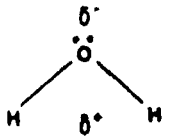
Αλουμίνα	Οξείδιο του μαγνησίου	Άμυλο
Ξυλάνθρακας	Ανθρακικό ασβέστιο	Κυτταρίνη σε μορφή σκόνης
Διοξείδιο του πυριτίου	Σάκχαρο	

Από τα παραπάνω μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει ένα μόνο ή και συνδυασμό προσροφητικών ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε διαχωρισμού. Συνήθως για το διαχωρισμό πολικών ουσιών χρησιμοποιούνται μη πολικά προσροφητικά μέσα. Ακόμη την επιτυχία του διαχωρισμού επηρεάζει το μέγεθος ή έμμεσα η επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Αυτό πάντα σε σχέση με την ποσότητα του προς διαχωρισμόν μίγματος, δεδομένου ότι για συγκέντρωση του τελευταίου μεγαλύτερη μιας οριακής τιμής επέρχεται κορεσμός των ενεργών κέντρων του προσροφητή.

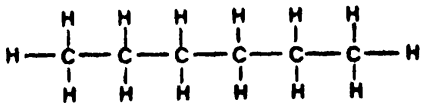
(Β) Το διαλυτικό μέσο

Αποτελεί το ρυθμιστικό παράγοντα για έναν επιτυχή διαχωρισμό. Το διαλυτικό μέσο-συνήθως σύστημα διαλυτών-επιλέγεται με βάση την πολικότητα των συστατικών του προς διαχωρισμόν μίγματος. Συνήθως προτιμούνται πολικοί διαλύτες για πολικά μίγματα ουσιών και μη πολικοί διαλύτες για μη πολικά μίγματα (όμοια διαλύουν όμοια). Αν χρησιμοποιηθεί πολικός διαλύτης σε μίγμα μη πολικών ουσιών, τα μόρια του διαλύτη θα προσροφηθούν κατά μήκος της στήλης πάνω στον προσροφητή και το δείγμα θα διέλθει μέσω της στήλης χωρίς να επιτευχθεί διαχωρισμός. Αν πάλι χρησιμοποιηθεί μη πολικός διαλύτης σε πολικό δείγμα, τα συστατικά του μίγματος θα προσροφηθούν στην αρχή της στήλης και πάλι δεν θα επιτευχθεί διαχωρισμός.

Πολικοί διαλύτες είναι το νερό, η μεθανόλη, η αιθανόλη και γενικώτερα οι ιοντικές ενώσεις. Το μόριο του νερού έχει καθαρά διπολικό χαρακτήρα, λόγω



(α)



(β)

Σχ. 2-2. Τα μόρια του (α) νερού (πολικού) και του (β) εξανίου (μη πολικού).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ύπαρξης ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων σθένους στο οξυγόνο (Σχ. 2-2α). Αντίθετα σε μόρια όπως το εξάνιο, το συνολικό φορτίο είναι εξ ίσου κατανεμημένο σ' όλα τα άτομα και γιαυτό το μόριο δεν εμφανίζει πολικότητα. Ο Πίνακας 2.3 δίνει τους πλέον συνηθισμένους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3

Μερικοί χρήσιμοι διαλύτες κατά σειρά αυξανόμενης ισχύος έκλουσης από την αλουμίνα

Φθορο-αλκάνια	Βενζόλιο	Οξικός αιθυλεστέρας
Πετρελαϊκός αιθέρας	Χλωροφόρμιο	Διοξάνη
Τετραχλωράνθρακας	Αιθέρας	Ακετονιτρίλιο
Τριχλωροαιθυλένιο	Μεθυλο-αιθυλοκετόνη	Μεθανόλη
Τολουόλιο	Ακετόνη	Νερό

Οι διάφοροι διαχωρισμοί στην πράξη επιτυγχάνονται είτε με κατάλληλο, ύστερα από επανειλλημένες δοκιμές, συνδυασμό διαφόρων διαλυτών, είτε με τροποποίηση της προσροφητικής ισχύος (ενεργότητας) του προσροφητικού μέσου. Προσθήκη νερού ελαττώνει την ενεργότητα του προσροφητή, ενώ αφαίρεση νερού αυξάνει την ενεργότητά του. Στην πράξη η ενεργοποίηση του προσροφητή επιτυγχάνεται με την τοποθέτησή του στο πυριατήριο σε θερμοκρασία 100-110°C για 1-2 ώρες.

Η χρωματογραφία προσρόφησης μπορεί να είναι υγρού-στερεού π.χ. χρωματογραφία στήλης, χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) ή αερίου-στερεού π.χ. αέρια χρωματογραφία.

Με χρωματογραφία προσρόφησης διαχωρίζονται μη πολικές αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις με βάση τον τύπο και τον αριθμό των χαρακτηριστικών τους ομάδων. Οι ομάδες αυτές μπορούν να καταταγούν κατά σειρά αυξανόμενης προσροφητικής ισχύος (ελαττούμενης τάσης έκλουσης) ως εξής:

$$R\text{-}Cl < H/C < ROCH_3 < R\text{-}NO_2 < R\text{-}\dot{N}(CH_3)_2 < RCOOCH_3 <$$
$$< RNH_2 < ROH < RCONH_2 < RCOOH$$

2.3 Χρωματογραφία κατανομής

Είναι η χρωματογραφική μέθοδος κατά την οποία ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με διαδοχικές εκλεκτικές κατανομές μεταξύ δύο ρευστών μη μιγνυομένων μεταξύ τους π.χ. μεταξύ ενός διαλύτη (κινούμενη φάση) και ενός υγρού συγκρατούμενου πάνω στο προσροφητικό μέσο (στατική φάση).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το ίδιο προηγούμενο πείραμα του διαχωρισμού των συστατικών (1) και (2) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και εδώ για την περιγραφή του φαινόμενου της κατανομής, με τη διαφορά ότι το αδρανές υλικό έχει επικαλυφθεί με λεπτό στρώμα υγρής ουσίας (στατική φάση) υψηλού σημείου ζέσης το οποίο συγκρατείται σταθερά στην επιφάνειά του.

Στην χρωματογραφία κατανομής, όπως και στην χρωματογραφία προσρόφησης ο συντελεστής κατανομής (partition coefficient, kp) μιας ουσίας x στην κατάσταση ισορροπίας δίνεται από τη σχέση 2.3.

$$K_P = \frac{C_S}{C_M} \qquad (2.3)$$

όπου: C_S = η συγκέντρωση της ουσίας x στη στατική φάση.
και C_M = η συγκέντρωση της ουσίας x στην κινούμενη φάση.

Αντίστοιχα ο όγκος κατακράτησης (V_R) στη χρωματογραφία κατανομής δίνεται από τη σχέση 2.4

$$V_R = V_M + V_S K_P \qquad (2.4)$$

όπου: V_M = όγκος κινούμενης φάσης που δεν λαβαίνει μέρος στην κατανομή (νεκρός όγκος διαλύτη).
και V_S = όγκος στατικής φάσης.

Το προς διαχωρισμόν μίγμα τοποθετείται στην κορυφή της στήλης και προστίθεται ο διαλύτης για την έκλουση. Τα συστατικά (1) και (2) διαλυμένα στον διαλύτη αρχίζουν να κινούνται κατά μήκος της στήλης και έρχονται σε επαφή με τη στατική φάση που περιβάλλει κάθε σφαιρίδιο του αδρανούς υλικού. Έστω ότι το συστατικό (1) έχει συντελεστή κατανομής K_P=3/7 μεταξύ στατικής και κινούμενης φάσης και το συστατικό(2) έχει αντίστοιχα K_P=7/3. Αυτό σημαίνει ότι από τα δέκα μόρια του συστατικού (1) τα 3 θα διαλυθούν στο πρώτο σωματίδιο της στατικής φάσης, ενώ τα 7 θα διέλθουν κατά μήκος της στήλης διαλυμένα στην κινούμενη φάση. Αντίστοιχα για το συστατικό (2) από τα δέκα μόρια του, τα 7 θα διαλυθούν στο πρώτο σωματίδιο της στατικής φάσης ενώ τα υπόλοιπα 3 θα συνεχίσουν την πορεία τους κατά μήκος της στήλης. Τα εναπομείναντα μόρια των συστατικών (1) και (2) στην κινούμενη φάση, μεταφέρονται με την βοήθεια του διαλύτη στο επόμενο σωματίδιο της στατικής φάσης όπου επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία κατανομής. Έτσι μέχρις ότου το αρχικό μίγμα διανύσει ολόκληρο το μήκος της στήλης έχουν κατακρατηθεί σε διαφορετικά ύψη τα συστατικά (1) και (2). Προστιθεμένου νέου διαλύτη στην κορυφή της στήλης, τα ήδη διαλυμένα στη στατική φάση συστατικά (1) και (2) επανακατανέμονται μεταξύ της στατικής και κινούμενης φάσης, ούτως ώστε μετά από «άπειρες» ανακατανομές επιτυγχάνεται ο πλήρης διαχωρισμός των συστατικών (1) και (2).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι οι ζώνες των διαχωρισθέντων συστατικών δεν είναι απολύτως σαφείς και ότι παρατηρείται αλληλοεπικάλυψη αυτών. Για να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο αυτό θα πρέπει: (1) να καταστεί η επιφάνεια της στατικής φάσης περισσότερο ανενεργός ή (2) να χρησιμοποιηθεί ένας περισσότερο πολικός διαλύτης που θα πάρει τη θέση του συστατικού σε κάποιο συγκεκριμένο τμήμα της στήλης, έτσι ώστε το τελευταίο να διαχωριστεί πλήρως. Το πρώτο επιτυγχάνεται κατόπιν έκπλυσης της στατικής φάσης με οξύ ή με σιλανοποίηση για την κάλυψη των ενεργών κέντρων της στατικής φάσης (βλ. κεφ. 2.8). Το δεύτερο επιτυγχάνεται με την τεχνική της «βαθμωτής έκλουσης» (gradient elution) στην οποία μεταβάλλεται η σύσταση, του διαλύτη κατά την έκλουση αυξανόμενης σταδιακά της πολικότητας, του τελευταίου (βλ. κεφ. 2.9).

Η χρωματογραφία κατανομής χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό κατά τάξεις υδρόφιλων ουσιών με μεγάλες διαφορές πολικότητας.

Τέλος στην χρωματογραφία κατανομής θα πρέπει να αναφερθεί η τεχνική της χρωματογραφίας ανεστραμμένης φάσης (reversed phase). Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται στην περίπτωση που η στατική φάση είναι πολική (συνήθως υδατική) και η κινούμενη φάση μετρίως έως μη πολική. Αν οι προς διαχωρισμόν ουσίες είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό συμπαρασύρονται από τη κινούμενη φάση (μη πολική) και δεν επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους. Στην περίπτωση αυτή η στατική φάση διαποτίζεται με κάποιο μέσο μη υδατικό που δρα το ίδιο σαν στατική φάση. Έτσι ο διαχωρισμός επιτελείται μεταξύ του μέσου αυτού και του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. Στην κανονική χρωματογραφία κατανομής η στατική φάση, συνήθως υδατική (π.χ. νερό που συγκρατεί φυσικά η κυτταρίνη) είναι πιο πολική από την κινούμενη φάση. Εδώ η κινούμενη φάση είναι πιο πολική από τη στατική, εξ' ού και ο όρος **«χρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης»**. Στην πράξη ο διαποτισμός της στατικής φάσης γίνεται με παράγωγα της σιλικόνης. Η τεχνική αυτή της χρωματογραφίας χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό λιπόφιλων ουσιών κατά τάξεις ή και για το διαχωρισμό σειράς ομόλογων με περισσότερα από 10 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα κάθε ομολόγου.

2.4 Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής

Είναι η χρωματογραφική μέθοδος στην οποία ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις μεταξύ ενός υγρού και ενός πορώδους στερεού που φέρει δραστικές ομάδες μετά των οποίων συνδέονται ευκίνητα ιόντα δυνάμενα να ανταλλαγούν με ιόντα του υγρού.

Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιοντικών

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

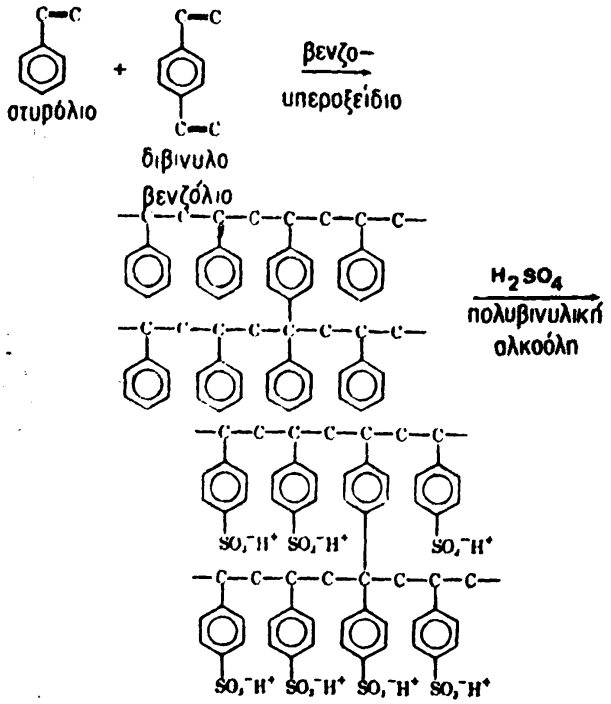
ουσιών όπως ανόργανες ουσίες και οργανικές στις οποίες περιλαμβάνονται σύνθετα μόρια, όπως πρωτεΐνες, ορμόνες, ένζυμα, νουκλεϊνικά οξέα κ.τ.λ. Η μέθοδος κατ' αρχήν επινοήθηκε από τον Thompson (1850) ο οποίος παρατήρησε ότι τα $(NH_4)_2SO_4$ και KCl δεν απομακρύνονται με έκπλυση από τα χώματα. Όταν δε στην κορυφή στήλης διαβίβαζε $(NH_4)_2SO_4$, εκλουόταν $CaSO_4$. Όταν προστίθετο KCl εκλουόταν $CaCl_2$. Και στις δύο περιπτώσεις εκλουόταν το **ανιόν**. Η συγκεκριμένη δηλαδή στήλη είχε την ικανότητα να ανταλάσσει το κατιόν της προστιθέμενης ουσίας με **κατιόντα** που συγκρατούσε το υλικό πλήρωσης της στήλης.

Η φύση των δυνάμεων αλληλεπίδρασης των ιόντων πάνω στη ρητίνη είναι του τύπου των δυνάμεων Coulomb (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις).

Το υλικό της ιονανταλλαγής μπορεί να είναι ανόργανη ουσία π.χ. $Na_2Al_2Si_3O_{10}$, φυσικός ζεόλιθος του οποίου το 20% περίπου των ατόμων του φέρουν αρνητικό φορτίο. Η δράση του είναι η εξής:

$$Na_2O.Al_2O_3 . 4SiO_2 . 2H_2O + 2KCl + \rightarrow K_2OAl_2O_3 . 4SiO_2 . 2H_2O + 2NaCl$$

Η χρήση των ανοργάνων ιονανταλλακτών είναι περιορισμένη σήμερα διότι αυτοί καταστρέφονται από ισχυρά οξέα και βάσεις. Συνήθως χρησιμοποιούνται οργανικοί ιονανταλλάκτες που είναι συνθετικές ρητίνες. Αυτές αποτελούνται από μικρά σφαιρίδια υψηλού ΜΒ πολυμερούς π.χ. πολυστυρολίου, το οποίο πολυμερίζεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε ο σκελετός του να περιέχει χημικές ομάδες (π.χ. $SO_3^-H^+$), που δύνανται να ανταλλάξουν ιόντα με το περιβάλλον. Η παρασκευή τέτοιων ρητινών φαίνεται στο Σχ. 2-3.



Σχ. 2-3. Δομή ιονανταλλακτικής ρητίνης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η χαρακτηριστική ομάδα που περιέχει τα προς ανταλλαγή ιόντα, προσδιορίζει τα χαρακτηριστικά της ρητίνης. Το ποσό του χρησιμοποιούμενου διβινυλοβενζολίου (Σχ. 2-3) προσδιορίζει το βαθμό «πορώδους» των προκυπτόντων σφαιριδίων.

Οι ρητίνες που λόγω δομής δύνανται να ανταλλάξουν κατιόντα τους με κατιόντα τους περιβάλλοντός τους ονομάζονται **ΚΑΤΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ** καί δίνουν την γενική αντίδραση του τύπου:

$$\bar{R}H^+ + Na^+ \rightarrow \bar{R}Na^+ + H^+ \qquad (2.5)$$

Αντίστοιχα οι ρητίνες που λόγω δομής δίνονται να ανταλλάξουν ανιόντα τους με ανιόντα του περιβάλλοντός τους ονομάζονται **ΑΝΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ** και δίνουν τη γενική αντίδραση του τύπου:

$$\overset{+}{R}OH^- + Cl^- \rightarrow \overset{+}{R}Cl^- + OH^- \qquad (2.6)$$

Οι πλέον συνηθισμένες συνθετικές ανταλλακτικές ρητίνες δύνονται στον Πίνακα 2.4

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4

Χαρακτηριστικές ιονανταλλακτικές ομάδες		
κατιονανταλλάκτες		ανιονταλλάκτες
$-SO_2H$	ισχυρή	$-N(CH_3)_3^+ Cl^-$
$-COOH$		$-\overset{+}{N}(CH_3Cl)_2^-$
		$-\overset{+}{N}(CH_2OH)$
$-CH_2SO_3H$		
$-OH$		$-NR_2$
$-SH$		$-NHR$
$-PO_2H_2$	ασθενής	$-NH_2$

Κάτω από συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων και θερμοκρασιών η τάση για ανταλλαγή ιόντων του περιβάλλοντος τη ρητίνη μέσου, με ιόντα της χαρακτηριστικής ομάδας της ρητίνης αυξάνει με την αύξηση του σθένους των ανταλλασομένων ιόντων δηλ.

$$Na^+ < Ca^{2+} < Al^{3+} < Th^{4+}$$

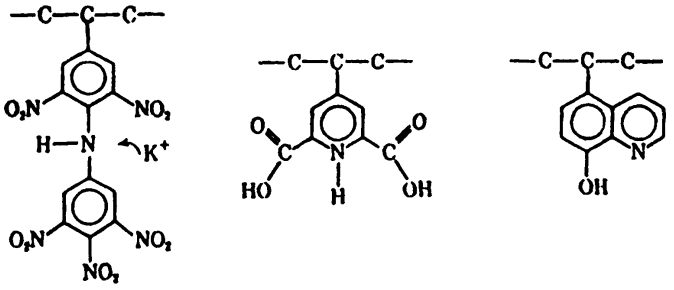
Για δοσμένο σθένος, η τάση για ανταλλαγή αυξάνει με τον ατομικό αριθμό του ανταλλασσόμενου ιόντος, δηλαδή:

$$Na^+ < K^+ < Ag^+$$
$$Mn^{2+} < Mg^{2+} < Cu^{2+} < Co^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+}$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σε υψηλές τιμές συγκεντρώσεων η τάση για ανταλλαγή ιόντων μηδενίζεται, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες η τάση για ανταλλαγή ιόντων παρομοίου φορτίου εξομοιώνεται.

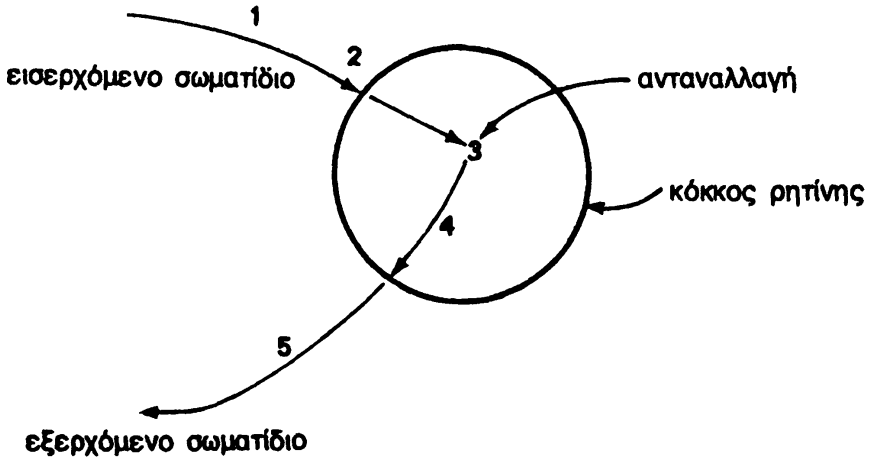
Για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας των ιονανταλλακτικών ρητινών χρησιμοποιούνται σήμερα διάφορες συμπλεκτικές και χηλικές ενώσεις που ενσωματώνονται στη δομή της ρητίνης. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων φαίνονται στο Σχ. 2-4.



Σχ. 2-4. Συμπλεκτικές και χηλικές ρητίνες.

Α. Μηχανισμός ιονανταλλαγής

Πιστεύεται ότι η ιονανταλλαγή επιτυγχάνεται στο εσωτερικό κάθε σφαιριδίου της πολυμερικής ρητίνης. Η διαδικασία ιονανταλλαγής για λόγους καλύτερης κατανόησης αναλύεται στα εξής πέντε στάδια. (Σχ. 2-5)



Σχ. 2-5. Διαδικασία ιονανταλλαγής

Στάδιο 1ο: το σωματίδιο (ιόν) πλησιάζει το σφαιρίδιο του πολυμερούς
Στάδιο 2ο: το σωματίδιο περνά από το διάλυμα στο εσωτερικό του σφαιριδίου
Στάδιο 3ο: γίνεται η ανταλλαγή του ιόντος με το ιόν της ρητίνης
Στάδιο 4ο: Το ανταλλαγέν ιόν της ρητίνης φτάνει στην εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στάδιο 5ο: Το ανταλλαγέν ιόν απομακρύνεται από το σφαιρίδιο

Τα στάδια που ρυθμίζουν την ταχύτητα της ανταλλαγής είναι τα 2ο και 4ο τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του περιβάλλοντος τη ρητίνη διαλύματος και το βαθμό «διακλάδωσης» του πολυμερούς. Οι διάφορες ρητίνες έχουν ορισμένη χωρητικότητα: ορισμένη δηλαδή ικανότητα δέσμευσης ιόντων. Αφού κορεστεί, η στήλη αναγεννάται. Για την αναγέννηση διαβιβάζεται μέσω της στήλης διάλυμα 0.5–1 M του επιθυμητού ιόντος και σε αναλογία 300-500% του θεωρητικώς απαιτούμενου ποσού.

Στην χρωματογραφία ιονανταλλαγής σαν συντελεστής κατανομής, K_d ορίζεται το πηλίκον:

$$K_d = \frac{[M]_r}{[M]} \qquad (2.7)$$

όπου: $[M]_r$ = ποσόν ιόντος ανά μονάδα βάρους της ρητίνης
και $[M]$ = ποσόν ιόντος ανά μονάδα όγκου του διαλύματος

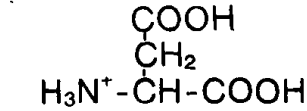
Ο δε όγκος κατακράτησης V_R (όγκος διαλύματος που απαιτείται να διέλθει μέσω της ρητίνης για να ληφθεί η μέγιστη συγκέντρωση του εκλουόμενου ιόντος x δίνεται από τη σχέση 2.8

$$V_R = K_d V_o + V_o \qquad (2.8)$$

όπου: V_o = «διάκενος» όγκος της στήλης που περιέχει τη ρητίνη

Τα τελευταία χρόνια η χρωματογραφία ιονανταλλαγής βρήκε ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση των αμινοξέων, καταρχήν με συσκευή στήλης (βλ. κεφ. 2.6), αργότερα δε με συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσ (HPLC) (βλ. κεφ. 2.9).

Η δυνατότητα ανάλυσης των αμινοξέων με χρωματογραφία ι ανταλλαγής στηρίζεται στο γεγονός ότι τα τελευταία απαντούν σε διάφορες ιοντικές μορφές. Σε ισχυρώς όξινο περιβάλλον (pH≤1), όλες οι αμινομάδες των αμινοξέων απαντούν σαν $-NH_3^+$. Για παράδειγμα στο ασπαρτικό οξύ:



PI = 2.97 $\quad pKa_1 = 2.09$, $pKa_2 = 3.86$ $\quad pKb = 9.82$

Σε pH=0.85, το -COOH με pKa=2.09 θα διασταθεί κατά 5% σε $-COO^-$. Καθώς το pH αυξάνεται σε 2.09 το -COOH θα διασταθεί κατά 50%. Επί πλέον αύξηση του pH οδηγεί στη πλήρη διάσταση του -COOH (pKa=3.86). Σε pH=2.97 η διάσταση του περισσότερου όξινου στο μόριο -COOH, είναι κατά 88% πλήρης, ενώ η διάσταση του ολιγότερου όξινου -COOH είναι κατά12% πλήρης. Αύξηση του pH πάνω από 5.11 οδηγεί στην πλήρη διάσταση του δεύτερου -COOH ενώ η διάσταση της πρωτονιωμένης αμινομάδας δεν φτάνει ούτε το 5% πριν από pH=8.57. Σε pH=9.82 το 50% της ομάδας αυτής διίσταται. Το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σημείο στο οποίο το αμινοξύ εμφανίζεται ηλεκτρικά ουδέτερο καλείται **«ισοηλεκτρικό σημείο»** (PI=2.97).

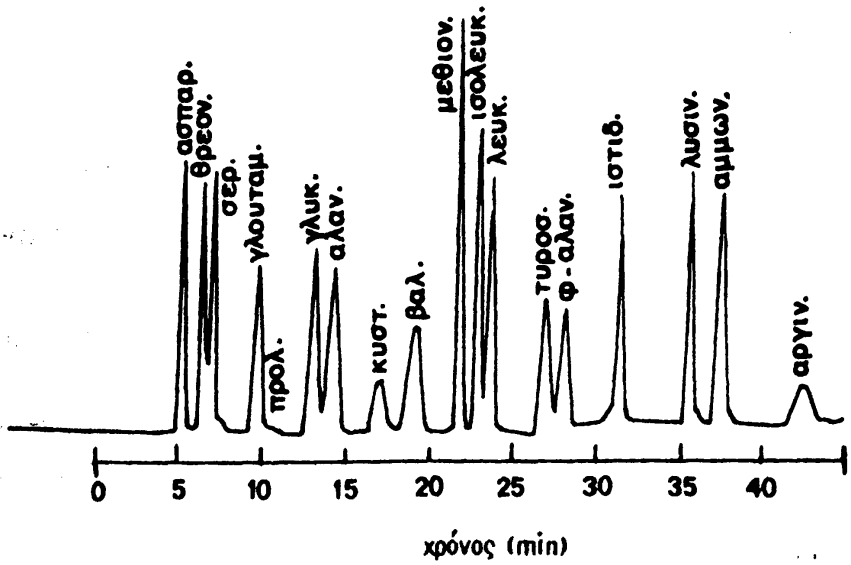
Οι νεότερες αυτοματοποιημένες τεχνικές στη χρωματογραφία ιονανταλλαγής μείωσαν κατά πολύ το χρόνο ανάλυσης από 100-160 hr σε 1-2hr.

Αυτό επετεύχθει: (1) με χρήση υψηλότερης παροχής του διαλύτη που από τιμή 47ml/hr/cm^2 κάθετης τομής στη στήλη αυξήθηκε σε 400ml/hr/cm^2 στη συσκευή HPLC (βλ. κεφ. 2.9). Οι πιέσεις που αντιστοιχούν σε τέτοιες ροές είναι της τάξης των 120-150Atm.

(2) με παρασκευή ρητινών μικρού όγκου σφαιριδίων που ελαχιστοποιούν τη διάχυση καί δίνουν οξύτερες κορυφές.

Β. Εφαρμογή

Στο σχήμα 2-6 φαίνεται η ανάλυση 17 αμινοξέων διαλυμένων σε NH_3/H_2O



Σχ. 2-6. Διαχωρισμός αμινοξέων με χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Συνθήκες ανάλυσης:

στατική φάση: πολυστορόλιο (8% διβυνιλοβενζόλιο), διαμ. κόκκων: 8 ± 1μm

στήλη: μήκος 30 cm, 1.75 mm εσωτερ. διαμ.

T=45°C και μετά την έκλουση της σερίνης ↑60° C

Κινούμενη φάση:	1. 0-16 min	pH = 3.1, [Na^+] = 0.2M
	2. 16-23 min	pH = 4.1, [Na^+] = 0.2M
	3. 23-τέλος	pH = 6.2, [Na^+] = 1.0M

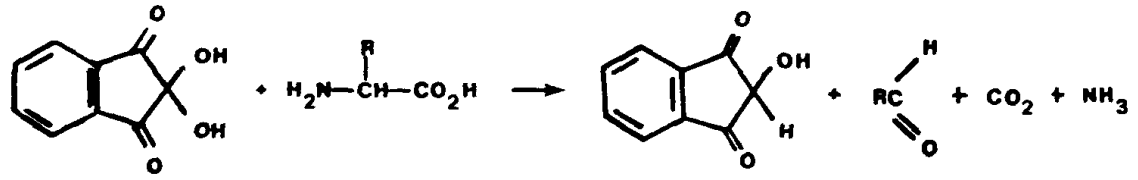
ροή διαλύτη: 9.2 ml/hr

πίεση εισόδου στήλης: 2150psi (146 Atm)

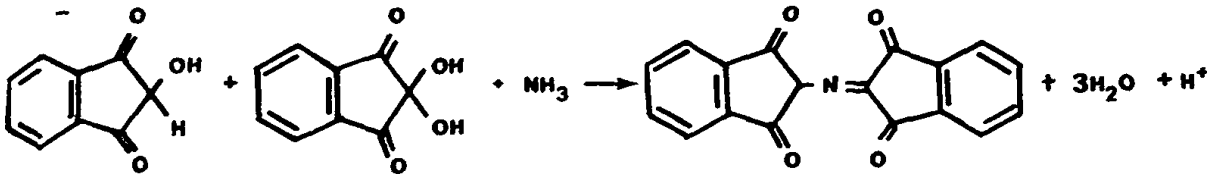
Τα αμινοξέα μετά την έξοδό τους από τη στήλη αντιδρούν με νινυδρίνη και

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σχηματίζουν έγχρωμο προϊόν που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά. Η αντίδραση έχει δύο στάδια. Η αρχικά σχηματιζόμενη υδροϋδαντοΐνη αντιδρά με NH_3 καί δίνει έγχρωμο προϊόν που μετρείται σε διαφορετικό για κάθε αμινοξύ, μήκος κύματος.



ninυδρίνη υδροϋδαντοΐνη



προϊόν μωβ χρώματος

2.5 Χρωματογραφία πηκτής (Gel permeation ή size exclusion chromatography)

Είναι η χρωματογραφική μέθοδος στην οποία ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση το μέγεθος των προς διαχωρισμόν ουσιών, πάνω σε πορώδες μέσο. Τα πορώδη αυτά υλικά αποτελούνται από σφαιρίδια με πόρους συγκεκριμένου μεγέθους. Μόρια με διάμετρο περίπου ίση ή μικρότερη από τη διάμετρο των πόρων, εισέρχονται και κατακρατούνται στους πόρους του υλικού, ενώ μόρια με διάμετρο μεγαλύτερη εκείνης των πόρων διέρχονται μέσω του πορώδους υλικού, χωρίς καμμιά αλληλεπίδραση. Δηλ. τα τελευταία εκλούονται πολύ γρηγορώτερα από τα πρώτα. Η παραπάνω διαδικασία φαίνεται στο σχήμα 2-7. Ο συνολικός όγκος στο εσωτερικό της στήλης Vc μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τα εξής στοιχεία (σχέση 2.9).

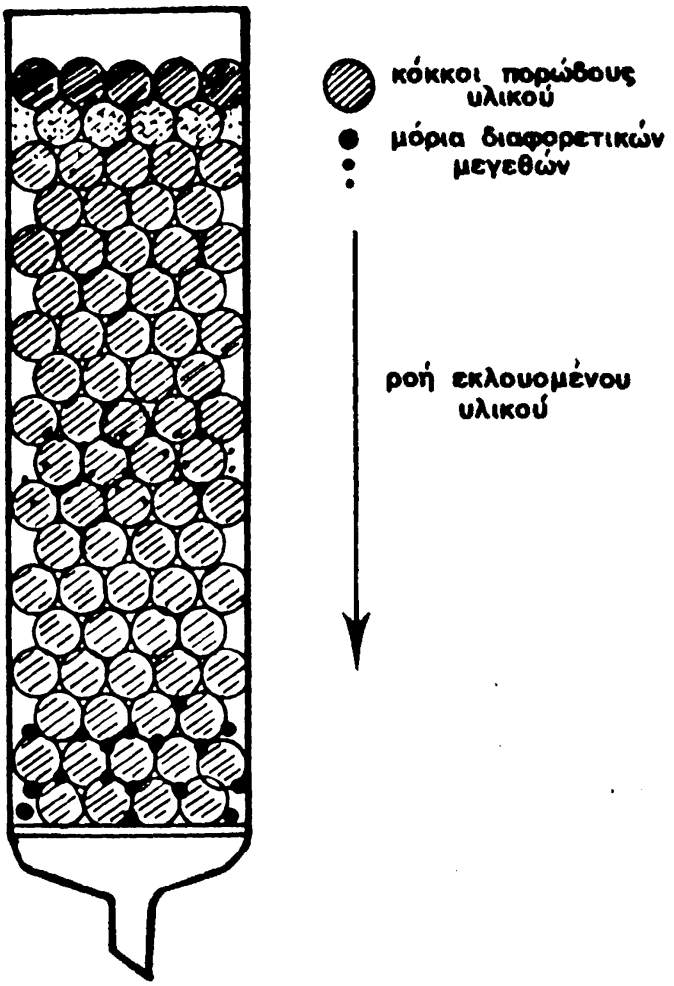
$$V_c = V_b + V_i + V_o \qquad (2.9)$$

όπου: V_b = ο όγκος που καταλαμβάνει το αδρανές τμήμα του υλικού πλήρωσης της στήλης

V_i = ο όγκος της κινούμενης φάσης (διαλύτη) στο εσωτερικό των πόρων του υλικού πλήρωσης

V_o = ο όγκος της κινούμενης φάσης (διαλύτη) έξω από τους πόρους του υλικού πλήρωσης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-7. Διαχωρισμός σε στήλη πηκτής

Αν κάποιο μόριο έχει μέγεθος μικρότερο του μεγέθους των πόρων, τότε ο όγκος του διαλύτη που επηρεάζει την έκλουσή του από τη στήλη είναι Vi + Vo. Αν πάλι τα μόρια έχουν μέγεθος πολύ μεγαλύτερο από το μέγεθος των πόρων, τότε μπορούν να εκλουσθούν από τη στήλη με όγκο διαλύτη Vo. Για τα ενδιάμεσα μεγέθη μορίων ο αντίστοιχος όγκος του διαλύτη V θα κυμαίνεται μεταξύ Vo και Vo+Vi.

Ο όγκος κατακράτησης V_R μιας δοσμένης ουσίας δίνεται από τη σχέση: 2.10

$$V_R = V_o + K_D V_i \qquad (2.10)$$

όπου:

$$K_D = \frac{C_i}{C_o} = \frac{X_i/V_i}{X_o/V_o} \qquad (2.11)$$

Ci= συγκέντρωση εκλουόμενης ουσίας στο εσωτερικό των πόρων του υλικού

C_o = συγκέντρωση εκλουόμενης ουσίας στο εξωτερικό των πόρων του υλικού

X_i και X_o= οι ποσότητες της εκλουόμενης ουσίας στις δύο φάσεις αντίστοιχα.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Από τη σχέση 2.11 φαίνεται ότι ο K_D μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 0 για ουσίες πολύ μεγάλες να διαχυθούν στο εσωτερικό των πόρων του αδρανούς υλικού (Ci=0) και της μονάδας για ουσίες που μπορούν να καλύψουν το συνολικό όγκο των πόρων της πηκτής (Ci=Co).
Η δύναμη που προκαλεί το διαχωρισμό είναι η διαφορά συγκέντρωσης της ουσίας μεταξύ Vo και Vi.

Α. Πορώδες Υλικό

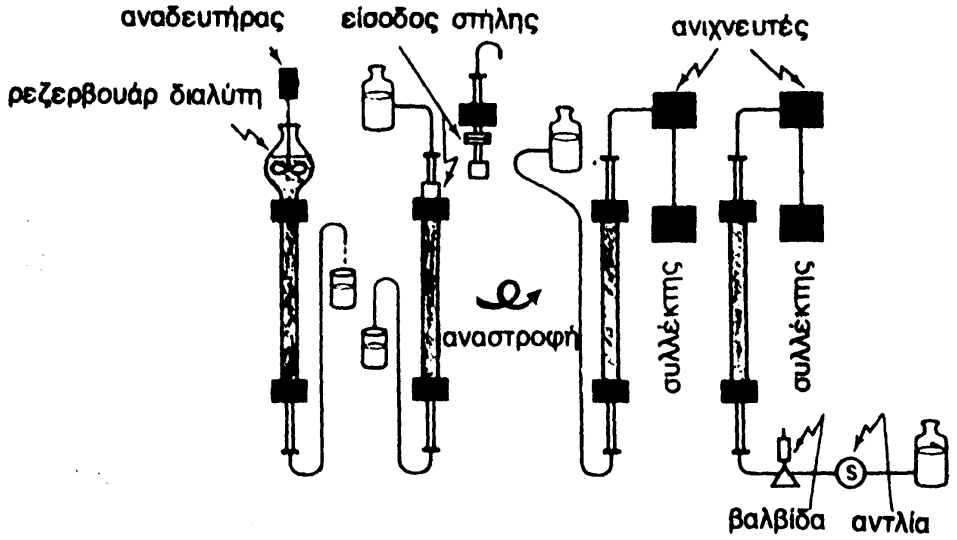
Για να χρησιμοποιηθεί ένα υλικό στη χρωματογραφία πηκτής θα πρέπει να έχει την ικανότητα αφού απορροφήσει διαλύτη να «διογκωθεί» δημιουργώντας ένα είδος «σφουγγαριού» μέσα στο οποίο είναι δυνατόν να διαχυθούν τα μόρια των προς διαχωρισμό ουσιών. Μια και στη χρωματογραφία πηκτής χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία διαλυτών, από νερό (πολικός) μέχρι υδρογονάνθρακες με ευθεία αλυσίδα (μη πολικοί), υπάρχει αντίστοιχα μεγάλος αριθμός χρησιμοποιούμενων πορωδών υλικών, από υδρόφιλα που διογκώνονται στο νερό, μέχρι υδρόφοβα που διογκώνονται παρουσία μη πολικών οργανικών διαλυτών. Για τις υδρόφιλες εφαρμογές χρησιμοποιούνται: συνθετικά διακλαδωμένοι πολυσακχαρίτες που προκύπτουν από τις δεξτρίνες και την επιχλωριδρίνη (εμπορικό όνομα Sephadex). Ανάλογα με το βαθμό διακλάδωσης προκύπτουν υλικά που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ουσιών με ΜΒ από 700-200.000. Άλλα πορώδη υλικά είναι το πολυακρυλαμίδιο και πηκτές αγαρόζης, που δίνουν υλικά για διαχωρισμό ουσιών με ΜΒ μέχρι 150.000.000. Για τις υδρόφοβες εφαρμογές χρησιμοποιούνται συνθετικά διακλαδωμένο πολυστυρόλιο και μεθυλιωμένες πηκτές δεξτρανών. Τα προϊόντα που προκύπτουν διαχωρίζουν ουσίες με ΜΒ από 2500-410.000.000. Επειδή ο βαθμός διόγκωσης του πολυμερούς και συνεπώς το μέγεθος των προκυπτόντων πόρων εξαρτάται από τη φύση και τη σύσταση του διαλύτη είναι δυνατόν με την εφαρμογή της τεχνικής της «βαθμωτής έκλουσης» (gradient elution, βλ. κεφ. 2.9) να μεταβληθεί, για συγκεκριμένο διαχωρισμό η διάμετρος των πόρων του πολυμερούς. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα. Γενικά μικρά σωματίδια δίνουν στήλη με μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα, αλλά ελαττώνουν τη ροή. Για ημιποσοτικούς διαχωρισμούς χρησιμοποιούνται στήλες μεγάλης διαμέτρου με χοντρά σφαιρίδια.

Β. Στήλη

Η χρωματογραφία πηκτής διεξάγεται συνήθως σε απλή στήλη (βλ. κεφ. 2.6) ή σε συσκευή HPLC (βλ. κεφ. 2.9). Στην πρώτη χρησιμοποιείται γυάλινη στήλη διαστάσεων 2.5× 50cm.
Η διογκωμένη, κατόπιν κατεργασίας με διαλύτη επί σειρά ωρών, πηκτή εισάγεται στη στήλη υπό μορφή πυκνόρρευστου υγρού και αφήνεται να

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ισορροπήσει, ενώ δίνεται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων αέρα στη μάζα της πηκτής. ((Σχ. 2-8)



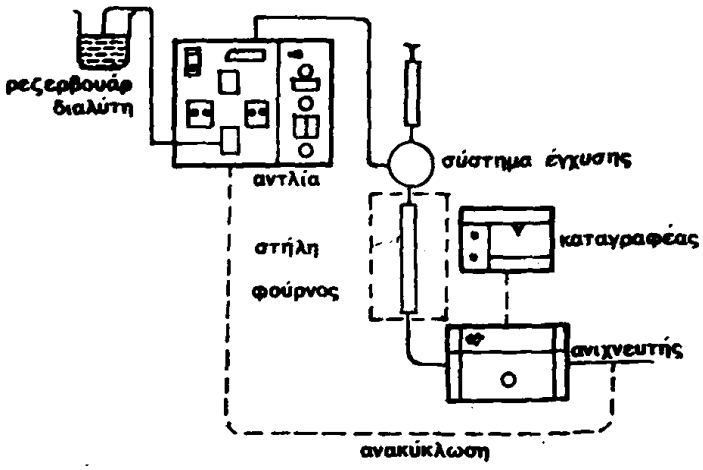
Σχ. 2-8. Πλήρωση στήλης με πηκτή πολυακριλαμιδίου ή αγαρόζης
Από Bio-Rad Lab., ΗΠΑ

Το δείγμα, ολίγα mg, προστίθεται στη κορυφή της στήλης, ενώ ακολουθεί η προσθήκη του διαλύτη έκλουσης. Ο διαλύτης αφήνεται να κινηθεί με ροή 15-20ml/hr. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα μικρότερου μεγέθους σωματίδια εκλούονται σε χρόνο ≃ 15-20hrs. Γρηγορότερες ροές αποφεύγονται διότι προκαλούν παραμόρφωση του πολυμερούς και συνεπώς και των ζωνών έκλουσης. Η ανίχνευση των εκλουόμενων ζωνών γίνεται με φασματοφωτομετρικούς ή διαθλασιμετρικούς ανιχνευτές. Η χρονοβόρα διαδικασία της στήλης συντομεύεται κατά πολύ με τη δεύτερη τεχνική, την τεχνική της χρωματογραφίας πηκτής υψηλής πίεσης (HPGPC).
Η βασική διάταξη της τελευταίας φαίνεται στο σχήμα 2-9.

Το κύριο χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ο σύντομος χρόνος μέσα στον οποίον ολοκληρώνεται ο διαχωρισμός. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την απομόνωση υψηλού ΜΒ κλασμάτων φυσικών προϊόντων και συνθετικών προϊόντων, όπως τα διάφορα πολυμερή. Το σύστημα HPGPC (Σχ. 2-9) αποτελείται από:

1) Δεξαμενή του διαλύτη. Ο διαλύτης επιλέγεται με βάση: την ικανότητα διόγκωσης του χρησιμοποιούμενου πολυμερούς,την ικανότητα διάλυσης του δείγματος και την ευαισθησία απόκρισης στον ανιχνευτή.
2) Αντλία υψηλής πίεσης. Η ροή ρυθμίζεται συνήθως μεταξύ 0.5-2.5 ml/min (250 psi).
3) Σύστημα εγχυτή του δείγματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-9. Βασική διάταξη HPLC.

4) Στήλη που βρίσκεται μέσα σε θερμοστατούμενο θάλαμο. Η θερμοκρασία διευκολύνει τον διαχωρισμό, αλλά δεν πρέπει να υπερβεί τους 150°C διότι αποικοδομείται το πορώδες υλικό της στήλης. Διαστάσεις στήλης: 0.5-2.5cm διάμετρος και 0.1-1m μήκος. Υλικό κατασκευής στήλης είναι συνήθως το γυαλί ή ανοξείδωτος χάλυβας.
5) Ανιχνευτή: χρησιμοποιείται συνήθως διαθλασίμετρο που λειτουργεί με βάση τη διαφορά που παρατηρείται στο δείκτη διάθλασης του διαλύματος μιας ουσίας, με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας. Όριο ανιχν. = 1×10^{-6} μονάδες δ.δ. Ακόμη εκτός του δ.δ.χρησιμοποιούνται ανιχνευτές IR, UV, FID κτ.λ.
6) Καταγραφέα.
Το δείγμα εισάγεται με τη βοήθεια μικροσύριγγας στη στήλη όπου επιτελείται ο διαχωρισμός πάνω στο πορώδες υλικό με τη βοήθεια της ροής του διαλύτη.

Γ. Εφαρμογές

Η χρωματογραφία πήκτής (GPC) χρησιμοποιείται κυρίως για την κλασμάτωση αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων (Sephadex G-25 και G-50) και πρωτεϊνών (Sephadex 75 και 100). Ακόμη υλικά όπως το Sephadex LH-20 χρησιμοποιούνται για την κλασμάτωση και καθαρισμό λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών. Για τον προσδιορισμό του ΜΒ συνθετικών και φυσικών πολυμερών χρησιμοποιείται το Sephadex G-100[1]. Για το σκοπό αυτό κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη (V_R έναντι ΜΒ) με ουσίες γνωστού ΜΒ π.χ. η σακχαρόζη (ΜΒ= 342), μπλε δεξτράνη (ΜΒ=2.000.000) κ.α. και γραφικά από τα πειραματικώς προσδιοριζόμενα V_R υπολογίζεται π.χ. το ΜΒ διαφόρων πρωτεϊνών[2].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ακολουθεί ανάπτυξη των χρωματογραφικών μεθόδων με βάση τη χρησιμοποιούμενη συσκευή.

2.6 Χρωματογραφία στήλης

Όπως έχει αναφερθεί στη χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής και πηκτής για τη συγκράτηση της στατικής φάσης χρησιμοποιούνται στήλες με διαστάσεις που ποικίλλουν ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Οι διαστάσεις αυτές κυμαίνονται από 1-5cm στη διάμετρο και από 10-150cm στο μήκος και είναι συνήθως κατασκευασμένες από γυαλί. (Σχ. 2-1). Στο κάτω μέρος η στήλη φέρει διάτρητο δίσκο για να συγκρατείται το υλικό πλήρωσης και στρόφιγγα που χρησιμεύει για την απομάκρυνση του πλεονάζοντος διαλύτη. Το υλικό πλήρωσης ποικίλλει ανάλογα με το αν για τον διαχωρισμό θα λάβει χώρα προσρόφηση (βλ. κεφ. 2.2), διάχυση σε πηκτή (βλ. κεφ. 2.5), ιονανταλλαγή (βλ. κεφ. 2.4) ή κατανομή (βλ. κεφ. 2.3), καθώς επίσης και τη φύση του προς διαχωρισμόν μίγματος των ουσιών. Τα υλικά αυτά ποικίλλουν από Silica gel, Alumina, κυτταρίνη, πηκτή αγαρ, διακλαδωμένο πολυστυρόλιο, πολυακρυλαμίδιο, ιονανταλλακτικές ρητίνες κ.α. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται κατά την πλήρωση της στήλης ώστε να είναι ομοιόμορφη για να ελαττωθεί κατά το δυνατόν, η διάχυση του δείγματος. Το υλικό συνήθως προστίθεται στην στήλη υπό μορφή πολτού σε δοσμένο υγρό.
Μετά την πλήρωση ανοίγεται η στρόφιγγα και απομακρύνεται το πλεονάζον υγρό. Ακολούθως προστίθεται με τη βοήθεια σιφωνίου το προς διαχωρισμό δείγμα,διαλυμένο στον κατάλληλο διαλύτη και αφήνεται να διέλθει μέσω της στήλης μέχρις ότου η στάθμη του διαλύτη να φθάσει μέχρι την άνω επιφάνεια του υλικού πλήρωσης. Εν συνεχεία προστίθεται ο διαλύτης έκλουσης και λαβαίνει χώρα ο διαχωρισμός σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως στο κεφ. 2.2

2.7 Χρωματογραφία χάρτου και λεπτής στοιβάδας

Η μεγάλη εξάπλωση τόσο της χρωματογραφίας χάρτου (PC) όσο και της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), αντανακλούν την απλότητα και την ποικιλία των εφαρμογών για την απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό όλων σχεδόν των μικρού ΜΒ οργανικών και πολλών ανοργάνων ακόμη ουσιών. Οι δύο παραπάνω τεχνικές εκτός των πιο πάνω εφαρμογών, χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικούς σκοπούς, καθώς και στην ανάλυση ιχνών ουσιών (trace analysis). Αν και στο κεφάλαιο αυτό γίνεται αλληλοδιαδοχική αναφορά στις δύο τεχνικές, πρέπει να τονιστεί ότι η TLC πλεονεκτεί

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΠΑΤΡΩΝ

σαφώς της PC διότι είναι πιο ευαίσθητη, δίνει οξύτερες και σαφώς διακεκριμένες ζώνες και συνεπώς καλύτερο διαχωρισμό. Ακόμη είναι γρηγορώτερη (χρόνος διάρκειας διαχωρισμού με TLC=10-30 min, έναντι αρκετών ωρών της PC και τέλος παρέχει τη δυνατότητα χρήσης δραστικών αντιδραστηρίων για την εμφάνιση των εκλουόμενων ουσιών.
Στη χρωματογραφία χάρτου το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα κατά τον διαχωρισμό είναι η κατανομή, ενώ στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας μπορεί να είναι η προσρόφηση ή κατανομή.

Α. Αδρανές υπόστρωμα

Στη χρωματογραφία χάρτου σαν προσροφητικό υλικό χρησιμεύει το χαρτί που ταυτόχρονα είναι και αδρανές υπόστρωμα. Ουσιαστικά η στατική φάση στην περίπτωση αυτή είναι το νερό που φυσικά συγκρατεί η κυτταρίνη (5-8% κ.β.). Στην TLC λεπτά στρώματα προσροφητικού υλικού δεσμεύονται πάνω σε αδρανές υπόστρωμα (γυαλί ή φύλλο πλαστικού PET). Οι διαστάσεις του αδρανούς υποστρώματος ποικίλλουν από 5,10 ή 20×20 cm και πάχος 3mm προκειμένου για γυαλί ή 0.2–0.5 mm προκειμένου για φύλλο πλαστικού.

Β. Προσροφητικά μέσα

Στη χρωματογραφία χαρτιού όπως ελέχθη και προηγουμένως η κυτταρίνη του χαρτιού αποτελεί το προσροφητικό μέσο. Συνήθως χρησιμοποιείται διηθητικό χαρτί Whatman διαφορετικών τύπων και πάχους ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Οι διαστάσεις του χαρτιού ποικίλλουν ανάλογα με τη συγκεκριμένη τεχνική (κατερχόμενη–ανερχόμενη) που θα χρησιμοποιηθεί και κυμαίνονται από 20 × 40 cm για την πρώτη, μέχρι 20 × 30 cm για τη δεύτερη. Στον Πίνακα 2.5 δίνονται οι συνηθέστεροι τύποι χαρτιού που χρησιμοποιούνται με τα χαρακτηριστικά τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5

Χαρακτηριστικοί τύποι χαρτιών που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία χαρτιού

Γρήγορης διήθησης	κανονικής διήθησης	αργής διήθησης
No 4	No 1	No 2
No 54	No 7	No 20
No 540		

Στην TLC χρησιμοποιείται ποικιλία προσροφητικών μέσων τα οποία στερεώνονται πάνω στο αδρανές υπόστρωμα με τη βοήθεια «δέτου» (συνδετικού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

υλικού), όπως το $CaSO_4$. Ο Πίνακας 2.6 δίνει τα κυριώτερα από αυτά τα προσροφητικά μέσα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.6

Αντιπροσωπευτικά προσροφητικά μέσα στην TLC

Προσροφητικό μέσον	Εφαρμογή	Φυσ/χημικό φαινόμενο διαχωρισμού
Silica gel	όλες οι τάξεις ουσιών	προσρόφηση, κατανομή ιονανταλλαγή
Alumina	Βάσεις, στεροειδή	προσρόφηση, κατανομή ιονανταλλαγή
Κυτταρίνη	πολικές ουσίες, αμινοξέα νουκλεοτίδια	κατανομή
Kieselguhr	Σάκχαρα	Κατανομή
Πολυαμίδια	ανθοκυανίνες, φλάβονες	προσρόφηση
DEAE, TEAE,	νουκλεοτίδια, φωσφολιπίδια	ιονανταλλαγή
CM	γλυκολιπίδια και χρωστικές	κατανομή

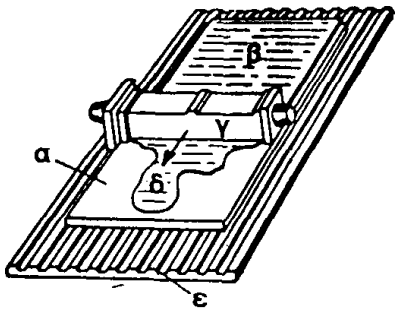
DEAE, διαιθυλαμινοαιθυλ–
TEAE, τριαιθυλαμινοαιθυλ–
CM, καρβοξυμεθυλο–

Από τα παραπάνω, στην TLC χρησιμοποιούνται ευρύτατα τα Silica gel και Alumina. Οι πλάκες TLC παρασκευάζονται σχετικά εύκολα στο εργαστήριο ή αγοράζονται έτοιμες. Προφανώς οι εμπορικές πλάκες είναι καλύτερης ποιότητας διότι είναι ομογενείς στο πάχος επίστρωσης του προσροφητικού υλικού. (πάχος ~ 0.25mm).

Για την εργαστηριακή παρασκευή πλακών TLC χρησιμοποιείται απλή σχετικά συσκευή (Σχ. 2-10) που φέρει υποδοχέα με ειδική σχισμή στη βάση του για τη συγκράτηση του ρευστού προσροφητικού υλικού. Η προς επίστρωση γυάλινη πλάκα τοποθετείται στη βάση της συσκευής και το τμήμα της συσκευής που περιέχει το ρευστό προσροφητικό υλικό σύρεται οριζόντια κατά μήκος της πλάκας, οπότε σχηματίζεται το στρώμα, επιθυμητού πάχους, του προσροφητικού υλικού. Ακολουθεί ξήρανση της πλάκας στον αέρα επί 30 min. Αναλόγως της εφαρμογής ακολουθεί ενεργοποίηση της πλάκας.

Η ενεργότητα του προσροφητικού υλικού αποτελεί τη σπουδαιότερη ιδιότητά του. Δηλαδή η τάση του να «κατακρατεί» τις προς διαχωρισμό ουσίες. Η ενεργότητα του προσροφητή είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων όπως: (1) ο αριθμός και η ισχύς των «ενεργών κέντρων» που φέρει στην επιφάνειά του

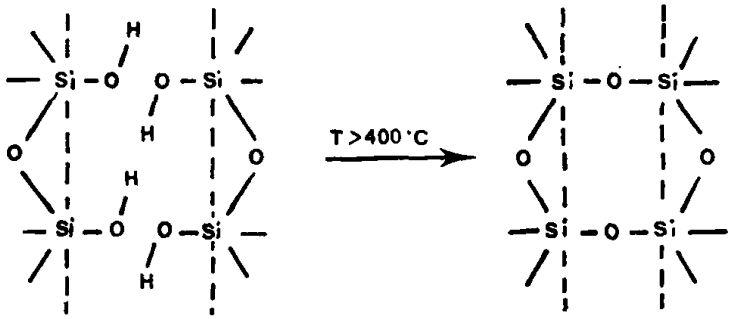
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-10. Παρασκευή πλακών TLC. (α) γυάλινη πλάκα (β) επιστρωμένη πλάκα (γ) υποδοχέας με το υλικό επίστρωσης (δ) υλικό επίστρωσης (ε) στήριξη πλάκας

(2) η επιφάνεια των ενεργών κέντρων (3) το περιεχόμενο της υγρασίας του προσροφητή. Συγκεκριμένα ο προσροφητής Silica gel επιφάνειας ~ 500m²/g αποτελείται από ομάδες Si-OH σε απόσταση ≃ 5 Å μεταξύ τους. Οι ομάδες αυτές αποτελούν τα ενεργά κέντρα του υλικού. Όπως ελέχθη και προηγουμένως, η ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 150-200°C οπότε κατόπιν απομάκρυνσης του μεγαλύτερου ποσού του νερού, αποκαλύπτονται τα ενεργά κέντρα του υλικού. Σε θερμοκρασία υψηλότερη των 200°C η ενεργότητα του προσροφητή καταστρέφεται σε μεγάλο βαθμό, λόγω πλήρους αφυδάτωσης, οπότε σχηματίζονται δεσμοί Si-O-Si (Σχ. 2-11).

Η διαδικασία ενεργοποίησης είναι αντιστρεπτή. Δηλαδή οι πλάκες επανεργοποιούνται με έκθεση σε περιβάλλον ατμών νερού. Σε θερμοκρασία υψηλότερη των 400°C, η ενεργότητα χάνεται μόνιμα. Αντίθετα το υλικό Alumina αυξάνει την ενεργότητά του με θέρμανση μέχρι τους 1000°C. Συνήθως ενεργοποιείται με θέρμανση επί 12hrs στους 400°C. Έχει επιφάνεια ~ 150m²/g και συνιστάται για τον διαχωρισμό αρωματικών παραγώγων και άκυκλων αλκενίων με κάποια ομοιότητα στη δομή τους.



Σχ. 2-11. Μηχανισμός αφυδάτωσης (απενεργοποίησης) του υλικού Silica.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Γ. Τροποποιημένα προσροφητικά μέσα

Κατά την παρασκευή των πλακών προστίθεται συνήθως 5-15% κ.β. $AgNO_3$ στο υλικό Silica gel. Το προσροφητικό που προκύπτει δείχνει ενισχυμένη εκλεκτική προσρόφηση και κατακρατεί ουσίες με διπλούς δεσμούς που δύνανται να σχηματίσουν π-δεσμούς με ιόντα Ag. Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στο χαρακτηρισμό κλασμάτων λιπιδίων, όπως τα φωσφολιπίδια. Το μέγεθος των κόκκων του τροποποιημένου προσροφητικού υλικού είναι ~ 15μm, ενώ η στοιβάδα του $AgNO_3$ αποτελείται από στρώμα 30 περίπου κόκκων.

Δ. Διαλύτης

Είναι λανθασμένο να θεωρήσει κανείς τον διαλύτη απλώς σαν την κινούμενη φάση που μεταφέρει το δείγμα κατά μήκος του προσροφητικού υλικού. Εκτός της παραπάνω αποστολής του, ο διαλύτης λαβαίνει ενεργό μέρος στη διαδικασία της προσρόφησης με το να συναγωνίζεται με το δείγμα για την κατάληψη των ενεργών κέντρων. Εάν ο διαλύτης προσροφάται ισχυρά, δύσκολα εκτοπίζεται από τα συστατικά του δείγματος και συνεπώς τα τελευταία μετακινούνται γρήγορα κατά μήκος της πλάκας. Συνεπώς για δοσμένο σύστημα προσροφητή/δείγματος, ο ρυθμός μετακίνησης των συστατικών του δείγματος δια μέσου του προσροφητή εξαρτάται όχι μόνο από τη διαλυτότητα του δείγματος στο διαλύτη, αλλά και από τη τάση με την οποία προσροφάται ο διαλύτης στον προσροφητή, π.χ. τα αλκάνια είναι περισσότερο διαλυτά στο επτάνιο απ΄ ότι στη μεθανόλη, αλλά η μεθανόλη συμπαρασύρει τα αλκάνια δια μέσου του προσροφητή πολύ γρηγορώτερα από το επτάνιο, επειδή η τελευταία προσροφάται πολύ ισχυρότερα στον προσροφητή απ΄ ότι τα αλκάνια.

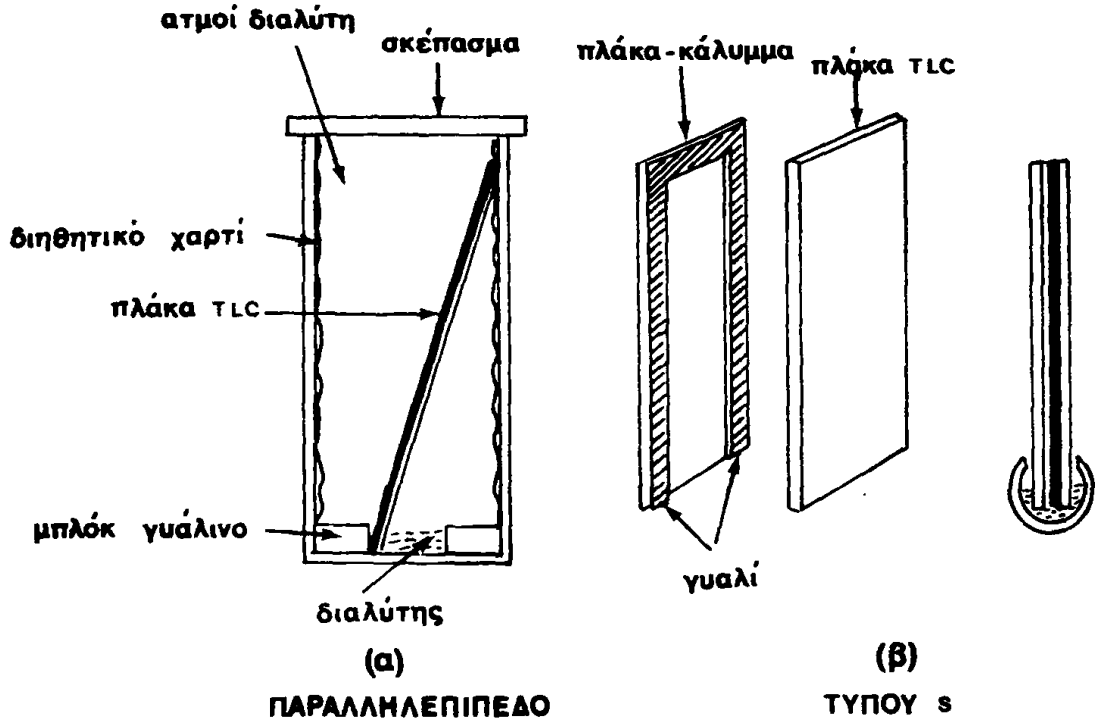
Προκειμένου ο αναλυτής να επιλέξει τον κατάλληλο διαλύτη πρέπει πρώτα να λάβει υπ΄ όψιν του τη γενική φύση του δείγματος που πρόκειται να διαχωρίσει. Αν αυτό είναι αδύνατο, τότε σε ξεχωριστά πάντα δοχεία δοκιμάζει διαφορετικά συστήματα διαλυτών (δύο ή τρεις διαλύτες μαζί συνήθως) και επιλέγει εκείνο που δίνει τον καλύτερο διαχωρισμό. Ένας γενικής χρήσης διαλύτης είναι το μίγμα: n-βουτανόλης/οξικού οξέος/νερού (40:10:50). Έτσι ενώ στην PC ο αναλυτής επιλέγει μόνο διαλύτη, στην TLC επιλέγει σύστημα διαλύτη/προσροφητή.

Ε. Δοχείο χρωματογράφησης

Για την TLC χρησιμοποιούνται παραλληλεπίπεδα δοχεία από γυαλί όγκου 40-50 lt ή μικρότερα (Σχ. 2-12 α) ή και δοχείο διάταξης σάντουιτς «sandwich» (Σχ. 2-12 β). Για την χρωματογραφία χαρτιού χρησιμοποιούνται τα ίδια

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

παραπάνω παραλληλεπίπεδα δοχεία (Σχ. 2-13 α,β) ή και κυλινδρικά (Σχ. 2-13 γ).



Σχ. 2-12. Δοχεία χρωματογράφησης TLC (ανερχόμενη τεχνική)

Οι παράπλευρες επιφάνειες εσωτερικά του δοχείου καλύπτονται συνήθως με διηθητικό χαρτί, πράγμα που βοηθάει στην πιο γρήγορη εξισορρόπηση της ατμόσφαιρας του δοχείου. Η διάταξη (2-12α) διαφέρει σημαντικά της (2-12β) κατά το ότι στην (α) η ατμόσφαιρα είναι κορεσμένη με ατμούς του διαλύτη, ενώ στην (β) η ατμόσφαιρα στο πάνω μέρος της πλάκας είναι διαφορετική εκείνης στο κάτω μέρος που είναι βυθισμένο στο διαλύτη.

ΣΤ. Προσθήκη του δείγματος

Το δείγμα αφού παρασκευαστεί με κάποια ή κάποιες κλασσικές τεχνικές, όπως εκχύλιση, εξάτμιση του διαλύτη κ.τ.λ. προστίθεται με τη βοήθεια μικροσιφωνίου υπό μορφή κηλίδας που απέχει τουλάχιστον 2.5cm από το ένα άκρο του χαρτιού ή της πλάκας TLC. Το μέγιστο της ποσότητας του προστιθέμενου δείγματος είναι περίπου 200mg (αλλεπάλληλες τοποθετήσεις κηλίδων ή μή). Για παρασκευαστικούς σκοπούς, αντί κηλίδας, το δείγμα προστίθεται υπό μορφή γραμμής παράλληλης προς τη μικρότερη πλευρά της

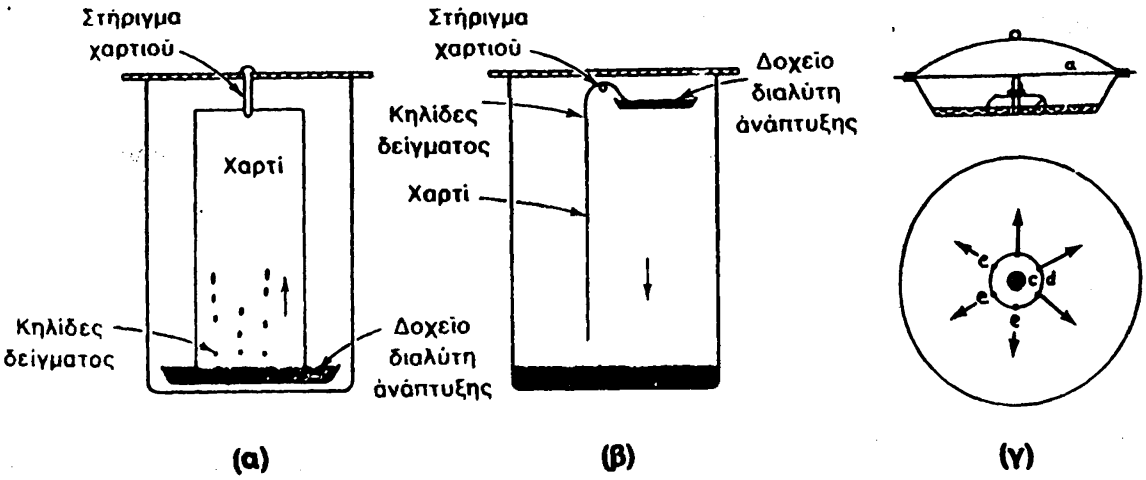
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πλάκας. Εδώ μπορεί να προστεθεί μέχρι 1mg/cm μήκους πλάκας, όταν το πάχος της πλάκας φτάνει το 1mm. Στη συνέχεια το χαρτί ή η πλάκα TLC τοποθετείται μέσα στον θάλαμο χρωματογράφησης (Σχ. 2-12, 2-13) ο οποίος προηγουμένως έχει κορεστεί με ατμούς του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και ο θάλαμος κλείνεται.

Ζ. Ανάπτυξη - τεχνικές ανάπτυξης

Για την ανάπτυξη χρησιμοποιούνται τρεις τεχνικές: (1) η ανερχόμενη (2) η κατερχόμενη και λιγώτερο η κυκλική (3)

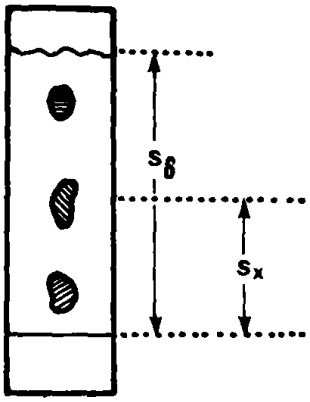
(1) Ανερχόμενη τεχνική. (Σχ. 2-13α)



Σχ. 2-13. Βασική συσκευή για τη χρωματογραφία σε χαρτί: (α) ανερχόμενη (β) κατερχόμενη (γ) κυκλική τεχνική: α= χαρτί, c= δείγμα, d,e= διαχωρισμένα συστατικά δείγματος.

Το δείγμα προστίθεται περίπου 2-3cm από το κάτω άκρο του χάρτου ή της πλάκας που τοποθετούνται κατακόρυφα στο εσωτερικό του θαλάμου, έτσι ώστε το κάτω άκρο τους να βυθίζεται κατά 1 cm περίπου στο διαλύτη. Ο διαλύτης ανέρχεται λόγω τριχοειδών φαινομένων κατά μήκος του χαρτιού ή της πλάκας και συμπαρασύρει στην πορεία του τα συστατικά του δείγματος τα οποία σταδιακά διαχωρίζονται.
Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού με την ανερχόμενη τεχνική φαίνεται στο σχήμα 2-14.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-14. Υπολογισμός του Rf ένωσης που διαχωρίστηκε με χρωματογραφία χαρτιού.
Sδ: απόσταση που διέτρεξε ο διαλύτης
Sx: απόσταση που διέτρεξε η ένωση

Σαν μέτρο της ταχύτητας με την οποία κινείται η ουσία χ πάνω στο χαρτί λαμβάνεται το Rf που ορίζεται σαν το πηλίκον:

$$R_f = \frac{S_x}{S_\delta} \qquad (2.12)$$

όπου: S_x= απόσταση που διέτρεξε η ουσία χ από το σημείο εκκίνησης
S_δ= απόσταση που διέτρεξε ο διαλύτης από το σημείο εκκίνησης.

Ακολουθεί εμφάνιση του χρωματοφήματος (βλ. κεφ. 2.7 Η)

(2) Κατερχόμενη τεχνική (Σχ. 2-13β).

Το δείγμα προστίθεται στο επάνω άκρο του χαρτιού που τοποθετείται στο θάλαμο. Ο διαλύτης ξεπερνώντας τη ράβδο του αντισιφωνισμού (χρησιμοποιείται για να εμποδίσει την απώλεια του διαλύτη λόγω σιφωνισμού) συμπαρασύρει προς τα κάτω το δείγμα και το διαχωρίζει στα συστατικά του. Η ανερχόμενη τεχνική πλεονεκτεί της κατερχόμενης γιατί είναι ταχύτερη. Έτσι π.χ. πηκτικές ουσίες δεν μπορούν να διαχωριστούν με κατερχόμενη τεχνική, διότι στο μεγάλο χρόνο που απαιτεί ο διαχωρισμός εμφανίζονται σημαντικές απώλειες στις ουσίες αυτές.

(3) Κυκλική τεχνική (Σχ. 2-13γ)

Το δείγμα τοποθετείται υπό μορφή κηλίδας στο κέντρο κυκλικού χαρτιού. Για την ανάπτυξη το χαρτί τοποθετείται οριζόντια μεταξύ της βάσης και του καλύμματος ξηραντήρα. Ο διαλύτης τοποθετείται σε ποτήρι στη βάση του ξηραντήρα και τροφοδοτεί το χαρτί μέσω φυτιλιού. Μετά την ανάπτυξη τα διαχωρισμένα συστατικά του δείγματος παρουσιάζονται σαν ομόκεντροι κύκλοι πάνω στο χαρτί.

(4) Δισδιάστατη τεχνική

Εφαρμόζεται για τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στη τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά διαλυτικά. Κατόπιν προσθήκης του πρώτου διαλυτικού αναπτύσσεται το χρωματογράφημα κατά μία διεύθυνση. Στη συνέχεια το χαρτί ή η πλάκα αφήνεται προς ξήρανση, στρέφεται κατά 90°, προστίθεται το δεύτερο διαλυτικό και ακολουθεί ανάπτυξη κατά τη νέα διεύθυνση. Με κατάλληλη επιλογή των δύο διαλυτών, διαχωρίζεται ποικιλία ενώσεων που άλλως θα ήταν δύσκολο να διαχωριστούν.

Η. Εμφάνιση του χρωματογραφήματος - ποιοτική ανίχνευση

Εάν οι διαχωρισμένες ουσίες είναι έγχρωμες π.χ. χρωστικές των ποτών, τότε ουσιαστικά η εμφάνιση είναι περιττή. Εάν όμως, όπως συμβαίνει στις περισσότερες περιπτώσεις, οι ουσίες είναι άχρωμες, τότε απαιτούνται ειδικές τεχνικές για την εμφάνιση των ουσιών αυτών. Οι τεχνικές εμφάνισης που συνήθως χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία χαρτιού και TLC, διακρίνονται σε:

(1) μη καταστρεπτικές για το δείγμα και

(2) καταστρεπτικές

Στις μη καταστρεπτικές τεχνικές περιλαμβάνονται: (α) η έκθεση στην ακτινοβολία UV, οπότε οι ουσίες διακρίνονται σαν σκοτεινές κηλίδες σε φωτεινό υπόβαθρο. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται προκειμένου περί φθοριζουσών ουσιών (απορ. ακτινοβ. σε $\lambda > 230$ nm), (β) ο ομοιόμορφος ψεκασμός του χρωματογραφήματος με κατάλληλο διάλυμα π.χ. 1% μεθανολικό διάλυμα ιωδίου και ξήρανση στο πυριατήριο οπότε εμφανίζονται οι ουσίες σαν κηλίδες φαιού χρώματος πάνω στο χαρτί ή την πλάκα (γ) τοποθέτηση του χρωματογραφήματος σε θάλαμο που περιέχει κρυστάλλους I_2, οπότε οι ουσίες διακρίνονται σαν καφέ κηλίδες. Ενώσεις με διπλούς δεσμούς ή άλλης πηγής π-ηλεκτρονίων διακρίνονται ευκολότερα λόγω εντονώτερης χρώσης. Το I_2 δεν αντιδρά με τις διαχωρισμένες ουσίες αλλά συμπυκνώνεται πάνω τους, συγκρατούμενο με δυνάμεις τύπου Van der Waals, (δ) για ραδιενεργές ενώσεις η ανίχνευση δυνατόν να γίνει με σαρωτή (scanner), συσκευή που μετρά την ένταση της εκπεμπόμενης από το δείγμα ραδιενέργειας.

Στις καταστρεπτικές τεχνικές περιλαμβάνονται: (α) οξείδωση με H_2SO_4. Χρησιμοποιούνται ευρέως συνδυασμοί H_2SO_4 με $K_2Cr_2O_7$. Το διχρωμικό ή κιτρικό οξύ προστίθενται για γρηγορώτερη απανθράκωση. Μετά τον ψεκασμό π.χ. με μεθανολικό διάλυμα 5-50% H_2SO_4, το χρωματογράφημα θερμαίνεται επί 5-30 min στους 100-120°C, οπότε οι ουσίες απανθρακούνται και ξεχωρίζουν πάνω στην πλάκα. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται μόνο στην TLC. (β) με ειδικές αντιδράσεις. Κυρίως χρησιμοποιούνται ειδικά αντιδραστήρια, όπως η νινυδρίνη, το πράσινο της βρωμοκρεσόλης, το μπλε της βρωμοθυμόλης, τριχλωριούχο αντιμόνιο, χλωροσουλφονικό οξύ, διχλωροφαινολινδοφαι-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΠΑΤΡΩΝ

νόλη κ.α. τα οποία κατόπιν εκλεκτικής αντίδρασης με τις αναλυόμενες ουσίες π.χ. α-αμινοξέα δίνουν χαρακτηριστικούς για κάθε ένωση χρωματισμούς. Αφού εμφανιστούν οι κηλίδες επιχειρείται η ταυτοποίηση με μέτρηση της R_f κάθε ουσίας ή κατόπιν σύγκρισης της R_f της άγνωστης ουσίας με πρότυπες ουσίες που συγχρωματογραφούνται. Η R_f παρέχει αρνητική πιστοποίηση της παρουσίας μιας ουσίας. Δηλαδή κάτω από παρόμοιες πειραματικές συνθήκες, υπάρχει μεγάλος αριθμός ενώσεων που δίνουν ίδιο ή παραπλήσιο R_f. Η θετική πιστοποίηση μιας ένωσης γίνεται κατόπιν απομόνωσης με απόξεση της ουσίας για την περίπτωση της πλάκας TLC ή κοψίματος του χαρτιού, για την περίπτωση της PC, διάλυσης στον κατάλληλο διαλύτη, απομάκρυνσης του διαλύτη με εξάτμιση και ταυτοποίηση κατόπιν εφαρμογής κλασσικών χημικών μεθόδων ανάλυσης.

Θ. Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαχωρισμένων συστατικών επιτυγχάνεται τοπικά πάνω στο χαρτί ή την πλάκα ή κατόπιν απομάκρυνσης από το αντίστοιχο μέσον, με μια από τις παρακάτω τεχνικές:

1) Μέτρηση του εμβαδού της κηλίδας με τη βοήθεια χιλιοστομετρικού χαρτιού (millimetré).
2) μέτρηση του χρώματος κάθε κηλίδας με φωτόμετρο. π.χ. μετρείται το ποσό του ανακλώμενου πάνω σε κάθε κηλίδα φωτός. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι μη ομοιόμορφα ανεπτυγμένες κηλίδες δεν μπορούν να δώσουν ποσοτικώς ικανοποιητικά αποτελέσματα.
3) μέτρηση της έντασης εκπεμπόμενης από κάθε κηλίδα ραδιενέργειας. Η τεχνική εφαρμόζεται μόνο στις περιπτώσεις ραδιενεργών ουσιών.
4) ζύγιση του χαρτιού αφού αποκοπεί κάθε κηλίδα χωριστά απ' το χρωματογράφημα.
5) εκχύλιση κάθε κηλίδας με τον κατάλληλο διαλύτη και αναλυτικό προσδιορισμό με κλασσικές χημικές μεθόδους. Στην τελευταία αυτή περίπτωση το χρωματογράφημα κόβεται σε λουρίδες, κάθε μια από τις οποίες περιέχει από μια κηλίδα. Το άκρο κάθε λουρίδας προσαρμόζεται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών (slides) μικροσκοπίου και το σύστημα εμβαπτίζεται σε δοχείο που περιέχει διαλύτη. Ακολουθεί παραλαβή της κάθε κηλίδας και αναλυτικώς προσδιορισμός της αντίστοιχης ουσίας σύμφωνα με τα παραπάνω.

Ι. Παρασκευαστική χρωματογραφία

Η PC όσο και η TLC χρησιμοποιούνται ενίοτε για τη λήψη καθαρών ουσιών. Για την παρασκευαστική PC χρησιμοποιούνται φύλλα χαρτιού μεγάλου πάχους, για δε την TLC πλάκες μεγαλύτερου πάχους προσροφητικού υλικού π.χ.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πάχος 1mm για ποσότητα δείγματος μέχρι 100mg. Ακολουθεί κανονική χρωματογράφηση.

Κ. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι εφαρμογές της PC και TLC είναι ευρύτατες και συνεχώς επεκτείνονται.

1. Χρωματογραφία χαρτιού

α) Πρωτεΐνες-αμινοξέα: Στη διάκριση μεταξύ ξυδιού από ζύμωση και συνθετικού ξυδιού, κατόπιν εξέτασης των περιεχομένων αμινοξέων με κυκλική τεχνική ανάπτυξης[3]. Στο από ζύμωση ξύδι οι κηλίδες των αναπτυσσόμενων αμινοξέων είναι ευδιάκριτες, ενώ στο συνθετικό ξύδι ανύπαρκτες. Στον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων του αλευριού, ζύμης και ψωμιού[4]. Τα αμινοξέα εδώ απομονώνονται από τα λοιπά συστατικά με χρωματογραφία ιονανταλλαγής.

β) Αιθέρια λάδια: Για τη διάκριση της προέλευσης διαφόρων αιθέριων λαδιών[5] κατ' αρχήν συλλέγονται οι φαινόλες από τα λιπαρά δείγματα με απόσταξη με υδρατμούς και αφού συζευχθούν με διαζωνιακά άλατα χρωματογραφούνται σε χαρτί. Η προέλευση των αιθερίων λαδιών προκύπτει από διαφορές στις τιμές R_f και στο χρώμα των κηλίδων του χρωματογραφήματος.

γ) Λιπαρές ύλες: Τα γλυκερίδια γενικά αναλύονται με χαρτοχρωματογραφία ανεστραμμένης φάσης. Η τεχνική χρησιμοποιείται στη διάκριση μονο-και διγλυκερίδιων.

Τα μονογλυκερίδια αντιδρούν απ' ευθείας πάνω στο χρωματογράφημα με HIO_4/αντιδραστήριο Schiff, ενώ τα διγλυκερίδια απαιτούν προηγουμένως αποικοδόμηση π.χ. με υδροξυλαμίνη[6]. Η ίδια τεχνική χρησιμοποιείται στην ανάλυση των λιπαρών οξέων λαδιών και λιπών φυτικής και ζωικής προέλευσης[7]. Στον προσδιορισμό της ποιότητας των ψαριών, κατόπιν ανάλυσης των κατωτέρων λιπαρών οξέων στον λιπαρό ιστό[8]. Η περιεκτικότητα σε βουτυρικό οξύ φρέσκων ψαριών, από αμελητέα στα φρέσκα αυξάνεται στα αλλοιωμένα ψάρια σε 2mg/100g. Στην ανάλυση του λίπους στο φύτρο σιταριού[9], του λίπους ψαριών[10] κ.τ.λ. κατόπιν υδρογόνωσης (παρουσία καταλύτη) των ακόρεστων λιπαρών οξέων πάνω στο χαρτί.

δ) Υδατάνθρακες: στην ανίχνευση γλυκόζης, φρουκτόζης, σακχαρόζης και λακτόζης σε διαιτητικά τρόφιμα[11]. Στην ανίχνευση ισομαλτόζης σε μίγματα μελάσσας[12] (ενδεικτικό παρουσίας μελάσσας από καλαμπόκι). Στον προσδιορισμό μονο- και δισακχαριτών σε ροφήματα σοκολάτας, κακάου, αναψυκτικών ποτών και παγωτών[13]. Στην ανίχνευση σκόνης γάλακτος σε λουκάνικα και άλλα κρεατοσκευάσματα. Στα δείγματα αυτά η περιεχόμενη λακτόζη υδρολύεται σε γαλακτόζη και γλυκόζη, οι οποίες στη συνέχεια ταυτοποιούνται με χαρτοχρωματογραφία[14].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ε) Βιταμίνες: στην ανάλυση θειαμίνης[15], ριβοφλαβίνης[16], πυριδοξίνης[17], παντοθενικού οξέος[16], κοβαλαμινών[18], ασκορβικού οξέος[19] και τοκοφερολών[20]. Στον διαχωρισμό υδατοδιαλυτών βιταμινών[21] χρησιμοποιώντας ειδικό χαρτί με ιδιότητες ιονανταλλάκτη. Στον διαχωρισμό λιποδιαλυτών βιταμινών[22] χρησιμοποιώντας χαρτί διαποτισμένο με alumina.

στ) Ιχνοστοιχεία: στην ανάλυση ιχνομετάλλων που καταλύουν την οξείδωση λιπαρών υλών[23]. Εδώ χρησιμοποιείται ειδική ποιότητα χαρτιού (μικρο-χρωματογραφία χαρτιού). Στον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων ευρέως φάσματος σε δημητριακά[24], οπωροκηπευτικά[24] και σε χρωστικές που χρησιμοποιούνται για τον τεχνητό χρωματισμό τροφίμων[25].

ζ) φυσικές χρωστικές: εκχυλίσματα τροφίμων χρωματογραφούνται σε χαρτί Whatman No 1 με συστήματα διαλυτών, όπως μίγμα n-βουτανόλη : οξικό οξύ:νερό (4:1:5) ή n-βουτανόλη:πυριδίνη:νερό (1:1:1). Η ταυτοποίηση των διαχωρισμένων χρωστικών γίνεται οπτικά[26].

η) Συνθετικές χρωστικές: Υδατοδιαλυτές χρωστικές απομονώνονται από τα τρόφιμα κατόπιν δέσμευσης πάνω σε μαλλί σε όξινο περιβάλλον και ακόλουθης αποδέσμευσης της χρωστικής κατόπιν εκχύλισης με οργανικό διαλύτη (π.χ. κινολίνη)[27]. Το εκχύλισμα εξετάζεται με κυκλική τεχνική ανάπτυξης. Λιποδιαλυτές χρωστικές απομονώνονται κατόπιν προσρόφησης σε ενεργοποιημένη alumina, αλλά εκλούονται με αιθανόλη[27].

θ) Υπολείμματα φυτοφαρμάκων: Στην ανάλυση χλωριωμένων εντομοκτόνων σε αυγά[28] με ευαισθησία της τάξης των 0.02 ppm. Στον προσδιορισμό χλωροφαινυλ-οξυ-οξέων στο σιτάρι[29] και μυκητοκτόνων περιεχόντων βάριο σε φρούτα[30]. Γενικά στην ανάλυση χλωριωμένων[31] και οργανοφοσφωρικών[32] φυτοφαρμάκων.

ι) Διάφορα: στην ανίχνευση νοθείας λαδιών, όπως το ελαιόλαδο, το κραμβέλαιο, το σογιέλαιο, το λινέλαιο. Το κραμβέλαιο διαπιστώνεται από το περιεχόμενο ερουκικό οξύ, το σογιέλαιο και λινέλαιο από το περιεχόμενο λινολεϊκό οξύ και το ηλιέλαιο από το περιεχόμενο λιγνοκερικό και βεχενικό οξυ. Η περιεκτικότητα σε βουτυρικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση νοθείας του βουτύρου με μαργαρίνη[33]. Στον προσδιορισμό υδρολυμένου αμυλοσιροπίου σε φυσικό μέλι[34]. Στην ανίχνευση νοθείας εγχρώμων φρουτοχυμών με χυμό επιδερμίδας σταφυλιού[35], από τη λήψη μεγάλου αριθμού κηλίδων-χρωστικών στο χρωματογράφημα. Στην νοθεία πορτοκαλοχυμού με εκχύλισμα σόγιας, από την ανίχνευση ραφινόζης και σταχυόζης που δεν απαντούν στον πορτοκαλοχυμό[36]. Στη νοθεία εκχυλίσματος βανίλιας με φυτικά εκχυλίσματα[37]. Στον προσδιορισμό γαλακτοματοποιητών στη μαργαρίνη[38], σε είδη αρτοποιΐας[39] και χυμούς φρούτων[40]. Στον προσδιορισμό ορισμένων αντιβιοτικών[41] με χρήση ειδικού χαρτιού. Στον προσδιορισμό χημικών συντηρητικών κατόπιν βρωμίωσης πάνω στο χαρτί, πριν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

από τη χρωματογράφηση[42].

2. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

α) Λιπαρές ύλες: το 1/3 περίπου των συνολικών εφαρμογών της TLC είναι στις λιπαρές ύλες. Οι τελευταίες προστίθενται σε πλάκες TLC διαποτισμένες με $AgNO_3$, οπότε διαχωρίζονται σύμφωνα με τον αριθμό και τη θέση των διπλών δεσμών στο μόριο τους[43]. Στρώσεις γύψου και $AgNO_3$ διαχωρίζουν μονο-δι και τριγλυκεριδικά λιπίδια κατά τάξεις[44,45].

Με TLC ανιχνεύεται η παρουσία λίπους γάλακτος σε ποσοστό 1% σε άλλα είδη λίπους[46] και η παρουσία συκωτιού σε κρεατοσκευάσματα[47]. Η μέθοδος επίσης χρησιμοποιείται στην ανάλυση των λιπαρών οξέων. Τα τελευταία υπό μορφή μεθυλεστέρων διαχωρίζονται σε πλάκες διαποτισμένες με $AgNO_3$, σύμφωνα με το μήκος της λιπαρής αλυσίδας και τη γεωμετρική διαμόρφωση των διπλών δεσμών στο μόριό τους[48]. Τα cis- και trans-ισομερή μονοενικών λιπαρών οξέων διαχωρίζονται πλήρως πάνω σε πλάκα από τάλκη (talc) με μίγμα αιθανόλης/οξικού οξέος/νερού (50:0.1:75)[49]. Στην ανάλυση φωσφολιπιδίων[50], τερπενικών σωμάτων[51], στον προσδιορισμό της τριγλυκεριδικής σύστασης του λίπους του γάλακτος[52] και λιποδιαλυτών χρωστικών[53].

Στον Πίνακα 2.7 δίνονται τα συστήματα διαλυτών για τον διαχωρισμό των λιπαρών κατά τάξεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.7

Διαλύτες για το διαχωρισμό των λιπαρών υλών κατά τάξεις με TLC σε Silica Gel

Λιπαρή τάξη	Διαλύτης
κηροί, υδρογονάνθρακες, λάδια	πετρ. αιθέρας — διαιθυλαιθέρας (19:1)
φυτικά και ζωικά λίπη	πετρ. αιθέρας — διαιθυλαιθέρας-οξικό οξύ (90:10:1)
λιπαρά οξέα και αλκοόλες	πετρ. αιθέρας — διαιθυλεθέρας-οξικό οξύ (35:15:1)
φωσφολιπίδια	χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (65:25:4 ή 13:6:1)

β) Υδατάνθρακες: στον προσδιορισμό σακχάρων[54-58], σακχαρόζης σε κρασί και μούστο[59] και λακτόζης στο γάλα υπό μορφή σκόνης που προστίθεται σε κρεατοσκευάσματα[60]. Στον Πίνακα 2.8 δίνονται τα αποτελέσματα ανάλυσης σακχάρων σε πλάκες Kieselguhr.

γ) Πρωτεΐνες: στην ανάλυση πρωτεϊνών πάνω σε πλάκες Sephadex[61], αμινοξέων της πατάτας[62] σε πλάκες κυτταρίνης και παραγώγων των αμινοξέων πάνω σε πλάκες Kieselgel G[63].

δ) Βιταμίνες: στην ανάλυση των βιταμινών A[64], B_1[65,66], B_2[65,66], B_6[65,66], B_{12}[67], C[65,66,68], D[64], E[64,69] και K[70].

Για την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος χρησιμοποιούνται τα εξής

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.8

TLC απλών σακχάρων σε Kieselguhr

Σάκχαρο	R_f x 100	Τελικό χρώμα με την προσθήκη ανισαλδεΰδης-θειϊκού οξέος
λακτόζη	4	πράσινο
μαλτόζη	6	μωβ
σακχαρόζη	8	μωβ
γλυκόζη	17	μπλε
γαλακτόζη	18	γκρι-πράσινο
μαννόζη	23	πράσινο
φρουκτόζη	25	μωβ
ριβόζη	49	μπλε

Διαλύτης: οξικός αιθυλεστέρας/ισοπροπανόλη/νερό (650:234:17).

Από Stahl and Kalthenbach, J. Chromatogr. 5,351 (1961)

συστήματα διαλυτών:

i) για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες: εξάνιο ή ακετόνη/εξάνιο/μεθανόλη (15:35:13) ή εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (9:1) ή εξάνιο/ακετόνη (9:1). Οι τοκοφερόλες διαχωρίζονται με $CHCl_3$ ή βενζόλιο ή βενζόλιο/μεθανόλη (49:1)

ii) για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες: πυριδίνη/οξικό οξύ/νερό (10:1:4) ή ακετόνη/διοξάνιο/25% NH_4OH (9:9:5).

Στον Πίνακα 2.9 φαίνονται τα αποτελέσματα του διαχωρισμού των βιταμινών του συμπλέγματος Β.

Για την εμφάνιση των βιταμινών Β χρησιμοποιούνται έγχρωμα αντιδραστήρια μικροβιολογικές μέθοδοι, αποτέφρωση με H_2SO_4 κ.α.

ε) Πρόσθετα: στον προσδιορισμό συνθετικών χρωστικών[71], επιτρεπομένων και μη[72,73] χημικών συντηρητικών[74,75], συνθετικών γλυκαντικών ουσιών[76,77] σε αναψυκτικά (σακχαρίνη, δουλσίνη, κυκλαμικό ασβέστιο), αντιοξειδωτικών σε λιπαρά δείγματα[78].

στ) Διάφορα: στον προσδιορισμό καταλοίπων φυτοφαρμάκων σε φυτικά τρόφιμα[79,80], αφλατοξινών σε φυστίκια[81,82], οπωροκηπευτικά[83] και σε γάλα[84,85], στη διαπίστωση της γνησιότητας προϊόντων όπως το εκχύλισμα βανίλιας[86] και κανέλλας[87], στην ανίχνευση νοθείας: φρουτοχυμών μήλου και κερασιού με χυμό προϊόντων κατώτερης ποιότητας[88], βρωσίμων λαδιών π.χ. ελαιόλαδο με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

λινέλαιο[90] ή σιναπελαίου με λινέλαιο[90] κ.τ.λ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.9

Διαχωρισμός TLC βιταμινών του συμπλέγματος Β σε Silica Gel

Βιταμίνη	$R_f \times 100$ σε διαλύτες	
	I	II
Φολικό οξύ	0	0
B_1, Θειαμίνη	5	0
B_{12}, κυανοκοβαλαμίνη	22	0
B_2, ριβοφλαβίνη	42	35
B_6, πυριδοξίνη	51	15
Νικοτιναμίδιο	50	65
Παντοθενικό οξύ	60	89
Νικοτινικό οξύ	76	75
Βιοτίνη	70	80
C, ασκορβικό οξύ	97	30

I νερό, II οξικό οξύ–ακετόνη–μεθανόλη–βενζόλιο (1:1:4:14).
Η βιταμίνη C συμπεριλαμβάνεται για λόγους σύγκρισης.

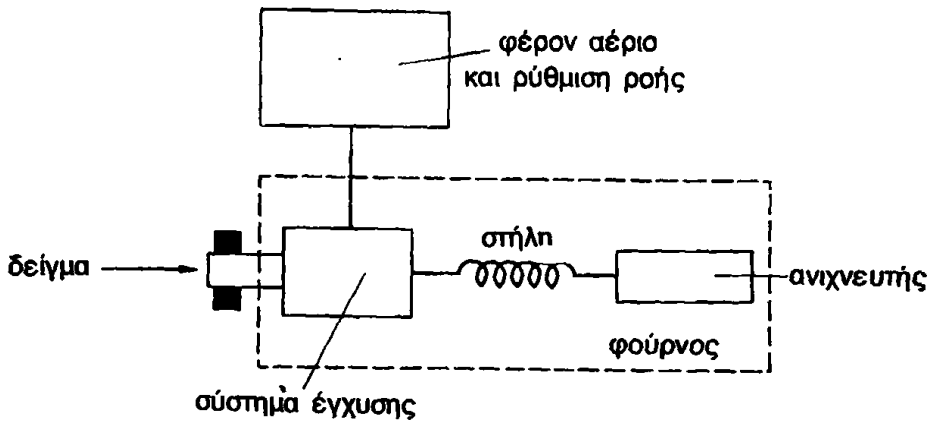
Από Ganshirt and Malzacher.
Naturwissen. 47,279 (1960)

2.8. Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Οι Martin και Synge το 1941 παρατήρησαν ότι η χρήση της αέριας φάσης διευκολύνει κατά πολύ το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Για επίτευξη γρήγορου και πλήρους διαχωρισμού το δείγμα πρέπει να διέλθει ταχέως μέσω της στατικής φάσης, ώστε να αποφευχθεί κατά το δυνατόν η διάχυση. Έτσι θα ληφθούν οξείες κορυφές, η κάθε μια από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα συστατικό του δείγματος.

Με τις παρατηρήσεις αυτές άρχισε να διαμορφώνεται η αέρια χρωματογραφία, η μέθοδος δηλαδή διαχωρισμού μίγματος στα συστατικά του, που λαβαίνει χώρα μεταξύ μιας υγρής ή στερεάς στατικής φάσης και μιας αέριας κινούμενης φάσης μέσα σε στήλη. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιεί ειδική συσκευή, τον αέριο χρωματογράφο, τα βασικά στοιχεία του οποίου φαίνονται στο σχήμα 2-15.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-15. Βασική διάταξη του αέριου χρωματογράφου

Α. Φέρον αέριο (carrier gas)

Αποτελεί το μέσον το οποίο μεταφέρει τις προς διαχωρισμόν ουσίες διαμέσου της στήλης. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή τις προς ανάλυση ουσίες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το N_2, He ή και το Ar. Η επιλογή γίνεται ανάλογα με τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιεί το χρωματογραφικό σύστημα (βλ. κεφ. 2.8 Ε). Το φέρον αέριο προσφέρεται στο εμπόριο σε οβίδες υπό πίεση. Η οβίδα φέρει ρυθμιστή πίεσης, με τη βοήθεια του οποίου το τελευταίο τροφοδοτείται στη στήλη υπό σταθερή πίεση.

Β. Ρυθμιστής πίεσης (pressure regulator)

Παίζει σημαντικώτατο ρόλο στο αεριοχρωματογραφικό σύστημα. Συνήθως η πίεση στην είσοδο της στήλης είναι 2-3 Atm, ενώ στην έξοδο ισούται προς την ατμοσφαιρική. Η τιμή της διαφοράς πίεσης εισόδου-εξόδου (ΔΡ) παίζει καθοριστικό ρόλο στον διαχωρισμό, γιατί αν μεν είναι πολύ χαμηλή, τα προς διαχωρισμόν συστατικά λόγω διάχυσης θα συνενώθούν (αλληλοεπικαλυφθούν) και η διαχωριστική ικανότητα της στήλης θα μειωθεί. Αν πάλι η ΔΡ είναι πολύ μεγάλη, η αντίσταση στη μεταφορά της μάζας των προς διαχωρισμόν ουσιών αυξάνεται υπερβολικά και πάλι η διαχωριστική ικανότητα της στήλης μειώνεται (βλ.: εξίσωση Van Deemter).

Γ. Θάλαμος εξαέρωσης (injection port)

Είναι το σημείο μέσω του οποίου εισάγεται το δείγμα στο χρωματογραφικό σύστημα χωρίς να διακοπεί η ροή του φέροντος αερίου. Ο θάλαμος εξάερωσης όπως υποδηλώνει και η ονομασία του, θερμαίνεται σε θερμοκρασία κατάλληλη για την άμεση εξαέρωση του δείγματος, εφ' όσον το δείγμα είναι υγρό. Οι συσκευές αέριας χρωματογραφίας κάποιας αξίας έχουν

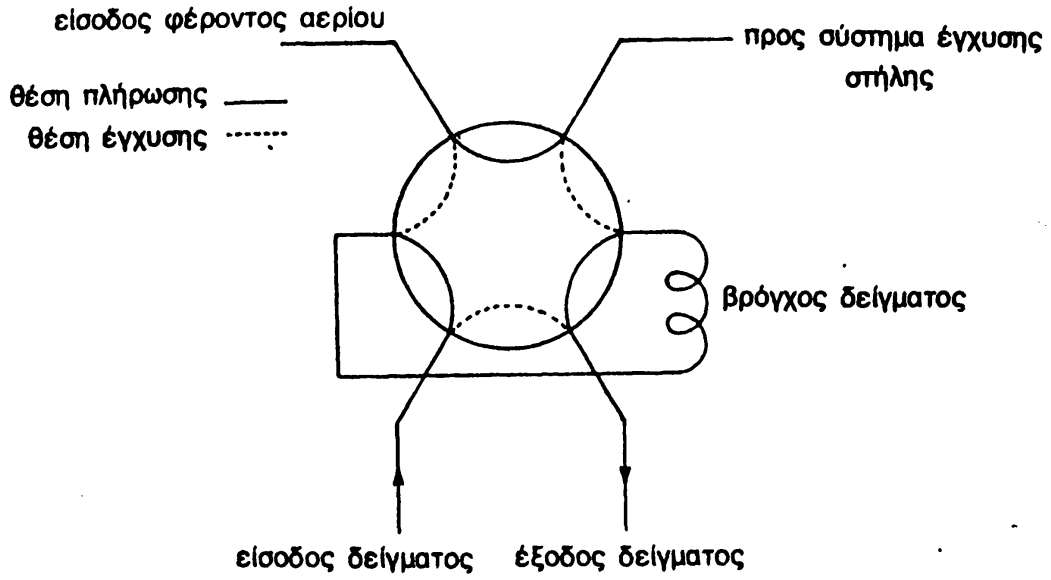
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ξεχωριστό θερμαντικό στοιχείο και θάλαμο για το σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται συνήθως με τη βοήθεια σύριγγας αεροστεγούς, όγκου 0.5-2ml προκειμένου για αέρια δείγματα και όγκου 1-10 μl, προκειμένου για υγρά δείγματα. Άλλος τρόπος εισαγωγής του δείγματος στη στήλη είναι: (1) ο αυτόματος δειγματολήπτης, (2) η βαλβίδα δειγματοληψίας (3) το σύστημα απ' ευθείας εισαγωγής κατόπιν πυρόλυσης κ.α.

(1) Ο αυτόματος δειγματολήπτης αποτελείται από φορητή συσκευή η οποία προσαρμόζεται κατάλληλα στο θάλαμο εξαέρωσης του αεριοχρωματογραφικού συστήματος. Φέρει μεγάλο αριθμό μονωμένων θαλάμων (μέχρι και 60) στους οποίους τοποθετούνται εκ των προτέρων τα υπό ανάλυση δείγματα. Η συσκευή προγραμματίζεται μέσω του συστήματος ώστε σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα π.χ. 1 ανά 1/2 hr να εισάγει αυτόματα τα δείγματα στον θάλαμο εξαέρωσης.

(2) Βαλβίδα δειγματοληψίας

Όπως φαίνεται στο σχήμα 2-16 η βαλβίδα έχει δύο θέσεις: τη θέση πλήρωσης και την θέση εισαγωγής του δείγματος. Έχει δε τη δυνατότητα να κινείται περιστροφικά μεταξύ αυτών των δύο θέσεων.



Σχ. 2-16. Αρχή λειτουργίας περιστροφικής βαλβίδας δείγματος

Στη θέση πλήρωσης το μεν φέρον αέριο κυκλοφορεί κανονικά μέσω του θαλάμου εξαέρωσης προς τη στήλη (συνεχής γραμμή σχ. 2-16) ενώ το δείγμα εισάγεται στη βαλβίδα και παγιδεύεται κανονικά στην περιέλιξη (Loop) του δείγματος. Στη θέση εισαγωγής, που προκύπτει με περιστροφή της βαλβίδας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κατά 60°, το φέρον αέριο διέρχεται δια μέσου της περιέλιξης του δείγματος και συμπαρασύρει το τελευταίο προς το θάλαμο εξαέρωσης (ασυνεχής γραμμή). Η περιέλιξη του δείγματος είναι βιδωτή και αντικαθίσταται εύκολα από άλλη επιθυμητού όγκου που κυμαίνεται μεταξύ 1-50μl.

(3) Σύστημα εισαγωγής κατόπιν πυρόλυσης.

Χρησιμοποιείται για στερεά και υγρά πολύ υψηλού Σ.Ζ. Το δείγμα μέσα στο θάλαμο πυρόλυσης καίγεται και τα προϊόντα πυρόλυσης του, που είναι πτητικά και χαρακτηριστικά της ύλης απ' την οποία προήλθαν εισάγονται απ' ευθείας στο θάλαμο εξαέρωσης. Το σύστημα πυρόλυσης αποτελεί μία μόνο εφαρμογή της γενικώτερης τεχνικής εισαγωγής δείγματος-προϊόντος κάποιας αντίδρασης-στον θάλαμο εξαέρωσης.

Δ. Στήλη-φούρνος (column-oven)

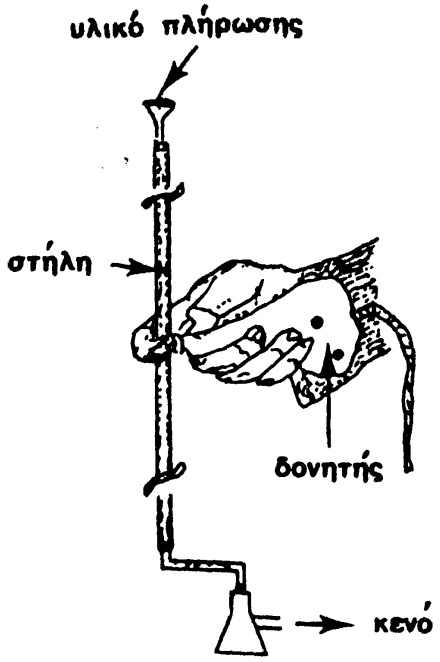
Η στήλη, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2-15 βρίσκεται μέσα σε θερμικά μονωμένα θάλαμο (φούρνο), η θερμοκρασία του οποίου ρυθμίζεται αυστηρά, κατά βούληση μεταξύ 25-400°C. Οι στήλες κατασκευάζονται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, αλουμίνιο ή και γυαλί με διάμετρο 0.64 (1/4 in) ή 0.32 cm (1/8 in) και μήκος από 1m μέχρι 3m. (Το μήκος των τριχοειδών στηλών φθάνει τα 300m). Ακόμη χρησιμοποιούνται στήλες διαμέτρου 0.95cm (3/8 in) για παρασκευαστικούς σκοπούς ή διαμέτρου 0.16 cm (1/16 in) για ειδικούς διαχωρισμούς. Οι τελευταίες είναι γνωστές σαν τριχοειδείς στήλες [capillary columns]. Για την εξοικονόμηση χώρου η στήλη τυλίγεται υπό μορφή πηνίου και συνδέεται στο άκρο της εισόδου της με το θάλαμο εξαέρωσης, στο δε άκρο της εξόδου της με τον ανιχνευτή. Η λειτουργία του φούρνου του χρωματογράφου μπορεί να είναι **ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας** κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Η δεύτερη αυτή περίπτωση εφαρμόζεται συνήθως όταν το προς διαχωρισμόν μίγμα αποτελείται από συστατικά χαμηλού και υψηλού αντίστοιχα Σ.Ζ. Αρχικά ρυθμίζεται η θερμοκρασία της στήλης σε χαμηλά επίπεδα οπότε εκλούονται οι χαμηλού Σ.Ζ. ενώσεις. Στη συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία της στήλης σύμφωνα με κάποιο πρόγραμμα π.χ. 20°C/min και εκλούονται σε λογικό χρόνο ουσίες υψηλού Σ.Ζ. που διαφορετικά θα απαιτούσαν πολύ μεγάλο χρόνο. Αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί, εν τούτοις, διάχυση του δείγματος μέσα στη στήλη και ελαττώνει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού (βλ. θεωρία αέριας χρωματογραφίας).

1. Πλήρωση της στήλης

Οι στήλες όσον αφορά τον τρόπο πλήρωσης διακρίνονται σε α) packed (με πλήρωση) και β) coated (με επικάλυψη). Στις πρώτες η στατική φάση διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη αναμιγνύεται με το αδρανές υλικό,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

απομακρύνεται ο διαλύτης συνήθως σε εξατμιστή κενού και το υλικό προστίθεται στη στήλη σύμφωνα με τη διαδικασία της διάταξης του σχήματος 2-17.



Σχ. 2-17. Πλήρωση της αεριοχρωματογραφικής στήλης

Το κάτω άκρο της στήλης που έχει κλειστεί με κομμάτι υαλοβάμβακα συνδέεται με αντλία κενού, ενώ από το πάνω άκρο προστίθεται το υλικό πλήρωσης μέσω μικρού χωνιού. Ταυτόχρονα δονούνται τα τοιχώματα της στήλης με ηλεκτρικό δονητή (vibrator) για την ομοιόμορφη πλήρωση και αποφυγή δημιουργίας κενών στο εσωτερικό της στήλης. Στις δεύτερες, που είναι συνήθως τριχοειδείς, προστίθεται διάλυμα 1-15% της στατικής φάσης στην είσοδο της στήλης και προωθείται στο εσωτερικό αυτής κατόπιν σύνδεσης της εισόδου της στήλης με το φέρον αέριο παροχής 2-5 ml/min. Αφού καλυφθούν τα τοιχώματα της στήλης με στρώμα πάχους 0.3-2 μm του υλικού, συνεχίζεται η διαβίβαση του φέροντος αερίου με μεγαλύτερη ταχύτητα για να απομακρυνθεί ο διαλύτης.

2. Αδρανές υλικό

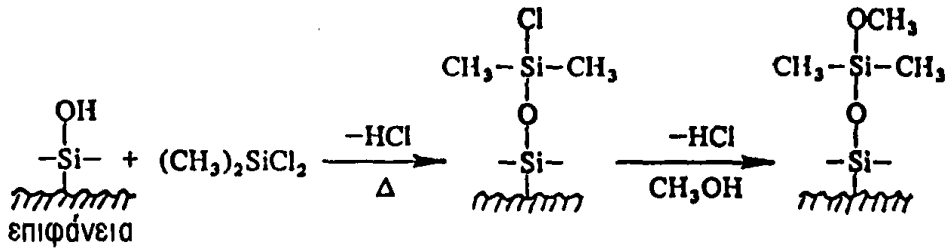
Το αδρανές υλικό έχει σκοπό να συγκρατήσει τη στατική φάση μέσα στη στήλη. Τα πιο συνηθισμένα αδρανή υλικά που χρησιμοποιούνται είναι:

α) Chromosorb P. Είναι γη διατόμων που έχει κοσκινιστεί σε αυστηρά καθορισμένο μέγεθος κόκκων. Έχει επιφάνεια 4-6 m^2/g.

(β) Chromosorb W. Είναι επίσης γη διατόμων κατεργασμένη με 3% Na_2CO_3. Έχει επιφάνεια 1-3.5m^2/g.Το υλικό αυτό είναι πιο αδρανές από το P, αλλά

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

παρέχει μικρότερη διαχωριστική ικανότητα από το P.
(γ) Chromosorb G. Συγκεντρώνει τα πλεονεκτήματα του P με ελαττωμένο ποσοστό επιφανειακής προσρόφησης, και χαμηλότερο ποσοστό αποικοδόμησης με τη χρήση.
(δ) Σιλανοποιημένα υποστρώματα.
Είναι υλικά με βάση το Chromosorb που έχουν επικαλυφθεί με διμεθυλοδιχλωροσιλάνιο (DMCS) για την ελάττωση της επιφανειακής ενεργότητας του υλικού. Το τροποιποιημένο με DMCS Chromosorb παρέχει οξύτερες κορυφές στο χρωματογράφημα. Η αντίδραση του υποστρώματος με το DMCS έχει ως εξής:



Λαβαίνει δηλαδή χώρα αντίδραση του DMCS με τις -OH ομάδες στην επιφάνεια του αδρανούς υλικού.
(ε) Fluoropak 80 και Chromosorb T.
Αποτελούνται από πολυμερές με βάση τους φθοριομένους υδρογονάνθρακες και χρησιμοποιούνται για διαχωρισμούς πολικών ενώσεων, όπως NH_3, CH_3COOH, RNH_2 κ.α.
(στ) Γυάλινα σφαιρίδια
Χρησιμοποιούνται σαν αδρανές υλικό με στατική φάση που δεν υπερβαίνει το 0.25% κ.β. Χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πολικών, υψηλού ΜΒ μορίων.

3. Στατική φάση

Οι στατικές φάσεις μπορούν να καταταγούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την πολικότητα τους:
α) μη πολικές
Είναι οι περισσότερες υγρές, αποτελούμενες από υδρογονάνθρακες. Έχουν βάση τη σιλικόνη π.χ. SE-30, το σκουαλένιο, OV-17, OV-101. Δεν περιέχουν αρωματικές ενώσεις. Ενδείκνυνται για το διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων.
β) σχετικά πολικές
Αποτελούνται από μακρυές αλυσίδες μη πολικών ενώσεων που φέρουν πλευρικές πολικές ομάδες ή ομάδες που μπορούν να καταστούν πολικές. π.χ. SE-52, διϊσοδεκυλ-φθαλικός εστέρας.
γ) πολικές

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Είναι συνήθως υγρές φάσεις με μεγάλο ποσοστό πολικών ομάδων π.χ. Carbowax 20M, Porapak Q, N κ.α. Ενδείκνυνται για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων.

4. Στερεά προσροφητικά

Η αέρια χρωματογραφία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1 μπορεί να είναι αερίου/στερεού ή αερίου/υγρού, ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης. Στη χρωματογραφία αερίου/στερεού, σαν στατική φάση χρησιμοποιούνται στερεοί προσροφητές, όπως αλουμίνα (Al_2O_3), Silica gel και Molecular Sieve για το διαχωρισμό κυρίως αερίων μιγμάτων (Πίνακας 2.10). Κοινός προσροφητής είναι επίσης το Porapak, πορώδες υλικό που παρασκευάζεται κατόπιν πολυμερισμού μονομερών, όπως στυρόλιο με διβινυλοβενζόλιο σαν μέσο διακλάδωσης του πολυμερούς. Ενδείκνυται για τον διαχωρισμό αερίων και πολικών ενώσεων. Με τις παραπάνω πρώτες ύλες παρασκευάζονται τα Porapak Q και P, ενώ τα Porapak N,S,T διαφοροποιούνται με την προσθήκη πολικών μονομερών. Στον Πίνακα 2.10 φαίνονται μερικές από τις πιο συνηθισμένες στατικές φάσεις σε σχέση με τις κατηγορίες των ενώσεων, για το διαχωρισμό των οποίων, χρησιμοποιούνται.

5. Κοντισιονάρισμα της στήλης

Οι στήλες πριν χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένο διαχωρισμό τίθενται σε λειτουργία κάτω από συνθήκες παραπλήσιες εκείνων της ανάλυσης (κοντισιονάρισμα). Ο χρόνος του κοντισιοναρίσματος είναι 10-20 hrs, σε θερμοκρασία 10-20°C υψηλότερη από την αντίστοιχη θερμοκρασία ανάλυσης. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται από τη στήλη κατάλοιπα διαλυτών, πτητικά και λοιπά προϊόντα που πιθανόν να προκαλέσουν παρεμποδίσεις στον διαχωρισμό των συστατικών του υπό εξέταση δείγματος. Κατά το κοντισιονάρισμα αφήνεται το φέρον αέριο, σε χαμηλή ροή(5-10 ml/min) να διέλθει μέσω της στήλης, η έξοδος της οποίας δεν έχει συνδεθεί με τον ανιχνευτή προς αποφυγή μόλυνσης του τελευταίου. Μετά το τέλος του κοντισιοναρίσματος συνδέεται η στήλη κανονικά στον ανιχνευτή και ρυθμίζεται επακριβώς η παροχή του φέροντος αερίου. Στην πράξη η παροχή κυμαίνεται μεταξύ 15-60 ml/min ανάλογα με τις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος.

Ε. Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής είναι το όργανο που μετράει διαφορές στη σύσταση του υλικού το οποίο εκλούεται από τη στήλη. Υπάρχουν αρκετοί τύποι ανιχνευτών, οι κυριώτεροι από τους οποίους είναι (1) ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας, (2) ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας και (3) ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων. Η επιλογή του κατάλληλου για κάθε διαχωρισμό ανιχνευτή γίνεται με βάση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.10

Μερικές συνηθισμένες στατικές φάσεις και οι εφαρμογές τους.

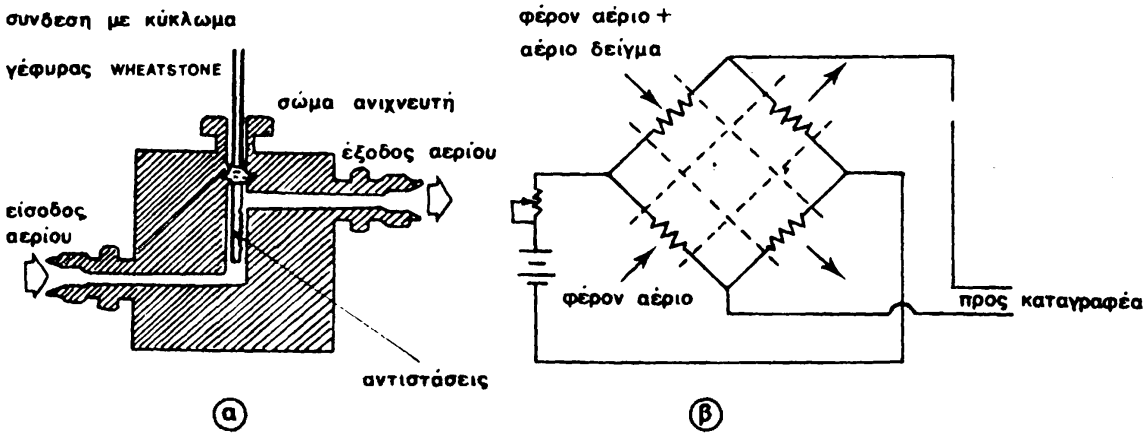
Στατική φάση	Εφαρμογή
	Οξέα
Porapak T6%	C_1-C_9
DEGS, Apiezon L	λιπαρά-μεθυλεστέρες
	Αλκοόλες
Porapak Q, Chromosorb 101, 102, Carbowax 1540	C_1-C_5
Carbowax 20M	C_1-C_{18}
	Αλδεΰδες
Porapak Q, Chromosorb 101, 102	C_1-C_5
Carbowax 20M	C_5-C_{18}
QI-1, SE-30	**Αλκαλοειδή**
OV-17	**Παράγωγα αμινοξέων**
	Εστέρες
Porapak Q, Chromosorb 101, 102	Μικτοί
OV-1, OV-101	τριγλυκερίδια
Carbowax 20M	**Αιθέρες**
Porapak Q, Chromosorb 101, 102	**Γλυκόλες**
Διϊσοδεκυλ-φθαλικός εστέρας, QF-1	**Αλογονοπαράγωγα**
	Υδρογονάνθρακες
Διϊσοδεκυλ-φθαλικός εστέρας, Carbowax 400	Αλιφατικοί C_1-C_5
SE-30, OV-1	C_5-C_{16}
Τρικρεσυλ φωσφορικός εστέρας, Carbowax	Αρωματικοί
SE-30	Πολιαρωματικοί
Porapak Q, Chromosorb 101, 102	**Κετόνες**
Porapak R, T, Chromosorb 104	**Νιτροενώσεις**
OV-225	**Νιτρίλια**
QF-1, SE-52, OV-17	**Παράγωγα σακχάρων**
QF-1, SE-30, OV-1, OV-17, OV-101, OV-225	**Εντομοκτόνα**
Carbowax 20 M, Porapak Q, Chromosorb 104	**Θειοενώσεις**
Porapak, Chromosorb 102	**νερό**
	αέρια
Molecular sieve SA	O_2
Silica gel, Porapak Q	CO_2
Porapak Q, Chromosorb 102	NO_2, NO

τη φύση του προς διαχωρισμόν μίγματος και το επιθυμητό όριο ευαισθησίας. Στη συνέχεια αναπτύσσεται η αρχή λειτουργίας των βασικών τύπων ανιχνευτών.

(1) **Ανιχνευτής Θερμικής αγωγιμότητας** (Thermal Conductivity Detector, TCD)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Αποτελείται από σύρμα-αντίσταση κατασκευασμένο από βολφράμιο και κατάλληλα τοποθετημένο στο θερμικά μονωμένο θάλαμο του ανιχνευτή (σχ. 2-18α). Το σύρμα θερμαίνεται με τη βοήθεια ρεύματος σταθερής έντασης.



Σχ. 2-18. Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (α) κάτοψη (β) ηλεκτρικό κύκλωμα

Το φέρον αέριο διερχόμενο μέσω του ανιχνευτή ψύχει το σύρμα με αποτέλεσμα την ελάττωση της ηλεκτρικής αντίστασής του. Επειδή τα διαχωριζόμενα συστατικά του μίγματος έχουν διαφορετικές τιμές θερμικής αγωγιμότητας από εκείνη του φέροντος αερίου, τόσο η θερμοκρασία όσο και η τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του σύρματος θα μεταβάλλοναι καθώς το κάθε συστατικό του μίγματος θα διέρχεται μέσω του ανιχνευτή. Όσο μεγαλύτερη η διαφορά στην τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας των συστατικών του μίγματος και του φέροντος αερίου, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ευαισθησία της μεθόδου.

Τα παραπάνω σύρματα (filaments) συνήθως τοποθετούνται ανά ζεύγη, ένα ζεύγος που διαρρέεται από το δείγμα και το φέρον αέριο και ένα ζεύγος που διαρρέεται από το φέρον αέριο. Η σύνδεση τους είναι τέτοια ώστε να αποτελούν τις τέσσερις πλευρές γέφυρας Wheatstone (σχ. 2-18β).

Όταν μέσω του ανιχνευτή δεν διέρχεται δείγμα και οι τέσσερις αντιστάσεις αλληλοεξουδετερώνονται αφού έχουν την ίδια τιμή, με αποτέλεσμα να μην φθάνει σήμα στον καταγραφέα. Αντίθετα η είσοδος κάποιου συστατικού στον ανιχνευτή θα ελαττώσει την θερμική αγωγιμότητα του φέροντος αερίου που με τη σειρά της θα προκαλέσει μεταβολή στην ηλεκτρική αντίσταση των συρμάτων του δείγματος, με αποτέλεσμα την καταστροφή της ισορροπίας στην γέφυρα και τη δημιουργία κάποιου σήματος που θα φθάσει στον καταγραφέα.

Ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

α) ενδείκνυνται για τον προσδιορισμό ουσιών που δεν καίγονται π.χ. H_2O, CO_2, N_2 κ.τ.λ.

(β) παρέχει ευθύγραμμη απόκριση μεταξύ ευρέων ορίων συγκέντρωσης

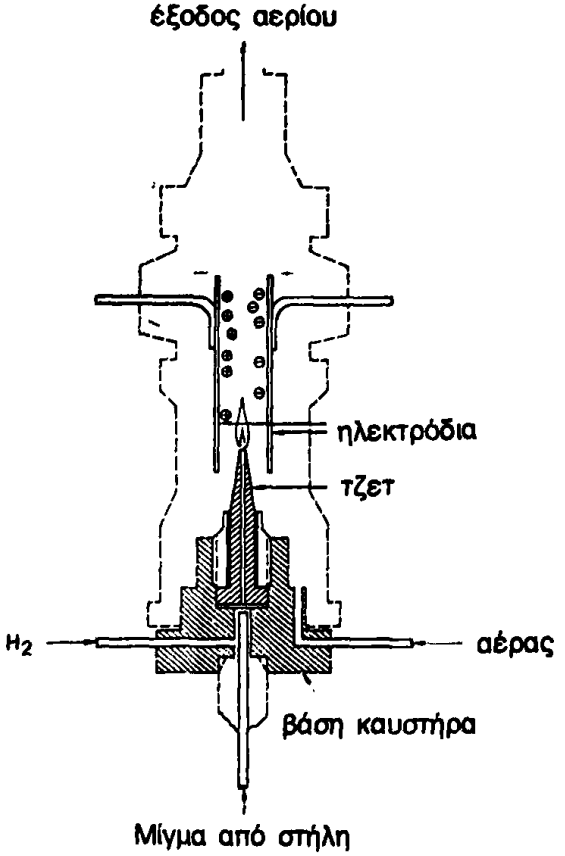
(γ) έχει αυξημένη ευαισθησία έναντι μεταβολών στη ροή του φέροντος αερίου και τη θερμοκρασία.

(δ) δέχεται σαν φέρον αέριο τα: He, H_2, N_2, Ar, CO_2.

(ε) έχει σαν ανώτατο όριο λειτουργίας τους 500°C.

(2) Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame ionization detector F.I.D.)

Αποτελείται από καυστήρα αερίου στο άκρο του οποίου καίγεται μίγμα υδρογόνου και αέρα παρουσία του φέροντος αερίου, οπότε δημιουργείται φλόγα θερμοκρασίας 2100°C (σχήμα 2-19).



Σχ. 2-19. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

Όταν από τη στήλη εκτός του φέροντος αερίου εξέρχεται κάποιο συστατικό, καίγεται στο ακροφύσιο και ιονιζόμενο παράγει θετικά και αρνητικά φορτισμένα ιόντα, (Το H_2 παράγει πολύ λιγότερα ιόντα από οποιαδήποτε οργανική ουσία περιέχουσα άνθρακα). Γύρω από το ακροφύσιο υπάρχουν δύο ηλεκτρόδια (συλλέκτες ιόντων) τα οποία έλκουν τα σχηματιζόμενα ιόντα. Η κίνηση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αυτή των ιόντων δημιουργεί ρεύμα της τάξης των 10^{-14} amp το οποίο αφού πολλαπλασιαστεί μετατρέπεται σε μηχανική κίνηση της γραφίδας του καταγραφέα (λήψη κορυφής που αντιστοιχεί στο εκλουόμενο από τη στήλη συστατικό).

Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

(α) Ενδείκνυται για όλες σχεδόν τις οργανικές ουσίες.

(β) Αντεδείκνυται για ανόργανες ουσίες, H_2O και αέρια, όπως O_2, H_2S, CO_2, NO_2.

(γ) Παρέχει ευθύγραμμη απόκριση μεταξύ ευρέων ορίων συγκέντρωσης.

(δ) έχει σαν ανώτατο όριο λειτουργίας την θερμοκρασία 400°C.

(ε) χρησιμοποιεί σαν φέρον αέριο το N_2, He ή το Ar.

(στ) Είναι περίπου 10^3 φορές πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (όριο ανίχνευσης ~ 1ng).

3. Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector E.C.D)

Εδώ αντί φλόγας για την δημιουργία ιόντων, χρησιμοποιούνται ηλεκτρόνια υψηλών ταχυτήτων (β-σωματίδια). Σαν πηγή β-σωματιδίων χρησιμοποιούνται τα Sr^{90} και H^3. Ο ανιχνευτής αποτελείται από θερμικά μονωμένο θάλαμο εφοδιασμένο με δύο ηλεκτρόδια στα άκρα των οποίων εφαρμόζεται τάση 300-500V. Τα παραγόμενα από την πηγή ηλεκτρόνια κινούμενα ταχέως στο μεταξύ των ηλεκτροδίων χώρο δημιουργούν ηλεκτρικό ρεύμα που με τη σειρά του δίνει κάποιο ηλεκτρικό σήμα. Όταν στον μεταξύ των ηλεκτροδίων χώρο εκλουσθεί κάποιο συστατικό του προς διαχωρισμόν μίγματος τότε μερικά από τα ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια συλλαμβάνονται από τα μόρια του συστατικού (δεν έχουν αρκετή ενέργεια για να προκαλέσουν ιονισμό των ατόμων του δείγματος) με αποτέλεσμα να μειώνεται ο αριθμός των ελεύθερων ηλεκτρονίων στον παραπάνω χώρο. Έτσι παρατηρείται μια μεταβολή στο αρχικό ηλεκτρικό σήμα, το μέγεθος της οποίας είναι συνάρτηση της φύσης και της ποσότητας του εκλουσθέντος συστατικού.

Τα χαρακτηριστικά του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων είναι:

(α) ενδείκνυται για αλογονωμένες ενώσεις, συζυγείς καρβονυλικές ενώσεις, νιτρίλια και οργανομεταλλικές ενώσεις.

(β) η ευαισθησία του είναι της τάξης του 0.1 pg (10^{-13}g). Είναι δηλαδή 10^3-10^4 φορές πιο ευαίσθητος από του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας

(γ) Παρέχει ευθύγραμμη απόκριση μεταξύ στενών σχετικά ορίων συγκέντρωσης.

(δ) Δεν ενδείκνυται για ανόργανες ουσίες, εκτός όσες περιέχουν αλογόνα, S, N κ.α.

(ε) Είναι πολύ ευαίσθητος στις μεταβολές θερμοκρασίας της στήλης

(στ) Έχει ανώτατο όριο λειτουργίας Θ=220°C

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(ζ) χρησιμοποιεί N_2 υψηλής καθαρότητας σαν φέρον αέριο.

ΣΤ. Καταγραφέας

Είναι το όργανο που μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα που φτάνει από τον ανιχνευτή, σε μηχανική κίνηση. Κατάλληλα προσαρμοσμένη γραφίδα καταγράφει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα εκλουόμενα από τη στήλη συστατικά του προς διαχωρισμόν μίγματος.

Ζ. Θεωρία Αέριας Χρωματογραφίας

Κάτω από τις παραπάνω αυστηρά καθορισμένες συνθήκες ροής, θερμοκρασίας και φύσης της στατικής φάσης τα διαχωριζόμενα συστατικά του δείγματος εκλούονται σε καθορισμένα για κάθε συστατικό χρονικά διαστήματα. Σαν χρόνος κατακράτησης του συστατικού (1) ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί από την έγχυση του δείγματος στο θάλαμο εξαέρωσης, μέχρι της λήψης του μεγίστου της κορυφής που αντιστοιχεί στο συστατικό αυτό (σχ. 2-20).

Αντίστοιχα σαν όγκος κατακράτησης (V_R) του συστατικού (1) ορίζεται το γινόμενο του χρόνου κατακράτησης επί τον όγκο του φέροντος αερίου (V_{CG}) που διήλθε από το σύστημα από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος μέχρι της λήψης του μεγίστου της κορυφής· δηλαδή,

$$V_R = t_r \cdot V_{CG} \qquad (2.13)$$

Όπως ακριβώς και στη χρωματογραφία χάρτου και την TLC, έτσι κι εδώ η στήλη θεωρείται ότι αποτελείται από μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών, σε κάθε μία από τις οποίες αποκαθίσταται ισορροπία κάθε συστατικού του προς διαχωρισμόν μίγματος, μεταξύ της κινούμενης και της στατικής φάσης. Όσες περισσότερες θεωρητικές πλάκες έχει μια στήλη τόσο μεγαλύτερη θα είναι η διαχωριστική ικανότητα αυτής (βλ. παρακάτω).

Αν N=ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, τότε:

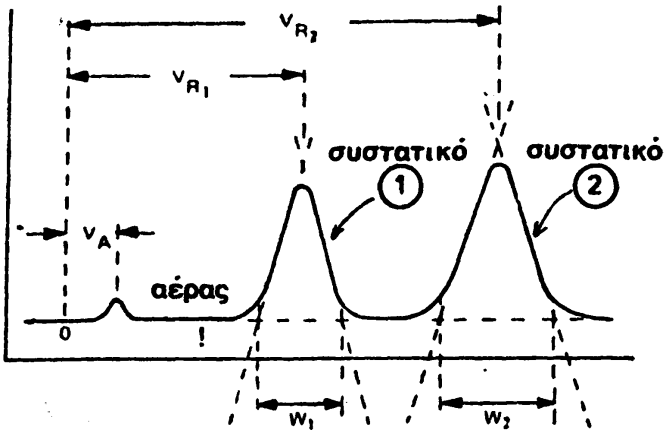
$$N = \left[4 \frac{V_{R1}}{w_1}\right]^2 \qquad (2.14)$$

όπου: V_{R_1} = όγκος κατακράτησης του συστατικού (1).

w_1 = μήκος βάσης του υποθετικού τρίγωνου που κατασκευάζεται για τη κορυφή του συστατικού (1) στο χρωματογράφημα (Σχ. 2-20). Όπως φαίνεται και από την εξίσωση (2.14), αυξανομένου του V_{R_1} αυξάνεται το N, συνεπώς και η διαχωριστική ικανότητα της στήλης. Ακόμη για υψηλό N, ελαττώνεται το w_1· δηλαδή σε έναν καλό διαχωρισμό οι κορυφές που λαμβάνονται είναι οξείες ($w_1 \rightarrow 0$).

Το HETP (height equivalent to a theoretical plate), το ύψος ή μήκος δηλ. της στήλης που απαιτείται για επίτευξη ισορροπίας του συστατικού x μεταξύ της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-20. Αεριοχρωματογράφημα

κινούμενης και της στατικής φάσης δίνεται από τη σχέση (2.15)

$$HETP = \frac{L}{N} \qquad (2.15)$$

όπου: L= μήκος στήλης (mm)

Με αντικατάσταση της (2.14) στην (2.15) προκύπτει:

$$HETP = \frac{L}{\left[4\,\frac{V_{R1}}{W_1}\right]^2} = L\left[\frac{W_1}{4V_{R1}}\right]^2 \qquad (2.16)$$

Το τελευταίο αυτό μέγεθος (HETP) αποτελεί μέτρο της «ποιότητας» της στήλης. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του HETP τόσο μεγαλύτερη είναι η α π ό δ ο σ η της στήλης (column efficiency) π.χ. μια στήλη μήκους 2m με 2000 «πλάκες», έχει τη μισή απόδοση από μια στήλη 1m με τον ίδιο αριθμό πλακών. Στην πράξη επιζητείται τιμή μεταξύ 500-1000 πλακών/30 cm ή 1500-3000 πλακών/m στήλης. Η απόδοση της στήλης εξαρτάται από τον τρόπο πλήρωσης της στήλης, τη θερμοκρασία, την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου, τη φύση της στατικής φάσης, τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος κ.α.

Η απόδοση της στήλης εκφράζεται επίσης και από την σχέση (2.17).

$$HETP = 2\lambda dp + \frac{2\gamma D_g}{\bar{\mu}} + \frac{8}{\pi^2}\cdot\frac{\kappa\bar{\mu}}{(\kappa+1)^2}\cdot\frac{df^2}{D_L} \qquad (2.17)$$

όπου: λ= σταθερά σχετιζόμενη με τη γεωμετρία των κόκκων του υλικού πλήρωσης της στήλης.

dp= μέση διάμετρος κόκκων του υλικού πλήρωσης

γ= παράγοντας αναφερόμενος στο είδος της διαδρομής των μορίων του αερίου δια μέσου της στήλης

Dg, DL= συντελεστές διάχυσης του συστατικού x, στην κινούμενη και τη στατική φάση αντίστοιχα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κ= συντελεστής χωρητικότητας ίσος προς V_L/V_g για δοσμένο τμήμα στήλης

$\bar{\mu}$= μέση ταχύτητα αερίου στην έξοδο της στήλης

df= πάχος της υγρής φάσης στον κόκκο της στατικής φάσης

V_g, V_L= όγκος της αέριας και υγρής φάσης αντίστοιχα.

Η εξίσωση (2.17) γνωστή και σαν εξίσωση Van Deemter μπορεί να γραφεί υπό την εξής μορφή:

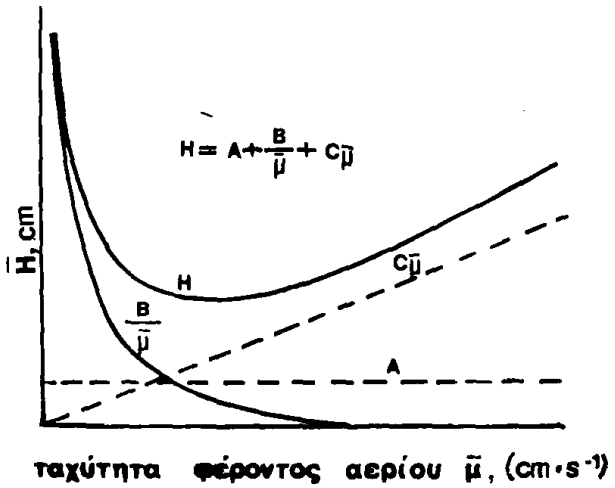
$$HETP = A + \frac{B}{\bar{\mu}} + C\bar{\mu} \qquad (2.18)$$

όπου: A= σταθερά γνωστή σαν παράγοντας διάχυσης κατά Eddy

B= σταθερά γνωστή σαν παράγοντας μοριακής διάχυσης

C= σταθερά γνωστή σαν παράγοντας αντίστασης μεταφοράς μάζας στη στατική φάση.

Η πρακτική έννοια της εξίσωσης (2.17) είναι ότι με ρύθμιση των παραγόντων $\bar{\mu}$, df, dp, λ και κ είναι δυνατόν να μεγιστοποιηθεί η απόδοση του χρωματογραφικού συστήματος. Γραφική παράσταση του HETP έναντι του $\bar{\mu}$ για ένα συστατικό x δίνει την καμπύλη του σχήματος 2.21.



Σχ. 2-21. Γραφική παράσταση εξίσωσης Van Deemter

Υπάρχει δηλαδή μια τιμή παροχής του φέροντος αερίου για την οποία το HETP ελαχιστοποιείται και συνεπώς αυξάνει η απόδοση της στήλης. Ο παράγοντας A είναι ανεξάρτητος από την παροχή του φέροντος αερίου και σχετίζεται με τη γεωμετρία των κόκκων του υλικού πλήρωσης της στήλης (μέγεθος κ.α.). Από το σχ. 2.21 φαίνεται πως το HETP μειώνεται καθώς το μέγεθος των κόκκων του υλικού πλήρωσης μειώνεται. Αυτό σημαίνει πως υλικό 100/120 Mesh θα δώσει οξύτερες κορυφές από υλικό 80/100 Mesh. Τα μεγαλύτερα μεγέθη κόκκων π.χ. 60/80 Mesh ενδείκνυται να χρησιμοποιού-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νται μόνο για στήλες μεγάλου μήκους, προς αποφυγή δημιουργίας πολύ υψηλών πιέσεων στο εσωτερικό της στήλης.
Ο παράγοντας Β είναι μέτρο της διάχυσης του δείγματος στο φέρον αέριον. Όσο πιο ομοιόμορφο μέγεθος και σχήμα έχει το υλικό πλήρωσης τόσο μικρότερος θα είναι ο παράγοντας γ (εξίσωση 2.17) και τόσο πιο καλός θα είναι ο διαχωρισμός (μικρό HETP). Για το λόγο αυτό πρέπει να αποφεύγεται το σπάσιμο του υλικού πλήρωσης κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας και τη διαδικασία πλήρωσης της στήλης.
Ο τρίτος παράγοντας C έχει σχέση με τη μοριακή διάχυση του αναλυόμενου συστατικού. Η εξίσωση 2.17 δείχνει πως το HETP αυξάνει ανάλογα με το τετράγωνο του «πάχους» df της στατικής φάσης. Δηλαδή ενδείκνυνται χαμηλά ποσοστά επικάλυψης αδρανών υλικών με στατική φάση (2-15%) για ελαχιστοποίηση του HETP.
Συμπερασματικά μια «καλής ποιότητας» στήλη πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:
(α) να έχει χαμηλό ποσοστό επικάλυψης του αδρανούς υλικού με στατική φάση
(β) το μέγεθος του υλικού πλήρωσης να είναι στενού εύρους και μικρής διαμέτρου κόκκων
(γ) να χρησιμοποιείται χαμηλή παροχή φέροντος αερίου πλησίον της τιμής για την οποία ελαχιστοποιείται το HETP κατά Van Deemter.
Η απόδοση του χρωματογραφικού συστήματος εκτός από την απόδοση της στήλης εξαρτάται και από την α π ό δ ο σ η του διαλύτη (solvent efficiency). Η απόδοση του διαλύτη έχει σχέση με το βαθμό διαχωρισμού δύο διαδοχικών κορυφών ή άλλως με το πηλίκον V_{R_2}/V_{R_1} (σχ. 2-20). Για καλό διαχωρισμό θα πρέπει το πηλίκον αυτό να είναι σημαντικά μεγαλύτερο της μονάδας. Η τιμή του πηλίκου ελέγχεται με κατάλληλη επιλογή του υλικού της στατικής φάσης:
Σαν βαθμός ή ικανότητα διαχωρισμού (Resolution, R) δύο συστατικών (1) και (2) στο χρωματογράφημα ορίζεται το πηλίκον:

$$R = \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{1/2\ (w_1+w_2)} \qquad (2.19)$$

όπου: t'_{R_2}, t'_{R_1} = διορθωμένος χρόνος κατακράτησης των συστατικών (2) και (1) αντίστοιχα

w_1, w_2 = μήκος βάσης υποθετικού τριγώνου που σχηματίζει η κάθε κορυφή στο χρωματογράφημα (σχ. 2-20)

Σαν t'_{rv}, ορίζεται η διαφορά: $t_{rv}-t_{ro}$
όπου: t_{rv} = χρόνος κατακράτησης συστατικού v

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

t_{r0}=χρόνος κατακράτησης αδρανούς μή κατακρατούμενης ουσίας π.χ. αέρας (σχ. 2-20)

Η. Εφαρμογές Αέριας Χρωματογραφίας

Η αέρια χρωματογραφία βρίσκει σειρά εφαρμογών αφ' ενός μεν στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αερίων, πτητικών υγρών ή και στερεών που με διάφορες μεθόδους είναι δυνατόν να μετατραπούν σε πτητικά προϊόντα, αφ' ετέρου δε για παρασκευαστικούς σκοπούς (χρήση ειδικών στηλών μεγάλης διαμέτρου).

1. Ποιοτική Ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω κάτω από δοσμένες χρωματογραφικές συνθήκες (στήλη, θερμοκρασία, παροχή φέροντος αερίου κ.τ.λ.), κάθε ουσία έχει χαρακτηριστικό χρόνο και όγκο κατακράτησης. Αν συνεπώς γίνει σύγκριση του t_r γνωστής ουσίας με τον αντίστοιχο t_r της υπό εξέταση ουσίας κάτω από τις ίδιες πάντα συνθήκες χρωματογράφησης είναι δυνατόν να γίνει ταυτοποίηση της τελευταίας. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η προκύπτουσα ταυτοποίηση είναι «αρνητική». Όπως δηλαδή ελέχθει και για το R_f, υπάρχουν και εδώ περισσότερες της μιας ουσίες οι οποίες κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες δίνουν τον ίδιο χρόνο κατακράτησης.

Για τη βελτίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται:

(1) σύστημα διαφορετικών στηλών: Συνήθως χρησιμοποιούνται συστήματα: (α) μη πολικής, (β) μετρίως και (γ) πολικής στήλης που αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα ταυτοποίησης μιας ουσίας μια και είναι κάπως απίθανο να συμπίπτουν οι χρόνοι κατακράτησης των δύο ουσιών (άγνωστης, πρότυπης) και στα τρία χρωματογραφικά συστήματα, χωρίς να ταυτίζονται οι δύο.

(2) Δείκτης Kovats:

Η μέθοδος αντί σύγκρισης των t_r της άγνωστης και πρότυπης ουσίας χρησιμοποιεί σύστημα δύο τουλάχιστον n-αλκανίων τα οποία συγχρωματογραφούνται με την άγνωστη ουσία και από τα οποία πρέπει το ένα τουλάχιστον να έχει $t_r < t_r$ άγνωστης και ένα δεύτερο να έχει $t_r > t_r$ άγνωστης.

Ο δείκτης Kovats δίνεται από τον τύπο:

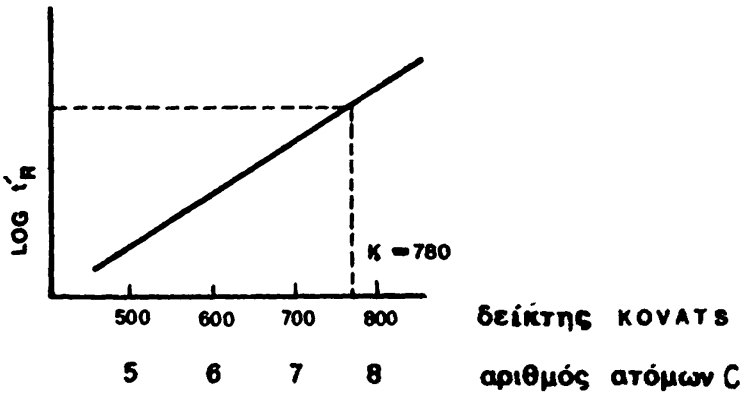
$$I = 100N + 100 \left[\frac{\log V'_{rX} - \log V'_{rA}}{\log V'_{rB} - \log V'_{rA}} \right] \qquad (2.20)$$

όπου: X = η υπό ταυτοποίηση ουσία
A = αλκάνιο με $t_r < t_rX$
B = αλκάνιο με $t_r > t_rX$
V'_r = διορθωμένος όγκος κατακράτησης
N = αριθμός ατόμων άνθρακα αλκανίου A

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Κατόπιν εφαρμογής του τύπου (2.20) υπολογίζεται ο δείκτης Kovats για την άγνωστη ουσία και συγκρίνεται με τους αντίστοιχους δείκτες που είναι καταχωρημένοι σε ειδικούς πίνακες στη βιβλιογραφία. Για δοσμένη στατική φάση, ο δείκτης Kovats κάθε ουσίας είναι χαρακτηριστική σταθερά, ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες συνθήκες της ανάλυσης. Για τα αλκάνια ο δείκτης Kovats ορίζεται σαν ο αριθμός ατόμων C x 100 σε ορισμένη θερμοκρασία και στατική φάση.

Ο υπολογισμός του δείκτης Kovats μιας ουσίας μπορεί να γίνει και γραφικά βάσει της καμπύλης Logt'_R = f(δείκτης Kovats) από τον χρόνο κατακράτησης της ουσίας αυτής (σχ. 2.22).



Σχ. 2-22. Γραφική παράσταση λογαρίθμου διορθωμένου χρόνου κατακράτησης συναρτήσει δείκτη Kovats

(3) Η άγνωστη ουσία συλλέγεται σε γυάλινη παγίδα σχήματος U που τοποθετείται σε δευτερεύουσα έξοδο της στήλης. Οι παγίδες ψύχονται με υγρό άζωτο (Θ= -196°C), μίγμα ξηρού πάγου/ακετόνης (Θ= -86°C) ή μίγμα πάγου/NaCl 1:2 (Θ= -21°C). Η ανάλυση στη συνέχεια γίνεται με κλασσικές χημικές μεθόδους.

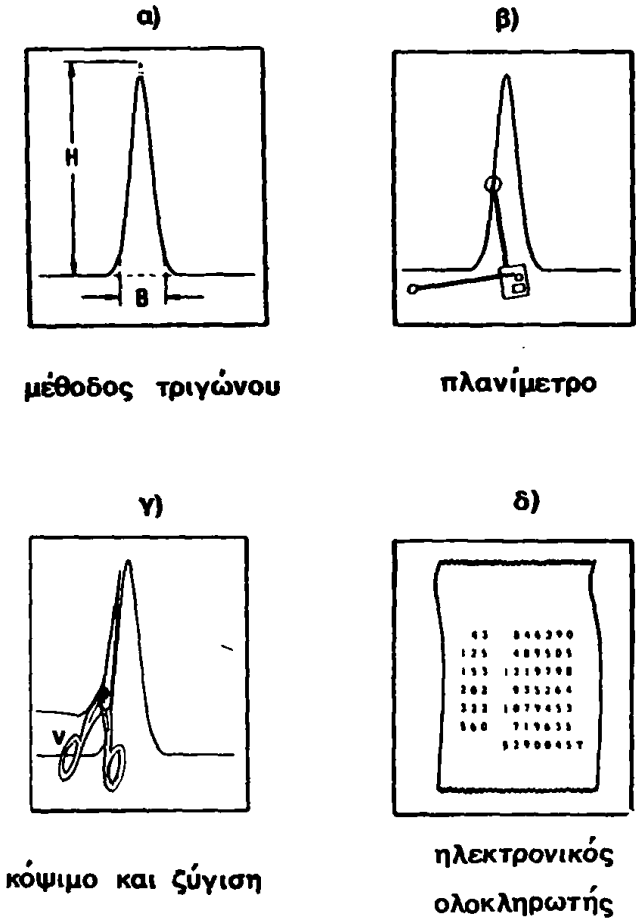
(4) Η έξοδος του αερίου χρωματογράφου συνδέεται απ' ευθείας με την είσοδο φασματογράφου μαζών (Mass Spectrometer, κεφ. 3.6) και η άγνωστη ουσία ταυτοποιείται από τα μοριακά θραύσματα τα οποία δίνει και τα οποία είναι αποκλειστικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης ουσίας (δακτυλικό αποτύπωμα της ουσίας).

2. Ποσοτική ανάλυση

Αν η αέρια χρωματογραφία είναι μέτριο εργαλείο για την ποιοτική ανάλυση μίγματος ουσιών, είναι σίγουρα άριστο εργαλείο για την ποσοτική ανάλυση. Αν ο χρόνος κατακράτησης δίνει την ταυτότητα του κάθε συστατικού στο μίγμα, το εμβαδόν κάτω από την αντίστοιχη κορυφή δίνει τ[illegible] του κάθε

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συστατικού. Για την περίπτωση λήψης πολύ οξειών κορυφών, λαμβάνεται σαν μέτρο μόνο το ύψος της κορυφής και όχι ολόκληρο το εμβαδόν.
Η μέτρηση του εμβαδού κάθε κορυφής μπορεί να γίνει με έναν από τους τρόπους που φαίνονται στο σχήμα 2-23.



Σχ. 2-23. Τρόποι μέτρησης εμβαδού κορυφών

Το εμβαδόν της συγκεκριμένης καμπύλης συγκρίνεται πάντα με το αντίστοιχο εμβαδόν πρότυπης ουσίας γνωστής συγκέντρωσης η οποία συγχρωματογραφείται με την άγνωστη. Στην πράξη κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη ως εξής: ποσότητα πρότυπης ουσίας =f (απόκριση χρωματογράφου, όπου απόκριση, f= εμβαδόν κορυφής) και με βάση την απόκριση της άγνωστης ουσίας, υπολογίζεται γραφικά από την καμπύλη το ακριβές ποσόν της στο μίγμα.
Ακόμη χρησιμοποιείται η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου (internal standard method), στην οποία σε δείγματα περιέχοντα άγνωστη ποσότητα (x) της αναλυόμενης ουσίας προστίθενται γνωστές ποσότητες (y) της ίδιας αλλά πρότυπης ουσίας: (y), (2y), (4y), (8y) κ.ο.κ. Στη συνέχεια κατασκευάζεται η

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

καμπύλη: απόκριση = f (ποσότητα (x+y), (x+2y), (x+4y) κ.ο.κ.). Από την καμπύλη αυτή εύκολα προσδιορίζεται η ποσότητα (x).

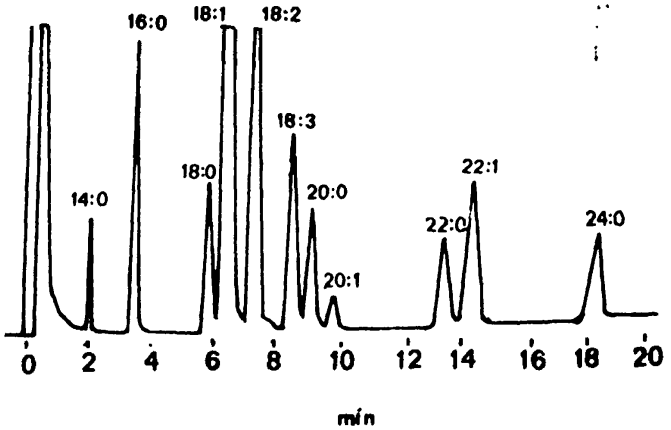
3. Ανάλυση σε ίχνη (trace analysis)

Το πρόβλημα που προκύπτει εδώ είναι η ανάγκη συμπύκνωσης της υπό ανάλυσης ουσίας σε τέτοιο βαθμό, ώστε να βρίσκεται μέσα στα όρια ανιχνευσιμότητας της αεριοχρωματογραφικής μεθόδου. Η συμπύκνωση, προκειμένου για αέρια δείγματα, γίνεται κατόπιν διέλευσης των τελευταίων μέσω ενεργού άνθρακα ή υγρού που αντιδρά ή απορροφά το αέριο. Αντίστοιχα για υγρά και στερεά εφαρμόζονται η εκχύλιση, η εξάτμιση, συνδυασμός των δύο κ.τ.λ.

4. Προσδιορισμός διαφόρων συστατικών των τροφίμων

α) Λίπη και λάδια

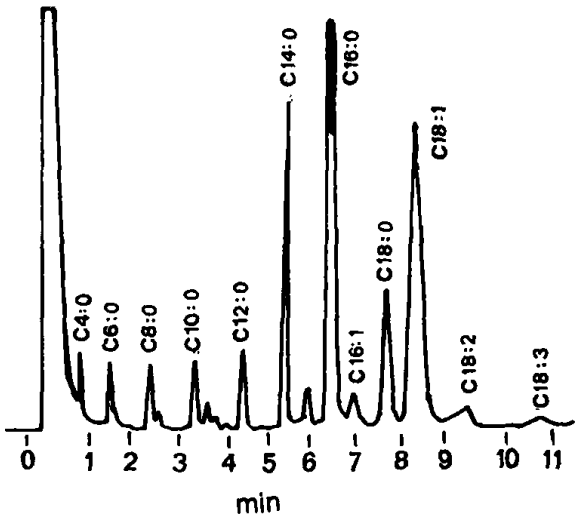
Στον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων κατόπιν μετατροπής των σε μεθυλεστέρες. Για το σκοπό αυτό το λιπαρό δείγμα υφίσταται μετεστεροποίηση παρουσία BF_3/CH_3OH υπό βρασμόν με κάθετο ψυκτήρα. Οι μεθυλεστέρες παραλαμβάνονται με επτάνιο, ξηραίνονται και αεριοχρωματογραφούνται[91]. Τα αποτελέσματα της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης για το κραμβέλαιο[92] φαίνονται στο σχ. 2.24.



Σχ. 2-24. Μεθυλεστέρες κραμβέλαιου.
Στήλη: 3% SP-2310/2% SP-2300, 180cm × 3mm, ανοξ.χαλυβ. Θερμοκρ: αρχική 2min, 190-220°C πρόγραμ: 2°C/min, ροή φεροντ. αερ. 20ml/min N_2, FID.

Στην απ' ευθείας ανάλυση των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε δείγματα τροφίμων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής για το πλήρες γάλα[93,94], φαίνονται στο σχήμα 2-25. Στον προσδιορισμό του βαθμού αυτοξείδωσης φυτικών λαδιών[95] μέσω του προσδιορισμού των σχηματιζόμενων γ και -δ λακτονών στα οξειδωμένα λάδια. Στον απ' ευθείας προσδιορισμό των -τρι, -δι και -μονογλυκεριδίων χωρίς προηγούμενη υδρόλυση των γλυκεριδικών δε-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-25. Ελεύθερα λιπαρά οξέα πλήρους γάλακτος
Στήλη: 10% SP-216-PS, 93cm × 2mm, γυάλινη σχήματος U. Τστηλ= 130-200°C προγραμ: 15°C/min. ροή φερ. αερ= 20ml/min N_2, FID

σμών[96,97,98]. Στον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αυγά στα ζυμαρικά[99], με εξέταση του 9-εξαδεκενικού οξέος το οποίο περιέχεται στο λίπος μόνο του αυγού και όχι του σκληρού σιταριού (σιμιγδάλι). Στον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του λίπους του καφέ που αποτελεί ένδειξη της τοπικής προέλευσης του προϊόντος[100]. Στον προσδιορισμό των στερολών[101,102] στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του λίπους που αποτελεί ένδειξη για την προέλευση του λίπους (καλαμποκέλαιο, ελαιόλαδο, βαμβακέλαιο, σογιέλαιο κ.τ.λ.). Στον προσδιορισμό των σε μικρή αναλογία απαντόντων των λιπαρών οξέων στο λίπος του χοίρου, του βοδιού και του προβάτου[103] για την διαπίστωση της προέλευσής του. Στην ανίχνευση της νοθείας του βουτύρου με φυτικά λάδια, όπως φοινικέλαιο ή καρυδέλαιο[104] ή με μαργαρίνη[105] κατόπιν προσδιορισμού του πηλίκου C_{12}/C_{10} των λιπαρών οξέων που στο γνήσιο βούτυρο δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 1.6. Στην ανίχνευση νοθείας του τελευταίου με μαργαρίνη[106] με προσδιορισμό των στερολών γ-σιτοστερόλης και στιγμαστερόλης που δεν υπάρχουν στο βούτυρο.

β) Πτητικές ουσίες υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση των τροφίμων. Για τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών απαιτείται κατ' αρχήν εκχύλισή τους με οργανικούς διαλύτες. Ακολουθεί συμπύκνωση του εκχυλίσματος σε χαμηλές θερμοκρασίες και ανάλυση συνήθως σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε τριχοειδείς στήλες μεγάλου μήκους. Μεταξύ των μελετών πάνω στο άρωμα των τροφίμων και ποτών συμπεριλαμβάνονται εκείνες στα: κρέας[107,108,109], ψάρια[110] γαλακτοκομικά προϊόντα[111,112,113], ψωμί[114,115], φρούτα[116], κηπευτικά[117], εδώδιμα λάδια[118,119,120], σοκολάτα[121], τσάϊ[122] χυμούς[123], αλκοολούχα ποτά[124-127]

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Οι υπεύθυνες ενώσεις για το άρωμα και τη γεύση είναι πολλές και ποικίλες όπως αλκοόλες, αλδεΰδες, κετόνες, εστέρες, οξέα κ.α. (βλ. κεφ. 20). Για παράδειγμα οι πτητικές γευστικές ενώσεις που απομονώθηκαν από το κρεμμύδι φαίνονται στον Πίνακα 2.11.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.11

Πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν από το κρεμμύδι	
Αιθανόλη	υδρόθειο
1-προπανόλη	1-προπανοθειόλη
2-προπανόλη	μεθυλοδισουλφίδιο
μεθανάλη	μεθυλ 1-προπυλοδισουλφίδιο
προπανάλη	1-προπυλ δισουλφίδιο
1-βουτανάλη	μεθυλο τρισουλφίδιο
ακετόνη	μεθυλο 1 προπυλτριοουλφίδιο
μεθυλο-αιθυλο κετόνη	1 προπυλ τρισουλφίδιο

Από Carson and Wong
J. Agr. Food Chem. 9,140 (1961)

γ) Κατάλοιπα φυτοφαρμάκων και οργανικών διαλυτών

Στον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων[128] σε φυτικά τρόφιμα χρησιμοποιώντας ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων. Στον προσδιορισμό καταλοίπων διαλυτών που απομένουν στα τρόφιμα σαν αποτέλεσμα βιομηχανικών διεργασιών[129] ή επαφής των τροφίμων με διάφορα υλικά συσκευασίας[130]. Στον προσδιορισμό κατάλοιπων πλαστικοποιητών[131], μονομερών[132] και λοιπών βιομηχανικών προσθέτων των πλαστικών υλών που μεταφέρονται στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της συντήρησης των τελευταίων.

δ) Πρωτεΐνες, αμινοξέα

Στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης κατά Edman. Χρησιμοποιείται το ισοθειοκυανιούχο φαινύλιο το οποίο αντιδρά με το ακραίο αμινοξύ του πεπτιδίου. Το προϊόν εκτίθεται σε όξινο περιβάλλον οπότε αποχωρίζεται το τερματικό αμινοξύ σαν θειαζολινόνη. Η τελευταία μετασχηματίζεται σε όξινο περιβάλλον και δίνει παράγωγα της θειοϋδαντοΐνης, τα περισσότερα των οποίων αεριοχρωματογραφούνται. Το πρώτο στάδιο της ανάλυσης περιλαμβάνει υδρόλυση της πρωτεΐνης και διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών (-S-S-) με αντιδραστήρια όπως αιθυλμερκαπτάνη. Τα προκύπτοντα πεπτίδια απομονώνονται και η αλληλουχία των αμινοξέων στο καθένα προσδιορίζεται όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

ε) Υδατάνθρακες

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ο προσδιορισμός των υδατανθράκων περιλαμβάνει τα εξής στάδια: 1) απομόνωση των υδατανθράκων, 2) αποικοδόμηση σε απλά σάκχαρα, 3) μετατροπή σε πτητικά παράγωγα, 4) προσδιορισμό παραγώγων με αέρια χρωματογραφία.

Προκειμένου περί των απλών σακχάρων στα τρόφιμα, η απομόνωση γίνεται κατόπιν άλεσης σε blender, διέλευσης μέσω κατιόν/ανιόν-ανταλλακτικών ρητινών και ξήρανσης με κατάψυξη. Ακολουθεί μεθυλίωση με διάλυμα NaOH παρουσία διμεθυλοσουλφοξείδιου. Η μεθυλίωση γίνεται σε ξηραμένα δείγματα υδατανθράκων μέσα σε κλειστά δοχεία. Στη συνέχεια στο προϊόν προστίθεται μεθυλοϊωδίδιο και τα μεθυλοπαράγωγα των σακχάρων εκχυλίζονται με βενζόλιο και χρωματογραφούνται. Προκειμένου περί πολυσακχαριτών πραγματοποιείται μεθυλίωση προς μεθυλαιθέρες και αποικοδόμηση με οξύ προς μονομερή και ολιγομερή. Οι ελεύθερες -OH ομάδες μετασχηματίζονται σε τριμεθυλ-πυριτικούς αιθέρες οι οποίοι προσδιορίζονται αεριοχρωματογραφικά.

2.9 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure-Liquid Chromatography, HPLC)

Η HPLC διαμορφώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '60 και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως στην αρχή της δεκαετίας του '70. Υπερτερεί της αέριας χρωματογραφίας διότι: (α) αναλύει απ' ευθείας και μη πτητικές ουσίες (μόνο το 20% των οργανικών ουσιών είναι πτητικές) π.χ. αμινοξέα, νουκλεϊνικά οξέα, χρωστικές, πολικά λιπίδια, πολυμερή, πρωτεΐνες κ.α. β) παρέχει τη δυνατότητα συνδυασμού δύο φάσεων (κινούμενη, στατική) για καλύτερο διαχωρισμό έναντι της μιας (στατικής) φάσης που παρέχει η GC, (γ) λειτουργεί σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλώτερες της GC, οπότε ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αποικοδόμησης ή απώλειας όλου ή μέρους του δείγματος, (δ) παρέχει η δυνατότητα χρήσης ποικιλίας ανιχνευτών, όπως φασματοφωτομετρικών (χρωματομετρικών, UV, φθορισμομετρικών) ηλεκτροχημικών (αμπερομετρικών), μέτρησης δείκτη διάθλασης κ.α.

Σε σχέση με τις άλλες τεχνικές υγρής χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία στήλης, χάρτου και λεπτής στοιβάδας, ή HPLC προυσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

(α) έχει πολύ καλύτερη επαναληπτικότητα και ακρίβεια.

(β) έχει δυνατότητες πλήρους αυτοματοποίησης

(γ) ο διαχωρισμός επιτελείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα: 30-90 min

(δ) παρέχει μεγαλύτερες δυνατότητες παρασκευαστικής εργασίας.

Μειονεκτεί έναντι των προηγουμένων τεχνικών λόγω αυξημένου κόστους

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συσκευών.
Σαν υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ορίζεται η μέθοδος διαχωρισμού μίγματος στα συστατικά του, που λαβαίνει χώρα με διαδοχικές προσροφήσεις/εκροφήσεις ή κατανομές μεταξύ μιας στερεής ή υγρής στατικής φάσης και μιας υγρής φάσης με τη βοήθεια πίεσης μεγαλύτερης από την ατμοσφαιρική. Ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης η HPLC διακρίνεται σε HPLLC (χρωματογραφία υγρού/υγρού) και σε HPLSC (χρωματογραφία υγρού/στερεού), ενώ τα φυσικοχημικά φαινόμενα που λαβαίνουν χώρα κατά το διαχωρισμό μπορεί να είναι: προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή ή αποκλεισμός μεγέθους (χρωματογραφία πηκτής). Όσα ελέχθησαν για τη χρωματογραφία υγρού/υγρού κατανομή, στερεού/υγρού (προσρόφηση), ιονανταλλαγής και αποκλεισμού μεγέθους ισχύουν και εδώ.
Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC (σχ. 2-9) είναι τα εξής:
Α. δοχείο (ρεζερβουάρ) κινούμενης φάσης-διαλύτης
Β. αντλία υψηλής πίεσης
Γ. βαλβίδα εισαγωγής δείγματος
Δ. στήλη
Ε. ανιχνευτής
ΣΤ. καταγραφέας-ολοκληρωτής

Α. Δοχείο (ρεζερβουάρ) κινούμενης φάσης-Διαλύτης

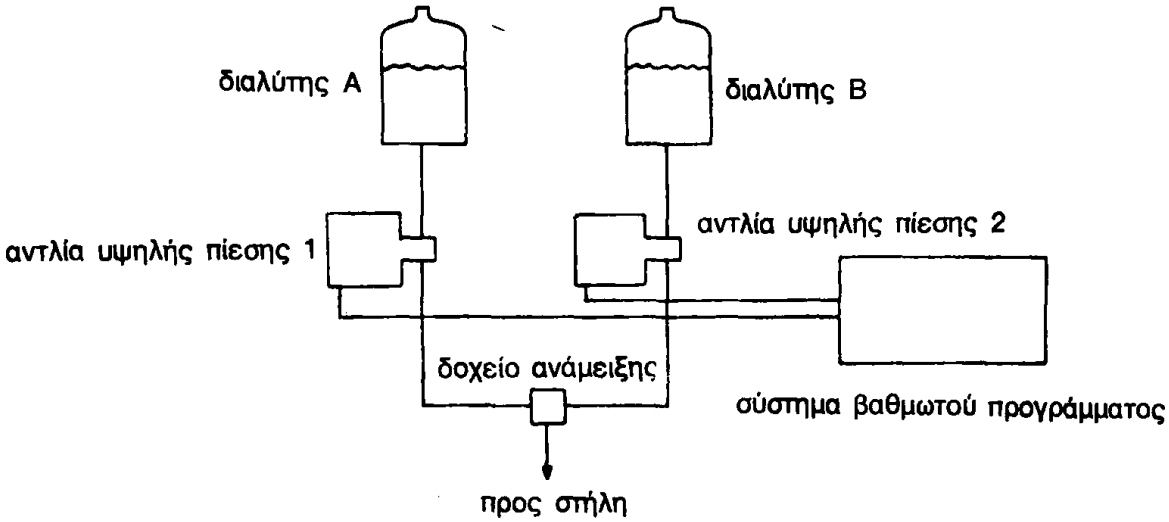
Αποτελείται συνήθως από γυάλινο υποδοχέα χωρητικότητας τουλάχιστον 500ml για αναλυτικούς σκοπούς και αρκετά μεγαλύτερης για παρασκευαστικούς σκοπούς. Στην πιο απλή περίπτωση χρησιμοποιείται μια κωνική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα. Στην απόληξη του σωλήνα τροφοδοσίας, η άλλη άκρη του οποίου συνδέεται με την αντλία, προσαρμόζεται ειδικό φίλτρο (2μm) που παρεμποδίζει τη μεταφορά σωματιδίων που μπορούν να «μπλοκάρουν» την αντλία. Ο διαλύτης ή το σύστημα διαλυτών που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και να έχει απαερωθεί (degassed) προς απομάκρυνση του περιεχόμενου αέρα που προκαλεί προβλήματα αφ' ενός μεν στην ομαλή ροή του διαλύτη αφ' ετέρου δε και στον ίδιο το διαχωρισμό. Για την διαδικασία της απαέρωσης ο διαλύτης διαβιβάζεται μέσω ειδικών μικρο-φίλτρων (0.2 μm) υπό κενόν (ειδική κωνική τύπου Buchner). Ακόμη η απαέρωση επιτυγχάνεται με διαβίβαση He υπό πίεση μέσω του διαλύτη. Οι σύγχρονες συσκευές HPLC αποτελούνται από δύο ή και τρία ρεζερβουάρ διαλύτη με δυνατότητα αυτόματης ανάμιξης δύο ή τριών διαλυτών. Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος διαλυτών αποτελεί το κλειδί της επιτυχίας σ' έναν διαχωρισμό με HPLC. Παράμετροι που πρέπει να

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

λαμβάνονται υπ΄ όψιν κατά την επιλογή του διαλυτικού μέσου είναι η ισχύς του διαλύτη και η εκλεκτικότητά του για το συγκεκριμένο δείγμα. Προτιμούνται διαλύτες με χαμηλό Σ.Ζ. και ιξώδες. Ακόμη πρέπει να εξετάζεται ο βαθμός συμβατότητας του διαλύτη με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Δηλ. να εξετάζεται το ελάχιστο λ στο οποίο ο διαλύτης παρέχει διαπερατότητα στο συγκεκριμένο ανιχνευτή π.χ. στο UV. Ως προς τις άλλες ιδιότητές του, ο διαλύτης πρέπει να πληροί τους όρους που τέθηκαν και στην χρωματογραφία στήλης, PC και TLC δηλ. να μην αντιδρά με το δείγμα, να μην πολυμερίζεται, να μην αναμειγνύεται με την υγρή στατική φάση, να διαλύει ποσοτικά το δείγμα κ.τ.λ.

Στην επιλογή του κατάλληλου διαλυτικού συστήματος για την HPLC βοηθάει πολύ η TLC, η οποία χρησιμοποιείται προκαταρκτικά για το σκοπό αυτό.

Στην HPLC χρησιμοποιείται η τεχνική της βαθμωτής έκλουσης (gradient elution). Δηλαδή κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, κατόπιν προγραμματισμού του οργάνου, μεταβάλλεται η σύσταση και συνεπώς η πολικότητα του διαλύτη, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών του αναλυόμενου δείγματος. Το σύστημα ανάμιξης δύο διαλυτών φαίνεται στο σχ. 2-26, ενώ η διαφορά στη χρήση έκλουσης με σταθερή τη σύσταση του διαλύτη και βαθμωτή έκλουση φαίνεται στο σχ. 2-27.



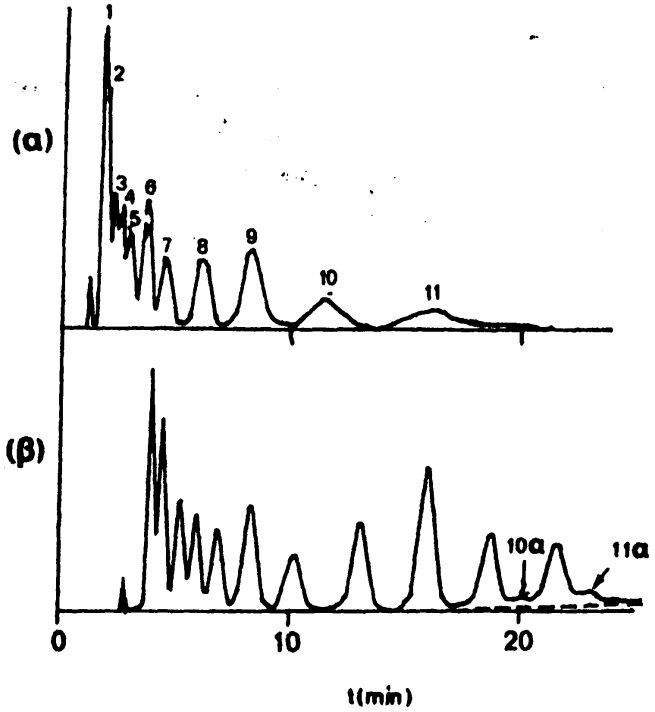
Σχ. 2-26. Βαθμωτή έκλουση με συνδυασμό δύο αντλιών υψηλής πίεσης

Β. Αντλία (pump)

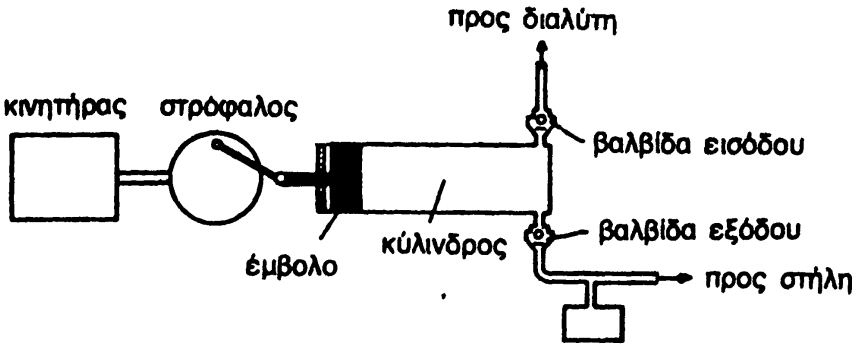
Σκοπό έχει να τροφοδοτεί, υπό αυστηρά καθορισμένη παροχή, τη στήλη με το διαλύτη. Η αντλία έχει τη δυνατότητα να λειτουργεί με πιέσεις που κυμαίνονται μεταξύ 14 και 6000 psi. (1 psi=70.2 g/cm^2). Το υλικό κατασκευής της αντλίας πρέπει να είναι ανθεκτικό έναντι των χημικών αντιδραστηρίων και

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

των υψηλών πιέσεων. Συνήθως οι στήλες κατασκευάζνται από ανοξείδωτο χάλυβα. Οι αντλίες ως προς την αρχή λειτουργίας τους μπορεί να είναι διαφόρων τύπων μεταξύ των οποίων πιο δημοφιλής είναι ο τύπος της περιστροφικής αντλίας με έμβολο (σχ. 2.28).



Σχ. 2-27. Έκλουση (α) ισοκρατική (β) βαθμωτή



Σχ. 2-28. Αρχή λειτουργίας απλής περιστροφικής αντλίας υψηλής πίεσης

Η περιστροφική αντλία αποτελείται από θάλαμο μικρής χωρητικότητας 35-400 μl, εφοδιασμένο με έμβολο το οποίο κινείται με τη βοηθεια στροφάλου. Ο στρόφαλος με τη σειρά του ενεργοποιείται από τον κινητήρα. Το έμβολο με την περιοδική κίνησή του ωθεί τον διαλύτη δια μέσου της στήλης. Ο τύπος αυτός της αντλίας δίνει πίεση εξόδου μέχρι 10.000 psi και παροχή μέχρι 28 ml/min.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Γ. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection port)

Ο τρόπος εισαγωγής, η ποσότητα και η καθαρότητα του δείγματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια του προσδιορισμού. Το δείγμα προ της εισαγωγής του πρέπει να καθαριστεί επιμελώς. Συνήθως εκχυλίζεται με κατάλληλο διαλύτη (π.χ. C_6H_{14}) και το εκχύλισμα εισάγεται στο θάλαμο έγχυσης με την βοήθεια μικροσύριγγας υγρού, μέσω ελαστικού πώματος (septum). Ο θάλαμος έγχυσης είναι εφοδιασμένος με βαλβίδα εισαγωγής (injection valve) η χωρητικότητα της οποίας κυμαίνεται από 1-500μl. Η βαλβίδα στη θέση «πλήρωσης» συγκρατεί ποσότητα δείγματος, ενώ στη θέση «εισαγωγής» εισάγει το δείγμα στη στήλη, (βλ. κεφ. 2.8 Γ2).

Δ. Στήλη

Αποτελεί την καρδιά του συστήματος HPLC γιατί εδώ επιτελείται ο διαχωρισμός. Το υλικό της στήλης είναι συνήθως ανοξείδωτος χάλυβας ή σε ειδικές περιπτώσεις γυαλί ειδικής κατασκευής. Χαρακτηριστικό είναι το πάχος των τοιχωμάτων της στήλης (2-3 mm) για να αντέχει τις υψηλές πιέσεις που αναπτύσσονται κατά την λειτουργία του συστήματος. Το μήκος της στήλης κυμαίνεται από 10-100 cm. Συνήθως κατασκευάζονται στήλες μήκους 25-30 cm.

1. Το υλικό πλήρωσης της στήλης, ως προς τη φύση του μπορεί να είναι:

(α) πορώδες, με βάση τη πυριτική γη (silica)

(β) μη πορώδες (pellicular)

(γ) σκληρή πηκτή, με βάση το πολυστορόλιο.

Τα υλικά αυτά αντέχουν σε πιέσεις μέχρι 5.000 psi.

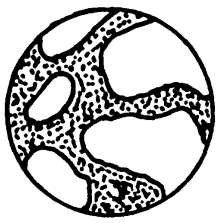
Τα πορώδη υλικά (σχ. 2-29α) μπορεί να είναι είτε σφαιρικά είτε μη κανονικού σχήματος και ενδείκνυται για παρασκευαστικές εφαρμογές (Πίνακας 2.12). Τα μη πορώδη υλικά (pellicular, σχ. 2-29 β) είναι σφαιρικά και παρασκευάζονται συνήθως με επιφανειακή επικάλυψη στατικής φάσης σε υαλοσφαιρίδια

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.12

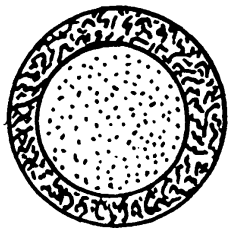
Υλικά πλήρωσης στήλης για αναλυτικούς και παρασκευαστικούς σκοπούς

Αναλυτικά (επιφ. πορώδη)	παρασκευαστικά (πορώδη)	επιφαν. πολικότητα
Corasil	Porasil	υψηλή
Duparak	Duparak	
Carbowax 400/ Corasil	Carbowax 400/ Porasil	ενδιάμεση
Bondapak C_{18}/Corasil	Bondapak C_{18}/Porasil	χαμηλή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Πορώδες



Επιφανειακά Πορώδες

Σχ. 2-29. Δομές υλικών πλήρωσης στήλης HPLC

κατάλληλης διαμέτρου. Χρησιμοποιούνται για αναλυτικούς σκοπούς (πίνακας 2.12).

Το μέγεθος των κόκκων του υλικού πλήρωσης κυμαίνεται από 5-10 μm.

Ενδείκνυται η χρήση υλικών με στενό εύρος διαμέτρου. Ομοιόμορφο μέγεθος υλικού δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης προτιμούνται τα μικρά μεγέθη κόκκων διότι αποδεικνύεται (βλ. κεφ. 2.8 Ζ) πως για δοσμένο μήκος στήλης, ελάττωση του μεγέθους των κόκκων αυξάνει τον αριθμό πλακών της στήλης (ελάττωση του HETP). Λαμβάνονται δηλαδή οξύτερες κορυφές στο χρωματογράφημα και συνεπώς αυξάνει η απόδοση της στήλης. Τέλος το υλικό πλήρωσης συγκρατείται μέσα στη στήλη με τη βοήθεια μεταλλικών πορωδών δίσκων (μέγεθος πόρων 2μm) που τοποθετούνται στην είσοδο και έξοδο αντίστοιχα της στήλης.

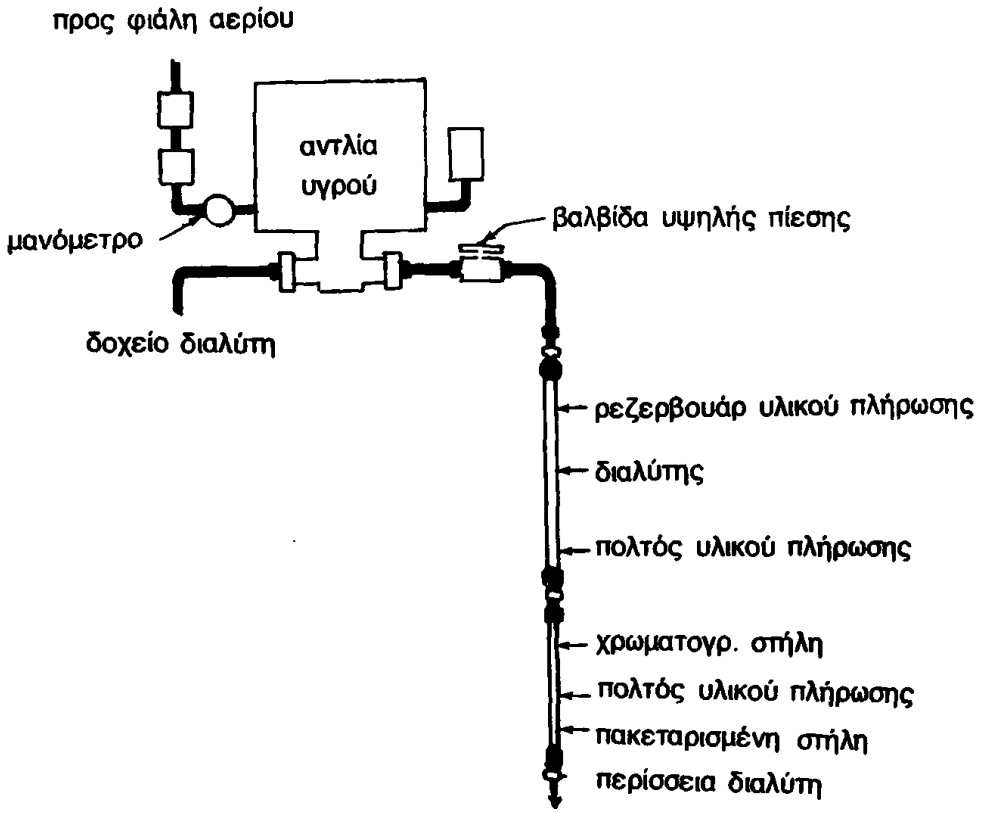
2. Πλήρωση της στήλης

Υπάρχουν δύο τρόποι πλήρωσης ανάλογα με τη φυσική κατάσταση και το μέγεθος του υλικού πλήρωσης. Αν πρόκειται για στερεό d > 20μm χρησιμοποιείται η μέθοδος «απλής» πλήρωσης που μοιάζει με εκείνη της αέριας χρωματογραφίας (βλ. κεφ. 2.8 Δ). Για υλικά d < 20μm και υγρά υλικά πλήρωσης χρησιμοποιείται η «τεχνική αιωρήματος» (slurry method) (σχ. 2-30):

Το προς πλήρωση υλικό υπό μορφή αιωρήματος με τη βοήθεια ειδικής αντλίας υγρών τροφοδοτείται μέσα στη στήλη ομοιόμορφα υπό πίεση. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υγρό του αιωρήματος.

Η τεχνική αυτή πλήρωσης είναι γνωστή και σαν **κατερχόμενη τεχνική.** Τέλος είναι προφανές πως εισαγωγή πολλών δειγμάτων περιεχόντων ισχυρά κατακρατούμενες στη στατική φάση ουσίες, ύστερα από ορισμένο χρόνο θα μειώσει την απόδοση της στήλης. Για την παράταση της ζωής των στηλών, η αξία των οποίων υπερβαίνει τις 100.000 δρχ. η καθεμιά, χρησιμοποιείται η λεγόμενη «προστατευτική στήλη» (guard column), η οποία συνδέεται μεταξύ injector και στήλης. Η στήλη αυτή, μήκους 5-10 cm, περιέχει το ίδιο υλικό με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-30. Πλήρωση στήλης HPLC με τη μέθοδο πολτού (slurry)

την κυρίως στήλη και σκοπό έχει να συγκρατεί το μεγαλύτερο μέρος των ισχυρά κατακρατούμενων ουσιών έτσι ώστε να μη μολύνεται η πρώτη.

3. Στατική φάση

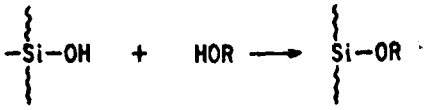
Η στατική φάση μπορεί να επικαλυφθεί στο αδρανές υλικό: (α) **φυσικά** κατόπιν διάλυσης της στατικής φάσης στον κατάλληλο διαλύτη, προσθήκης του αδρανούς υλικού, ανάμειξης και απομάκρυνσης του διαλύτη σε εξαερωτή κενού (rotoevaporator) και (β) **χημικά** οπότε προκύπτει η λεγόμενη δεσμευμένη στατική φάση (bonded phase). Συνήθως χρησιμοποιούνται υποστρώματα με βάση τη πυριτική γη επί της οποίας με χημική αντίδραση προστίθεται η επιθυμητή ομάδα (Σχ. 2-31 α,β) π.χ. εστέρας, άνθρακας, άζωτο κ.τ.λ.

Η HPLLC (χρωματογραφία υγρού/υγρού) όπως και η χρωματογραφία στήλης, PC, και TLC δυνατόν να είναι:

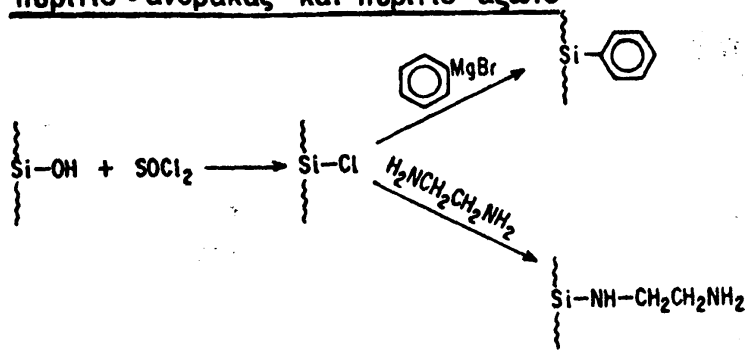
(α) κανονικής φάσης (normal phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι πολική και η κινούμενη φάση σχετικά μη πολική. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών (υδατικών) ουσιών οι οποίες εκλούονται τελευταίες από τη στήλη και (β) ανεστραμμένης φάσης (reverse phase) όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, ενώ ο διαλύτης είναι πολικός. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας χρησιμοποιείται για το διαχωρι-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

α) εστέρες πυριτίου



β) πυρίτιο - άνθρακας και πυρίτιο άζωτο



Σχ. 2-31. Παρασκευή υλικών πλήρωσης τύπου bonded phase
α) εστέρες πυριτίου
β) πυρίτιο-άνθρακας και πυριτιο-άζωτο

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.13

Αντιπροσωπευτικά συστήματα χρωματογραφίας υγρού/υγρού

Στατική φάση	Κινούμενη φάση
LLC κανονικής φάσης	
οξυ-διπροπιονιτριλιο	πεντάνιο, κυκλοπεντάνιο, εξάνιο
τρι (2-κυανοαιθόξυ) προπάνιο	ισοκτάνιο
	ίδιο με προσθήκη 10-20% χλωροφόρμιο
Carbowax 600	διχλωρομεθάνιο
τριαιθυλενογλυκόζη	τετραϋδροφιράνιο, ακετονιτρίλιο
τριμεθυλενογλυκόλη	διοξάνιο κ.τ.λ.
αιθυλενο γλυκόλη	δι-n-βουτυλαιθέρας
διμεθυλο σουλφοξείδιο	ισοοκτάνιο
νερό/αιθυλενογλυκόλη	εξάνιο/CCl_4
αιθυλενοδιαμίνη	εξάνιο
νερό	n-βουτανόλη
αιθυλενογλυκόλη	νιτρομεθάνιο
νιτρομεθάνιο	CCl_4/εξάνιο
LLC ανεστραμμένης φάσης	
κυανο αιθυλ-σιλικόνη	μεθανόλη/νερό
διμεθυλοπολυσιλοξάνιο	ακετονιτρίλιο/νερό
επτάνιο	υδατική μεθανόλη
πολυμερείς Η/C	μεθανόλη/νερό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σμό μη πολικών ουσιών. Στον Πίνακα 2.13 δίνονται αντιπροσωπευτικά συστήματα στατικής/κινούμενης φάσης στις χρωματογραφίες κανονικής και ανεστραμμένης φάσης.

Ε. Ανιχνευτής

Αποτελεί το όργανο που ανά πάσα στιγμή ελέγχει το προϊόν της στήλης. Επειδή είναι εκατοντάδες χιλιάδες οι ενώσεις που δύνανται να διαχωριστούν στη στήλη HPLC δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για όλες αυτές ο ίδιος τύπος ανιχνευτή. Ανάλογα με τη φύση των αναλυομένων, ουσιών μπορεί σαν ανιχνευτής να χρησιμοποιηθεί:

(1) φωτόμετρο UV, ορατού
(2) διαφορικό διαθλασίμετρο
(3) φθορισμόμετρο
(4) φωτόμετρο IR
(5) ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής κ.τ.λ.

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή είναι:

(α) υψηλή ευαισθησία
(β) απόκριση σε πλατύ, όσο γίνεται φάσμα ουσιών
(γ) γραμμικότητα απόκρισης μεταξύ ευρέων ορίων συγκέντρωσης
(δ) να μην καταστρέφει το δείγμα
(ε) να είναι εύχρηστος
(στ) να είναι οικονομικά προσιτός

(1) Ο πιο συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή για την HPLC σήμερα είναι το φασματοφωτόμετρο UV/ορατού. Οι ουσίες που μπορούν να αναλυθούν μ' αυτόν πρέπει να απορροφούν ακτινοβολία στο διάστημα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 190-600 nm. (Για τη λειτουργία του τύπου αυτού του ανιχνευτή βλ. κεφ. 3.1.). Κατ' αρχήν κατασκευάστηκαν ανιχνευτές UV με καθορισμένο μήκος κύματος ανάλυσης π.χ. λ=254 nm. Το μήκος κύματος αυτό επιλέχτηκε διότι βρέθηκε πως πολλές ουσίες απορροφούν σ' αυτό το λ, αρκεί να έχουν στο μόριό τους χρωμοφόρα ομάδα με την ακόλουθη διάταξη:

$$-\underset{\underset{Z}{|}}{X} = Y$$

όπου: X = C, S, P
Y = O, S, P, N
Z = S, P

και τα Y, Z φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια

Εκτός από τα φωτόμετρα UV χρησιμοποιούνται και τα φωτόμετρα ορατού στις περιπτώσεις που τα προϊόντα της στήλης, με κατάλληλα αντιδραστήρια δίνουν έγχρωμες ενώσεις.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(2) Ο δεύτερος, από άποψη συχνότητας χρήσης, ανιχνευτής είναι το διαφορικό διαθλασίμετρο.
Το όργανο αυτό (βλ. κεφ. 6.1, 6.2) καταγράφει τις διαφορές στο δείκτη διάθλασης μεταξύ καθαρού διαλύτη και προϊόντων (στήλης+διαλύτη). Πλεονεκτήματα του ανιχνευτή αυτού είναι: (α) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλη ποικιλία ουσιών, (β) είναι εύχρηστος, μη καταστρεπτικός για το δείγμα και (γ) έχει υψηλή, σχετικά, ευαισθησία. Μειονεκτεί κατά το ότι είναι πολύ ευαίσθητος στην παραμικρή μεταβολή της θερμοκρασίας. Απαιτεί αυστηρά καθορισμένη θερμοκρασία κυψελίδας και συνεπώς ειδική εγκατάσταση σταθεροποίησης της θερμοκρασίας μεταξύ εξόδου της στήλης και κυψελίδας του ανιχνευτή.
3. Φθορισμόμετρο
Χρησιμοποιείται για την ανάλυση φθοριζουσών ουσιών ή παραγώγων των προϊόντων της στήλης που φθορίζουν. (Για τη λειτουργία του φθορισμομέτρου βλ. κεφ. 3.4). Χρησιμοποιείται στην ανάλυση ιχνών και είναι 100 φορές πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή UV. Πρόσφατα μάλιστα κατασκευάστηκε ειδικό φθορισμόμετρο που χρησιμοποιεί ακτίνες Laser σαν πηγή ακτινοβολίας που αυξάνουν κατά πολύ την ευαισθησία της μεθόδου (π.χ. προσδιορισμός αφλατοξινών στα τρόφιμα σε επίπεδο pg).
4. Φωτόμετρο I.R
Για τη λειτουργία του βλ. κεφ. 3.3.
5. Ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής
Ο τύπος αυτός ανιχνευτή χρησιμοποιείται συνήθως για ουσίες που οξειδώνονται ή ανάγονται εύκολα.
Αποτελείται βασικά από δύο ηλεκτρόδια μεταξύ των οποίων εφαρμόζεται συγκεκριμένη τάση και μετρείται το ρεύμα που προκύπτει από την εισαγωγή της οξειδούμενης ή αναγόμενης ουσίας στον μεταξύ των ηλεκτροδίων χώρο. Τέλος περιορισμένη χρήση βρίσκουν οι ανιχνευτές ραδιενέργειας και αγωγιμότητας.

ΣΤ. Καταγραφέας-ολοκληρωτής

Ο καταγραφέας-ολοκληρωτής χρησιμοποιείται στην HPLC όπως ακριβώς και στην αέρια χρωματογραφία (βλ. κεφ. 2.8 ΣΤ).

Ζ. Θεωρία της HPLC

Ισχύουν και εδώ τα όσα αναπτύχθηκαν στη θεωρία της Αέριας Χρωματογραφίας με μόνη τη διαφορά ότι αντί αερίου υπάρχει εδώ η υγρή κινούμενη φάση (διαλύτης). Επί πλέον εδώ θα δοθεί η έννοια του παράγοντα χωρητικότητας K. Η παράμετρος αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στον βαθμό διαχωρισμού δύο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

διαδοχικών συστατικών στο χρωματογράφημα. (βλ. κεφ. 2.8 Ζ). Έστω u(cm/sec) η μέση ταχύτητα των μορίων του διαλύτη S και u_x η αντίστοιχη ταχύτητα του συστατικού x, του προς διαχωρισμόν μίγματος στη στήλη. Αν R είναι το κλάσμα των μορίων του συστατικού x στην κινούμενη φάση τότε:

$$u_x = u \cdot R \qquad (2.21)$$

Αν οριστεί σαν παράγοντας χωρητικότητας (K) το πηλίκον

$$K = \frac{n_s}{n_m} \qquad (2.22)$$

όπου: n_s = αριθ. μορίων του συστατικού x στη στατική φάση
και n_m = αριθ. μορίων του συστατικού x στην κινούμενη φάση

τότε $$K + 1 = \frac{n_s}{n_m} + \frac{n_m}{n_m} = \frac{n_s + n_m}{n_m} \qquad (2.23)$$

αλλά εξ ορισμού $$R = \frac{n_m}{n_m + n_s} \qquad (2.24).$$

Η (2.23) γίνεται $R = \frac{1}{K+1}$ · (2.25) καί από την (2.21) ⇒

$$\frac{u_x}{u} = \frac{1}{K+1} \Rightarrow u_x = \frac{u}{K+1} \qquad (2.26)$$

Αν ο χρόνος που απαιτείται για το συστατικό x να εκλουστεί από τη στήλη είναι t_r (χρόνος κατακράτησης), τότε:

τότε: $t_r = \frac{L}{u_x}$ (2.27) όπου L = μήκος της στήλης (cm),

ενώ αντίστοιχα για το διαλύτη S (μη κατακρατούμενο συστατικό)

$$t_0 = \frac{L}{u} \qquad (2.28)$$

Από τις (2.27) κ' (2.28) ⇒ $\frac{t_r}{t_0} = \frac{u}{u_x} \Rightarrow t_r = \frac{u t_0}{u_x}$ (2.29) και βάσει της (2.26) ⇒

$$t_r = \frac{u_x (1+K)\, t_0}{u_x} = (1+K)\, t_0 \quad (2.30) \Rightarrow 1+K = \frac{t_r}{t_0} \Rightarrow$$

$$K = \frac{t_r}{t_0} - 1 \quad \text{ή} \quad K = \frac{t_r - t_0}{t_0} \qquad (2.31)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Προφανώς όσο μεγαλύτερο είναι το K τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός των συστατικών. Αν αντί του χρόνου κατακράτησης στην (2.21) ληφθεί υπ' όψιν ο όγκος κατακράτησης Vr του συστατικού x ή

$$\text{η } (2.31) \Rightarrow K = \frac{V_r - V_0}{V_r} \qquad (2.32)$$

Μιά και ο σκοπός της HPLC είναι ο διαχωρισμός των συστατικών (δύο ή περισσότερων), αυτό που ενδιαφέρει είναι το πηλίκον των συντελεστών χωρητικότητας δύο διαδοχικών συστατικών. Το πηλίκον αυτό καλείται **παράγοντας διαχωρισμού** (α) των δύο συγκεκριμένων συστατικων και αντιστοιχεί στη διαχωριστική ικανότητα (R) που αναπτύχθηκε στην αέρια χρωματογραφία (κεφ. 2.8 Z)

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = \frac{V_{r_2} - V_0}{V_{r_1} - V_0} \qquad (2.33)$$

Για α=1 δεν υπάρχει διαχωρισμός και οι κορυφές αλληλοεπικαλύπτονται. Συνήθως επιδιώκονται τιμές του $1.5 \leq \alpha \leq 5$.

Z. Εφαρμογές της HPLC

Όπως και η GC, έτσι και η HPLC χρησιμοποιείται στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, στην ανάλυση ιχνών και για παρασκευαστικούς σκοπούς στην ανάλυση των συστατικών των τροφίμων.

(1) Ποιοτική ανάλυση

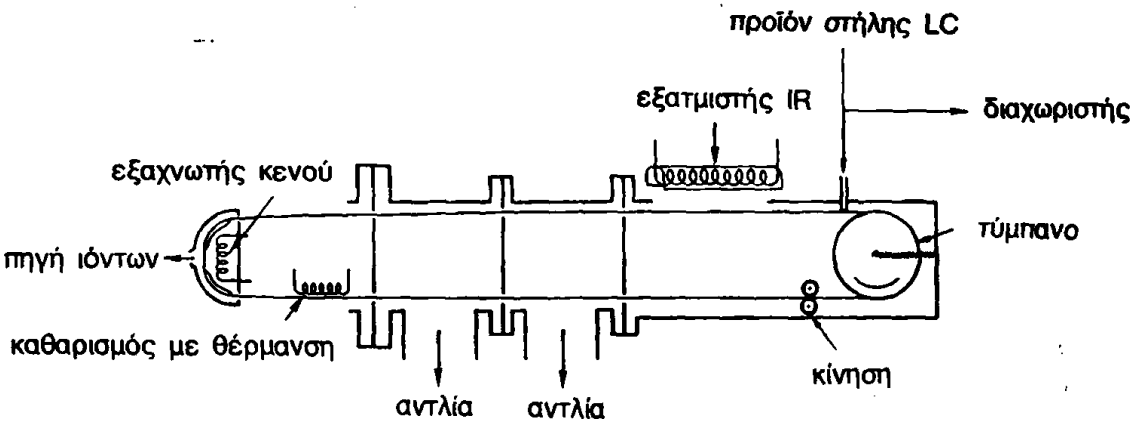
Ισχύουν και εδώ τα όσα αναπτύχθηκαν στο αντίστοιχο κεφάλαιο της αέριας χρωματογραφίας. Για την πλήρη ταυτοποίηση των αγνώστων συστατικών, έχει τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός HPLC/MS. Η σύνδεση του HPLC με τον φασματογράφο μάζας γίνεται με τον «ιμάντα μεταφοράς» (belt transport interface). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 2-32 το προϊόν της στήλης εισέρχεται μέσω κατάλληλης εισόδου στον ιμάντα ο οποίος αποτελείται από ανοξείδωτο χάλυβα. Περνά μέσω ενός εξατμιστή IR, όπου εξατμίζεται το μεγαλύτερο μέρος του διαλύτη και μέσω θαλάμου κενού εισέρχεται στο φασματογράφο μάζας, όπου σπάζει σε θραύσματα (βλ. κεφ. 3.6) χαρακτηριστικά κάθε ουσίας (δακτυλικό αποτύπωμα ουσίας).

Ακόμη για την ταυτοποίηση των διαχωριζόμενων ουσιών χρησιμοποιείται ο συνδυασμός HPLC/IR.

α) Προσδιορισμός αμινοξέων και πεπτιδίων

Για την ανάλυση των συστατικών αυτών απαιτείται κατ' αρχήν υδρόλυση των πρωτεϊνών. Η υδρόλυση προς αμινοξέα επιτυγχάνεται με επίδραση διαλύμα-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-32. Σύνδεση HPLC με MS με «ιμάντα μεταφοράς»

τος HCl 6N στους 110°C επί 24h[133]. Αντίθετα, για τον προσδιορισμό των ελεύθερων, και όχι των προκυπτόντων κατόπιν υδρόλυσης, αμινοξέων σε δείγματα όπως αναψυκτικά[134] πραγματοποιείται κατ' αρχήν αποπρωτεΐνωση, κατόπιν καθίζησης με 3% σουλφοσαλυκιλικό οξύ και φυγοκέντριση για απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Με τη διαδικασία αυτή προσδιορίστηκαν τα ελεύθερα αμινοξέα, στους καρπούς του κακάο[135] σαν παράγωγα της ο-φθαλικής αλδεΰδης με την τεχνική ανεστραμμένης φάσης ενώ σε δείγματα πορτοκαλοχυμού[136], μπύρας και κρασιού άμεσα, χωρίς δηλαδή παρασκευή παραγώγων, χρησιμοποιώντας στήλη LiChrosorb NH_2 και ανιχνευτή UV στο λ= 200nm. Επίσης με HPLC προσδιορίστηκαν ατομικά, τα αμινοξέα: (1) κυστίνη και γλουταθειονίνη σε φρούτα[137] χρησιμοποιώντας στήλη Zipax SCX και ηλεκτροχημικό ανιχνευτή υδραργύρου, (2) θρυπτοφάνη σε ζωοτροφές[138] χρησιμοποιώντας στήλη ιονανταλλαγής, σε σόγια και εσπεριδοειδή[139] (3) λυσίνη σε αλεύρια, ζύμες και ψωμί[140], χρησιμοποιώντας στήλη μ-Bondopak C_{18}, την τεχνική ανεστραμμένης φάσης και ανιχνευτή UV στο λ= 254nm και σε προϊόντα υδρόλυσης των πρωτεϊνών της καζεΐνης και γλουτένης[141], (4) 3-μεθυλιστιδίνη ανάλογο του αμινοξέος ιστιδίνη (που απαντά στο μυικό ιστό και χρησιμοποιείται σαν δείκτης πρωτεΐνης ζωϊκής προέλευσης) σε τρόφιμα όπως μπιφτέκια[142] και ψάρια[143], χρησιμοποιώντας στήλη Zipax SCX και ανιχνευτή UV στο λ=210 nm.

(5) Λυσινοαλανίνη (LAL), που ενδιαφέρει λόγω πιθανής τοξικότητας, σε γάλα και ζελατίνη[144].

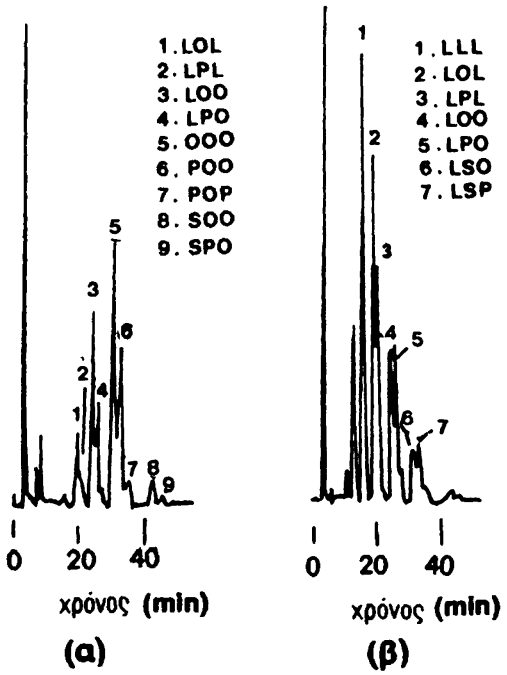
Τέλος προσδιορίστηκαν αρκετά πεπτίδια τα οποία πιστεύεται ότι αφ' ενός μεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πικρής γεύσης σε προϊόντα όπως τα τυριά[145] και η μπύρα[146], αφ' ετέρου δε αποτελούν ένδειξη νοθείας κρεατοσκευασμάτων με πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης π.χ. σόγιας[147].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

β) Προσδιορισμός λιπαρών υλών

(1) Τριγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Ο διαχωρισμός μίγματος τριγλυκεριδίων ή ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) στα επί μέρους συστατικά τους απαιτεί την τεχνική της ανεστραμμένης φάσης. Τα λιπαρά οξέα είναι δυνατόν να διαχωριστούν άμεσα[148], χωρίς δηλαδή μετατροπή σε παράγωγα, χρησιμοποιώντας στήλη μ-Bondapak C_{18} και ανιχνευτή UV στο λ=210 nm. Στο σχήμα 2-33 φαίνεται ο άμεσος διαχωρισμός τριγλυκεριδίων του ελαιόλαδου (α) και του σογιέλαιου (β)[149]χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανεστραμμένης φάσης σε στήλη LC-18.



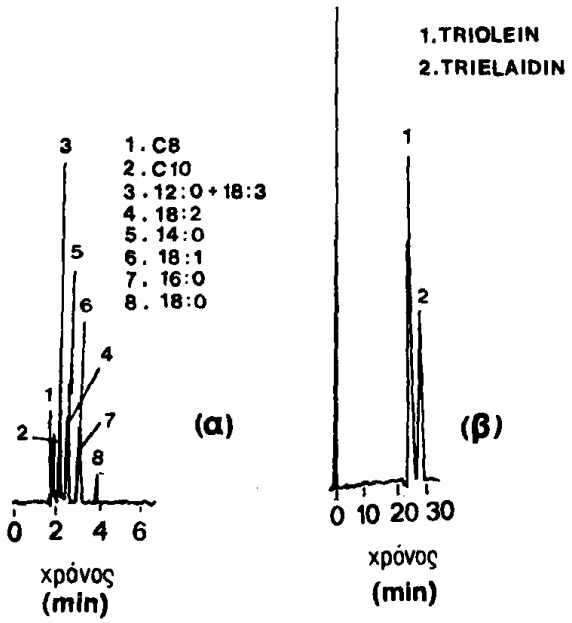
Σχ. 2-33. Διαχωρισμός τριγλυκεριδίων με την τεχνική της ανεστραμμένης φάσης (α) ελαιόλαδου (β) σογιέλαιου.
στήλη: SUPELCOSIL LC-18 κινούμενη φάση: ακετόνη: ακετονιτρίλιο 63.6:36.4 (V/V) ροή διαλύτη: 1.0 ml/min αντλία: Tracor 995. Ανιχνευτής: διαθλασίμετρο Waters R401 δείγμα: 10ml 10% ελαιολάδου ή σογιέλαιου στην κινούμενη φάση.

Διαχωρισμός μπορεί επίσης να επιτευχθεί και κατόπιν μετατροπής των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες[149] σε στήλη LC-18 (σχ. 2-34 α). Τέλος με την ίδια στήλη μπορεί να διαχωριστούν cis-trans ισομερή[1,9], όπως της τριολεΐνης και τριελαϊδίνης στο ελαιόλαδο (σχ. 2-34β).

(2) Φωσφολιποειδή (πολικά λιπίδια)

Προσδιορίστηκαν:τα φωσφολιποειδή του αυγού[150] σε μεθανολικό εκχύλισμα, χρησιμοποιώντας στήλη Ultrasil-NH_2 με βάση την πυριτική γη και ανιχνευτή UV στο λ=206 nm, οι λεκιθίνες δειγμάτων σοκολάτας[151], χρησιμοποιώντας παρόμοια στήλη και οι λεκιθίνες σόγιας και αυγού[152], χρησιμοποιώντας στήλη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-34. Διαχωρισμός (α) μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (β) ισομερών γλυκεριδίων με HPLC

(α) Στήλη: SUPELCOSIL LC-18 Κινούμενη φάση: ακετονιτρίλιο/ακετόνη(59:41)(V/V).ροή διαλύτη 1.0 ml/min. Αντλία: Tracor 995. Ανιχνευτής: διαθλασίμετρο Waters R401. Δείγμα: 10μl 9% C_8-C_{18} μεθυλεστέρες κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κινούμενη φάση.

(β) Στήλη SUPELCOSIL LC-18. Κινούμενη φάση: ακετόνη/ακετονιτρίλιο(63.6:36.4)(V/V). Ροή διαλύτη, αντλία, ανιχνευτής ίδια όπως στο (α). Δείγμα 10μl 9% τριολεΐνης και τριελαϊδίνης στην κινούμενη φάση.

μ-Bondapak C-18 με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης.

γ) προσδιορισμός Υδατανθράκων

(1) σάκχαρα

Διαχωρισμός και προσδιορισμός μονο-και ολιγο σακχάρων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ποικιλία στηλών και ανιχνευτών π.χ. ιονανταλλακτική στήλη και ηλεκτροχημικό αμπερομετρικό ανιχνευτή[153] ή στήλη μ-Bondapak και ανιχνευτή δείκτη διάθλασης[154] κ.ο.κ. (Σχ. 2.35)

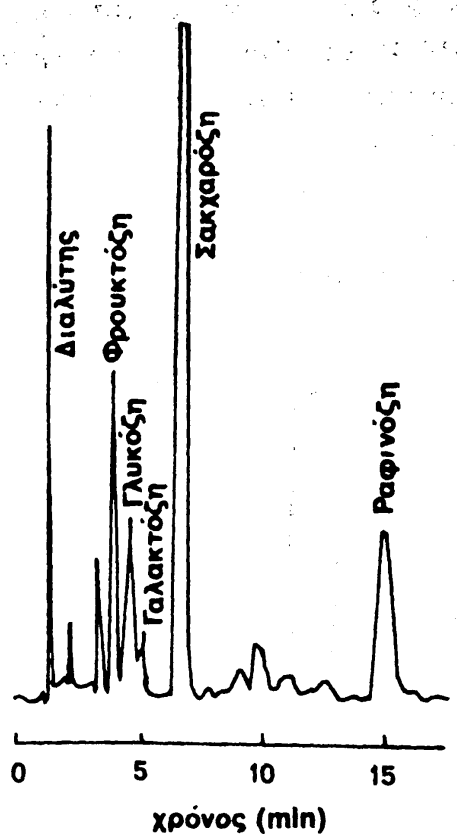
Προσδιορίστηκαν τα σάκχαρα σε είδη αρτοποιίας[155], σοκολάτα[156], σόγια[157], χυμούς φρούτων, και γαλακτοκομικά προϊόντα[158], παγωτά και γάλα[159], δημητριακά προγεύματος[160], φύτρο σιταριού[161], αμυλοσιρόπι[162] κ.τ.λ.

δ) Προσδιορισμός βιταμινών

(1) λιποδιαλυτές βιταμίνες (A.D.E.K)

Προσδιορίστηκαν: η βιταμίνη Α σε γάλα, μαργαρίνη και παιδικές τροφές[163] με στήλη LiChrosorb (10μm) και ανιχνευτή UV στο λ=235 nm, σε δημητριακά προγεύματος[164] με στήλη μ-Porasil και ανιχνευτή UV στο λ=313 nm και σε τυριά[165] με στήλη Nucleosil[10] C_{18} και ανιχνευτή UV στο λ=328 nm, τα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-35. Ανάλυση σακχάρων του σιταριού (φύτρο). Στήλη Spherisorb S5NH$_2$.250 mm x 4.6 mm. διαλύτης 75% ακετονιτρίλιο, 25% νερό, 3ml/min. ανιχνευτής: διαθλασίμετρο

καροτινοειδή σε μαργαρίνη[163], σε ντομάτες[166] με στήλη Partisil PxS 5/0DS και ανιχνευτή ορατού στο λ=470 και σε χυμό πορτοκαλιού[167] με στήλη Alumina (18-30μm) και ανιχνευτή ορατού στο λ=440nm, οι βιταμίνες D_2 και D_3 σε γάλα[168] με στήλη LiChrosorb (5μm) και ανιχνευτή UV στο λ=265 nm, σε μαργαρίνη και βούτυρο[169] με στήλη Nucleosil C_{18} (5μm) και ανιχνευτή UV στο λ=264, οι βιταμίνες E (τοκοφερόλες) σε φυτικά λάδια[170] με στήλη Jascopack-WC 03-500 και ανιχνευτή UV στο λ=295, σε δημητριακά και γάλα[171] με στήλη Li Chrosorb SI 60 (5μm) και ανιχνευτή UV στο λ=295, η βιταμίνη K σε γαλακτοκομικά προϊόντα[172].

(2) Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

Προσδιορίστηκαν: η θειαμίνη (B_1) σε κρέατα και πατάτες[173] με στήλη silica gel (20-30 μm) με ανιχνευτή φθορισμού κατόπιν οξείδωσης στην έξοδο της στήλης με KSCN και σε δημητριακά[174] με στήλη μ-Bondapak C_{18} και ανιχνευτή UV στο λ=254 nm, η ριβοφλαβίνη (B_2) σε γάλα[175] με στήλη ODS Sil-X-1 και ανιχνευτή φθορισμού, σε δημητριακά[174] και κρεατοσκευάσματα[176] με στήλη Spherisorb Silica (20 μm) και ανιχνευτή φθορισμού, η νιασίνη (νικοτινικό οξύ) σε δημητριακά[177] με στήλη μ-Bondapak C_{18} και ανιχνευτή UV στο λ=254, η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) σε χυμούς φρούτων[178] με στήλη μ-Bondapak C_{18}

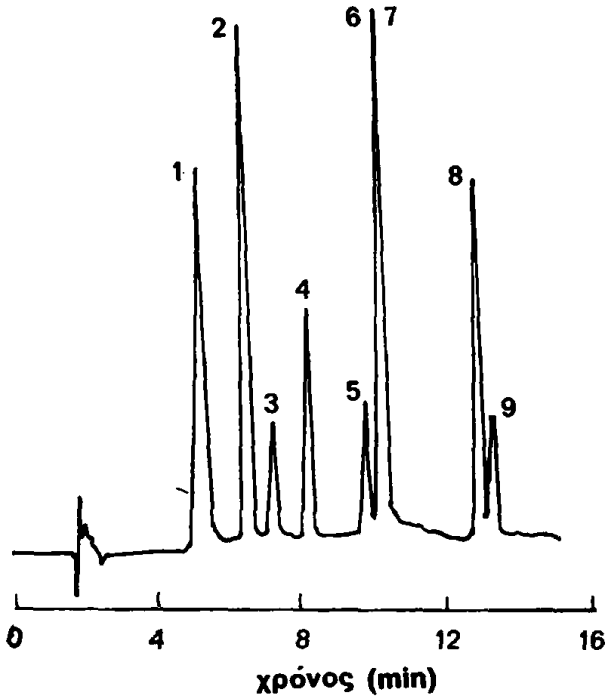
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

και ανιχνευτή UV στο λ=254 nm και σε φρούτα, γάλα και παιδικές τροφές[179] με στήλη LiChrosorb RP18 και ηλεκτροχημικό ανιχνευτή.

ε) Προσδιορισμός προσθέτων άμεσων και έμμεσων

(1) συνθετικά αντιοξειδωτικά

Προσδιορίστηκαν κατόπιν εκχύλισης με μίγμα ακετονιτριλίου/νερού/αλκοόλης τα αντιοξειδωτικά που φαίνονται στο σχήμα 2-36 σε φυτικά λάδια και ζωϊκά λίπη[180] με στήλη LiChrosorb RP-18 (10μm) και ανιχνευτή UV στο λ=280 nm.



Σχ. 2-36. Διαχωρισμός αντιοξειδωτικών με HPLC

1. προπυλεστέρας γαλλικού οξέος 2. 2,4,5 τριϋδροξυβουτυροφαινόνη 3. τριβουτυλυδροκινόνη 4. διυδρογουαρετικό οξύ 5. BHA 6. IONOX-100 7. οκτυλικός εστέρας γαλλικού οξέος 8. δωδεκυλικός εστέρας γαλλικού οξέος 9.BHT

(2) γλυκαντικές και αρωματικές ύλες

Προσδιορίστηκαν η σακχαρίνη σε αναψυκτικά[181] και κρασιά[182], η θεοφυλλίνη, θεοβρωμίνη και καφεΐνη σε σοκολάτα[183], καφέ[184] και τσάι[185] με στήλες C_8 και C_{18}, συστατικά των αιθερίων ελαίων, όπως η βανιλίνη, η ευγενόλη, η θυμόλη κ.α. σε εσπεριδοειδή[186] με στήλη Mypersil-SAS και ανιχνευτή UV στα 260nm

(3) Χημικά συντηρητικά

Προσδιορίστηκαν σορβικό και βενζοϊκό οξύ σε χυμούς εσπεριδοειδών[187], σορβικό οξύ σε κρασί[188] με στήλη Silica και νιτρωζαμίνες[189] (προϊόντα αντίδρασης των νιτρωδών αλάτων με τις πρωτεΐνες των τροφίμων). Αλλα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

έμμεσα πρόσθετα που μπορούν να προσδιοριστούν με HPLC περιλαμβάνουν κατάλοιπα φυτοφαρμάκων, αντιμικροβιακούς παράγοντες, χρωστικές κ.τ.λ.

(2) Ποσοτική ανάλυση

Ισχύουν και εδώ όσα αναπτύχθηκαν στην αέρια χρωματογραφία (βλ. κεφ. 2.8 Η2). Για ακριβείς ποσοτικές αναλύσεις προτιμάται η ισοκρατική ανάλυση (με σταθερή σύσταση διαλύτη). Η τεχνική της βαθμωτής έκλουσης (gradient elution) χρησιμοποιείται όπου είναι απολύτως αναγκαία. Η τελευταία παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι μεταβάλλει τη γραμμή βάσης (baseline) του χρωματογραφήματος με αποτέλεσμα να γίνεται δύσκολη η μέτρηση του ύψους και συνεπώς του εμβαδού κάθε κορυφής.

(3) Ανάλυση ιχνών

Η HPLC χρησιμοποιείται με επιτυχία για τον προσδιορισμό ουσών σε ίχνη ($C<0.01\%$), επειδή παρέχει (α) τη δυνατότητα πολλών συνδυασμών μεταξύ υγρών-στατικών φάσεων και κινούμενης (σύστημα διαλυτών) φάσης και (β) τη δυνατότητα χρήσης εκλεκτικών ανιχνευτών κατάλληλων για σχεδόν κάθε ουσία (UV, IR, φθορισμομέτρο κ.τ.λ.)

Εδώ χρησιμοποιείται συνήθως η τεχνική της χρωματογραφίας ανεστραμμένης φάσης όπου οι παρεμποδίζουσες ουσίες εξέρχονται σύντομα από τη στήλη και στη συνέχεια αναλύονται τα ιχνοστοιχεία. Η χρησιμοποιούμενη στήλη είναι συνήθως μικρού μήκους, το υλικό πλήρωσης έχει μέγεθος κόκκων ($d=10\mu m$) που παρέχει αριθμό θεωρητικών πλακών $N\simeq5000$.

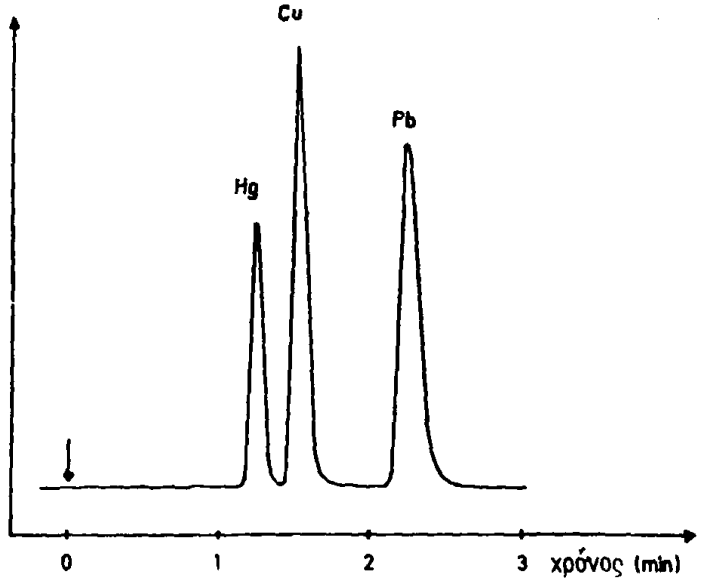
Χρησιμοποιούνται χαμηλές ταχύτητες κινούμενης φάσης ($u \simeq 0.2cm/sec$), και μεγάλοι, κατά το δυνατόν, όγκοι δειγμάτων. Συνήθως πριν από τη χρωματογράφιση προηγείται συμπύκνωση του δείγματος (σε ρεύμα ξηρού αζώτου) για εμπλουτισμό του στην υπό ανάλυση ουσία. Στο σχήμα 2-37 φαίνεται το αποτέλεσμα του προσδιορισμού των ιχνομετάλλων Hg, Cu και Pb σε δείγμα τροφίμου.

(4) Παρασκευαστική HPLC

Η HPLC αποτελεί εύχρηστη και αποτελεσματική τεχνική για την απομόνωση και τον καθαρισμό μεγάλων ποσοτήτων ουσιών ($w>0.1g$). Για τους σκοπούς αυτούς χρησιμοποιούνται στήλες μεγάλης εσωτερικής διαμέτρου (περίπου 8mm), με διάμετρο κόκκων του υλικού πλήρωσης περίπου 30-50μm. Η ποσότητα του δείγματος κυμαίνεται μεταξύ 1-10 mg/g υλικού πλήρωσης. Στους αντίστοιχους αναλυτικούς προσδιορισμούς η ποσότητα του δείγματος κυμαίνεται μεταξύ 0.01–1 mg/g υλικού πλήρωσης.

Τέτοιες μεγάλες ποσότητες δείγματος αυξάνουν το HETP που συνεπάγεται

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 2-37. Προσδιορισμός ιχνομετάλλων με HPLC στήλη: Nucleosil 100-10 30x0.23 cm διαλύτης: βενζόλιο 1.5 ml/min T=23°C, ανιχνευτής: UV 360nm

τη μείωση της αποτελεσματικότητας του διαχωρισμού, αλλά τέτοιοι παράγοντες παραβλέπονται στην παρασκευαστική χρωματογραφία.

Ειδική Βιβλιογραφία

1. **Andrews P.**, Biochem J. 91, 222 (1964)
2. **Andrews P.**, Biochem J. 96, 595 (1965)
3. **Bergner K.G.** and **Petri HR** Z. Lebensmitt. Unter. Forsch. III, 494 (1960)
4. **Kretovich VL** and **Ponomareva AV** Biokhimiya 26, 237 (1961)
5. **Lee LA** and **Caruso VI** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 41, 446 (1958)
6. **Clark BFC** J. Chromatogr 5, 368 (1961)
7. **Shoeb ZE** Grasas aceit 20, 4 (1969)
8. **Wierzchowski J** and **Witkowski H.** Mitt. Geb. Lebensmitt. Unters. u. Hyg. 57, 101 (1966)
9. **Yamamoto N** and **Miyakawa T.** J. Japan Oil Chem. Soc. 10, 200 (1961)
10. **Miyakawa T.** Fette Seifen Anstr. Mittel 61, 850 (1959)
11. **Genest C** and **Chapman DG.** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 45, 585 (1962)
12. **Herriman LE** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 45, 585 (1962)
13. **Valls C** and **Garcia-Olmedo R.** Anal. Bromat. 15, 127 (1963)
14. **Wyler O.** Mitt. Geb. Lebensmittel. Unters. u. Hyg. 55, 487 (1964)
15. **David S.** and **Hirshfeld H.** Bull. Soc. Chim. France 5, 1011 (1963)
16. **Kniewals J** and **Mildner P.** Kem. u. Ind. Zagreb 11, 639 (1962)
17. **Gustarson WR, Ledin GJ** and **Furst A.** J. Chromatogr. 24, 288 (1966)
18. **Hüttenrauch R** and **Klotz L.** J. Chromatogr. 12, 464 (1963)
19. **Szöke K** Nahrung 4, 825 (1960)
20. **Taüfel K** and **Serzich R** Nahrung 7, 606 (1963)
21. **Klotz L.** and **Hüttenrauch R** Arch. Pharm. Berlin 296, 721 (1963)
22. **Lichtenthaler HK.** J. Chromatogr. 13, 166 (1964)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

23. **Gorbach G.** Nahrung 12, 859 (1968)
24. **Duffield WD.** Analyst 83, 503 (1958)
25. **Sulser H.** Mitt. Geb. Lebensmitt. Unters. u. Hyg. 57, 66 (1966)
26. **Paris R** and **Rousselet R.** Ann. Pharm. Franc. 16, 747 (1958)
27. **Onrust H.** Chem. Weekbl. 55, 637 (1959)
28. **Onley JH.** and **Mills PA.** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 45, 983 (1962)
29. **Yip G.** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 47, 343 (1964)
30. **Henderson JL.** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 46, 209 (1963)
31. **Beynon KI** and **Elgar KE** Analyst 91, 143 (1966)
32. **Abbot DC** and **Egan M. Analyst 92, 475 (1967)**
33. **Del. C. Rego M** and **Garcia-Olmedo R** Anal. Bromat. 15, 53 (1963)
34. **Wojciechowicz M.** and **Andrelowicz A.** Chem. Anal. Warsaw. 4, 259 (1959)
35. **Fitelson J.** J. Assoc. Anal. Chem. 51, 937 (1968)
36. **Benk E** and **Krein G.** Riechstoff Arom. Koerperflegemittel 19, 55 (1969)
37. **Fitelson J.** J. Assoc. Agric. Chem. 45, 246 (1962)
38. **Kröler E.** Fette Seifen Anstr. Mittel. 64, 85 (1962)
39. **Kröler E.** Fette Seifen Anstr. Mittel. 65, 482 (1963)
40. **Kröler E.** Fette Seifen Anstr. Mittel. 70, 431 (1968)
41. **De Herrera EC** and **Portoles A.** Anal. Bromat. 17, 313 (1965)
42. **Padmoyo M** and **Baumgartner E.** Mitt. Lebensmittel. Unters u. Hyg. Bern 54, 432 (1963)
43. **Blank ML. Verdino B** and **Privett OS.** J. Amer. Oil Chem Soc. 42, 87 (1965)
44. **Franzke C.** and **Jantz. A.** Nahrung 8, 637 (1964)
45. **Γαλανού Δ.** και **Βουδούρη Ε.** «Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων», Αθήνα (1975)
46. **Cerbulis J** and **Zitte CA** Fette Seifen Anstr. Mittel 67, 273 (1965)
47. **Pokorny J** and **Janicek G.** Nahrung 11, 381 (1967)
48. **Bergelson LD, Dyatlovitskaya EV** and **Voronkova W.** J. Chromatogr. 15, 191 (1964)
49. **Carreau JP.** and **Raulin J.** J. Chromatogr. 15, 186 (1964)
50. **Supelco Inc.** Chromatography of Lipids Vol. V(3), June, (1971)
51. **Kirchner JC, Miller JM** and **Keller GJ.** Anal. Chem. 23, 420 (1951)
52. **Shehata AAY, Deman JM** and **Alexander JG.** Can. Inst. Food Sci. and **Tech. J. 5(1), 13 (1972)**
53. **Daridek J** and **Janicek G.** J. Chromatogr. 15, 542 (1964)
54. **Tore JP.** Chromatogr. —, — (1963)
55. **Grasshof H.** Deut. Apotheker-Ztg. 103, 1396 (1963)
56. **Marais JP.** J. Chromatogr. 27, 321 (1967)
57. **Lombard A.**, J. Chromatogr. 26, 283 (1967)
58. **Kringstad K.** Acta Chem. Scand. 18, 2399 (1964)
59. **Stella C.** and **Niccolai L.** Rev. Vitic. Enol. 19, 104 (1966)
60. **Wyler O.** Mitt. Geb. Lebensmittel. Unters. u. Hyg. 55, 487 (1964)
61. **Morris CJ.** Biochem J. 92, 68 (1964)
62. **Bancher E, Washuetti J.** and **Windtmann G.** Z. Lebensmittel Unters. u. Forsch. 138, 201 (1968)
63. **Brenner M., Niederwieser A.** and **Pataki G.** Experimentia 17:145 (1961)
64. **Ludwig E.** and **Freimuth U.** Nahrung 8, 563 (1964)
65. **Ludwig E** and **Freimuth U.** Nahrung 9, 41 (1965)
66. **Gänshirt H** and **Maizacher A,** Naturwissenschaften 47, 279 (1966)
67. **Popova VG, Popov K** and **Ilieva N.** J. Chromatogr. 24, 279 (1960)
68. **Brenner GC, Hinkley DF, Perkins LM** and **Weber S.** J. Org. Chem. 29, 2389 (1964)
69. **Tendille C, Bats J, Gerrais C.** and **Guborit J.** Ann. Physiol. Veg. Paris 7, 85 (1965)
70. **Egger K** and **Kleiding H.** Z. Analyt. Chem. 211, 187 (1965)
71. **Paris R.** Qualitas Pl. Mater. Veg. 16, 244 (1968)
72. **Synodinos E, Kotakis G** and **Kokkoti-Kotaki E.** Riv. Ital. Sosttanze Grasse 40, 674 (1963)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

73. **Chapman WB** and **Oakland D.** J. Assoc. Publ. Anal. 6, 124 (1968)
74. **Prahl L. Engst R** and **Jarmatz E.** Nahrung 12, 845 (1968)
75. **Ludwig E** and **Freimuth U.** Nahrung 9, 751 (1965)
76. **Korbelak T** and **Bartlett JN.** J. Chromatograph. 41, 124 (1969)
77. **Korbelak T** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52, 487 (1969)
78. **Glavind J.** and **Holmer L. K.** Amer. Oil Chem. Soc. 44, 539 (1967)
79. **Kovacs MFJ.** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 48, 1018 (1965)
80. **Papington J.C.** J. Assoc. Publ. Anal. 6, 25 (1968)
81. **Eppley RM** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49, 1218 (1966)
82. **Beckwith AC** and **Stoloff L.** J. Assoc. Off Anal. Chem. 51, 662 (1968)
83. **Pons WAJ, Cucullu AF, Lee LS. Robertson JA, Franz AO** and **Goldblatt LA.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49, 554 (1966)
84. **Purchase FH** and **Steyn M.** J. Assoc. Off Anal. Chem. 50, 363 (1967)
85. **Masri MS, Page JR** and **Garcia VR.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 52, 641 (1969)
86. **Prat Y** and **Stoll S.** Ann. Falsif. Expert. Chim. 61, 5 (1968)
87. **Betts TJ.** J. Pharm. Pharmac. 17, 520 (1965)
88. **Alvarez BN** Analyst 92, 176 (1967)
89. **Sliwiok J.** Mikrochim, Ichnoanalyst Acta 2, 294 (1965)
90. **Chakrabarty MM, Bhattacharyya D.** and **Mondal B.** Indian J. Tech. 1, 473 (1963)
91. **Γαλανού ΔΣ** και **Βουδούρη ΕΚ.** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων, Αθήνα (1975)
92. **Supelco Inc. "Reference Lipids", Bellefonte, PA (1983)**
93. **Supelco Inc** Fatty Acid Analysis Bull. 727 H, Bellefonte PA (1975)
94. **Shehata AAY Deman JM** and **Alexander JC** Can. Inst. Food Sci. and Tech. 5(No1) 13 (1972)
95. **Fioriti JA, Krampl V** and **Sims RJ.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 44, 534 (1967)
96. **Kuksis A.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 269 (1965)
97. **Litchfield C, Harlow** and **Reiser R** J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 849 (1965)
98. **Kuksis A** and **Breckenridge WC** J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 978 (1965)
99. **Spiteri J. Castang** and **Solere M.** Ann. Falsif. Expert. Chim. 56, 93 (1963)
100. **Calzolari** and **Cerma E** Riv. Ital. Sostanze Grasse 40, 176 (1963)
101. **Eisner J** and **Firestone D.** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 46, 542 (1963)
102. **Kaufmann HP** and **Wessels H.** Fette Seifen Austr. Mittel 69, 338 (1967)
103. **Hubbard AWE** and **Pocklington WD** J. Sci. Food Agr. 19, 571 (1968)
104. **Provvedi F** and **Ciallella G** Riv Ital. Sostanze Grasse 38, 361 (1961)
105. **Doro B** and **Gabucci G.** Boll Lab. Chirm. Provinciali 14, 3 (1963)
106. **Eisner J. Wong N.P., Firestone D** and **Bond J.** J. Ass. Off. Agric. Chem. 45, 337 (1962)
107. **Flament I, Willhelm B** and **Ohloff G.** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens June 27-29, Academic Press (1978)
108. **Kohnstam H** and Co. Flavor Ind. 2(No4) 212 (1971)
109. **Cramer DA** Food Tech. May:249 (1983)
110. **Tarr HLA** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens June 27-29 Academic Press (1978)
111. **Day EA Proc.** Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens June 27-29 Academic Press (1978)
112. **Adda J., Roger S.** and **Dumont JP** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens June 27-29 Academic Press (1978)
113. **Manning DJ** amd **Moore C.** J. Dairy Res. 46(3) 539 (1979)
114. **Johnson JA, Rooney L** and **Salem A** Adv. in Chem Ser. No 56 A.C.S. Washington D.C. (1966)
115. **Voudouris E.C., Komaitis ME** and **Pattakou** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens, June 23-29, Academic Press (1978)
116. **Teranishi R.** Adv. in Chem. Ser. No 56 ACS Washington DC. (1966)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

117.**Bernhard RA** Adv. in Chem. Ser. No 56 ACS Washington DC (1966)
118.**Montedoro G. Bertuccioli M** and **Anichini F** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens June 27-29, Academic Press (1978)
119.**Min. DB** J. Food Sci 46, 1453 (1981)
120.**Krishnamurthy RG, Smouse TH, Mookherjee BD, Reddy BR** and **Changs S** J. Food Sci 32(4) 372 (1967)
121.**Reymond D** and **Rostagno W.** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens, June 27-29, Academic Press (1978)
122.**Yamanishi T.** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens, June 27-29, Academic Press (1978)
123.**Alberola J.** and **Izquierdo L.J.** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens June 27-29, Academic Press (1978)
124.**Ribéreau-Gayon P** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens, June 27-29, Academic Press (1978)
125.**Eriksson P.J.** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens, June 27-29, Academic Press (1978)
126.**Moll M. Vinh. T** and **Floyeux R.** Proc. Flavor of Foods and Beverages Symp. Athens, June 27-29, Academic Press (1978)
127.**Konigsbacher KS** and **Donworth ME** Adv. in Chem. Ser. No 56 ACS, Washington DC (1966)
128.**Abbot DC** and **Egan H.** Analyst 92, 475 (1967)
129.Report of the Government Chemist 34(1968)
130.**Kontominas M.G.** and **Voudouris E.C.** Chim. Chrom. New Series, 11, 215 (1982)
131.**Heath JL** and **Reilly M** Poultry Sci. 60(10), 2258 (1981)
132.**Kontominas MG, Hatzidimitriou E** and **Voudouris E.K.** Sci. des Alim. 5, 331 (1985)
133.**Savoy CF, Heinis JL** and **Seals RG.** Analyt Biochem. 68, 562 (1975)
134.**Hamilton P.B.**, Ann. N.Y. Acad. Sci 102, 55 (1962)
135.**Hurst WJ** and **Martin RA** J. Agric. Food Chem. 28, 1039 (1980)
136 **Schuster R** Analyt. Chem. 52, 617 (1980)
137.**Saetre R** and **Rabenstein DL** J. Agr. Food Chem. 26, 982 (1978)
138.**Knox R, Kohler GO, Palter R** and **Walker HG,** Analyt Biochem. 36, 136 (1970)
139.**De Vres JW, Koski CM, Egberg DC** and **Larson PA** J. Agric. Food Chem. 28, 896 (1980)
140.**Warthesen JJ** and **Kramer PL** Cereal Chem. 55, 481 (1978)
141.**Peterson WR** and **Warthesen JJ,** J. Food Sci. 44, 994 (1979)
142.**Rangeley WRD** and **Lawrie RA,** J. Food Tech. 11, 143 (1976)
143.**Abe H.** Bull Jap. Soc. Sci Fish. 47, 139 (1981)
144.**Haagema N** and **Slump P.** Z. Lebensmittelunters u-Forsch 167, 238 (1978)
145.**Schormüller J.** Adv. Food Res. 16, 231 (1968)
146.**Claperton JF,** J. Inst. Brew. 77, 177 (1971)
147.**Bailey FJ** J. Sci. Food Agr. 27, 827 (1976)
148.**Busch KJ, Russell RW** and **Young JW** J. Liquid Chromatogr. 2, 1367 (1979)
149.**Supelco Inc** HPLC bulletin 787 B, Bellefonte, Penn USA (1980)
150.**Hanson VL Park JY** and **Kival RM** J. Chromatogr. 205, 393 (1981)
151.**Hurst WJ** and **Martin RA** J. Amer. Oil Chem. Soc. 57, 307 (1980)
152.**Porter NA, Wolf RA** and **Nixon JR** Lipids 14(1) 20 (1978)
153.**Franklin GO** Inter. Lab. (July/Aug) 56, (1985)
154.**Palmer JK** Anal. Lett. 8, 215(1975)
155.**Timbie DJ** and **Keeney PG,** J. Food Sci 42, 1590 (1977)
156.**Hurst WJ** and **Martin Ra** J. assoc. Off. Anal. Chem. 60, 1180 (1973)
157.**Havel E, Tweeten TN, Seib PA, Wetzer DL** and **Liang YT** J. Food Sci 42, 666 (1977)
158.**Hurst WJ. Martin RA** and **Zoumass BL** J. Food Sci 44, 892 (1977)
159.**Wartesen JJ** and **Kramer PL** J. Food Sci 44, 626 (1979)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

160.**Macrae R.** HPLC in Food Analysis Academic Press, London (1982)
161.**Macrae R.** HPLC in Food Analysis Academic Press, London (1982)
162.**Macrae R.** HPLC in Food Analysis Academic Press, London (1982)
163.**Thompson JN** and **Maxwell WB** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 766 (1977)
164.**Widicus WA** and **Kirk JR** J. Ass. Off. Anal. Chem. 62, 637 (1979)
165.**Bui-Nguyen MH** and **Blanc B.**, Experimentia 36, 374 (1980)
166.**Zakaria M, Simpson K, Brown PR** and **Krstulovic A.** J. Chromatogr. 176, 109 (1979)
167.**Reeder SK** and **Park GL** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58, 595 (1975)
168.**Thompson JN, Maxwell WB** and **L'Abbe M** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 998 (1977)
169.**Van Niekerk PJ** and **Smit SCC**; J. Amer. Oil. Chem. Soc. 57, 417 (1980)
170.**Abe K, Yuguchi Y** and **Katsui G** J. Nutr. Sci Vitaminol 21, 183 (1975)
171.**Thompson JN** and **Hatina G.** J. Liquid Chromat. 2, 327 (1979)
172.**Barnett SA, Erick LA** and **Baine HM,** Analyt. Chem. 52, 610 (1980)
173.**Van de Weerdhof T, Wiersum ML** and **ReissenWeber H** J. Chromatogr. 83, 455 (1973)
174.**Kamman JF, Labuza TP** and **Warthesen JJ** J. Food Sci. 45, 1497 (1980)
175.**Williams ATR** and **Slavin W,** Chromat. Newsl. 5,9 (1977)
176.**Ang. CYW** and **Moseley FA** J. Agric. Food Chem. 28, 483 (1980)
177.**Tyler TA** and **Shrago RR** J. Liquid Chromat. 3, 269 (1980)
178.**Sood SP, Sartori LE, Wittmer DP** and **Haney WG** Analyt. Chem. 48, 796 (1976)
179.**Pachla LA** and **Kissinger PT,** Methods Enzymol. 62, 15 (1979)
180.**Page D B** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 1239 (1979)
181.**Woodward BB, Heffelingen GP** and **Ruggles DT** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 1011 (1979)
182.**Tenenbaum M** and **Martin GE** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 1321 (1977)
183.**Wildanger WA** J. CHromatogr. 114, 480 (1975)
184.**Madison BL,** Kozarek WJ and **Dame CP** J. Assoc. Off Anal. Chem. 59, 1258 (1976)
185.**Van Duijn S** and **Van der Stegen GHD** J. Chromatogr. 179, 199 (1979)
186.**Ross MSF** J. Chromatogr. 160, 199 (1978)
187.**Bennett MC** and **Petrus DR** J. Food Sci. 92, 1220 (1977)
188.**McCalla MA, Mark FG** and **Kipp WH** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 60, 71 (1977)
189.**Cox GB** J. Chromatogr. 83, 471 (1973)

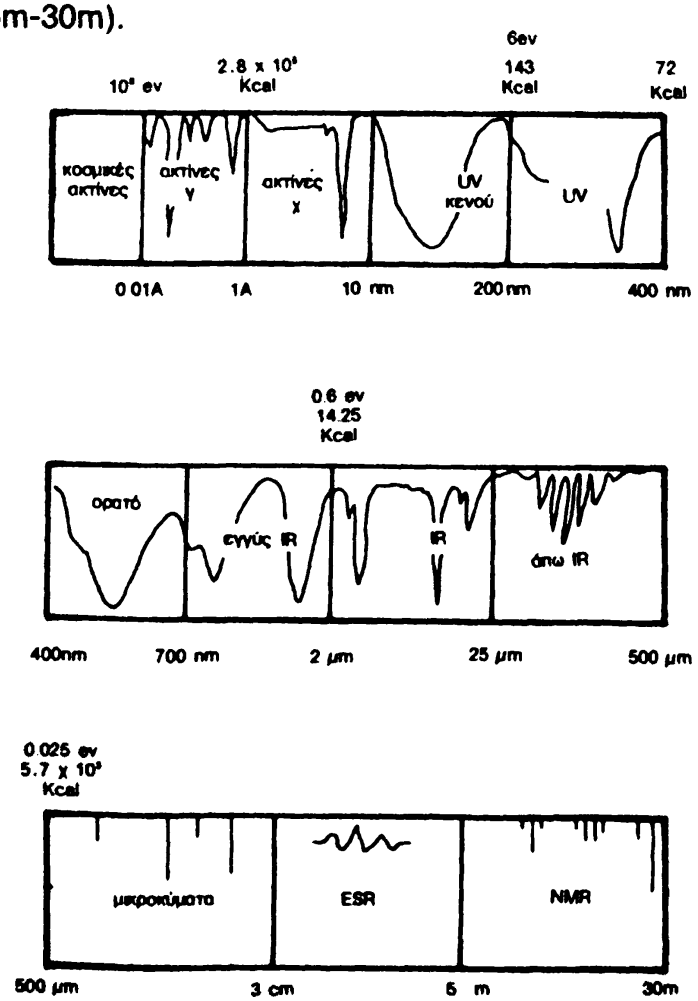
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

3.1. Εισαγωγή

Η φασματοφωτομετρία είναι ενόργανη μέθοδος ανάλυσης που βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ύλης και της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (σχ. 3-1) αποτελείται από διάφορες περιοχές που κατά σειρά αυξανόμενου μήκους κύματος (λ) ή ελαττούμενης ενέργειας (Ε) είναι: οι κοσμικές ακτίνες μέχρι 0.01A, οι ακτίνες γ (0.01A~1A), οι ακτίνες x (1A-10 nm) οι υπεριώδεις ακτίνες (10-400 nm), το ορατό (400-700 nm), το εγγύς υπέρυθρο (700 nm - 2 μm), το υπέρυθρο (2-500 μm), τα μικροκύματα (500 μm - 3 cm), η περιοχή ESR (electron spin resonance, 3cm - 5 m) και η περιοχή NMR (nuclear magnetic resonance, 5m-30m).



Σχ. 3-1. Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Οι βασικές σχέσεις που συνδέουν τη συχνότητα (ν), το μήκος κύματος (λ), και την ενέργεια (Ε) της ακτινοβολίας είναι οι εξής:

$$\lambda . \nu = c \qquad (3.1)$$

$$E = h . \nu \qquad (3.2)$$

όπου: λ εκφράζεται σε (cm)

ν εκφράζεται σε cycles/sec

c = ταχύτητα φωτός = 3×10^{10} cm/sec

h = σταθερή Planck = 6.62×10^{27} erg/sec.

E= erg ή eV

Τα άτομα της ύλης αποτελούνται από συγκεκριμένο αριθμό ηλεκτρονίων τα οποία κινούνται πάνω σε αυστηρά καθορισμένες τροχιές ορισμένης ενέργειας. Η συνολική ενέργεια κάθε ατόμου (Εσυν) δίνεται από τη σχέση (3.3):

$$\text{Εσυν} = \text{Επερ} + \text{Εδον} + \text{Επυρ} + \text{Εηλ}. \qquad (3.3)$$

όπου: Επερ = ενέργεια οφειλόμενη στη περιστροφική κίνηση των ηλεκτρονίων μέσα στο άτομο

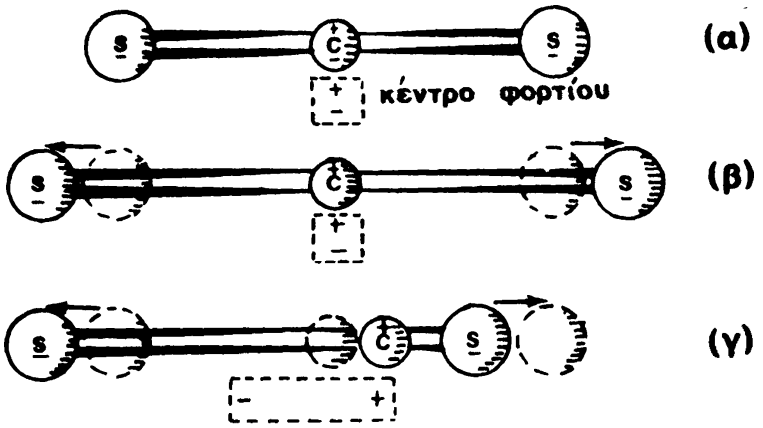
Εδον = ενέργεια οφειλόμενη στις δονήσεις των ηλεκτρονίων μέσα στο άτομο

Επυρ = ενέργεια του πυρήνα

Εηλ = ενέργεια ηλεκτρονίων λόγω κάποιας απόστασης τους από τον πυρήνα.

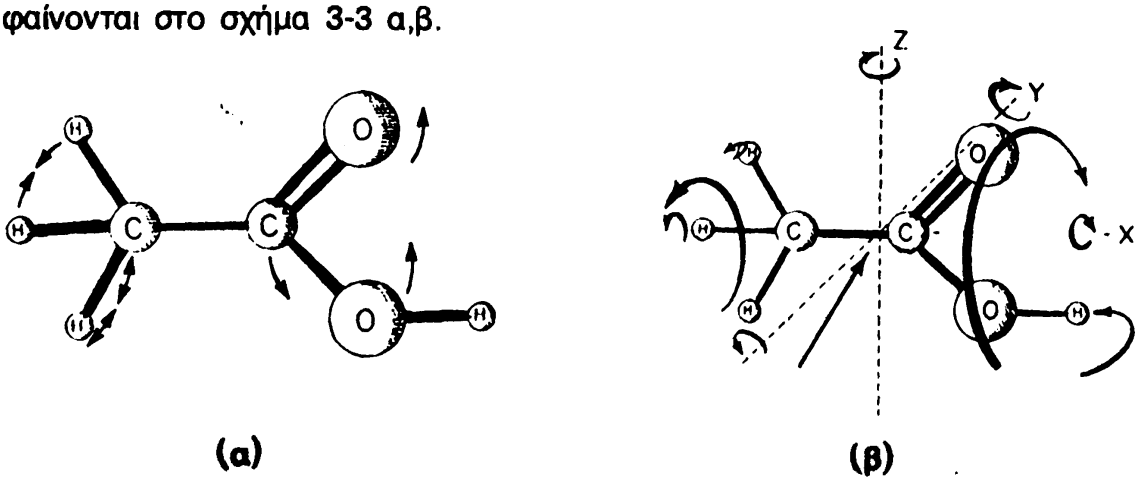
Όταν η ακτινοβολία διέλθει μέσω της ύλης είναι δυνατόν κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις να απορροφηθεί ένα μέρος αυτής από τα άτομα της ύλης. Για να απορροφηθεί ενέργεια θα πρέπει να ικανοποιούνται οι εξής δύο όροι: (1) η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι ίση με τη συχνότητα δόνησης, περιστροφής, ηλεκτρονική ή πυρηνική των ατόμων της ύλης και (2) να παράγεται κάποιο έργο από την ακτινοβολία στα άτομα της ύλης. Για να γίνει κατανοητός ο δεύτερος αυτός όρος, έστω το μόριο του CS_2 (σχημ. 3-2) με τα δύο άτομα του θείου δεξιά και αριστερά του ατόμου του άνθρακα. Έστω ακόμη ότι η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ισούται με τη συχνότητα δόνησης των ατόμων του S από και προς το άτομο του C. Στη συμμετρική δόνηση του μορίου CS_2 (σχ. 3-2 β). Όσο έργο χρειάζεται για τη μετακίνηση του ενός ατόμου S προς τα αριστερά, τόσο χρειάζεται και για τη μετακίνηση του δεύτερου ατόμου S προς τα δεξιά, έτσι ώστε η συνολική εκτέλεση έργου από την ακτινοβολία στο μόριο του CS_2 να είναι μηδενική. Στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρείται απορρόφηση ακτινοβολίας από την ύλη. Στη μη συμμετρική δόνηση του μορίου (σχ. 3-2 γ) το έργο για την απομάκρυνση του πρώτου S προς τ' αριστερά είναι διαφορετικό εκείνου που χρειάζεται για την μετακίνηση του δευτέρου S προς τα δεξιά. Το συνολικά

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



Σχ. 3-2. Συμμετρικές και μη συμμετρικές δονήσεις του μορίου CS_2

εκτελούμενο πάνω στο μόριο του CS_2 έργο είναι διάφορο του μηδενικού και επομένως παρατηρείται απορρόφηση ακτινοβολίας από την ύλη.
Η απορροφούμενη ενέργεια προκαλεί συνήθως περιστροφικές μεταπτώσεις του μορίου (0.1-2 Kcal/mol) στο αποϋπέρυθρο, δονητικές μεταπτώσεις (2-10 Kcal/mol) στο υπέρυθρο, ηλεκτρονικές μεταπτώσεις (10-100 Kcal/mol) στο υπεριώδες, ιονισμό των ατόμων της ύλης (>100 kcal/mol) στην περιοχή των ακτίνων χ, γ κ.τ.λ.
Οι κυριότερες δονήσεις και περιστροφές για το μόριο του CH_3COOH φαίνονται στο σχήμα 3-3 α,β.



Σχ. 3-3. Μοριακές δονήσεις (α) και περιστροφές (β) του CH_3COOH

Από τις παραπάνω ενεργειακές τιμές για τις διάφορες μεταπτώσεις, συνάγεται πως κάθε ηλεκτρονική μετάπτωση δυνατόν να συνοδεύεται από πολλές δονητικές μεταπτώσεις και κάθε δονητική από πολλές περιστροφικές μεταπτώσεις) αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό το φάσμα IR (ενέργεια στην περιοχή της οποίας προκαλούνται δονητικές και περιστροφικές μεταπτώσεις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ενώσεων, σε αντιδιαστολή με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

το φάσμα UV (ενέργεια στη περιοχή της οποίας προκαλούνται ηλεκτρονικές μεταπτώσεις) το οποίο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον παραπάνω σκοπό.
Με την απορρόφηση ενέργειας σ' ένα μήκος κύματος, το άτομο μεταπίπτει από τη βασική σε διηγερμένη κατάσταση. Αν η απορρόφηση επαναληφθεί σε διαφορετικά μήκη κύματος, τότε λαμβάνεται το σύνολο των διεγέρσεων που είναι χαρακτηριστικές της ιδιαίτερης δομής του υπό εξέταση ατόμου, γνωστό σαν **φάσμα απορρόφησης** αυτού. Όταν σε κάποια χρονική στιγμή, κάτω από ορισμένες συνθήκες, το άτομο αποβάλλει την επί πλέον ενέργεια που απορρόφησε, μεταπίπτει στην αρχική του κατάσταση. Έτσι προκύπτει το αντίστοιχο **φάσμα εκπομπής** του ατόμου.
Ανάλογα με το ποσό της ενέργειας που απορροφάται στην κάθε περίπτωση, στη Φασματοφωτομετρία περιλαμβάνονται οι εξής τεχνικές:
- Φασματοφωτομετρία ορατού και υπεριώδους
- Φασματοφωτομετρία υπερύρθου
- Φθορισμομετρία
- Φλογοφωτομετρία
- Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης
- Φασματοφωτομετρία Μαζών
- Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

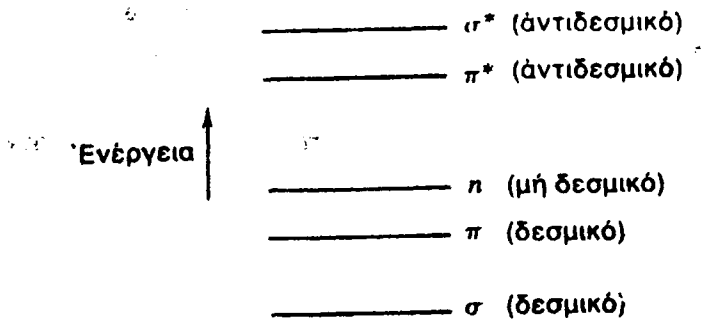
3.2. Φασματοφωτομετρία ορατού - υπεριώδους

Το απορροφούμενο, στις περιοχές του ορατού και υπεριώδους, ποσό ακτινοβολίας (10-100 Kcal/mol) προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων από τροχιές χαμηλότερης σε τροχιές υψηλότερης ενέργειας. Τα ηλεκτρόνια που μετέχουν στις μεταπτώσεις αυτές είναι συνήθως των εξωτερικών στοιβάδων και συνήθως συμμετέχουν σε π δεσμούς. Δηλαδή παρατηρούνται μεταπτώσεις του τύπου $\pi \rightarrow \pi^*$ καθώς και $n \rightarrow \pi^*$ (σχημ. 3-4) όπου:
π = δεσμικά π τροχιακά
π* αντιδεσμικά π τροχιακά
n = μη δεσμικά τροχιακά

Α. Οργανολογία

Η διαδικασία της απορρόφησης ακτινοβολίας από διάλυμα μιας ουσίας καθώς και η μέτρηση του ποσού της απορροφούμενης ακτινοβολίας γίνεται με ειδικά όργανα, σπουδαιότερα από τα οποία είναι τα εξής:
(1) φασματοφωτόμετρο
(2) φωτόμετρο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-4. Ενεργειακό διάγραμμα ηλεκτρονικών μοριακών τροχιακών.

(3) χρωματόμετρο

(1) Το φασματοφωτόμετρο (σχ. 3-5) απλουστευμένες μορφές του οποίου αποτελούν τα φωτόμετρα και χρωματόμετρα, αποτελείται από τα εξής βασικά στοιχεία:

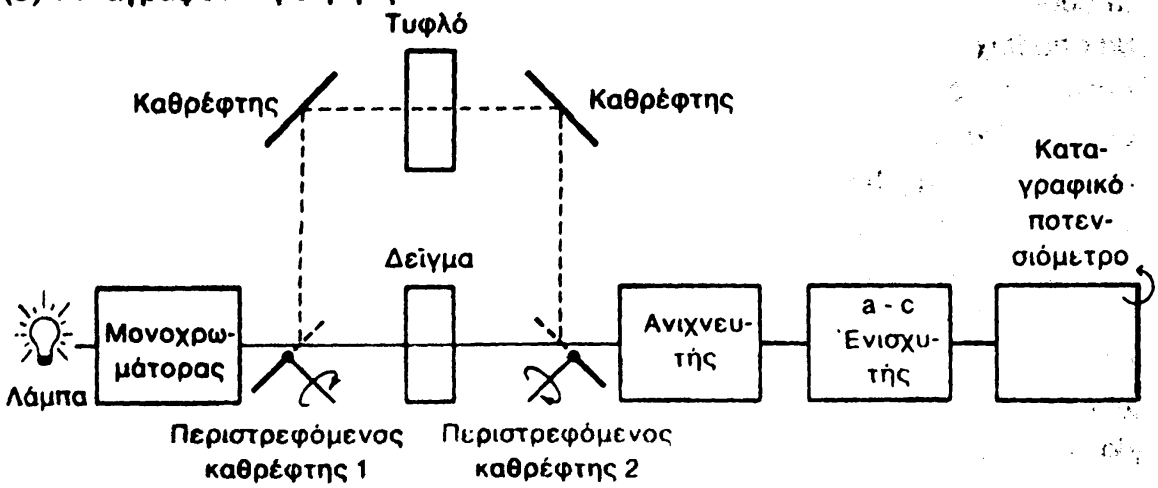
(α) πηγή της ακτινοβολίας

(β) σύστημα επιλογής καταλλήλου μήκους κύματος - μονοχρωμάτορα

(γ) κυψελίδα για το δείγμα - διαλύτη

(δ) ανιχνευτή

(ε) καταγραφέα - μετρητή



Σχ. 3-5. Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης με περιστρεφόμενους καθρέφτες.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3-5, ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος διερχόμενη μέσω διαλύματος του δείγματος απορροφάται μερικά. Το εξερχόμενο μη απορροφηθέν ποσόν αυτής φτάνει στον ανιχνευτή όπου μετρείται. Εξέλιξη του τύπου αυτού φασματοφωτομέτρου (όργανο απλής δέσμης), είναι το όργανο διπλής δέσμης με το οποίο αποφεύγεται το σφάλμα της διακύμανσης του δυναμικού της πηγής ακτινοβολίας καθώς και το σφάλμα λόγω απορρόφησης ορισμένου ποσού ακτινοβολίας από τον διαλύτη.

Η ακτινοβολία σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης διακλαδίζεται με τη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

βοήθεια καθρέφτη σε δύο δέσμες: η μία διέρχεται μέσω του δείγματος, ενώ η δεύτερη μέσω του διαλύτη (τυφλό). Ο ανιχνευτής ρυθμίζεται έτσι ώστε να «βλέπει» τη διαφορά των δύο σημάτων που φτάνουν σ' αυτόν. Έτσι το φάσμα που λαμβάνεται οφείλεται αποκλειστικά στην υπό εξέταση ουσία και όχι και στο διαλύτη.

(α) πηγή ακτινοβολίας

Για το ορατό τμήμα της ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λυχνία βολφραμίου (tungsten lamp). Για το υπεριώδες χρησιμοποιούνται λυχνίες He, Hg και Δευτερίου.

(β) μονοχρωμάτορας

Είναι διάταξη που επιτρέπει σε ορισμένο ή ορισμένα μήκη κύματος της ακτινοβολίας να διέλθουν μέσω του δείγματος. Επιλέγονται δε εκείνα τα μήκη κύματος που αντιδρούν εντονότερα με το δείγμα. Τα σχετικά φτηνά όργανα (φωτόμετρα) χρησιμοποιούν αντί μονοχρωμάτορα, φίλτρα από γυαλί που απομονώνουν περιοχή της ακτινοβολίας ίση προς 30-50 nm. Τα χρωματόμετρα, ακόμη φτηνότερα όργανα, χρησιμοποιούν το φως της ημέρας σαν πηγή ακτινοβολίας χωρίς τη χρήση κανενός φίλτρου. Αντίθετα ο μονοχρωμάτορας απομονώνει περιοχή της ακτινοβολίας ίση προς ~ 10 nm πράγμα που, όπως θα αποδειχθεί αμέσως παρακάτω, καθιστά πολύ πιο ευαίσθητη στην ανάλυση. Έστω π.χ. διάλυμα $KMnO_4$ (μωβ χρώματος) μέσω του οποίου διέρχεται ακτινοβολία των εξής μηκών κύματος: μωβ, μπλε, πράσινο, κίτρινο και κόκκινο. Από τις 100 μονάδες της προσπίπτουσας ακτινοβολίας θα εξέλθουν του διαλύματος οι 75. Το μόνο μέρος της ακτινοβολίας που ουσιαστικά απορροφήθηκε είναι εκείνο που αντιστοιχεί στο πράσινο χρώμα. Αν τώρα με την παρεμβολή μονοχρωμάτορα προσπέσουν πάνω στο διάλυμα $KMnO_4$ 100 μονάδες ακτινοβολίας που όλες αντιστοιχούν στο πράσινο χρώμα τότε μετά την απορρόφηση του μεγαλύτερου μέρους της ακτινοβολίας από το δείγμα θα εξέλθουν μόνο 5 μονάδες. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρήθηκε απορρόφηση 100%-75% = 25%, ενώ στη δεύτερη 100%-5% = 95%. Με τη χρήση συνεπώς του μονοχρωμάτορα αυξάνεται σημαντικά (στην προκείμενη περίπτωση σχεδόν τετραπλασιάζεται) η ευαισθησία του προσδιορισμού.

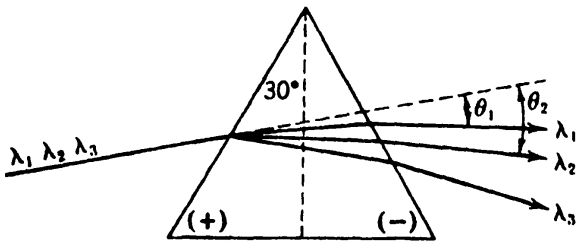
Οι μονοχρωμάτορες είναι δύο τύπων:

(i) πρίσματα (prisms)

(ii) φράγματα ανάκλασης - περίθλασης (diffraction gratings)

(i) Το πρίσμα (σχ. 3-6) διαχωρίζει την πολυχρωματική ακτινοβολία σε μικρές ζώνες μηκών κύματος που εξέρχονται από το πρίσμα με διαφορετικές κατευθύνσεις. Για να κατευθυνθεί το επιθυμητό μήκος κύματος προς τη σχισμή εξόδου, γίνεται κατάλληλη περιστροφή του πρίσματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-6. Διασπορά πολυχρωματικής ακτινοβολίας από πρίσμα Cornu

Για να επιτευχθεί μεγάλη διαχωριστική ικανότητα της πολυχρωματικής ακτινοβολίας δηλαδή καλός γωνιακός διαχωρισμός των διαφόρων μηκών κύματος, απαιτείται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διασπορά (dispersion). Η διασπορά ορίζεται ποσοτικά σαν το πηλίκον dθ/dλ που είναι η μεταβολή της γωνίας απόκλισης προς την αντίστοιχη μεταβολή του μήκους κύματος. Η διαχωριστική ικανότητα του πρίσματος αυξάνει κοντά στα μήκη κύματος της ακτινοβολίας που απορροφά. Για το υπεριώδες χρησιμοποιούνται πρίσματα από χαλαζία (κρυστ[illegible] μορφή Si) τα οποία μεταδίδουν ακτινοβολία μέχρι τα 200 nm. Τα υψηλής ποιότητας πρίσματα από SiO_2 μεταδίδουν μέχρι τα 185 nm. Το κύριο μειονέκτημα των πρισμάτων είναι ότι η διασπορά μεταβάλλεται με το μήκος κύματος. Συγκεκριμένα η διασπορά αυξάνεται σε μήκη κύματος που είναι κοντά στις ζώνες απορρόφησης του πρίσματος.

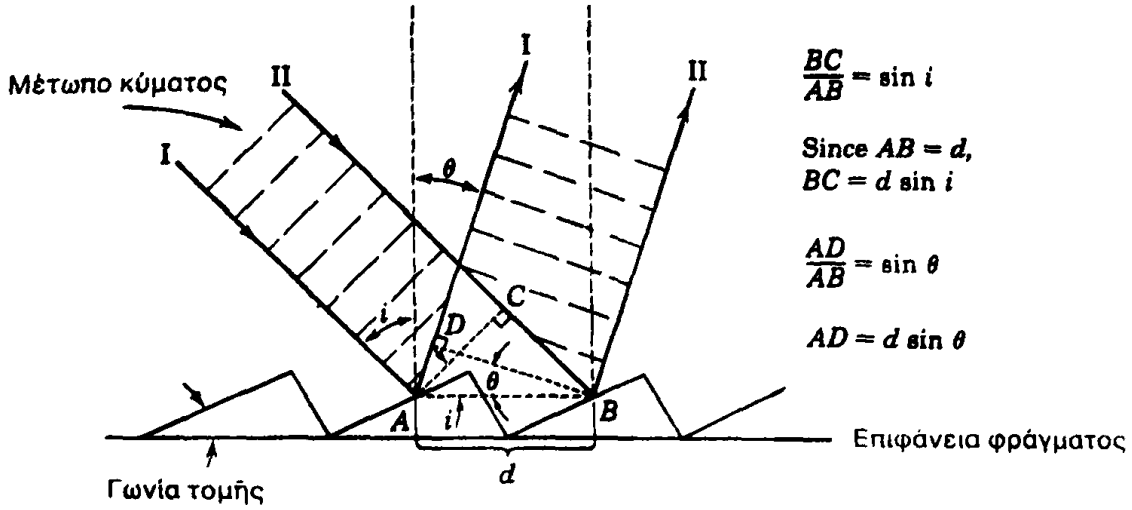
(ii) Το μειονέκτημα αυτό των πρισμάτων ξεπερνιέται με τη χρήση φραγμάτων ανάκλασης τα οποία παρουσιάζουν σταθερή γωνιακή διασπορά σε ολόκληρη την περιοχή μεταξύ 200-800 mm. Ένα άλλο πλεονέκτημα των φραγμάτων είναι ότι επηρεάζονται λιγότερο από τους υδρατμούς σε σχέση με τα πρίσματα. Η διαδικασία παραγωγής μονοχρωματικής ακτινοβολίας με τη βοήθεια φράγματος ανάκλασης στηρίζεται σε εντελώς διαφορετική αρχή. Τα φράγματα ανάκλασης κατασκευάζονται κατόπιν εξάτμισης μεταλλικού στρώματος (film) πάνω σε επιφάνεια από γυαλί και στη συνέχεια χάραξης της επιφάνειας αυτής σε ίσια και παράλληλα αυλάκια (γραμμές). Τα συνηθισμένα φράγματα έχουν από 600-2.000 γραμμές/mm.

Αποδεικνύεται πως όταν μονοχρωματική ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια φράγματος ανάκλασης (γραμμές I και II σχημ. 3-7) συμβαίνει ενίσχυση της ανακλώμενης ακτινοβολίας, αν η διαφορά πορείας στις γραμμές I και II είναι ακέραιο πολλαπλάσιο (1, 2, 3...n) μηκών κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η εξίσωση που περιγράφει το φαινόμενο αυτό είναι:

$$n\lambda = d(\eta\mu i + \eta\mu\theta) \qquad (3.4)$$

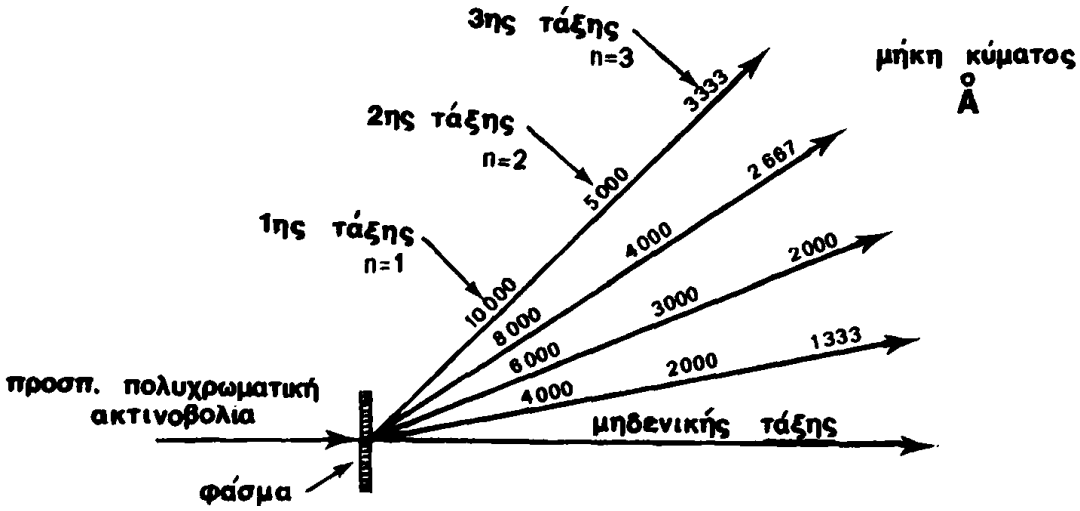
όπου: n ακέραιος που ορίζει την τάξη της ακτινοβολίας. Δηλαδή **μονοχρωματική** ακτινοβολία που συναντά ένα φράγμα ανάκλασης υπό γωνία

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-7. Ενίσχυση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα φράγμα ανάκλασης.

i, μπορεί να υποστεί ενίσχυση σε διάφορες γωνίες θ, που εξαρτώνται από την τάξη της ακτινοβολίας. Η ανάκλαση και διασπορά μιας **πολυχρωματικής**, προσπίπτουσας σε φράγμα ανάκλασης, ακτινοβολίας φαίνεται στο σχήμα 3-8. Από το σχήμα 3-8 φαίνεται επίσης ότι η γωνία ανάκλασης πρώτης τάξης στα 4000 Å μπορεί να ενισχυθεί από υψηλότερη τάξη ακτινοβολίας 2000 και 1333 Å.



Σχ. 3-8. Ανάκλαση και διασπορά πολυχρωματικής ακτινοβολίας προσπίπτουσας σε φράγμα ανάκλασης

(γ) κυψελίδια δείγματος - διαλύτης

Είναι παραλληλεπίπεδος υποδοχέας κατασκευασμένος από γυαλί για χρήση στην ορατή περιοχή. Στο υπεριώδες επειδή το γυαλί απορροφά τα λ<360 nm, χρησιμοποιούνται τα υλικά quartz (όριο μετάδοσης=200 nm) και συντηγμένη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πυριτική γή (fused silica) (όριο μετάδοσης = 185 nm). Οι συνήθειες διαστάσεις των κυψελίδων είναι 1cm×1cm×5cm. Η κυψελίδα γεμίζεται σχεδόν πλήρως με το δείγμα για να αποφεύγονται προβλήματα ανάκλασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στην επιφάνεια του υγρού δείγματος στην κυψελίδα.

Στην ορατή περιοχή του φάσματος σαν διαλύτης χρησιμοποιείται το νερό και το $CHCl_3$. Στο υπεριώδες χρησιμοποιούνται τα κυκλοεξάνιο και για δείγματα πολικά ή C_2H_5OH 95%. Άλλα διαλυτικά μέσα περιλαμβάνουν τα CH_3OH, C_6H_{14}, C_7H_{16} που κατά βάση περιέχουν κορεσμένους σ δεσμούς. Η μόνη δυνατή μετάπτωση σε ενώσεις αυτού του τύπου θα ήταν $\sigma \rightarrow \sigma^*$ που όμως απαιτούν υψηλότερη ενέργεια από την διατεθέμενη στο υπεριώδες. Έτσι οι διαλύτες αυτοί δεν απορροφούν στην περιοχή αυτή και συνεπώς δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό.

Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται μερικοί από τους πιο κοινούς διαλύτες για το UV.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1

Κοινοί διαλύτες στο UV σε σχέση με το λmin χρησιμοποίησης τους

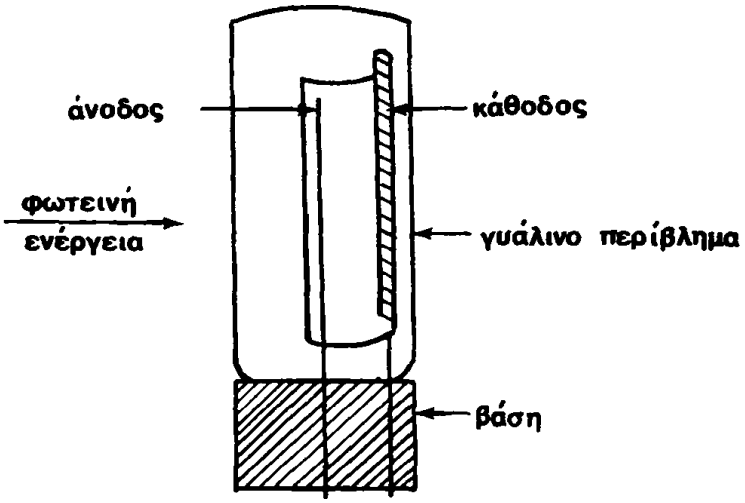
διαλύτης	$\lambda_{min(nm)}$	διαλύτης	$\lambda_{min(nm)}$
ακετόνη	330	αιθέρας	220
ακετονιτρίλιο	210	οξικός αιθυλεσ.	260
βενζόλιο	280	επτάνιο	210
διθειάνθρακας	380	εξάνιο	210
τετραχλωράνθρακας	265	μεθανόλη	210
χλωροφόρμιο	245	μεθυλοκυκλοεξάνιο	210
κυκλοεξάνιο	210	πεντάνιο	210
κυκλοπεντάνιο	210	τολουόλιο	285
1,2 διχλωροαιθάνιο	230	m-ξυλόλιο	290
N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο	270	διοξάνιο	220

(δ) ανιχνευτής

Κάθε ανιχνευτής απορροφά την ενέργεια των φωτονίων που προσκρούουν επάνω του και τη μετατρέπει σε μία μετρήσιμη ποσότητα, όπως είναι το μαύρισμα φωτογραφικής πλάκας, το ηλεκτρικό ρεύμα ή κάποια θερμική μεταβολή. Οι σύγχρονοι ανιχνευτές παράγουν ένα ηλεκτρικό σήμα, που μπορεί να μετρηθεί σε κάποιο όργανο ανάγνωσης (κίνηση βελόνας ή ψηφιακό) ή σε καταγραφέα.

Ο κύριος τύπος ανιχνευτή για το υπεριώδες είναι η φωτολυχνία (phototube) η βασική διάταξη της οποίας φαίνεται στο σχήμα 3-9.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-9. Βασική διάταξη φωτολυχνίας

Αποτελείται από κυλινδρικό γυάλινο περίβλημα εφοδιασμένο με δύο ηλεκτρόδια: μία ημικυλινδρική κάθοδο η εσωτερική επιφάνεια της οποίας είναι καλυμμένη με ένωση που χάνει σχετικά εύκολα ηλεκτρόνια π.χ. CS_2O ή Ag_2O και μια κεντρική άνοδο από μεταλλικό σύρμα. Μεταξύ των δύο ηλεκροδίων εφαρμόζεται τάση της τάξης των 50 - 100 V. Κάθε φωτόνιο της ακτινοβολίας προσκρούοντας στα εσωτερικά τοιχώματα της καθόδου αποσπά 1 μέχρι 4 ηλεκτρόνια τα οποία έλκονται προς την άνοδο λόγω της εφαρμοσμένης διαφοράς δυναμικού. Η κίνηση αυτή των ηλεκτρονίων δημιουργεί ρεύμα έντασης περίπου 10^{-11} amp, το οποίο στη συνέχεια ενισχύεται σε διάταξη φωτοπολλαπλασιαστή.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και όταν δεν υπάρχει προσπίπτουσα ακτινοβολία στη φωτολυχνία παρατηρείται ένα πολύ ασθενές ρεύμα, γνωστό σαν «ρεύμα σκότους» (dark current) το οποίο οφείλεται στην τυχαία θερμική εκπομπή ηλεκτρονίων από την επιφάνεια της καθόδου. Στο εμπόριο κυκλοφορούν ανιχνευτές σταθερού μήκους κύματος (συνήθως 254 nm) και μεταβαλλόμενου μήκους κύματος.

(ε) καταγραφέας - μετρητής

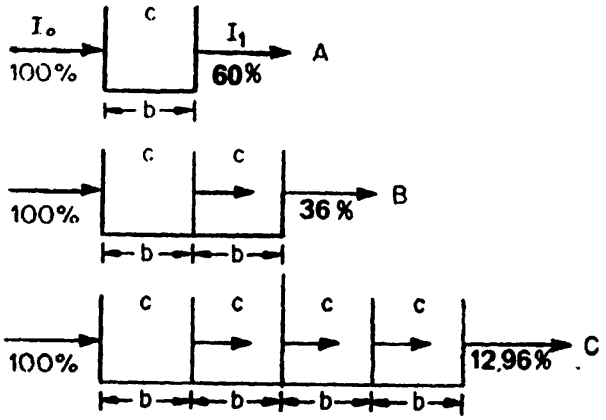
Το με τον παραπάνω τρόπο παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα μεταφέρεται στον καταγραφέα όπου με κατάλληλη διάταξη μετατρέπεται σε μηχανική κίνηση γραφίδας ή σε μετρητή όπου μετατρέπεται σε κίνηση βελόνας ή ψηφιακή ένδειξη.

Β. Θεωρία φασματοφωτομετρίας

Έστω κυψελίδα πάχους b, που περιέχει το διάλυμα συγκέντρωσης c του δείγματος (σχ. 3-10). Έστω ακόμη ότι επί του δείγματος προσπίπτει

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ακτινοβολία αρχικής έντασης. I_0 (100%). Αν υποτεθεί ότι κατά την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας - δείγματος απορροφάται 40% της πρώτης, τότε η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας θα είναι I_1 (60%).



Σχ. 3-10. Πείραμα νόμου του Beer

Αν τώρα διπλασιαστεί το πάχος του διαλύματος (b →2b), η εξερχόμενη από το διάλυμα ακτινοβολία θα έχει τιμή I_2=(60 x 60/100)=36%. Αν τριπλασιαστεί το πάχος του διαλύματος η εξερχόμενη απ' αυτό ακτινοβολία θα έχει τιμή I_3=21.6, η I_4=12.96% κ.ο.κ. Αν τώρα παρασταθεί γραφικά το πηλίκον I_n/I_0 συναρτήσει του πάχους της κυψελίδας (διαλύματος), λαμβάνεται η καμπύλη του σχήμ. 3-11.

Η καμπύλη αυτή περιγράφεται από την εξίσωση (3.5).

$$\frac{-dI}{db} = k_1 \cdot I \quad (3.5) \longrightarrow \frac{-dI}{I} = k_1 db \quad (3.6)$$

Η τελευταία κατόπιν ολοκλήρωσης δίνει:

$$-\ln I = k_1 b + c \quad (3.7)$$

$$\text{για } b = 0 \rightarrow I = I_0 \text{ και } -\ln I_0 = c \quad (3.8)$$

με συνδυασμό (3.7) (3.8): $-\ln I = k_1 b - \ln I_0$ (3.9) $\longrightarrow I/I_0 = e^{-k_1 b}$ (3.10)

Αν το όλο πείραμα επαναληφθεί με μεταβλητή τη συγκέντρωση (c) της ουσίας επί του πάχους της κυψελίδας b θα προκύψει η εξίσωση (3.11)

$$\frac{-dI}{dc} = k_2 I \quad (3.11)$$

απο την οποία μέσω καταλλήλων μετασχηματισμών θα προκύψει η εξίσωση:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-k_2 c} \quad (3.12)$$

από τις (3.10) και (3.12) → $\frac{I}{I_0} = e^{-k_{1,2} bc}$ (3.13)

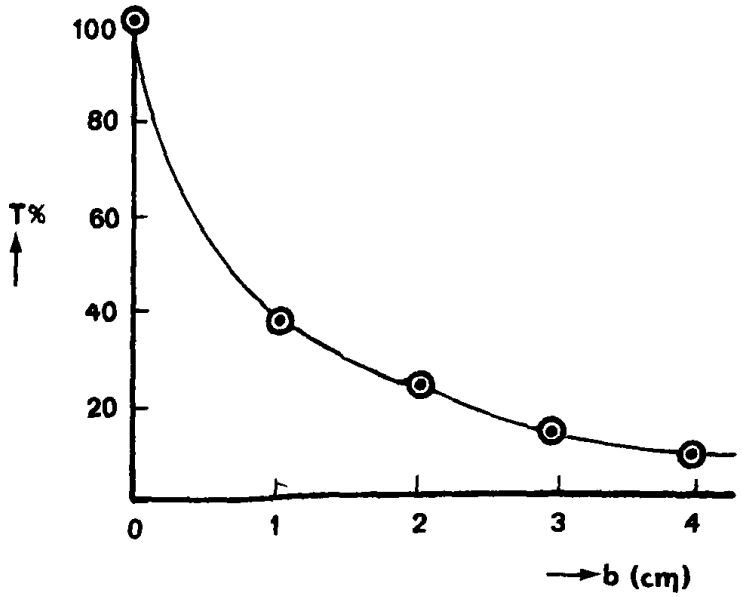
όπου: $k_{1,2} = k_1 \cdot k_2$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Με λογαρίθμηση της (3.13) $\longrightarrow$ $\log \frac{I}{I_o} = -2.3k_{1,2}bc \longrightarrow$ (3.14)

$\log \frac{I_o}{I} = 2.3k_{1,2}bc$ (3.15) $\longrightarrow$ $\log \frac{I_o}{I} = a \cdot b \cdot c$ (3.16)

όπου $a = 2.3k_{1,2}$ = σταθερά



Σχ. 3-11. Μεταβολή της έντασης της εξερχόμενης ακτινοβολίας (I) με το πάχος της κυψελίδας (διαλύματος)

Το πηλίκον $\log I_o/I$ καλείται απορρόφηση (A) ή οπτική πυκνότητα (O.D), είναι δε:

$$A = abc \qquad (3.17)$$

Το πηλίκον I/I_o καλείται διαπερατότητα (T), δηλαδή: $I/I_o = T \rightarrow$

$\log \frac{I}{I_o} = \log T$ (3.18) ή λόγω της (3.16) $\longrightarrow$ $A = \log 1/T$ (3.19)

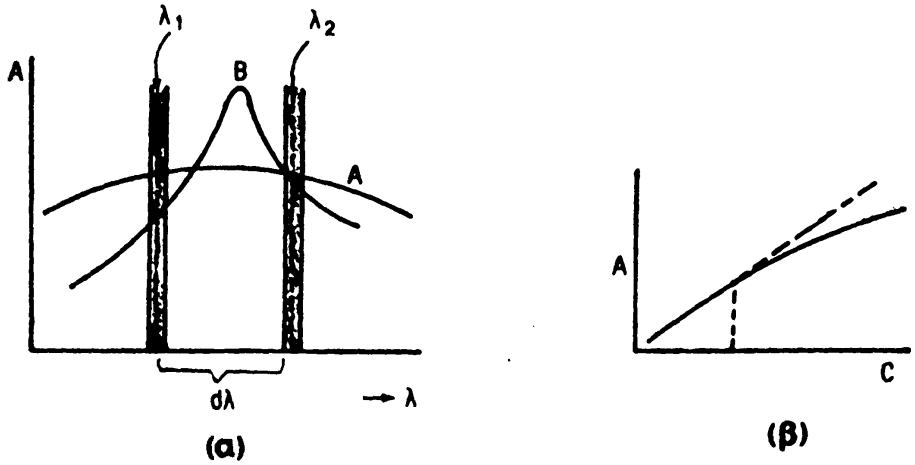
Η εξίσωση (3.16) αποτελεί την έκφραση του νόμου των Lambert-Beer. Όταν η συγκέντρωση (c) εκφράζεται σε g/g, η σταθερά a παριστάνει την απορρόφηση στοιβάδος πάχους 1 cm διαλύματος καθαρής ουσίας (1g/g) και καλείται συντελεστής απορρόφησης (absorption coefficient) ή συντελεστής απόσβεσης (extinction coefficient) ή απορροφητικότητα (absorptivity). Αν η συγκέντρωση εκφράζεται σε g/l τότε το a αντικαθίσταται από το ε που

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

καλείται ειδική απορροφητικότητα (specific absorptivity).

Ο νόμος των Lambert-Beer ισχύει: (1) για αυστηρά μονοχρωματική ακτινοβολία. Στην πράξη οι μονοχρωμάτορες δεν δίνουν μονοχρωματική ακτινοβολία αλλά στενό εύρος αρκετών μηκών κύματος (1 - 20 nm). Το παραπάνω προϋποθέτει πως η σταθερά απορρόφησης (α) θα έχει σταθερή τιμή μέσα στο εύρος των μηκών κύματος λ_1 και λ_2 που απομονώνει ο μονοχρωμάτορας ή το φίλτρο. Δηλαδή όπως φαίνεται από τα φάσματα των ουσιών Α και Β (σχ. 3 - 12α), ο νόμος των Lambert-Beer ισχύει για την ουσία Α, ενώ δεν ισχύει για την Β.

(2) υπό την προϋπόθεση ότι η απορροφητικότητα του δείγματος είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης. Σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις τα μόρια της υπό εξέταση ουσίας τείνουν να σχηματίσουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με συνέπεια να μεταβάλλεται η απορροφητικότητα και να παρατηρείται απόκλιση από το νόμο των Lambert-Beer (σχ. 3-12β).



Σχ. 3-12. Αποκλίσεις από τον νόμο Lambert-Beer

(3) το υπό εξέταση συστατικό (Α) δεν αντιδρά χημικά με άλλα συστατικά του περιβάλλοντός του π.χ. με τον διαλύτη (Β) κατά την αντίδραση.

$$A+B \rightleftharpoons \Gamma+\Delta$$

Μια τέτοια αντίδραση θα είχε σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή στις συγκεντρώσεις του Α.

(4) η υπό εξέταση ουσία δεν διίσταται κατά την αραίωση και δεν εμφανίζει διχρωϊσμό-κλασσικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης αποτελούν τα $Cr_2O_7^{2-}$ (λmax=375 nm) τα οποία κατόπιν αραίωσης διίστανται με σύγχρονη μεταβολή στο χρώμα τους (λmax=450 nm)

$$Cr_2O_7^{2-} + H_2O \rightleftharpoons 2H^+ + 2CrO_4^{2-}$$

(πορτοκαλί) (κίτρινο)

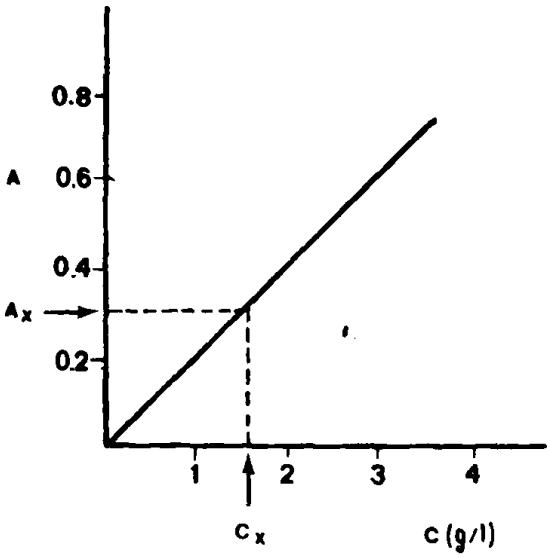
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(5) εφ' όσον ο διαλύτης δεν απορροφά έστω και μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας κ.ο.κ.

Γ. Εφαρμογές της φασματοφωτομετρίας ορατού και υπεριώδους

Οι περισσότερες εφαρμογές της φασματομετρίας ορατού και υπεριώδους είναι στην ποσοτική ανάλυση. Το φάσμα UV για λόγους που αναπτύχθηκαν στο κεφ. 3.1 δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην ταυτοποίηση ουσιών.

1. Ο ποσοτικός προσδιορισμός συστατικού άγνωστης συγκέντρωσης σε διάλυμα έχει ως εξής: κατ' αρχήν παρασκευάζεται σειρά διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης της υπό εξέταση ουσίας. Ακόμη παρασκευάζεται ένα τυφλό δείγμα συνήθως από αποσταγμένο νερό. Το τελευταίο τοποθετείται στην κυψελίδα η οποία φέρεται στο φασματοφωτόμετρο και ρυθμίζεται το μηδέν του οργάνου στο μήκος κύματος που έχει επιλεγεί για τον προσδιορισμό. Στη συνέχεια, με την ίδια διαδικασία μετρείται η απορρόφηση ενός εκάστου των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η κυψελίδα μεταξύ δύο διαδοχικών δειγμάτων εκπλύνεται καλά με αποσταγμένο νερό. Τέλος μετρείται η απορρόφηση του δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης. Κατασκευάζεται τέλος η πρότυπη καμπύλη A=f(c) και γραφικά από την τιμή της Απορρόφησης του αγνώστου προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του, όπως φαίνεται στο σχήμα 3-13.



Σχ. 3-13. Προσδιορισμός συγκέντρωσης ουσίας σε διάλυμα βάσει πρότυπης καμπύλης

(α) Υπεριώδες (UV)

(Ι) Στην ανάλυση λιπών και ελαίων, λόγω της χαρακτηριστικής ακόρεστης ολεφινικής δομής των τελευταίων που απορροφά στην περιοχή αυτή του

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

φάσματος.

Συγκεκριμένα: στον χαρακτηρισμό βρώσιμων φυτικών λαδιών, όπως τα ελαιόλαδα. Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών[1] προκειμένου περί παρθένου ελαιολάδου θα πρέπει ο συντελεστής ειδικής απορρόφησης* K_{270} να είναι μικρότερος της τιμής 0.180. Για τιμές που $K_{270} > 0.180$ εξετάζεται ο λόγος (R) των συντελεστών:

$$R = \frac{K_{315} - K_{320}}{K_{310} - K_{315}}$$

Για παρθένα ελαιόλαδα με συντελεστή $K_{270} < 0.30$, ο λόγος R δεν πρέπει να υπερβαίνει την τιμή 1.35, ενώ για παρθένα ελαιόλαδα με συντελεστή $K_{270} > 0.30$, ο λόγος R δεν πρέπει να υπεβαίνει την τιμή 1.00.

Για τη μέτρηση της απορρόφησης στο αντίστοιχο μήκος κύματος, το δείγμα αραιώνεται (1:100) με οπτικά ανενεργό κυκλοξάνιο και τοποθετείται στην κυψελίδα του οργάνου. Ο συντελεστής ειδικής απόσβεσης υπολογίζεται βάσει του τύπου (3.20)

$$K = \frac{A}{L \cdot c} \qquad (3.20)$$

όπου: L= πάχος της στοιβάδας του διαλύματος σε cm

C = συγκέντρωση του διαλύματος σε g/100 ml

Για τον χαρακτηρισμό των λαδιών προτάθηκε επίσης[2] η εξέταση των τιμών των συντελεστών K_{232}, K_{268} και ΔK όπου:

$$\Delta K = 1000\,[K_{268} - 0.5\,(K_{264} + K_{274})] \qquad (3.21)$$

Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 3.2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2

Σταθερές UV διαφόρων ελαιολάδων

	K_{232}	K_{268}	Δ K
ελαιόλαδο	0	0.25	+ 10
ελαιόλαδο	3.0	0.90	+ 120
υδρογωνομένο λάδι	3.3	1.10	+ 150
λαδ. φλοιού ελιάς	5.5	1.80	+ 160
λάδι φλοιού και καρπού ελιάς	5.0	1.60	+ 180

* Σαν συντελεστής ειδικής απορρόφησης ($K^{1\%}/_{1cm}$) ορίζεται η απορρόφηση στοιβάδας πάχους 1cm διαλύματος 1% (w/v) της ουσίας.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στην ανίχνευση της νοθείας λιπαρών υλών όπως το βούτυρο[3] με φτηνότερα προϊόντα όπως μαργαρίνη, με υπολογισμό διαφόρων συντελεστών που προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά· στην ανίχνευση λίπους αλόγου σε κρεατοσκευάσματα[4] κατόπιν αλκαλικής ισομερίωσης και μέτρησης της απορρόφησης στα 268 nm (συζυγή τριένια)· στην ανίχνευση νοθείας γάλακτος αγελάδας με γάλα βουβάλου[5] που στηρίζεται στην ίδια αρχή κ.τ.λ. Στον προσδιορισμό της σύστασης λιπών και λαδιών κατόπιν αλκαλικής ισομερίωσης για το σχηματισμό προϊόντων με συζυγείς διπλούς δεσμούς[6]· Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε το περιεχόμενο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ιχθυελαίων, όπως του βακαλάου[7] (~ 12% λινολεϊκό ~ 8% λινολενικό, ~ 7% αραχιδονικό, ~ 13% κλουπαδονικό).

Στον προσδιορισμό του βαθμού αυτοξείδωσης λιπών και λαδιών [8,9]. Η οξείδωση του λινελαϊκού οξέος οδηγεί στο σχηματισμό του αντίστοιχου συζυγούς υδροϋπεροξειδίου που απορροφά στα 232 nm. Αν η οξείδωση συνεχιστεί σχηματίζονται τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης δηλαδή α-δικετόνες ακόρεστες α-κετόνες οι οποίες απορροφούν στα 270 nm. Συνεπώς όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 232 και 270 nm τόσο μεγαλύτερη ποσότητα υδροϋπεροξειδίων και α-καρβονυλικών ενώσεων αντίστοιχα περιέχει το τελευταίο. Ειδικά το παρθένο ελαιόλαδο[10] δίνει συντελεστή $K^{1\%}_{1cm}$ ~ 0.08, ενώ αντίστοιχα αυτοξειδωμένο δείγμα δίνει $K^{1\%}_{1cm}$ μέχρι και 0.47.

(II) Βιταμίνες

Στον προσδιορισμό της βιταμίνης Α[11] λόγω συζυγούς διενικής δομής, της βιταμίνης Ε[12], της βιταμίνης K_2[13].

(III) Συντηρητικά

Στον προσδιορισμό του σορβικού οξέος σε ψωμί και αλεύρι[14] στο λ=262 nm, του βενζοϊκού οξέος σε αναψυκτικά[15], η πραγματική απορρόφηση του οποίου υπολογίζεται από τη σχέση (3.22).

$$A_{\pi\rho} = A_{230} - (0.6\, A_{220} + 0.4\, A_{245}) \qquad (3.22)$$

Στον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού BHT σε δείγματα λαρδιού, κατόπιν εκχύλισης με κυκλοεξάνιο σε στήλη πυριτικού οξέος[16] και αλουμίνας.

(IV) Διάφορα

Στον προσδιορισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων[18] (καρκινογόνα)· αν και η ενδεδειγμένη μέθοδος για το σκοπό αυτό είναι η φθορισμομετρία (βλ. κεφ. 3.4)· στον έμμεσο προσδιορισμό σακχάρων όπως γλυκόζης, φρουκτόζης και σακχαρόζης σε γάλα[19] και κρασί[20], κατόπιν ενζυματικής οξειδοαναγωγής του αντίστοιχου σακχάρου παρουσία NAD^+ και προσδιορισμού του προκύπτοντος $NADH_2$ το οποίο παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

στο υπεριώδες· στον προσδιορισμό πηκτίνης και συναφών πολυσακχαριτών ταυτόχρονα στο δείγμα[21], καφεΐνης σε καφέ και τσάι[22], καθώς και ουσιών υπεύθυνων για την πικρή γεύση της μπύρας[23], κατόπιν εκχύλισης των ουσιών αυτών με 2,2,4 τριμεθυλοπεντάνιο και μέτρηση της απορρόφησης στο λ=275 nm.

(β) ορατό

(I) Φυσικές χρωστικές. Στην κατηγορία αυτή των ενώσεων περιλαμβάνονται κυρίως οι χλωροφύλλες, τα καροτινοειδή και οι ανθοκυανίνες. Από τα καροτινοειδή το β-καροτίνιο προσδιορίζεται στο λ= 450 και λ= 454 nm, ενώ το λυκοπίνιο, υπεύθυνο για το κόκκινο χρώμα της ντομάτας στο λ= 505 nm και χρησιμοποιείται σαν δείκτης του περιεχόμενου σε ντομάτα διαφόρων τροφίμων[24]. Το β-καροτίνιο προστίθεται εξ άλλου για την ενίσχυση του χρώματος πορτοκαλοχυμών και συμπυκνωμένων προϊόντων[25] πορτοκαλιού, προϊόντα στα οποία ανιχνεύεται η προσθήκη του, κατόπιν εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα, απομόνωση σε στήλη χρωματογραφίας και προσδιορισμού στο λ= 450nm. Με προσδιορισμό του περιεχόμενου β-καροτίνιου σε δείγματα γάλακτος αγελάδας (0.40 ppm) ανιχνεύεται η νόθευση του τελευταίου με γάλα βουβάλου περιεκτικότητας 0.005 ppm σε β-καροτίνιο[26]. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να ανιχνευθεί νοθεία της τάξης του 5%. Τέλος στον προσδιορισμό συνθετικών χρωστικών[27].

(II) Λίπη και έλαια

Στη διάκριση μεταξύ παρθένου και εξευγενισμένου κραμβελαίου[28] με μέτρηση της απορρόφησης στο λ=670 nm μια και η απορρόφηση εξαλείφεται ,κατά τη διάρκεια του αποχρωματισμού· στη νόθευση του ελαιολάδου με βαμβακέλαιο[29] (μέχρι 10%) κατόπιν μέτρησης της απορρόφησης στα λ= 380, 415, 450 και 480 nm και υπολογισμού των συντελεστών:

$$R = \frac{A_{380}}{A_{480}} \qquad S = A_{415} + A_{450} + A_{480} \qquad R_1 = \frac{S}{A_{480}}$$

Οι τιμές των οποίων συγκρίνονται με τις αντίστοιχες των σχετικών πινάκων· στη διάκριση παρθένου από εξευγενισμένο ελαιόλαδο[30] με μέτρηση της απορρόφησης στο λ= 670 nm που οφείλεται στην περιεχόμενη χλωροφύλλη· στη διάκριση παρθένου ελαιόλαδου από άλλα φυτικά λάδια[31] κατόπιν μέτρησης της απορρόφησης αποχρωματισμένου και κατεργασμένου με HNO_3 δείγματος στο λ= 450 nm (αντίδραση Κώνστα Συνοδινού, κεφ. 13). Παρθένα ελαιόλαδα δίνουν τιμές απορρόφησης μεταξύ 0.1-0.3, ενώ λάδια διαφορετικής προέλευσης, τιμές μεταξύ 1-3.5.

Στον προσδιορισμό συνθετικών αντιοξειδωτικών ουσιών που προστίθενται για την σταθεροποίηση των λαδιών, όπως το BHT το οποίο παρουσία του

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αντιδραστηρίου τουGibb's (2.6 di chloro-p-benzoquinone-4 chlorimine) δίνει μπλε χρώμα[32] η απορρόφηση του οποίου μετρείται στο λ= 620 nm· το αντιοξειδωτικό BHT προσδιορίζεται κατόπιν αντίδρασης με ο-διανισιδίνη και νιτρώδες οξύ[33].

Τα προπυλικά παράγωγα του γαλλικού οξέος[34] προσδιορίζονται κατόπιν αντίδρασης με τρυγικό σίδηρο και μέτρησης της απορρόφησης του σχηματιζόμενου μωβ χρώματος στο λ=515 nm. Στον προσδιορισμό του βαθμού οξείδωσης των λιπαρών υλών με μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων κατόπιν υπολογισμού του περιεχόμενου σε αλδεΰδες (malonaldehyde). Η τελευταία σχηματίζει σύμπλοκο με το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ[35] η απορρόφηση του οποίου μετρείται στο λ= 532 nm και χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν δείκτης της αυτοξείδωσης των λιπαρών υλών.

(III) Αμινοξέα - Πρωτεΐνες

Στον προσδιορισμό των συνολικών αλλά και των επί μέρους αμινοξέων κατόπιν σχηματισμού των αντίστοιχων συμπλόκων με χαλκό και προσδιορισμού στη συνέχεια του χαλκού με την κλασσική μέθοδο του διαιθυλδιθειοκαρβαμιδίου. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση των αμινοξέων σε ξύδι[36]. Στον προσδιορισμό των αμινοξέων κατόπιν αντίδρασης με νινυδρίνη και μέτρησης της απορρόφησης του σχηματιζόμενου μπλε/μωβ χρώματος στα λ= 440 nm και 570 nm. Αντιδρούν μόνο τα αμινοξέα με ελεύθερο καρβοξύλιο και πρωτοταγή α-αμινομάδα. Η μέθοδος βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή σε προϊόντα όπως η μπύρα[37]. Στον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο της δέσμευσης χρωστικών ουσιών (dye binding method)[38].

Σύμφωνα με τη μέθοδο στο πρωτεϊνούχο εκχύλισμα προστίθεται γνωστή περίσσεια χρωστικής, μέρος της οποίας δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες. Η περίσσεια της χρωστικής προσδιορίζεται χρωματομετρικά. Η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως στο γάλα. Οι συνήθως χρησιμοποιούμενες για το προϊόν αυτό χρωστικές είναι οι Amido Black 10B και Acid Orange 10[39]. Για το σιτάρι και αλεύρι δείχτηκε πως η χρωστική Lissamine Green 5F-150 δίνει καλύτερο αποτέλεσμα. Στην ανάλυση συγκεκριμένων αμινοξέων κατόπιν υδρόλυσης της πρωτεΐνης, διαχωρισμού των προκυπτόντων αμινοξέων με χρωματογραφία ιονανταλλαγής και χρωματομετρικού προσδιορισμού του συγκεκριμένου αμινοξέος[40]. Στον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη γεύση και την οσμή τροφίμων, όπως τα ψάρια[41], τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτης αποικοδόμησης του αντίστοιχου προϊόντος. Τα ελεύθερα αμινοξέα εκχυλίζονται, διαχωρίζονται με χαρτοχρωματογραφία, αποξύνονται από το χαρτί και προσδιορίζονται χρωματομετρικά.

(IV) Βιταμίνες

Στον προσδιορισμό της βιταμίνης A[42] κατόπιν αντίδρασης με το αντιδραστήριο Carr-Price (Τριχλωριούχο αντιμόνιο) και μέτρησης της απορρόφησης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

του σχηματιζόμενου μπλε χρώματος στο λ=500 nm· της θειαμίνης[43] κατόπιν αντίδρασης με νινυδρίνη και μέτρησης του σχηματιζόμενου κίτρινου χρώματος στα λ=400-450 nm· της βιταμίνης B_{12}[43], κατόπιν προσδιορισμού του περιεχόμενου Co, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το αντιδραστήριο Nitroso-R και μέτρησης στο λ=550 nm· της βιταμίνης C κατόπιν οξείδωσης με 2.6 διχλωροφαινολινδοφαινόλη και μέτρησης της απορρόφησης του παραμένοντος χρώματος αυτής στο λ=525 nm (βλ. κεφ. 15)· της βιταμίνης D[44] με χρήση του αντιδραστηρίου Carr-Price όπως ακριβώς για τη βιταμίνη A· της βιταμίνης E κατόπιν οξείδωσης με αντιδραστήρια όπως τριχλωριούχο σίδηρο κ.ά. Ο παραγόμενος Fe προσδιορίζεται με συμπλοκοποίηση και μέτρηση της απορρόφησης του σχηματιζόμενου χρώματος στο λ= 520 nm.

(V) Υδατάνθρακες

Στον χρωματομετρικό προσδιορισμό των υδατανθράκων χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία χρωματομετρικών αντιδραστηρίων. Ανάλογα με τις συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν: ανθρόνη/H_2SO_4, φαινόλη/H_2SO_4, ορκινόλη/$FeCl_3$, καρβαζόλιο/H_2SO_4. Η μέθοδος βρίσκει πολυάριθμες εφαρμογές όπως π.χ. στον προσδιορισμό της λακτόζης στο γάλα[45] και τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο γλεύκος (wort) από το οποίο παρασκευάζεται η μπύρα[46]. Σύμφωνα με τη μέθοδο παρασκευάζονται αραιά πρότυπα διαλύματα σακχάρων που καλύπτουν την περιοχή συγκεντρώσεων από 10-100 ppm σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια σε κάθε σωλήνα προστίθεται το χρωματομετρικό αντιδραστήριο π.χ. φαινόλη/H_2SO_4, και αφήνεται ο σωλήνας σε υδρόλουτρο για την ανάπτυξη του χρώματος. Τέλος μετρείται η απορρόφηση σε ορισμένο λ (470 nm για το παραπάνω αντιδραστήριο) και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη A= f (c). Κατόπιν αντίστοιχης κεταργασίας του άγνωστης συγκέντρωσης διαλύματος προσδιορίζεται γραφικά η συγκέντρωση αυτή.

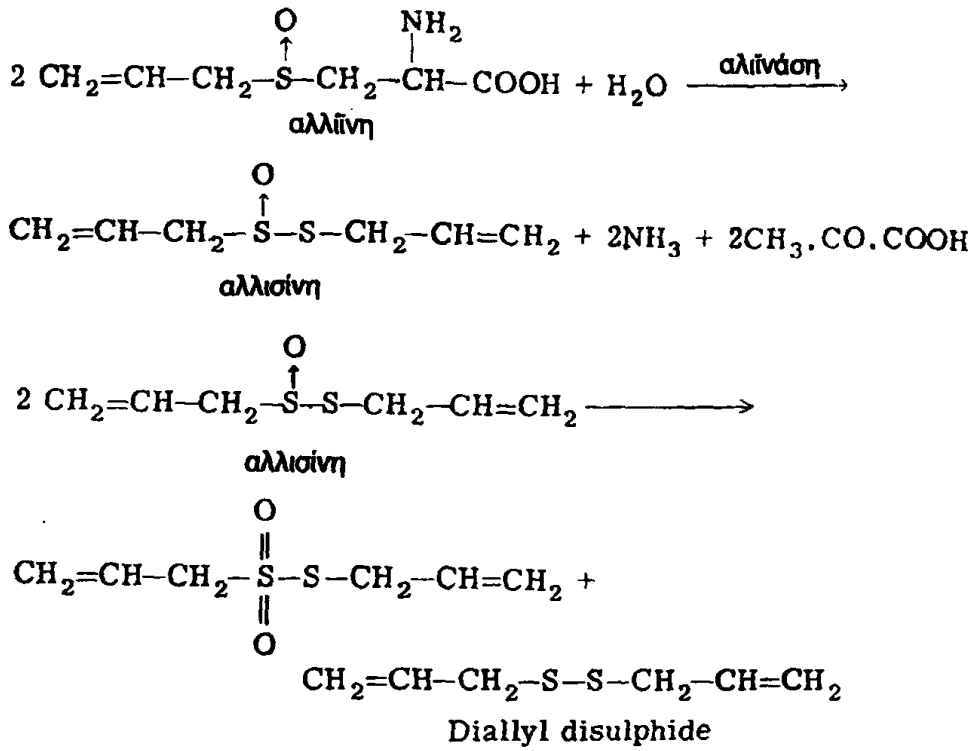
(VI) Διάφορα

Στον προσδιορισμό καταλοίπων φυτοφαρμάκων όπως καταλοίπων του υδραργύρου[47] που υπολογίζεται χρωματομετρικά κατόπιν αντίδρασης με διθειοζίνη, καταλοίπων του αρσενικού σε πατάτες, βρωμίου σε κεράσια, χλωρίου σε πατάτες, μαγγανίου σε λάχανο και νικελίου σε βρώμη[48]. Το κύριο πρόβλημα εδώ είναι ο καθορισμός του δείγματος λόγω μεγάλου βαθμού παρεμποδίσεων από το περιβάλλον. Στον προσδιορισμό φυσικών αρωματικών υλών άμεσα ή έμμεσα, όπως π.χ. του πυροσταφυλικού οξέος το οποίο σχηματίζεται κατά την αντίδραση η οποία παράγει τη χαρακτηριστική οσμή του σκόρδου (διαλλυλδισουλφίδιο).

Το πυροσταφυλικό οξύ προσδιορίζεται κατόπιν μετατροπής του σε 2.4 δινιτροφαινυλ-υδραζόνη και αποτελεί μέτρο της ισχύος της οσμής του

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σκόρδου[49].



2. Ανάλυση μιγμάτων

Πολλές φορές προκειμένου να αποφευχθεί ο επίπονος διαχωρισμός δύο ή περισσοτέρων συστατικών μίγματος, προσδιορίζονται τα συστατικά αυτά ταυτόχρονα με την εφαρμογή της μεθόδου η οποία στηρίζεται στην παραδοχή πως η συνολική απορρόφηση του μίγματος είναι το άθροισμα των απορροφήσεων εκάστου συστατικού σε ορισμένο μήκος κύματος. Έστω τα συστατικά x και y και $\bar{C}x$ και $\bar{C}y$ οι συγκεντρώσεις τους σε μίγμα. Επιλέγεται κατόπιν δοκιμών το λmax (λ στο οποίο η απορρόφηση του συστατικού είναι μέγιστη) για κάθε ένα από τα x και y. Αν λ_1 και λ_2 είναι τα μήκη κύματος αυτά, τότε για τις ουσίες x και y ισχύει:

$$\text{στο } \lambda_1\text{: } A_{x,\lambda 1} = a_{x,\lambda 1} \cdot b \cdot c_{x,\lambda 1} \quad (3.22)$$

$$A_{y,\lambda 1} = a_{y,\lambda 1} \cdot b \cdot c_{y,\lambda 1} \quad (3.23)$$

$$\text{στο } \lambda_2\text{: } A_{x,\lambda 2} = a_{x,\lambda 2} \cdot b \cdot c_{x,\lambda 2} \quad (3.24)$$

$$A_{y,\lambda 2} = a_{y,\lambda 2} \cdot b \cdot c_{y,\lambda 2} \quad (3.25)$$

αντίστοιχα για το μίγμα:

$$\text{στο } \lambda_1\text{: } A\text{συν}_{,\lambda 1} = a_{x,\lambda 1} \cdot b \cdot \bar{c}_x + a_{y,\lambda 1} \cdot b \cdot \bar{c}_y \quad (3.26)$$

$$\text{στο } \lambda_2\text{: } A\text{συν}_{,\lambda 2} = a_{x,\lambda 2} \cdot b \cdot \bar{c}_x + a_{y,\lambda 2} \cdot b \cdot \bar{c}_y \quad (3.27)$$

Από τις εξισώσεις (3.22), (3.23), (3.24) και (3.25) υπολογίζονται τα $a_{x,\lambda 1}$, $a_{y,\lambda 1}$, $a_{x,\lambda 2}$, $a_{y,\lambda 2}$, οπότε από τις (3.26) και (3.27) υπολογίζονται τα $\bar{c}_x$, και $\bar{c}_y$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

3.3. Φασματοφωτομετρία υπερύθρου

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η ενέργεια που απορροφάται από το μόριο στην περιοχή του IR είναι δυνατόν να προκαλέσει περιστροφικές (10^{11}-10^{13} Hz) και δονητικές (10^{13}-10^{15} Hz) μεταπτώσεις χαρακτηριστικές κάθε ατόμου. Για το λόγο αυτό η φασματοφωτομετρία IR χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ταυτοποίηση ουσιών.

Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά μόλις πριν τον Β΄ παγκόσμιο πόλεμο.

Α. Οργανολογία

Τα βασικά στοιχεία του φασματοφωτομέτρου IR είναι τα εξής:

(1) Πηγή ακτινοβολίας

(2) Μονοχρωμάτορας

(3) Κυψελίδα δείγματος

(4) Ανιχνευτής

(5) Καταγραφέας

(1) Πηγή ακτινοβολίας

Απαιτείται πηγή που να παρέχει συνεχές φάσμα μεγάλης έντασης. Τέτοιες είναι οι λυχνίες πυράκτωσης Nerst και Globar. Η πρώτη είναι μια κοίλη ράβδος από οξείδια του Zr και Y που θερμαίνεται στους 1500°C με διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος. Εκπέμπει ακτινοβολία στην περιοχή 0.4-20 μm και δεν παρέχει ένταση μεγάλης σταθερότητας. Η δεύτερη αποτελείται από μια ράβδο ανθρακοπυριτίου που θερμαίνεται στους 1200°C. Εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή 1-40 nm πολύ σταθερής έντασης.

(2) Μονοχρωμάτορας

Είναι του ιδίου τύπου με εκείνους που χρησιμοποιούνται στο UV.

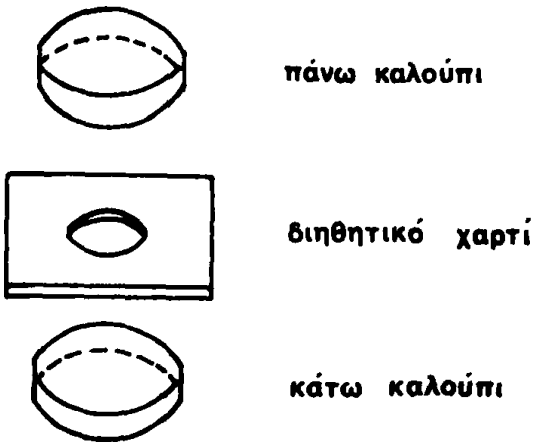
(3) Κυψελίδα

Το υλικό της κυψελίδας πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να μην απορροφά ακτινοβολία στην περιοχή του IR. Στην περιοχή αυτή απορροφούν συνήθως οργανικές ενώσεις με ομοιοπολικούς δεσμούς, συνεπώς η κυψελίδα κατασκευάζεται από ανόργανες ιοντικές ενώσεις όπως KBr, KCl, γυαλί, SiO_2 (quartz) MgO, LiF, KI, CsBr κ.ά.

Τα άλατα των αλογόνων έχουν και ορισμένα μειονεκτήματα όπως το ότι είναι υδατοδιαλυτά, χαράσσονται εύκολα και έχουν υψηλό συντελεστή θερμικής διαστολής που σημαίνει ότι απαιτείται αυστηρή ρύθμιση της θερμοκρασίας στο σύστημα. Λόγω σημαντικής διαλυτότητάς των στο νερό, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με διαλύτες όπως CCl_4 (για $\lambda > 1330\ cm^{-1}$) ή CS_2 (για $\lambda < 1330 cm^{-1}$).

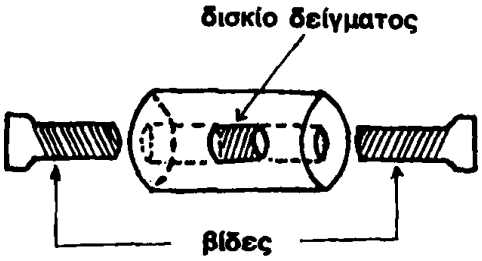
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το δείγμα σε υγρή κατάσταση, τοποθετείται με τη βοήθεια σταγονόμετρου στην εσωτερική επιφάνεια της κυψελίδας η οποία αποτελείται από δύο κυλινδρικά δισκία (σχ. 3-14). Τοποθετούνται αλλεπάλληλες στρώσεις δείγματος στην κυψελίδα, αφού προηγουμένως η κάθε στρώση ξηραίνεται με τη βοήθεια θερμού ρεύματος αέρα (πιστολάκι). Στη συνέχεια η κυψελίδα κλείνει υπό τύπον sandwich και τοποθετείται στην ειδική υποδοχή του φασματοφωτομέτρου για τη λήψη της μέτρησης.



Σχ. 3-14. Προετοιμασία δείγματος για ανάλυση IR με τη μέθοδο KBr

Αν το δείγμα είναι στερεό τότε διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη (διάλυμα 1% περίπου) και στη συνέχεια ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία. Για να αποφευχθούν τυχόν παρεμποδίσεις εκ μέρους του διαλύτη το στερεό δείγμα αναμειγνύεται με καθαρό KBr και μορφοποιείται σε δισκίο οχήματος παρομοίου εκείνου της κυψελίδας (διαμ. 1-1.5 cm).
Το δισκίο στη συνέχεια τοποθετείται στον υποδοχέα του οργάνου για μέτρηση. Στην πράξη για τη μορφοποίηση του δισκίου του δείγματος χρησιμοποιείται ένα είδος πρέσσας η οποία αποτελείται από κυλινδρικό σωλήνα (σχ. 3-15). Τα άκρα του σωλήνα είναι κατάλληλα διαμορφωμένα ώστε να δέχονται βίδες ειδικής κατασκευής.



Σχ. 3-15. Mini-πρέσσα για τη μορφοποίηση του δείγματος σε δισκίο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

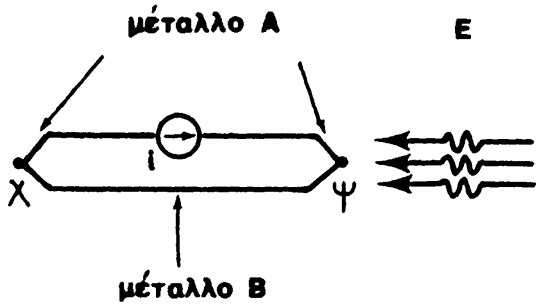
Το δείγμα τοποθετείται στο εσωτερικό του σωλήνα και με κλειδιά βιδώνονται ταυτόχρονα και από τα δύο άκρα οι βίδες. Αφού συμπιεστεί το δείγμα, αφαιρούνται οι βίδες και ο σωλήνας τοποθετείται ολόκληρος στο όργανο για μέτρηση.

(4) Ανιχνευτής

Προφανώς ο ανιχνευτής IR λειτουργεί με ενέργεια πολύ χαμηλότερη εκείνης στο UV και ορατό. Έχει δε την ικανότητα να διακρίνει διαφορές στη θερμοκρασία της τάξης των 5×10^{-5} C. Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι διάφοροι τύποι θερμομέτρων ταχείας απόκρισης όπως: (α) το θερμοζεύγος και (β) το θερμόμετρο αντίστασης.

(α) θερμοζεύγος (thermocouple)

Σχηματίζεται όταν έλθουν σε επαφή δύο διαφορετικά μετάλλα Α και Β, τα άκρα των οποίων βρίσκονται σε διαφορετική θερμοκρασία, (Σχ. 3-16).



Σχ. 3-16. Αρχή λειτουργίας θερμοζεύγους

Έστω ότι η σύζευξη Χ των μετάλλων βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ επί της σύζευξης Ψ προσπίπτει ακτινοβολία έντασης I. Λόγω διαφορετικής φύσης, τα δύο μετάλλα θα θερμανθούν σε διαφορετική θερμοκρασία.

Η διαφορά αυτή θερμοκρασίας προκαλεί ροή ηλεκτρονίων από το ένα μέταλλο στο άλλο με αποτέλεσμα τη δημιουργία κάποιου ασθενούς ρεύματος κατά μήκος του θερμοζεύγους. Η ένταση του παραγόμενου ρεύματος εξαρτάται από τη φύση των μετάλλων και την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το ασθενές αυτό ρεύμα πολλαπλασιάζεται και διοχετεύεται στον καταγραφέα. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα ζεύγη μετάλλων, για την κατασκευή θερμοζευγών περιλαμβάνουν χαλκό/κονσταντάνη, σίδηρο/κονσταντάνη, νικέλιο/κονσταντάνη κ.ο.κ.

(β) θερμόμετρο αντίστασης (bolometer)

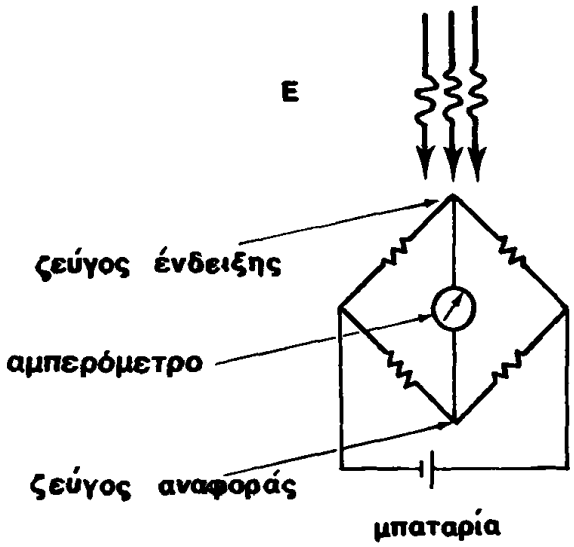
Αποτελείται από γέφυρα wheatstone (σχήμα 3-17) στην οποία διοχετεύεται ρεύμα σταθερής έντασης μέσω π.χ. μπαταρίας. Όταν επί των στοιχείων ένδειξης προσπέσει ακτινοβολία, μεταβάλλεται η ηλεκτρική αντίσταση του

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στοιχείου και συνεπώς η ένταση του ρεύματος που διαρρέει το στοιχείο. Οποιαδήποτε διακύμανση της ακτινοβολίας της οφειλομένης σε εξωτερικούς παράγοντες εξουδετερώνεται από τα στοιχεία της γέφυρας. Έτσι μόνο η ακτινοβολία η προερχόμενη από το δείγμα μετρείται στον ανιχνευτή. Το bolometer είναι πιο ευαίσθητο από το θερμοζεύγος και γιαυτό βρίσκει περισσότερες εφαρμογές από το πρώτο.

(5) Καταγραφέας

Για τον καταγραφέα ισχύει ό,τι αναφέρθηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια.



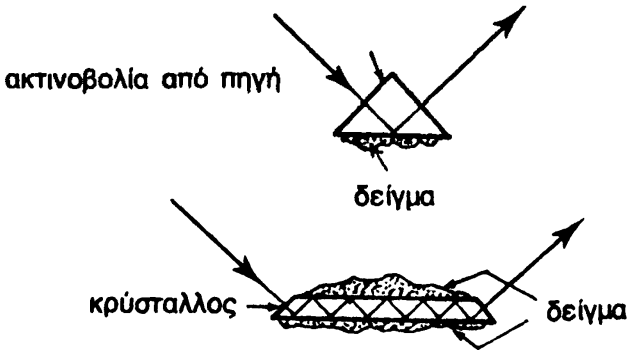
Σχ. 3-17. Αρχή λειτουργίας μπολομέτρου

Β. Πολλαπλή εσωτερική ανάκλαση (multiple internal reflection, MIR or attenuated total reflectance, ATR)

Τα τελευταία χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της πολλαπλής εσωτερικής ανάκλασης σε περιπτώσεις ανάλυσης, όπου το ενδιαφέρον περιορίζεται στις επιφανειακές στοιβάδες του δείγματος. Η ακτινοβολία εδώ διαπερνά μερικές μοριακές στοιβάδες του εξεταζόμενου υλικού και στη συνέχεια ανακλάται ολικά (σχ. 3-18 α,β).

Για την ολική ανάκλαση χρησιμοποιείται κρυσταλλικό πρίσμα από υλικό με υψηλό δείκτη διάθλασης π.χ. KRS-5 από βρωμιούχο ή ιωδιούχο θάλιο ή AgCl. Το δείγμα απορροφά τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η οποία λόγω συγκεκριμένης γωνίας πρόσπτωσης θα υποστεί ολική ανάκλαση και θα εξέλθει εξασθενημένη από την άλλη άκρη του πρίσματος (σχ. 3-18α). Στην πράξη αντί μιας ολικής εσωτερικής ανάκλασης επιτυγχάνονται πολλαπλές εσωτερικές ανακλάσεις (σχ. 3-18 β) που αυξάνουν την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ειδικό τραπεζοειδές πρίσμα. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τ΄ αποτελέσματα δεν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-18. (α) Απλή και (β) πολλαπλή εσωτερική ανάκλαση

επηρεάζονται από το πάχος του δείγματος, μια και η διείσδυση της ακτινοβολίας γίνεται μόνο στα πρώτα λίγα μm της επιφάνειας του υλικού. Με τη μέθοδο αυτή εξετάζονται συνήθως υδατικά διαλύματα ουσιών μια και οι χρησιμοποιούμενοι κρύσταλλοι είναι αδιάλυτοι στο νερό. Ο βαθμός διείσδυσης της ακτινοβολίας είναι συνάρτηση του δείκτη διάθλασης του χρησιμοποιούμενου πρίσματος (μεγάλος δ.δ συνεπάγεται μικρή διείσδυση) και της γωνίας πρόσπτωσης της ακτινοβολίας (μεγάλη γωνία, συνεπάγεται μεγάλη διείσδυση).

Γ. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

1. Ποιοτική ανάλυση.

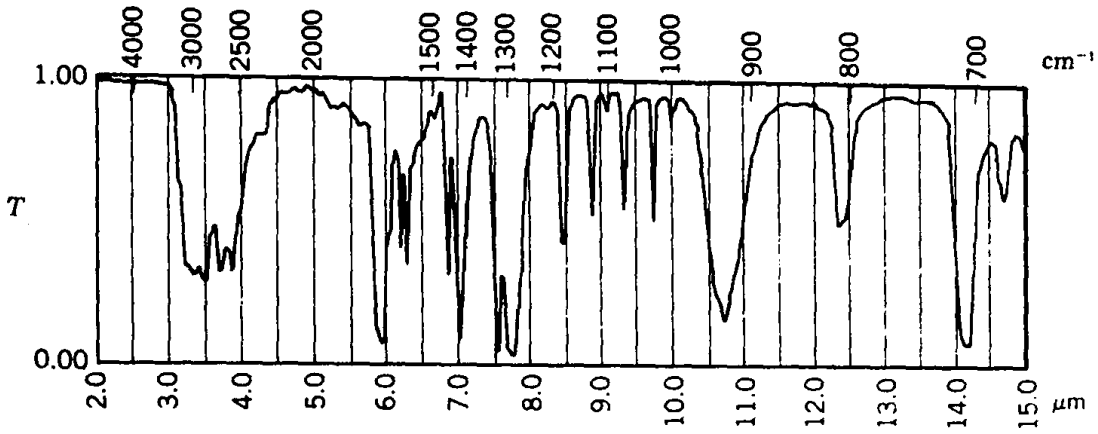
Η σπουδαιότερη εφαρμογή που βρίσκει η φασματοφωτομετρία IR είναι στην ταυτοποίηση ενώσεων και χαρακτηριστικών ομάδων και για το λόγο αυτό βρίσκει περιορισμένη χρήση στην ανάλυση των τροφίμων. Κορυφές στο φάσμα IR που αντιστοιχούν σε μήκη κύματος από 2-10 μm οφείλονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών που είναι χαρακτηριστικές των ατόμων και μορίων, που συμμετέχουν σ' αυτούς. Για το λόγο αυτό η περιοχή αυτή του φάσματος θεωρείται «δακτυλικό αποτύπωμα» (fingerprint region) κάθε ομάδας ή ουσίας και χρησιμοποιείται ευρέως στην ταυτοποίηση των ενώσεων. Στον Πίνακα 3.3 δίνονται τα μέγιστα απορρόφησης των κυριοτέρων χαρακτηριστικών ομάδων.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι φάσματα της ίδιας ουσίας σε διαφορετικούς διαλύτες δεν είναι πάντοτε τα ίδια. Ακόμη λόγω ακαθαρσιών στο δείγμα σε αναλογία $\geqslant$ 1% περιπλέκεται σημαντικά το λαμβανόμενο φάσμα IR. Στο σχήμα 3-19 δίνεται το φάσμα IR του συντηρητικού βενζοϊκό οξύ.

(α) Λίπη και έλαια[50]

Στη διαφοροποίηση της ποιότητας ελαιολάδου (παρθένο, ραφινέ, προϊόν δεύτερης πίεσης κ.τ.λ.) σε μίγμα στο λ = 10.36 μm. Ανίχνευση trans-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-19. Υπέρυθρο φάσμα του βενζοϊκού οξέος

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3

Απορροφήσεις χαρακτηριστικών ομάδων στο IR

Χαρακτηριστική ομάδα	Απορρόφηση μm	Απορρόφηση cm^{-1}
$-NH_2$ πρωτοταγής αμίνη	2.85 έως 3.15	3180 έως 3505
-OH αλκοόλες	2.84 έως 3.22	3100 έως 3520
>C-H (αλειφατικό)	3.3 έως 3.6	2780 έως 3050
>C-H αρωματικό	3.2 έως 3.35	2995 έως 3140
$-CH_2$ - μεθυλένιο	3.42 έως 3.55	2180 έως 2920
-C≡N νιτρίλιο	4.16 έως 4.55	2200 έως 2405
-C≡C -	4.42 έως 4.65	2150 έως 2270
>C=O εστέρας	5.71 έως 5.81	1722 έως 1752
>C=O οξέα	5.75 έως 6.01	1660 έως 1740
>C=O(αλδεΰδες,κετόνες)	5.76 έως 6.05	1650 έως 1740
$-NH_2$ αμίνη	6.08 έως 6.35	1575 έως 1645
-C=C-	5.98 έως 6.17	1620 έως 1670
>C-Cl	13.1 έως 15.2	660 έως 765
>C-Br	15.6 έως 18.9	530 έως 640

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ισομερών σε εστεροποιημένο ελαιόλαδο σ' αυτό το μήκος κύματος αποτελεί ένδειξη νοθείας του παρθένου ελαιόλαδου μια και κατά την αυτοξείδωση δεν παράγονται trans-ισομερή[52]. Στη διαφοροποίηση του παρθένου ελαιολάδου από εστεροποιημένα ελαιόλαδα με μέτρηση της απορρόφησης στην περιοχή λ = 2.7 - 3.0 μm[53]. Τα δεύτερα δίνουν σημαντικά μεγαλύτερη απορρόφηση από τα πρώτα. Στη διαφοροποίηση ελαιόλαδου από πυρηνέλαιο τσαγιού[54] στην περιοχή λ = 8-11 μm. Στον προσδιορισμό του cis-trans-ακόρεστου περιεχόμενου των λιπών και λαδιών[55]: Συζυγές cis-trans σύστημα δίνει απορρόφηση στα λ = 10.16 και 10.54 μm, trans-trans σύστημα στο λ = 10.11 μm, συζυγές τριένιο στο λ = 10.05 μm, μη συζυγές trans-ακόρεστο σύσημα στο λ = 10.36 μm[56] και cis-ακόρεστο σύστημα στο λ = 2.15 μm[57]. Στην ανίχνευση της νοθείας ελαιολάδου[58] με άλλα λίπη ή έλαια σε ποσοστό 10-20% με χρήση οργάνου διπλής δέσμης στο οποίο η υπό εξέταση λιπαρή ύλη τοποθείται στην κυψελίδα του δείγματος και το παρθένο ελαιόλαδο στην κυψελίδα του πρότυπου. Επίσης με εξέταση των μεθυλεστέρων των ανωτέρων ακόρεστων λιπαρών οξέων[59]. Το αγνό βούτυρο δίνει απορροφήσεις στα λ = 10.34 (trans ακορεστότητα) και 10.55 μm (συζυγής trans-cis ακορεστότητα)[60]. Υδρογονωμένα ιχθυέλαια, φοινικέλαια και μαργαρίνη ανιχνεύονται έτσι στο βούτυρο σε ποσοστό μέχρι ⩾ 5 %. Στην ανίχνευση νοθείας του βουτύρου του κακάο σε σοκολάτα[61] κατόπιν σύγκρισης των φασμάτων IR του γνήσιου με το υπό εξέταση δείγμα. Στην ανίχνευση παραφινελαίου σε σταφίδες.[62]

(β) Σιτηρά

Στη διαφοροποίηση μεταξύ σκληρού και μαλακού σιταριού[63], κατόπιν εξέτασης των λιπαρών εκχυλισμάτων τους στο IR μεταξύ 2.5-4 μm και 8-10 μm. Το σκληρό σιτάρι παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα λ = 2.975, 9.1 και 8.94 μm, ενώ το μαλακό στα 2.95 και 9.3 μm.

(γ) Διάφορα

Στην ανίχνευση: προσθέτων χρωστικών όπως κίτρινων[64], πράσινων[65], κόκκινων[66] και αζω-χρωστικών[67], κατόπιν εξέτασης των φασμάτων IR αυτών· προϊόντων όπως το σχετικά τοξικό αιθυλενοξείδιο[68] (ασφυξιογόνο σε γεωργικές καλλιέργειες) και η αιθυλενο-χλωριδρίνη, τοξικό προϊόν σε ποικιλία φυτικών τροφίμων κ.ά.

2. Ποσοτική ανάλυση

Η ποσοτική ανάλυση στο IR παρουσιάζει ορισμένα προβλήματα γιατί είναι δύσκολο να προσδιοριστεί αφ' ενός μεν το πάχος της κυψελίδας, αφ' ετέρου δε να αναπαραχθεί η ρύθμιση του συγκεκριμένου μήκους κύματος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται εμπειρικές μέθοδοι που έχουν απλουστεύσει τη διαδικασία. Οι κυριότερες απ' αυτές τις μεθόδους είναι οι εξής:

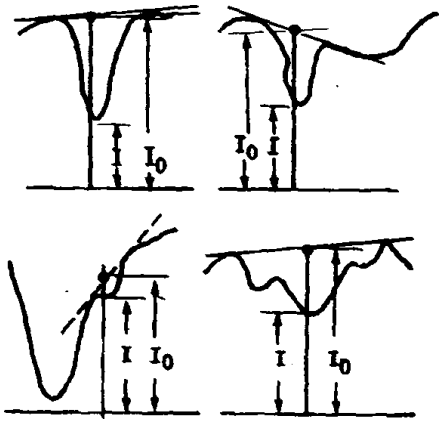
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(α) Μέθοδος Cell in, Cell out

Σ' αυτήν ρυθμίζεται κατ' αρχήν το όργανο στο επιθυμητό λ. Στη συνέχεια τοποθετείται ο διαλύτης στην κυψελίδα και λαμβάνεται η τιμή I_0 της εξερχόμενης ακτινοβολίας. Τέλος στην κυψελίδα τοποθετείται το δείγμα και λαμβάνεται η τιμή I. Με εφαρμογή του νόμου των Lambert - Beer υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος.

(β) Μέθοδος Baseline

Λαμβάνεται κατ' αρχήν το φάσμα IR (σχ. 3-20) στο οποίο ορίζονται αντίστοιχα τα μεγέθη I_0 και I. Με εφαρμογή του νόμου των Lambert - Beer υπολογίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος. Στο σχήμα 3-20 φαίνονται τέσσερις χαρακτηριστικές περιπτώσεις κορυφών και ο γραφικός προσδιορισμός των I_0 και I.



Σχ. 3-20. Ποσοτικός προσδιορισμός ουσιών με IR (μέθοδος baseline)

(i) Λίπη και έλαια

Στον προσδιορισμό: φωσφολιπιδίων σε αυγά και σόγια[69] κατόπιν προηγούμενης χρωματογραφικής απομόνωσης στην περιοχή λ = 6.5 - 9.5 μm· υδροξυομάδων στο βούτυρο του κακάο[70] και το ελαιόλαδο[71] στο λ = 2.76 μm.

(ii) Κατάλοιπα φυτοφαρμάκων

Στον προσδιορισμό οργανοχλωριούχων[72] και οργανοφωσφορικών[73] κατάλοιπων σε φυτικά τρόφιμα.

(iii) Υγρασία

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας χρησιμοποιούνται συνήθως τα λ = 1.93, 1.45 και 0.977 μm σε τρόφιμα όπως χυμούς φρούτων, μπύρα, κρασί, κονιάκ, μαρμελάδες και μέλι[74]. Για τον προσδιορισμό της υγρασίας στο βούτυρο το δείγμα διαλύεται σε CCl_4, διαιρείται σε δύο ίσα μέρη, το πρώτο από τα οποία ξηραίνεται με $CaCl_2$. Στη συνέχεια λαμβάνονται οι απορροφήσεις και των δύο στο λ = 1.9 μm και η διαφορά δίνει την υγρασία του δείγματος[75] (όριο ανίχνευσης 0.02%).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(iiii) Διάφορα

Στον προσδιορισμό: των βιταμινών A, C και E σε φυτικά λάδια[76] και πορτοκάλια[77], πρόσθετων γλυκαντικών υλών, όπως σακχαρίνης, δουλσίνης και κυκλαμικών[78] στα λ = 1149, 1512 και 1194 cm^{-1} αντίστοιχα· της βανιλίνης[79] και αιθυλβανιλίνης σε προϊόντα με γεύση βανίλιας, κατόπιν προηγουμένης απομόνωσης με χαρτοχρωματογραφία κ.ά.

3.4. Φθορισμομετρία

Το φαινόμενο της φωταύγειας (luminescence) παρατηρήθηκε πρώτα από τον Stokes το 1852, ο οποίος διαπίστωσε ότι ορισμένα υλικά φωτιζόμενα εκπέμπουν δικό τους φως. Οι φωτεινές πινακίδες στους δρόμους, οι πλάκες των ρολογιών όταν φωτιστούν τη νύχτα, εκπέμπουν με τη σειρά τους φωτεινή ακτινοβολία. Απ' τα δύο παραπάνω παραδείγματα τα πρώτα υλικά εκπέμπουν το δικό τους φως μόνον όσο χρόνο φωτίζονται (φθορισμός, fluorescence) ενώ τα δεύτερα συνεχίζουν να εκπέμπουν δικό τους φως και μετά τη διακοπή του φωτισμού των (φωσφορισμός, phosphorescence).

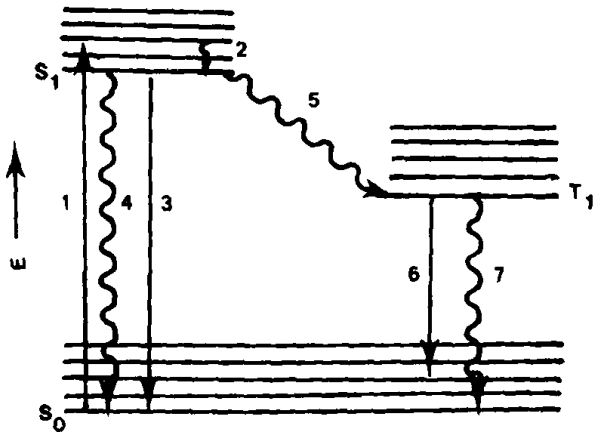
Γενικά τα υλικά που παρουσιάζουν τα φαινόμενα το φθορισμού είτε φωσφορισμού περιέχουν στο μόριό τους ομάδα δότη ηλεκτρονίων (αμίνες, αλκοόλες, ετεροάτομα περιέχοντα ζεύγος ηλεκτρονίων σθένους μη δεσμικών ή π) ή σύστημα διπλών δεσμών (αρωματικούς δακτυλίους, συζυγή διένια). Το φαινόμενο της φωταύγειας των μορίων είναι αρκετά πολύπλοκο διότι: (α) περιλαμβάνει εκτός των ηλεκτρονικών μεταπτώσεων ταυτόχρονα και δονητικές και περιστροφικές μεταπτώσεις έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός των διεγέρσεων να είναι εξαιρετικά μεγάλος. (β) μελετάται συνήθως σε συμπυκνωμένες φάσεις όπου οι αποστάσεις των γειτονικών μορίων ως προς το υπό εξέταση είναι μικρές και είναι δυνατή η ανταλλαγή ενέργειας μεταξύ των μορίων αυτών.

Α. Θεωρία φωταύγειας

Έστω άτομο με μη δεσμικό ζεύγος ηλεκτρονίων σθένους αντιπαράλληλου spin ευρισκόμενου στη βασική ενεργειακή κατάσταση (So) (σχ. 3-21). Έστω ακόμη ότι στα ηλεκτρόνια αυτά προσφέρεται ενέργεια υπό μορφήν ακτινοβολίας στην περιοχή UV. Η ενέργεια αυτή δυνατόν να προκαλέσει δονητικές, περιστροφικές ή και ηλεκτρονικές μεταπτώσεις στο άτομο. Προσλαμβάνοντας ενέργεια το ένα ηλεκτρόνιο του ζεύγους μεταπηδά στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση (S_1) (singlet state). Η διαδικασία της διέγερσης διαρκεί περίπου 10^{-15} sec έτσι ώστε το μόριο να μη προφτάνει να μεταβάλλει τη γεωμετρική του δομή. Από την κατάσταση αυτή το ηλεκτρόνιο μπορεί ή να

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

επανέλθει κατευθείαν στη βασική του κατάσταση (φθορισμός συντονισμού) (πορεία 3) ή να μεταπηδήσει στην κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μέσα όμως στην διηγερμένη κατάσταση που βρίσκεται (πορεία 2) (δόνηση επαναφοράς). Στην κατάσταση αυτή το ηλεκτρόνιο παραμένει περίπου 10^{-7} - 10^{-9} sec. Από εκεί μέσω της πορείας 3 επανέρχεται στη βασική του κατάσταση So, ενώ ταυτόχρονα εκπέμπει ενέργεια μέρος της οποίας βρίσκεται στο ορατό και μέρος στο εγγύς IR. Το μάτι μας βλέπει το ορατό τμήμα της ακτινοβολίας αυτής και σχηματίζει την εντύπωση ότι το υλικό «εκπέμπει φως» ή μ' άλλα λόγια **φθορίζει**. Ο φθορισμός διαρκεί 10^{-8} sec. Από την απλή διηγερμένη κατάσταση (↑↓ σπιν) το ηλεκτρόνιο αντί να επιστρέψει στη βασική του κατάσταση μπορεί να μεταπηδήσει στη λεγόμενη τριπλή κατάσταση (triplet state) (↑↑ spin) (πορεία 5). Η μετάπτωση αυτή απαιτεί χρόνο 10^{-8} sec και υποβοηθείται από την παρουσία βαρέων ατόμων μέσα στο μόριο. Παρ' όλα αυτά η διαδικασία αυτή, γνωστή σαν εσωτερική διασταύρωση (intersystem crossing) είναι αρκετά πιο αργή από τη «δόνηση επαναφοράς» και αυτό παρατηρείται αφού το ηλεκτρόνιο έχει φτάσει στη χαμηλότερη δονητική στάθμη μέσα στην απλή διηγερμένη κατάσταση.
Αμέσως μετά την εσωτερική διασταύρωση (10^{-13} sec) το ηλεκτρόνιο καταλαμβάνει τη χαμηλότερη δονητική στάθμη στην τριπλή διηγερμένη κατάσταση. Στη νέα αυτή διηγερμένη κατάσταση το ηλεκτρόνιο παραμένει επί χρόνο αρκετά μεγαλύτερο (10^{-4} - 10 sec) από εκείνον στην απλή διηγερμένη κατάσταση. Τέλος το ηλεκτρόνιο μέσω της πορείας 6 μεταπίπτει στη βασική του κατάσταση, εκπέμποντας ενέργεια ορατή από το ανθρώπινο μάτι. Το φαινόμενο είναι γνωστό σαν **φωσφορισμός**. Η τελευταία αυτή μετάπτωση



Σχ. 3-21. Μοριακά ενεργειακά επίπεδα. Δονητικές στάθμες: So= βασική απλή S_1= απλή διεγερμένη T_1= τριπλή.
Διεργασίες: 1. απορρόφηση ενέργειας 2. δονητική χαλάρωση 3. φθορισμός 4, 7. quenching (μετατροπή ηλεκτρονικής ενέργειας σε θερμότητα) 5. εσωτερική διασταύρωση 6. φωσφορισμός

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

είναι διαδικασία αργή γιαυτό και το το φωσφορίζον υλικό φαίνεται ότι εκπέμπει φως και μετά την παύση φωτισμού του από την πηγή. Οι γραμμές 4 και 7 στο σχ. 3-21 αντιστοιχούν σε μετατροπή της ηλεκτρονικής ενέργειας σε θερμότητα και δεν συνοδεύονται από εκπομπή ακτινοβολίας. Η μετάπτωση So→ Τι απαιτεί μεταβολή στο spin του ηλεκτρονίου και δεν είναι πιθανή. Επειδή ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα κάποιας απώλειας σε δονητική και ηλεκτρονική ενέργεια, γιαυτό και το μήκος κύματος της παραγόμενης ακτινοβολίας φθορισμού θα είναι μεγαλύτερο (μικρότερης συχνότητας) απ' ότι εκείνο της απορροφούμενης ακτινοβολίας.

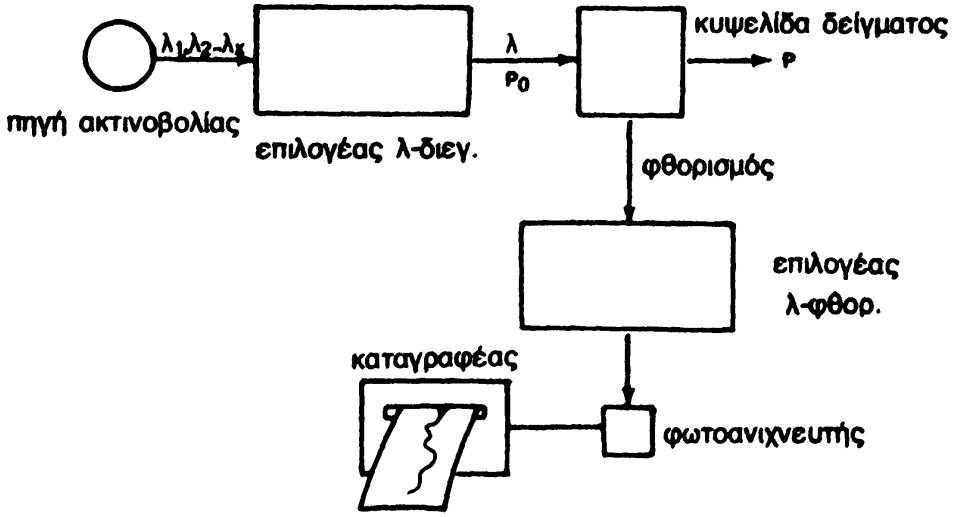
Στην πράξη ο φθορισμός βρίσκει περισσότερες εφαρμογές από τον φωσφορισμό.

Το μεγάλο πλεονέκτημα της φθορισμομετρίας έναντι της φασματοφωτομετρίας UV / ορατού είναι η μεγάλη της ευαισθησία. Είναι δυνατός ο προσδιορισμός ουσιών σε ποσότητα 10^{-9}g ή και μικρότερη. Αντίθετα στη φασματοφωτομετρία UV/ορατού το κατώτερο όριο προσδιορισμού εγγίζει τα 10^{-7}g.

Β. Οργανολογία

Το φθορισμόμετρο (σχ. 3-22) αποτελείται από τα εξής βασικά στοιχεία:

1. Πηγή ακτινοβολίας
2. Επιλογέα μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής
3. Κυψελίδα δείγματος
4. Ανιχνευτή
5. Καταγραφέα



Σχ. 3-22. Σχηματικό διάγραμμα φθορισμομέτρου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

1. Πηγή ακτινοβολίας

Είναι ίδια με εκείνη που χρησιμοποιείται στη περιοχή UV. Συνεπώς οποιαδήποτε λυχνία H_2,D_2, ή ατμών Hg είναι κατάλληλη.

2. Επιλογέας μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής (φθορισμού).

Όπως και στα φασματοφωτόμετρα UV οι χρησιμοποιούμενες διατάξεις για την επιλογή των κατάλληλων μηκών κύματος είναι τα φίλτρα, τα πρίσματα και τα φράγματα ανάκλασης (βλ. κεφ. 3.2). Με τη χρήση των παραπάνω διατάξεων απομονώνεται αρχικά η περιοχή μηκών κύματος που θα χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση των μορίων του δείγματος και μετά την αλληλεπίδραση ύλης/ακτινοβολίας απομονώνεται η ακτινοβολία που οφείλεται αποκλειστικά στον φθορισμό.

3. Κυψελίδα δείγματος (cuvette)-διαλύτης.

Οι χρησιμοποιούμενες κυψελίδες είναι από συντηγμένη πυριτική γη (fused silica) ή από quartz. Από τους διαλύτες προτιμούνται το νερό και η αιθανόλη.

4. Ανιχνευτής

Μια και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία φθορισμού είναι στην ορατή περιοχή του φάσματος, σαν ανιχνευτής χρησιμοποιείται η φωτολυχνία σε συνδυασμό με φωτοπολλαπλασιαστή (βλ. κεφ. 3.2). Όπως φαίνεται και στο σχ. 3-22 ο ανιχνευτής είναι τοποθετημένος στο σύστημα έτσι ώστε να «βλέπει» το τμήμα εκείνο της εξερχόμενης από το δείγμα ακτινοβολίας που σχηματίζει γωνία 90^0 ως προς την προσπίπτουσα στο δείγμα ακτινοβολία. Αυτό είναι δυνατόν γιατί ο φθορισμός είναι φαινόμενο με ισοτροπικές ιδιότητες, δηλαδή η φθορίζουσα ακτινοβολία μεταδίδεται ομοιόμορφα προς όλες τις κατευθύνσεις.

Με τη μέτρηση της ακτινοβολίας κάθετα προς την προσπίπτουσα επιτυγχάνεται η ελαχιστοποίηση της παρεμβολής της ακτινοβολίας η οποία χρησιμοποιείται για τη διέγερση των μορίων του δείγματος. Αν μετριόταν η φθορίζουσα ακτινοβολία στην προέκταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας θα χρειαζόταν «τέλειος» μονοχρωμάτορας για τον διαχωρισμό των ακτινοβολιών διέγερσης / φθορισμού, πράγμα δύσκολο γιατί η δεύτερη είναι πολύ μικρότερη σε ένταση από την πρώτη.

5. Καταγραφέας

(βλ. κεφ. 3.2)

Παράγοντες ιδιαίτερα σημαντικοί στη φθορισμομετρία περιλαμβάνουν:

(α) Τη θερμοκρασία

Έχει δειχτεί ότι πολλά από τα φθορίζοντα μόρια χάνουν μέρος της ενέργειάς τους λόγω αλληλοσυγκρούσεων με γειτονικά μόρια (αρνητικό σφάλμα). Για την ελαχιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων του τύπου αυτού καταψύχεται το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

δείγμα με υγρό άζωτο για μερικά sec οπότε η λαμβανόμενη, στη συνέχεια ένταση φθορισμού αυξάνει κατά 10-10^3 φορές.

(β) ρύθμιση pH

Ανάλογα με την τιμή του pH τα μη δεσμικά ηλεκτρόνια είναι δυνατόν να προσλάβουν πρωτόνια, οπότε παύουν να συμμετέχουν στη διαδικασία του φθορισμού. Έτσι αλλοιώνεται ή καταστρέφεται η ικανότητα φθορισμού της ουσίας.

(γ) η ακτινοβολία UV

Η ισχυρή UV ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος είναι δυνατόν να αλλοιώσει ριζικά τη δομή μέρους των μορίων του δείγματος.

(δ) Αυτοαπορρόφηση (quenching)

Πολλές φορές η εκπεμπόμενη από ένα μόριο ακτινοβολία φθορισμού έχει τέτοια ενέργεια που είναι δυνατόν να απορροφηθεί από ένα δεύτερο γειτονικό μόριο. Η ενέργεια αυτή τελικά θα χαθεί μέσω αλληλοσυγκρούσεων μεταξύ γειτονικών μορίων ή μέσω επανεκπομπής της.

Σε περίπτωση επανεκπομπής η ακτινοβολία θα έχει διέλθει μέσω περισσοτέρων του ενός μορίων, ενώ ο ανιχνευτής «βλέπει» και μετράει την ακτινοβολία αυτή σαν να είχε διέλθει μέσω ενός μόνο μορίου (αρνητικό σφάλμα). Το πρόβλημα της αυτοαπορρόφησης εμφανίζεται πιο έντονο σε δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων, οι οποίες πρέπει να αποφεύγονται. Αντίστοιχο πρόβλημα μπορεί να δημιουργήσει η αλληλεπίδραση ουσίας - διαλύτη.

Γ. Ποσοτική ανάλυση

Η ένταση φθορισμού του δείγματος είναι ανάλογη προς την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ισχύει δηλαδή ο νόμος των Lambert-Beer:

$$\log P_o/P_o\text{-}P = a \cdot b \cdot c \qquad P_o,\ P \qquad (3.28)$$

όπου: Po = ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας

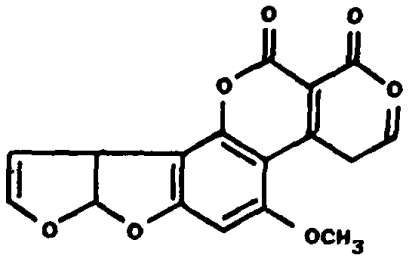
P = ένταση φθορισμού που μετρείται.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος γίνεται όπως και στη φασματοφωτομετρία ορατού/UV και για τη περιοχή των χαμηλών συγκεντρώσεων ($\leqslant$ 1% διάλυμα). Στη φθορισμομετρία είναι συνηθισμένη η τεχνική του εσωτερικού προτύπου (βλ. κεφ. 2.8).

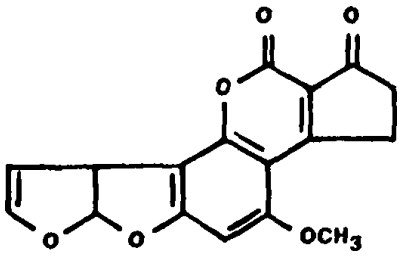
Δ. Εφαρμογές

Στον προσδιορισμό του καρκινογόνου βενζοπυρενίου και άλλων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στη μπύρα[80] και σε δημητριακά[81] σε επίπεδα της τάξης 5×10^{-5} και 1×10^{-6} ppm αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές απαντούν σε ψημένα ή καβουρντισμένα προϊόντα όπως η βύνη, ο καφές[82] και το ψημένο κρέας[83] και προέρχονται από την καύση διαφόρων οργανικών υλικών. Παρουσιάζουν δε έντονο φθορισμό λόγω εκτεταμένης συζυγούς

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



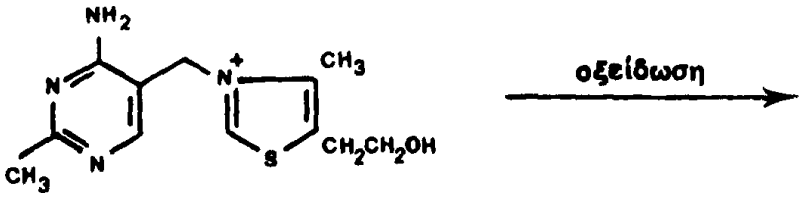
αλφατοξίνη G_1



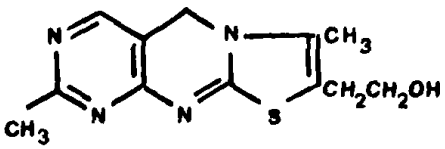
αλφατοξίνη B_1

δομής. Στον προσδιορισμό των αφλατοξινών ισχυρά τοξικών ουσιών, προϊόντων μεταβολισμού του μύκητα Aspergillus flavus. Οι επί μέρους αφλατοξίνες B_1,B_2,G_1,G_2 προσδιορίζονται φθορισμομετρικά[84,85] κατόπιν απομόνωσης με TLC, διέγερσης της πλάκας TLC με ακτινοβολία λ=365 nm και μέτρησης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού στο λ = 425 nm. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η αφλατοξίνη B_1 σε ποσότητα 8×10^{-11} g.

Στον προσδιορισμό της βιταμίνης Α σε διάφορα τρόφιμα χρησιμοποιώντας n-βουτανόλη σαν διαλύτη, λ διέγερσης = 340 nm και λ εκπομπ. = 490 nm· της θειαμίνης[86] (B_1) κατόπιν οξείδωσής της προς το φθορίζον θειόχρωμα με ισοβουτανόλη σαν διαλύτη, λ διεγ. = 365 nm και λ εκπομπ. = 435 nm· της βιταμίνης B_6[87], B_{12}[88] και C[89]



θειαμίνη



θειόχρωμα

Στη διάκριση, μεταξύ παρθένου και εξευγενισμένου ελαιολάδου[90] από τον ισχυρό φθορισμό που δίνουν τα δεύτερα στο λ διεγ.=360 nm. Στον προσδιορισμό του μυκητοκτόνου διφαινυλίου[91] και του φυτοφαρμάκου παρα-

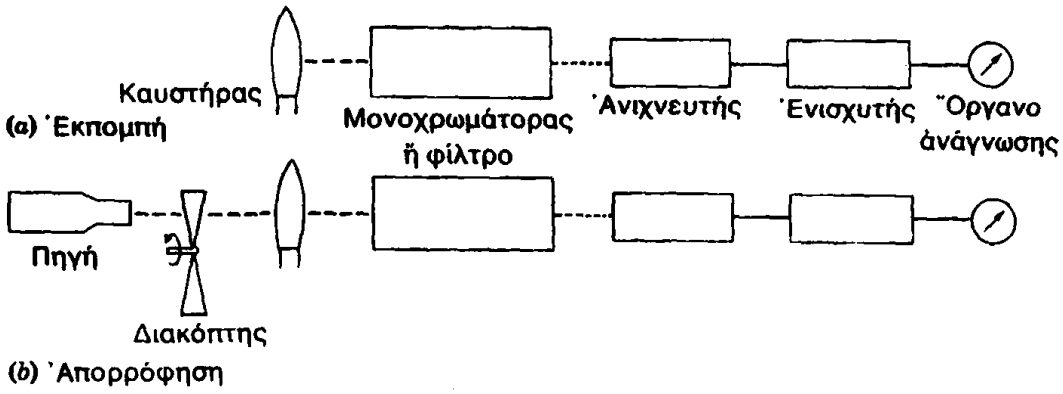
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

θείου[92] σε διάφορα δείγματα τροφίμων· της χρωστικής Πιοβερδίνης (pyoverdine) που σχηματίζεται στα μολυσμένα με Ψευδομονάδα αβγά[93]· στον προσδιορισμό ομάδων όπως το -S-S- των πρωτεϊνών από το ποσοστό της απόσβεσης (quenching) που προκαλούν στον φθορισμό της ακετοξυ-υδραργυρο-φλουορεσκείνης (λ διεγ. = 499 nm, λ εκπομπ. = 520 nm)· στον προσδιορισμό παραγώγων χημικών συντηρητικών όπως οι νιτρωδαμίνες σε κρεατοσκευάσματα[94] και τυριά,[94] κατόπιν απομόνωσης σε πλάκα TLC στα λ διεγ = 300 και λ εκπομπ. = 450 nm. Τέλος στον προσδιορισμό αμινοξέων που φθορίζουν, όπως η θρυπτοφάνη[95] σε συγκεντρώσεις της τάξης του 5×10^{-5} M στα λ διεγ. = 280 nm και λ εκπομπ. = 348 nm.

3.5. Φλογοφωτομετρία - Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης.

Κατ' αρχήν πρέπει να τονιστεί ότι παρά την προφανή σημασία τους στην ανάλυση, οι τεχνικές αυτές βρίσκουν περιορισμένη εφαρμογή αφ' ενός μεν γιατί χρησιμοποιούνται σχεδόν μόνο για ποσοτικούς σκοπούς, αφ' ετέρου δε γιατί ενδείκνυνται μόνον για την ανάλυση μετάλλων ή ημι-μετάλλων.
Είναι γνωστό πως αν εισαχθούν άλατα του Na,K,Ca κ.ο.κ. στη φλόγα λύχνου θα παραχθεί έγχρωμη ακτινοβολία π.χ. κίτρινη για το Na.
Αντίθετα, στοιχεία όπως Fe, Cu, Mn κ.ο.κ. δεν παράγουν ακτινοβολία.
Στοιχεία όπως το Na, K και Ca απαιτούν μικρά σχετικά ποσά ενέργειας (ενέργεια που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία της φλόγας, 900-1200^0 C) για τη διέγερσή τους. Αφού τα στοιχεία αυτά διεγερθούν, επιστρέφουν στη βασική ενεργειακή τους κατάσταση με σύγχρονη εκπομπή ακτινοβολίας χαρακτηριστικού, για κάθε στοιχείο, μήκους κύματος. Η μέτρηση του ποσού της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό του στοιχείου (φλογοφωτομετρία). Αντίστοιχα για τη διέγερση άλλων στοιχείων όπως Fe, Cu, Mn κ.ο.κ. απαιτείται υψηλότερη ενέργεια, ορισμένου μήκους κύματος, η οποία είναι δυνατόν να προσφερθεί από εξωτερική πηγή ακτινοβολίας. Η μέτρηση του ποσού της απορροφούμενης από το στοιχείο ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτού (φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης).
Στη φλογοφωτομετρία η φλόγα χρησιμοποιείται ταυτόχρονα σαν μέσον διέγερσης και σαν κυψελίδα του δείγματος. Στη βασική διάταξη του φλογοφωτόμετρου (σχ. 3-23α), το δείγμα υπό μορφή νέφους, τροφοδοτείται μέσω ενός καυστήρα στη φλόγα όπου διεγείρονται τα άτομα του. Ακολούθως, η κατά την αποδιέγερση των ατόμων του δείγματος, εκπεμπόμενη ακτινοβολία, μέσω φίλτρου μονοχρωμάτορα που απομονώνει εκλεκτικά συγκεκριμένα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-23. Φλογοφωτόμετρο (α) και φασματόμετρο ατομικής απορρόφησης (b)

μήκη κύματος, φθάνει στον ανιχνευτή όπου μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Τέλος στο όργανο μέτρησης, το σήμα αυτό μετατρέπεται σε μηχανική απόκλιση βελόνας, μέτρο της συγκέντρωσης του εξεταζόμενου στοιχείου. Παρόμοια είναι και η διάταξη του φασματοφωτομέτρου ατομικής απορρόφησης (σχ. 3-23β), με μερικές διαφορές. Δηλαδή εδώ απαιτείται επιπλέον μια χωριστή πηγή ακτινοβολίας και ένας διακόπτης ο οποίος στην ουσία διακόπτει την ακτινοβολία της εξωτερικής πηγής έτσι ώστε η τελευταία να διακρίνεται από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία της φλόγας.

Α. Διέγερση - Φλόγα

Στη φασματοφωτομετρία εκπομπής η ακτινοβολία εκπέμπεται από άτομα που βρίσκονται σε διηγερμένη κατάσταση ενώ στη φασματοφωτομετρία απορρόφησης τα άτομα που απορροφούν βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση. Στη κατάσταση ισορροπίας ο λόγος του αριθμού των ατόμων στη διηγερμένη κατάσταση (N_Δ), προς τον αριθμό των ατόμων στη θεμελιώδη (N_0) δίνεται από την εξίσωση 3.29

$$N_\Delta = N_0 \frac{g_\Delta}{g_0} \cdot e^{-\Delta E/KT}$$

όπου: g_Δ/g_0 = στατιστικός συντελεστής βάρους για τις συγκεκριμένες στάθμες

ενέργειας π.χ. για το Na $g_\Delta/g_0 = 2$, τον Zn $g_\Delta/g_0 = 3$ κ.ο.κ.

ΔΕ = ενέργεια διέγερσης του ατόμου του στοιχείου

Κ = σταθερά Boltzman

Τ = θερμοκρασία φλόγας (^{0}K).

Για παράδειγμα σε θερμοκρασία 3000^{0}K μόνον 1 από 58.800 ουδέτερα άτομα Na διεγείρονται. Για τον Zn η αντίστοιχη τιμή είναι 1 από 558×10^{12} άτομα. Για το λόγο αυτό ο Zn δεν προσδιορίζεται φλογοφωτομετρικά αλλά με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης. Αντίθετα το Na προσδιορίζεται με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

φλογοφωτομετρία.
Οι μετρήσεις εκπομπής και απορρόφησης σε φλόγα γίνονται συνήθως σε θερμοκρασία κάτω από 3000° C και συνεπώς τα περισσότερα άτομα βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση ($N_\Delta/N_0 \rightarrow 0$). Έτσι αιτιολογείται γιατί η απορρόφηση πρέπει να είναι ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία, ενώ ο αριθμός των διηγερμένων ατόμων (N_Δ), και συνεπώς η ένταση εκπομπής, μεταβάλλεται εκθετικά με τη θερμοκρασία.
Η εκλογή του καυσίμου και του οξειδωτικού εξαρτώνται από την απαιτούμενη θερμοκρασία φλόγας για την ατομοποίηση του δείγματος. Προσοχή χρειάζεται ώστε να μην παρεμβάλλεται η εκπομπή του υποστρώματος στην ανάλυση. Από τις φλόγες που χρησιμοποιούνται συνήθως η φλόγα του ακετυλενίου - υποξειδίου αζώτου παρουσιάζει την πιο έντονη εκπομπή υποστρώματος. Η παρεμβολή αυτή αποφεύγεται στην ατομική απορρόφηση με τη χρήση μιας διακοπτόμενης δέσμης ακτινοβολίας (σχ. 3-23 β). Το σύστημα διακοπής διακόπτει την πηγή ακτινοβολίας με σταθερή συχνότητα, ώστε ο ανιχνευτής να δέχεται διαδοχικά το υπόστρωμα της φλόγας μόνο του και το υπόστρωμα της φλόγας συν την ακτινοβολία της πηγής. Το σταθερό σήμα του υποστρώματος (dc) φιλτράρεται και ο ενισχυτής δέχεται μόνο το εναλλασσόμενο σήμα διαφοράς (ac). Παρόμοια τεχνική, ώστε να αποφεύγεται το υπόστρωμα της φλόγας δεν υπάρχει στις μετρήσεις εκπομπής (φλογοφωτομετρία). Οι προτεινόμενες φλόγες για την φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης(ΦΑΑ)φαίνονται στον Πίνακα 3.4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4

Μίγματα καυσίμου/οξειδωτικού αερίου στη φλογοφωτομετρία/ΦΑΑ

καύσιμο	οξειδωτικό αέριο	T (°C)
ακετυλένιο	αέρας	2125-2400
ακετυλένιο	υποξείδιο αζώτου	2600-2800
ακετυλένιο	οξυγόνο	3060-3135
υδρογόνο	οξυγόνο	2550-2700
υδρογόνο	αέρας	2000-2050

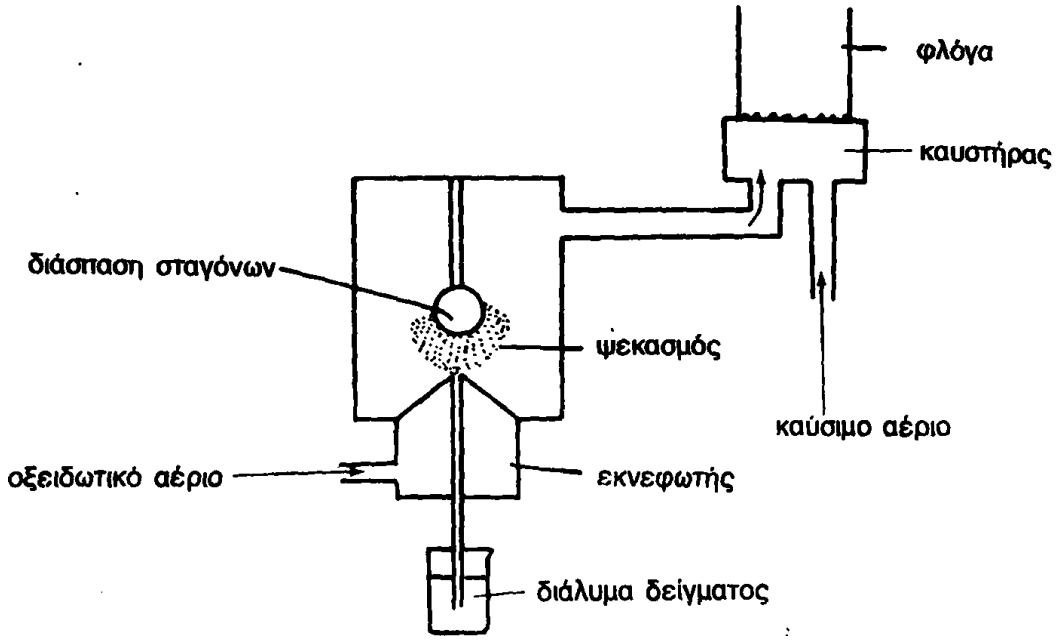
Για τη φλογοφωτομετρία προτείνεται συνήθως η φλόγα ακετυλενίου - υποξειδίου αζώτου, εκτός από τα αλκαλι-μέταλλα και το σίδηρο, για τα οποία προτιμάται η φλόγα χαμηλής θερμοκρασίας ακετυλενίου - αέρα.

Β. Οργανολογία

1. Εκνεφωτής και καυστήρας

Το σύστημα εκνεφωτή (nebulizer) και καυστήρα (burner) που φαίνεται στο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-24. Σύστημα εκνεφωτή - καυστήρα στη φλογοφωτομετρία

σχημ. 3-24 λειτουργεί ως εξής:

Το δείγμα, σαν διάλυμα, τροφοδοτείται στον θάλαμο εκνέφωσης όπου αναμειγνύεται με το οξειδωτικό, συνήθως αέρα και διερχόμενο μέσω του εκνεφωτή σπάζει σε σταγονίδια. Το νέφος των σταγονιδίων προσκρούει πάνω στον διασπαστήρα (spoiler), όπου αφ' ενός παγιδεύονται οι τυχόν μεγάλες σταγόνες του δείγματος, αφ' ετέρου σπάζουν σε σταγονίδια διαμέτρου $\leqslant 10$ μm. Τα τελικά αυτά σταγονίδια συμπαρασύρονται από τον αέρα στον καυστήρα όπου αναμειγνύονται με το καύσιμο για να εισέλθουν αμέσως μετά στη φλόγα.

Στη φλόγα, τα σταγονίδια του δείγματος κατ' αρχήν εξατμίζονται και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, διασπώνται σε άτομα (ατομοποίηση) ή θραύσματα μορίων. Τα δεύτερα δεν μπορούν να συνεισφέρουν στην εκπομπή ή στην απορρόφηση. Ακόμη μερικά από τα άτομα ιονίζονται στη φλόγα. Ο ιονι ιός των ατόμων δημιουργεί αρνητικό σφάλμα στον προσδιορισμό και αντιμετ πίζεται με την προσθήκη περίσσειας ενός ευκολότερα ιονιζόμενου στοιχε υ στο δείγμα. Αυτό δημιουργεί υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρονίων, που κατ στέλλει τον ιονισμό του δυσκολότερα ιονιζόμενου στοιχείου. Ο ιονισμό αυξάνει με την ελάττωση της συγκέντρωσης του δείγματος. Επίσης αυξάνε με τη θερμοκρασία και την ελάττωση του δυναμικού ιονισμού του στοιχείου. Η αποτελεσματικότητα της εκνέφωσης εξαρτάται από το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του δείγματος, την παροχή του οξειδωτικού μέσου και την κατασκευή του ίδιου του καυστήρα.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Πηγή παρεμπόδισης στην ατομοποίηση κατά τους φλογοφωτομετρικούς προσδιορισμούς είναι η παρουσία φωσφορικών ιόντων στο διάλυμα. Έχει δειχθεί ότι διάλυμα Ca^{2+} που περιέχει PO_4^{3-} θα δώσει μικρότερο ηλεκτρικό σήμα - απόκριση από το αντίστοιχο διάλυμα Ca^{2+} που δεν περιέχει PO_4^{3-}. Το γεγονός αποδίδεται στο σχηματισμό πυροφωσφορικού ασβεστίου το οποίο ατομοποιείται στη φλόγα πολύ αργότερα από τα υπόλοιπα άλατα του ασβεστίου. Τέτοιου είδους παρεμποδίσεις ελαχιστοποιούνται αν χρησιμοποιηθούν αρκετά υψηλές θερμοκρασίες φλόγας. Ακόμη χρησιμοποιούνται ουσίες που έχουν την τάση ν' απελευθερώνουν άτομα Ca, από περιβάλλοντα που περιέχουν PO_4^{3-}. Τέτοιες ουσίες είναι τα οξείδια του Ca που δεσμεύουν εκλεκτικά τα PO_4^{3-}. Ακόμη χρησιμοποιείται το EDTA που συμπλέκει το Ca, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συνένωση Ca^{2+}- PO_4^{3-}. Με την εισαγωγή του δείγματος στη φλόγα το σύμπλοκο EDTA-Ca καταστρέφεται και απελευθερώνει τα άτομα του Ca. Για τους παραπάνω λόγους όποιος χρησιμοποιεί τη φλογοφωτομετρία πρέπει να συμβουλεύεται τη βιβλιογραφία για τις συγκεκριμένες παρεμποδίσεις που υπεισέρχονται στην ανάλυση κάθε στοιχείου.

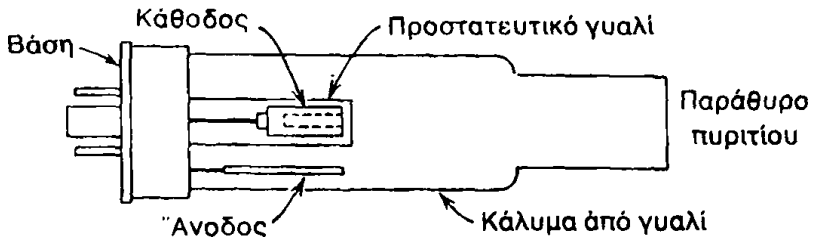
Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα που οφείλονται στις διάφορες παρεμποδίσεις προτάθηκε η ιδέα να χρησιμοποιηθεί πηγή ακτινοβολίας που θα εκπέμπει τα συγκεκριμένα εκείνα μήκη κύματος τα οποία απαιτεί κάθε στοιχείο για να διεγερθεί. Έτσι διαμορφώθηκε η φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης, η βασική διάταξη της οποίας φαίνεται στο σχημ. 3-23β.

2. Πηγή ακτινοβολίας στην Φ.Α.Α.

Χρησιμοποιούνται συνήθως λυχνίες κοίλης καθόδου (σχ. 3-25). Η λυχνία αποτελείται από την άνοδο (αδρανές υλικό, όπως βολφράμιο, νικέλιο κ.τ.λ.) και την κάθοδο που αποτελείται από το ίδιο στοιχείο με αυτό που πρόκειται να προσδιοριστεί. Η λυχνία γεμίζεται με Αργό σε πίεση λίγων torr. Λόγω εφαρμογής διαφοράς δυναμικού μεταξύ ανόδου / καθόδου αποσπώνται ηλεκτρόνια από την κάθοδο και μετακινούνται προς την άνοδο.

Στη διάρκεια της διαδρομής τους αυτής ιονίζουν άτομα Ar($Ar \rightarrow Ar^+ + e^-$) που περιέχει η λυχνία. Τα ογκώδη αυτά ιόντα Ar^+ προσκρούουν με ταχύτητα στην κάθοδο και αποσπούν απ' αυτήν άτομα του στοιχείου από το οποίο αυτή αποτελείται. Τα άτομα αυτά διεγείρονται κατόπιν σύγκρουσης με τα ιόντα Ar^+ και κατά την αποδιέγερσή τους εκπέμπουν ακτινοβολία χαρακτηριστική του υλικού της καθόδου. Η ακτινοβολία αυτή παρέχει φασματική γραμμή εύρους (0.01Å), γιαυτό οι παρεμποδίσεις ελαχιστοποιούνται. Συνήθως οι λυχνίες αυτές κατασκευάζονται για κάθε στοιχείο χωριστά, αλλά υπάρχουν και λυχνίες πολλαπλών στοιχείων (μέχρι και 6).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-25. Λάμπα κοίλης καθόδου

3. Διακόπτης (chopper)

Για τη χρήση και τη λειτουργία του διακόπτη βλ. κεφ. 3.5Α

4. Μονοχρωμάτορας και ανιχνευτής

Η λυχνία κοίλης καθόδου εκπέμπει γενικά πολλές σύνθετες γραμμές για κάθε στοιχείο, αλλά η απαιτούμενη φασματική γραμμή μπορεί να απομονωθεί με τη βοήθεια μονοχρωμάτορα μικρής σχετικά διασποράς. Πολλές από τις γραμμές αυτές δεν είναι γραμμές απορρόφησης, επειδή περιλαμβάνουν μεταπτώσεις που δεν προέρχονται από τη θεμελιώδη κατάσταση. Για επίτευξη μέγιστης ευαισθησίας γίνεται επιλογή της πιο έντονης γραμμής απορρόφησης με επιλογή μικρού ανοίγματος σχισμών εισόδου και εξόδου στον μονοχρωμάτορα.

Το ανεκτό φασματικό πλάτος ζώνης ποικίλλει μεταξύ 0.1 και 1.0 nm.

Τα φίλτρα δίνουν κατάλληλη απομόνωση της απαιτούμενης φασματικής γραμμής, αν το στοιχείο έχει πολύ απλό γραμμικό φάσμα. Έτσι τα φίλτρα χρησιμοποιούνται συχνά για προσδιορισμούς ρουτίνας των στοιχείων Na,K,Ca και Mg σε βιολογικά δείγματα.

Σαν ανιχνευτής και στις δύο τεχνικές χρησιμοποιείται η φωτολυχνία (βλ. κεφ. 3.2) σε συνδυασμό με φωτοπολλαπλασιαστή.

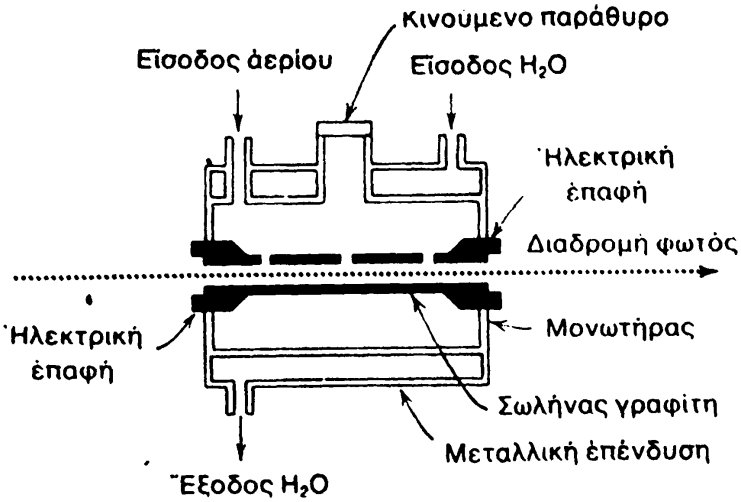
5. Άφλογοι ατομοποιητές (flameless atomizers)

Οι συνηθισμένες τεχνικές φλόγας δεν είναι ικανοποιητικές. Μεγάλο μέρος του δείγματος δεν ατομοποιείται, είτε γιατί δεν φθάνει ποτέ στη φλόγα, είτε γιατί τα σταγονίδια είναι πολύ μεγάλα και το ποσοστό αυτών που ατομοποιείται μένει για πολύ λίγο χρόνο στην οπτική δέσμη. Οι ανάγκες ανάλυσης δειγμάτων με πολύ μικρά ποσά συστατικών, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων ατομοποίησης χωρίς φλόγα.

Οι περισσότεροι ατομοποιητές χωρίς φλόγα βασίζονται στο φούρνο Massmann (σχ. 3-26).

Το δείγμα, που μπορεί να είναι λίγα ml υγρού ή λίγα mg στερεού τοποθετείται σε σωλήνα ή κύπελλο από γραφίτη (carbon rod) που θερμαίνεται με τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος. Η θέρμανση γίνεται συνήθως σε τρία στάδια. Κατ' αρχήν σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία απομακρύνεται ο διαλύτης, στη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-26. Φούρνος Massmann.

συνέχεια σε υψηλότερη θερμοκρασία επιτυγχάνεται η αποτέφρωση του δείγματος (διάσπαση του μορίου με εξαέρωση και πυρόλυση) και τέλος θερμαίνεται ο σωλήνας μέχρι πυράκτωσης (3000°K) για την ατομοποίηση του δείγματος. Η οξείδωση του γραφίτη αποφεύγεται αν περιβληθεί σε ατμόσφαιρα αζώτου ή αργού. Το αποτέλεσμα είναι μια αρκετά λεπτή κορυφή απορρόφησης που καταγράφεται σε διάταξη καταγραφέα (βλ. κεφ. 2.8). Τα λαμβανόμενα όρια ανίχνευσης εξαρτώνται από τα στοιχεία και τις παραμέτρους λειτουργίας και είναι περίπου 1 με 10 picograms (10^{-12} g).
Μεταξύ των μειονεκτημάτων του άφλογου ατομοποιητή είναι το πορώδες του υλικού κατασκευής του, που έχει σαν αποτέλεσμα την απορρόφηση μέρους του δείγματος (αρνητικό σφάλμα). Αυτό ξεπερνιέται με χρήση του «πυρολυτικού» άνθρακα που είναι λιγότερο πορώδης. Η μέση ζωή του άφλογου ατομοποιητή είναι περίπου για εκατό προσδιορισμούς.

Γ. Εφαρμογές

Η φλογοφωτομετρία αν και πιο απλή έχει σε μεγάλο βαθμό παραμεριστεί από την φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης λόγω αφ' ενός του μικρότερου ποσοστού παρεμποδίσεων που υπεισέρχονται στη δεύτερη, αφ' ετέρου δε των καλλίτερων, σε μερικές περιπτώσεις, ορίων ανίχνευσης (τεχνική φούρνου γραφίτη). Η φλογοφωτομετρία χρησιμοποιείται κυρίως στον προσδιορισμό Na και K, ενώ η Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης στον προσδιορισμό 70 περίπου στοιχείων, σε υποστρώματα όπως τρόφιμα, φάρμακα, καλλυντικά κ.ά.

1. Ποιοτική ανάλυση

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να γίνει ταυτοποίηση των στοιχείων με φλογοφωτομετρία και φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

βάση τις χαρακτηριστικές φασματικές γραμμές εκπομπής και απορρόφησης του κάθε στοιχείου.

(2) Ποσοτική ανάλυση

Είναι η κύρια εφαρμογή των δύο τεχνικών. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί μια ακόμη διαφορά μεταξύ της φλογοφωτομετρίας και φασματοφωτομετρίας ατομικής απορρόφησης. Στην πρώτη (εκπομπή) η σχέση μεταξύ απόκρισης του οργάνου και της συγκέντρωσης του στοιχείου είναι, μέσα σε ορισμένα όρια, γραμμική. Αντίθετα στη δεύτερη (απορρόφηση) η παραπάνω σχέση ακολουθεί το νόμο των Lambert-Beer. Η γραμμική σχέση είναι πιο εξυπηρετική για ποσοτική ανάλυση, αλλά η λογαριθμική σχέση δίνει πολύ μεγαλύτερη περιοχή συγκέντρωσης, όπου οι μετρήσεις γίνονται χωρίς αλλαγή των συνθηκών λειτουργίας του οργάνου.

Το προς ανάλυση δείγμα, ανάλογα με τη φύση του, υφίσταται κάποια προκατεργασία πριν εισαχθεί στη φλόγα. Τα στερεά συνήθως διαλύονται σε οξέα, όπως το υδροχλωρικό, αλλά πάλι χρειάζονται αλκαλική σύντηξη προηγουμένως. Χρησιμοποιούνται ακόμη και οργανικοί διαλύτες για εκλεκτική εκχύλιση των μετάλλων μετά από συμπλοκοποίηση σε υδατικό διάλυμα. Οι διαλύτες αυτοί στη συνέχεια αναρροφώνται κατ' ευθείαν στη φλόγα. Τέτοιοι διαλύτες είναι η μεθυλοϊσοβουτυλική κετόνη και ο οξικός μεθυλεστέρας.

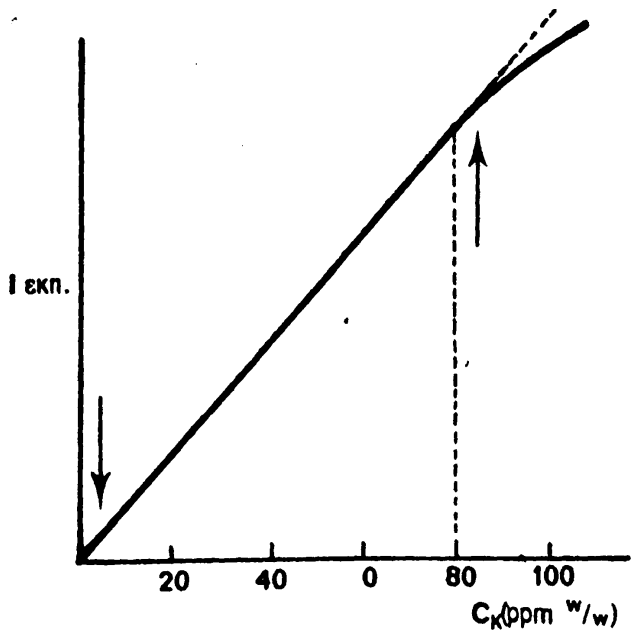
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των στοιχείων τόσο στην φλογοφωτομετρία, όσο και στη φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης γίνεται γραφικά με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης που κατασκευάζεται από σειρά πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης ($\leqslant$ 1mg/ml). Στη συνέχεια με βάση την πρότυπη καμπύλη και την τιμή απορρόφησης ή εκπομπής του διαλύματος άγνωστης συγκέντρωσης προσδιορίζεται η τελευταία.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται σε πλαστικές φιάλες πολυαιθυλενίου, γιατί το γυαλί προσροφά στην επιφάνειά του αρκετά από τα μέταλλα.

Μια χαρακτηριστική πρότυπη καμπύλη για το K δίνεται στο σχημ. 3-27.

Η καμπύλη αυτή τόσο στο πάνω, όσο και στο κάτω άκρο της αποκλείνει από την ευθεία. Για συγκεντρώσεις (C > 85 ppm) ή απόκλιση οφείλεται στο φαινόμενο της αυτοαπορρόφησης (self absorption) του δείγματος. Δηλαδή στα άκρα της φλόγας, τα άτομα έχουν χαμηλότερη θερμοκρασία απ' ότι στο μέσον. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από τα «εσωτερικά-ζεστά» άτομα απορροφάται από τα «εξωτερικά-ψυχρά» άτομα με αποτέλεσμα την ελάττωση στην ισχύ του παραγόμενου σήματος. Αντίστοιχα στο κάτω άκρο της καμπύλης παρατηρείται απόκλιση λόγω ιονισμού. Δηλαδή ένας μικρός αριθμός ατόμων K ιονίζεται και συνεπώς ο αριθμός των ατόμων που είναι διαθέσιμα για διέγερση ελαττώνεται.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-27. Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό του K με φλογοφωτομετρία και φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης

Στη φλογοφωτομετρία και ΦΑΑ χρησιμοποιείται αρκετά συχνά η τεχνική του εσωτερικού προτύπου (βλ. κεφ. 2.8).

Η ΦΑΑ έχει χρησιμοποιηθεί:

Στον προσδιορισμό μετάλλων, όπως Cu, Zn και Mg σε μπύρες και κρασιά[96,97] με απ' ευθείας ανάλυση των αλκοολούχων δειγμάτων, των δε Fe και Pb κατόπιν εκχύλισής των υπό μορφή χηλικών συμπλόκων με οργανικούς διαλύτες· του Ag σε κρασί[98] σε συγκέντρωση 0.003 ppm· στον προσδιορισμό των μετάλλων Na, K, Ca, Mg και των ιχνοστοιχείων Cu, Zn, Mn και σε χυμούς φρούτων απ' ευθείας[99] ή κατόπιν όξινης υδρόλυσης[100]· στον προσδιορισμό των μετάλλων Cu και Fe σε λιπαρές ύλες [101,102] λόγω της προφανούς επίδρασης των μετάλλων αυτών στην οξείδωση των λιπών και λαδιών· επίσης των μετάλλων Ni και Va, καταλυτών της υδρογόνωσης λαδιών για τη παραγωγή μαγειρικών λιπών, με υγρή καύση ή αποτέφρωση[103,104] του Pb στο ελαιόλαδο[105] κονσερβοποιημένου τόννου.

Στον προσδιορισμό των μετάλλων Na, K, Fe, Pb και Cu σε δημητριακά, αλεύρι[106] και ζυμαρικά[107]· των στοιχείων Na, K, Ca και Mg απ' ευθείας σε γάλα[108] και των ιχνοστοιχείων Fe, Zn, Cu και Mn σε ποικιλία τυριών[109]· σειράς μετάλλων σε βούτυρο και μαργαρίνη[110].

Στον προσδιορισμό σειράς μετάλλων σε νωπά κρέατα και νωπά ή κατεργασμένα φρούτα[111] κατόπιν υδρόλυσης με HCl, Hg σε νωπά[112] ή κατεψυγμένα[113] ψάρια κατόπιν αποτέφρωσης.

Στον προσδιόρισμό οργανομεταλλικών καταλοίπων όπως τα μυκητοκτόνα[114],

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κατόπιν όξινης υδρόλυσης που ελευθερώνει το χλωριούχο άλας των μετάλλων (Zn, Fe, Mg) και απ' ευθείας, στη συνέχεια, προσδιορισμού αυτού. Στον έμμεσο προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων σε σέλινο και φράουλες[115,116] κατόπιν προσθήκης διαλύματος Fehling και παραλαβής του μη αναχθέντος ποσού Cu, σαν Cu_2O. Με σταθμικό προσδιορισμό του Cu_2O προκύπτει το ποσόν των αναγόντων σακχάρων (βλ. αναγωγικές μέθοδοι προσδιορισμού σακχάρων κεφ. 14).

Τέλος στον προσδιορισμό των τοξικών μετάλλων Cd, Pd, Cu κ.ο.κ. σε ίχνη, με τη μέθοδο του φούρνου γραφίτη σε προϊόντα[117] όπως τυριά, μαργαρίνες, ψωμί, πατάτες, αυγά, ρύζι κ.τ.λ.

Η φλογοφωτομετρία έχει χρησιμοποιηθεί:

Στον προσδιορισμό K και Na σε κρασιά και άλλα αλκοολούχα ποτά[118,119], σε μήλα[120] και άλλα φρούτα[121,122] σε λαχανικά[123], σε προϊόντα κρέατος[124], σε αλεύρι και ψωμί[125], ζαχαρότευτλα[126] και αποστάγματα[118,119]. Στον ταυτόχρονο προσδιορισμό K, Na και Ca σε χυμούς πορτοκαλιού και λεμονιού[127] σε πλήρες γάλα και γάλα σκόνη[128]· στον προσδιορισμό Ca, Mg και K σε κονσέρβες τομάτες και τοματοχυμού[129] που αποτελεί ένδειξη προσθήκης Ca στα προϊόντα αυτά. Στον ταυτόχρονο προσδιορισμό Ca/Sr και Ca/P σε γάλα[130,131] και ραδιενεργού στροντίου σε γάλα[132], όπου η τεχνική απομόνωσης του μετάλλου παίζει σημαντικότατο ρόλο· στον προσδιορισμό K σε τσάι[133,134], Na/K σε ζωικά λίπη[135] (λαρδί), που αποτελεί ένδειξη κατεργασίας με άλκαλι και τέλος στον έμμεσο προσδιορισμό συστατικών όπως πηκτίνης[116] σε χυμούς φρούτων κατόπιν προσδιορισμού του Ca στο περιεχόμενο πηκτινικό ασβέστιο το οποίο καταβυθίζεται κατόπιν προσθήκης διαλύματος ασβεστίου στο κατεργασμένο προϊόν.

3.6. Φασματοφωτομετρία μαζών (Mass Spectrometry)

Η φασματοφωτομετρία μαζών είναι μια σύγχρονη τεχνική ανάλυσης ουσιών που στηρίζεται στη μετατροπή του δείγματος σε θετικά φορτισμένα ιόντα και στον εν συνεχεία διαχωρισμό αυτών ανάλογα με το πηλίκον m/e (μάζα/φορτίο) τους. Ο όρος φασματοφωτομετρία είναι μάλλον ατυχής γιατί κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής δεν λαμβάνει χώρα ούτε απορρόφηση ούτε εκπομπή ακτινοβολίας.

Α. Θεωρία

Το δείγμα, σε αέρια κατάσταση βομβαρδίζεται από ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια που προκαλούν τον ιονισμό των μορίων του:

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$$

Πολλά από τα ιονιζόμενα μόρια αποκτούν τέτοια ενέργεια ώστε κατόπιν διάσπασης να σχηματίζουν ιόντα χαμηλότερης μάζας, γνωστά σαν θραύσματα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ιόντων, καθώς επίσης ουδέτερα μόρια:

$$M^+ \rightarrow M_1^+ + M_2$$
$$M^+ \rightarrow M_3^+ + M_4$$
$$M_1^+ \rightarrow M_5^+ + M_6$$

Μια και το προφίλ θραύσης είναι χαρακτηριστικό για κάθε μόριο, το λαμβανόμενο φάσμα μαζών αποτελεί «δακτυλικό αποτύπωμα» της κάθε ουσίας. Για το λόγο αυτό η φασματοφωτομετρία μάζας αποτελεί ανεκτίμητο εργαλείο στην ταυτοποίηση των οργανικών ουσιών.

Στο φασματογράφο μαζών τα παραγόμενα ιόντα επιταχύνονται στο εσωτερικό ηλεκτρικού πεδίου και στη συνέχεια αποκλίνουν από την αρχική τους πορεία υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου. Κατά τη διάρκεια της επιτάχυνσής τους, τα ιόντα αποκτούν ενέργεια, Ε, ίση προς:

$$E = eV \qquad (3.30)$$

όπου: e = φορτίο ιόντος

V = δυναμικό ηλεκτρικού πεδίου

Επειδή η ενέργεια Ε, ισούται με τη κινητική ενέργεια των ιόντων η (3.30) γράφεται:

$$eV = 1/2\ mv^2 \qquad (3.31)$$

όπου: m = μάζα ιόντος

v = ταχύτητα ιόντος

Καθώς τα ιόντα εισέρχονται στο εσωτερικό του μαγνητικού πεδίου, διαγράφοντα κυκλική πορεία (σχ. 3-28) η ασκούμενη πάνω τους από το πεδίο δύναμη Fc ισούται:

$$Fc = Hev \qquad (3.32)$$

όπου: H = ισχύς μαγνητικού πεδίου

Η δύναμη αυτή εξουδετερώνεται από την φυγόκεντρο δύναμη κάθε ιόντος, άρα:

$$Hev = mv^2/r \qquad (3.33)$$

όπου: r = η ακτίνα της κυκλικής πορείας που ακολουθεί το ιόν.

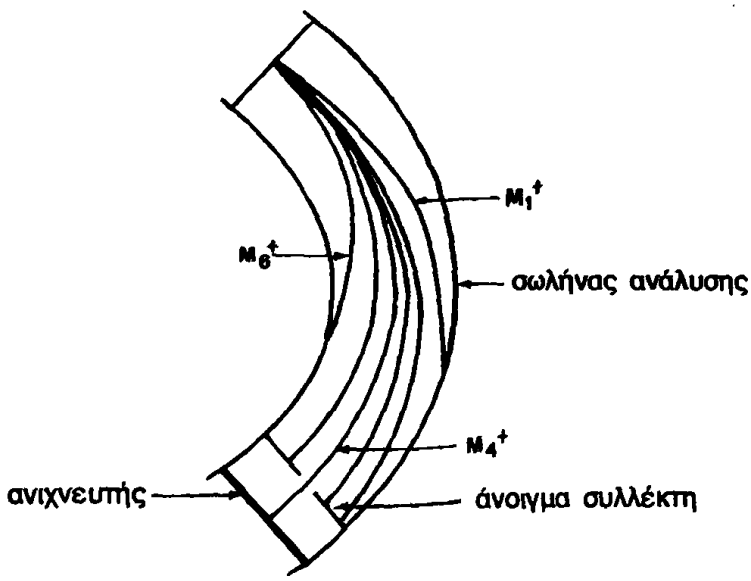
Από τις εξισώσεις (3.31) και (3.33) προκύπτει:

$$m/e = H^2r^2/2V \qquad (3.34)$$

Η (3.34), είναι η θεμελιώδης εξίσωση της φασματοφωτομετρίας μαζών.

Η εξίσωση (3.33) δηλώνει ότι ιόν με χαρακτηριστικό πηλίκον m/e, υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου σταθερής ισχύος και σταθερού ηλεκτρικού δυναμικού θα ακολουθήσει κυκλική πορεία ακτίνας r. Επειδή το κάθε ιόν έχει διαφορετική μάζα θα διαγράψει και διαφορετική πορεία. Έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των διαφόρων ιόντων-θραυσμάτων που φθάνουν χωριστά στον ανιχνευτή.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-28. Σχηματική παράσταση διαφοροποίησης της πορείας των ιόντων στον μαγνητικό αναλυτή του φασματογράφου μαζών

Β. Οργανολογία

Στο σχήμα 3-29 δίνονται τα στοιχεία που αποτελούν τον φασματογράφο μαζών

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. Θάλαμος ιονισμού - επιταχυντής
3. Αναλυτής μαζών - μαγνήτης
4. Ανιχνευτής - συλλέκτης ιόντων
5. Καταγραφέας.

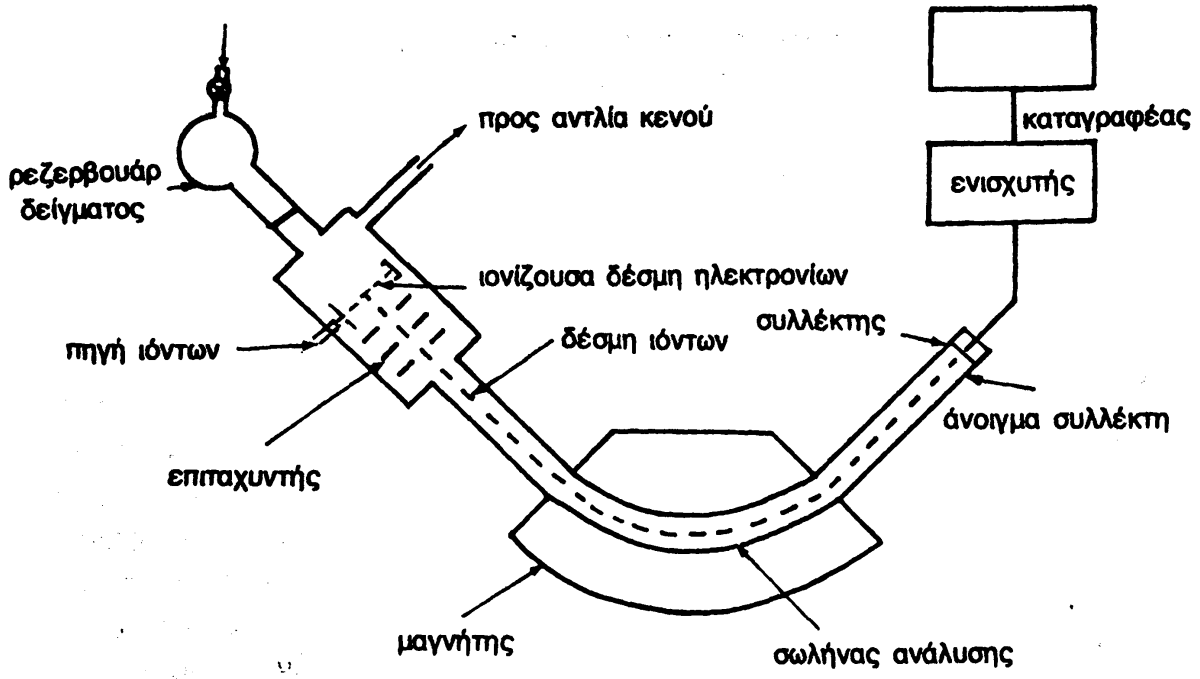
Το δείγμα εισάγεται είτε σαν αέριο ή μετατρέπεται σε αέριο με θέρμανση και στη συνέχεια προωθείται στο θάλαμο ιονισμού όπου με τη βοήθεια της πηγής ιονισμού μετατρέπεται σε ιόντα. Στον αναλυτή τα ιόντα αυτά χωρίζονται σε δέσμες ανάλογα με την τιμή του πηλίκου m/e, ενώ στον ανιχνευτή γίνεται η ανίχνευση κάθε ιόντος ηλεκτρονικά. Χαρακτηριστικό φάσμα μαζών για το τολουόλιο φαίνεται στο σχήμα 3-30.

Η μέθοδος είναι καταστρεπτική για το δείγμα, αλλά απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα του τελευταίου, της τάξης των 100-200ng προκειμένου περί στερεού ή του 1 μl προκειμένου περί υγρού.

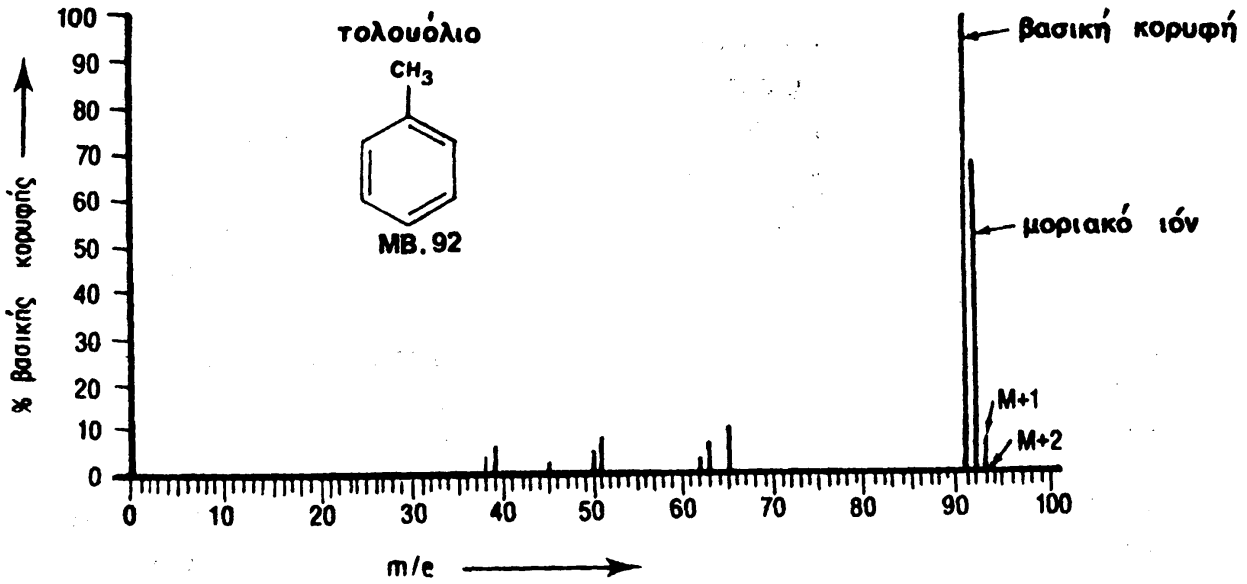
Οι φασματογράφοι μαζών μπορούν να καταταγούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή μαζών που χρησιμοποιούν. Ανάλογα δηλαδή με τον τρόπο που διαχωρίζουν τα φορτισμένα ιόντα.

(Ι) Όργανα μαγνητικής απόκλισης (magnetic deflection). Αυτά με τη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 3-29. Φασματογράφος μαζών απλής εστίασης



Σχ. 3-30. Φάσμα μαζών για το τολουόλιο

σειρά τους διακρίνονται σε: (α) απλής εστίασης, φέροντα μόνο μαγνητικό πεδίο. Τα όργανα αυτά είναι χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας, και (β) διπλής εστίασης, φέροντα ηλεκτρικό πεδίο πριν από το αντίστοιχο μαγνητικό. Τα όργανα αυτά είναι υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.

(ΙΙ) Όργανα χρόνου πτήσης (time of flight)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(III) Όργανα τετραπολικού αναλυτή (quadrupole)

Για τον καθορισμό του είδους της διαχωριστικής ικανότητας ενός οργάνου, υψηλής ή χαμηλής, ας υποτεθούν δύο γειτονικές κορυφές ίσης έντασης (ύψους) στο φάσμα μαζών. Η διαχωριστική ικανότητα (R) θα δίνεται από τη σχέση:

$$R = M/\Delta M \qquad (3.35)$$

όπου: M = η μεγαλύτερη των δύο μαζών που αντιστοιχούν στις δύο κορυφές.

ΔM = η διαφορά στον αριθμό μάζας των δύο κορυφών.

Σαν χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας ορίζονται τα όργανα που διακρίνουν ιόντα με m/e ≤ 2000 [R = 2000/2000-1999 = 2000], ενώ σαν υψηλής διαχωριστικής ικανότητας εκείνα που διακρίνουν ιόντα με m/e μέχρι 10,000-15,000. [R = 10,000 – 15.000], π.χ. ένα όργανο υψηλής διαχωριστικής ικανότητας με R = 10,000 μπορεί να διαχωρίσει ιόν με μάζα 500.00 από άλλο ιόν με μάζα 499.95 δηλ. R = 500/0.05 = 10,000. Το είδος αυτό των οργάνων είναι πολύ ακριβό και γιαυτό τα εργαστήρια και οι βιομηχανίες προτιμούν τα χαμηλής διαχωριστικής ικανότητας όργανα που και κατά πολύ φτηνότερα είναι και παρέχουν αρκετή ακρίβεια για τις περισσότερες εφαρμογές.

1. Σύστημα εισαγωγής (sample handling inlet system)

Αποτελείται από διάταξη εισαγωγής του δείγματος που φέρει: (i) μικρομανόμετρο για την ένδειξη της ακριβούς ποσότητας του δείγματος που εισάγεται, (ii) όργανο που ρυθμίζει την παροχή του δείγματος στο θάλαμο ιονισμού (ειδικό ροόμετρο) και (iii) σύστημα άντλησης για την επίτευξη κενού. Για τα αέρια η προσθήκη του δείγματος γίνεται με αεροστεγή σύριγγα ή με τη βοήθεια ειδικού ρεζερβουάρ που μέσω του συστήματος εισαγωγής φθάνει στο θάλαμο ιονισμού. Για υγρά η προσθήκη του δείγματος γίνεται συνήθως με μικροσύριγγα υγρού. Για την περίπτωση ολιγότερο πτητικών ουσιών χρησιμοποιείται θερμαινόμενο σύστημα εισαγωγής. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος κυμαίνεται μεταξύ 180 και 300^0 C.

2. Θάλαμος ιονισμού-επιταχυντής (ionization chamber -accelerator)

Το ρεύμα του αερίου δείγματος από το σύστημα εισαγωγής εισέρχεται στο θάλαμο ιονισμού που λειτουργεί σε πίεση 10^{-6} 10^{-5} torr.

Εκεί βομβαρδίζεται υπό ορθή γωνία με ηλεκτρονική ακτινοβολία που εκπέμπει πυρακτωμένο σύρμα από βολφράμιο (hot filament). Τα θετικά φορτισμένα ιόντα του τύπου $[A - B]^+$ που προκύπτουν κατά την γενική αντίδραση:

$$A\text{-}B + e^- \rightarrow [A\text{-}B]^+ + 2e^-$$

ωθούνται προς το *σύστημα επιταχυντού* που λειτουργεί με τάση E = 1000 V. Υπάρχει και η περίπτωση σχηματισμού αρνητικών ιόντων του τύπου $[A\text{-}B]^-$ που σχηματίζονται κατά την αντίδραση:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$$A\text{-}B + e^- \rightarrow [A\text{-}B]^-$$

αλλά η αναλογία θετικών προς αρνητικά ιόντα έχει δειχτεί πώς είναι 10^4:1 για τα περισσότερα οργανικά μόρια.

3. Αναλυτής μαζών-Μαγνήτης (analyzer tube-magnet)

Τα θετικά φορτισμένα ιόντα που ήδη έχουν αποκτήσει υψηλή επιτάχυνση, εισέρχονται με μεγάλη ταχύτητα στον αναλυτή που αποτελείται από μεταλλικό σωλήνα κεκαμένο κατά 180^0 (σχ. 3-29). Ο αναλυτής λειτουργεί υπό κενό 10^{-7} - 10^{-8} torr και βρίσκεται μέσα σε σταθερό μαγνητικό πεδίο που δημιουργεί ηλεκτρομαγνήτης. Υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου τα ιόντα ανάλογα με το πηλίκον m/e και τα όσα αναπτύχθηκαν ήδη στη θεωρία εστιάζονται διαφορετικά μέσα στον σωλήνα του αναλυτή. Έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των σχηματισθέντων ιόντων με βάση τη μάζα τους.

4. Συλλέκτης ιόντων (Ion collector)

Είναι ηλεκτρόδιο στο οποίο συλλέγονται τα ήδη διαχωρισμένα ιόντα. Έτσι δημιουργείται ένα ηλεκτρικό σήμα που μέσω του ενισχυτή φτάνει στον καταγραφέα.

5. Καταγραφέας

Ο καταγραφέας μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα σε μηχανική κίνηση γραφίδας η οποία αποτυπώνει το φάσμα μαζών της ουσίας. Για το τολουόλιο το φάσμα μαζών φαίνεται στο σχήμα 3-30 και τον Πίνακα 3.5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5

Κυριότερα θραύσματα ιόντων και ισοτόπων του τολουολίου

m/e	Σχετική % ένταση ως προς τη βασική κορυφή	
38	4.4	
39	5.3	
45	3.9	
50	6.3	
51	9.1	
62	4.1	
63	8.6	
65	11	
91	100	(βασική κορυφή)
92	68	(μητρική κορυφή ή κορυφή μοριακού ιόντος, M)
93	4.9	(M+1)
94	0.21	(M+z)

Κορυφές ισοτόπων

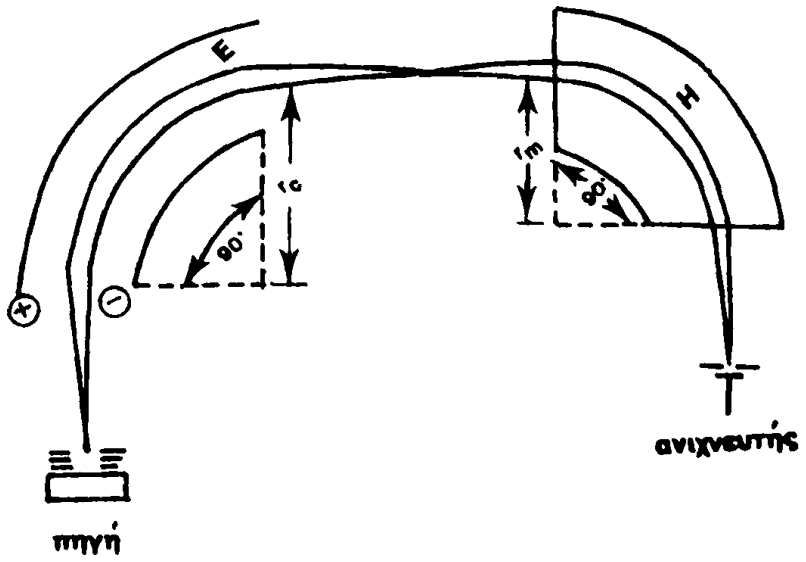
m/e	% M
92 (M)	100
93 (M+1)	7.23
94 (M+2)	0.29

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Όπως φαίνεται στο σχ. 3-30 η γραφική παράσταση του m/e συναρτήσει της % έντασης των κορυφών δίνει το φάσμα μαζών μιας χημικής ουσίας. Η πιο έντονη κορυφή σ' ένα φάσμα μαζών καλείται βασική κορυφή (base peak) και βαθμολογείται αυθαίρετα με 100 στην κλίμακα της έντασης (ύψος × παράγοντα ευαισθησίας). Οι υπόλοιπες κορυφές του φάσματος βαθμολογούνται σε σχέση πάντα με τη βασική κορυφή. Το ιόν που παράγεται αν από το μόριο της ουσίας αποσπασθεί ένα ηλεκτρόνιο καλείται Μοριακό ιόν (molecular ion) και έχει ιδιαίτερη σημασία γιατί δίνει το μοριακό βάρος της ουσίας.Σε ορισμένες περιπτώσεις οι δύο κορυφές (βασική και μοριακού ιόντος) μπορεί να ταυτίζονται. Στις οργανικές ουσίες εξαιτίας της μικρής αλλά παρατηρήσιμης παρουσίας του ^{13}C και ^{2}H, υπάρχει συνήθως μια μικρή κορυφή με μάζα κατά μια μονάδα μεγαλύτερη από την κορυφή μοριακού ιόντος (η M + 1 κορυφή). Τέλος αν δύο βαριά ισότοπα τυχαίνει να βρίσκονται στο ίδιο μόριο, υπάρχει μια ακόμη μικρότερη κορυφή με μάζα κατά δύο μονάδες μεγαλύτερη από την κορυφή μοριακού ιόντος (η M+2 κορυφή). Οι κορυφές αυτές ισοτόπων (πίνακ. 3.5) υποβοηθούν σημαντικά στον προσδιορισμό του μοριακού τύπου μιας ουσίας (βλ. παράδειγμα παρακάτω).

Ο φασματογράφος μαζών συνήθως σαρώνει την περιοχή μαζών από 0-500 και καταγράφει όλες τις ενδιάμεσες γραμμές - κορυφές.

Στα όργανα διπλής εστίασης η παρεμβολή ενός ηλεκτρικού πεδίου πριν από το μαγνητικό πεδίο του οργάνου απλής εστίασης επιτρέπει τη βελτίωση κατά 3 ή και 4 δεκαδικά ψηφία διαχωριστικής ικανότητας του φασματογράφου. Ένα τέτοιο όργανο φαίνεται στο σχήμα 3-31.



Σχ. 3-31. Μαγνητικός αναλυτής διπλής εστίασης (Nier Johnson) E= ηλεκτρικό πεδίο, H= μαγνητικό πεδίο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

II. Ανάλυση με όργανα χρόνου πτήσης

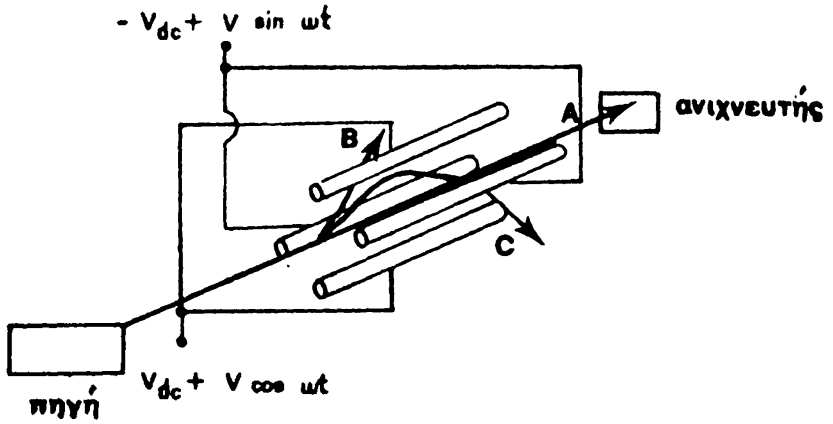
Για την κατανόηση της αρχής λειτουργίας των οργάνων αυτών δίνεται το εξής παράδειγμα. Έστω σύνολο σωματιδίων που τη χρονική στιγμή t_0 βρίσκονται σε ηλεκτρικό πεδίο και επιταχύνονται. Κάθε ιόν έχει κινητική ενέργεια που δίνεται από τη σχέση (3.31). Για ιόντα που διανύουν απόσταση (d) μεταξύ πηγής ιόντων και ανιχνευτή, ο χρόνος πτήσης τους (t) θα ισούται:

$$t = d/v = d/\left(\frac{1}{2V}\right)^{1/2}\left(\frac{m}{e}\right)^{1/2} \qquad (3.35)$$

Συνεπώς ο χρόνος πτήσης τους είναι συνάρτηση του πηλίκου m/e. Για V = 1000 volt, ο χρόνος διαχωρισμού δύο ιόντων με $m_1/e = 300$ και $m_2/e = 301$ είναι της τάξης των sec x 10^{-9}.

III. Όργανα τετραπολικού αναλυτή

Ο τύπος αυτός αναλυτή μαζών αποτελείται από τέσσερις ηλεκτροφόρες ράβδους, όπως φαίνεται στο σχήμα 3-32.



Σχ. 3-32. Τετραπολικός αναλυτής. Το ιόν Α λόγω ορισμένης τιμής m/e ανιχνεύεται.

Ανά δύο διαγωνίως οι ράβδοι αυτές διατηρούνται σε δυναμικό + Vdc και -Vdc αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονα ένας παλμογράφος ραδιοσυχνοτήτων τροφοδοτεί το πρώτο ζεύγος με κάποια ραδιοσυχνότητα (rf) σε φάση και το δεύτερο ζεύγος με ραδιοσυχνότητα εκτός φάσης κατά 180^0. Τα φορτισμένα ιόντα εισερχόμενα στον τετραπολικό αναλυτή προσκρούουν στα εσωτερικά του τοιχώματα. Για δοσμένη τιμή dc/rf αποδεικνύεται πως μόνο τα ιόντα με ορισμένη τιμή m/e μπορούν να διέλθουν μέσω του αναλυτή και να ανιχνευτούν. Το φάσμα λαμβάνεται με καθορισμένη και ταυτόχρονη μεταβολή των δυναμικών dc και της ραδιοσυχνότητας rf, έτσι ώστε το πηλίκον dc/rf να παραμένει σταθερό.

Γ. Φάσμα μαζών - Ερμηνεία - Ποιοτική ανάλυση

Κατά τη διάρκεια του βομβαρδισμού των μορίων μιας ουσίας μέσα στο θάλαμο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ιονισμού, το απλούστερο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η απόσταση ενός ηλεκτρονίου από τα μόρια της ουσίας στην αέρια φάση, προς σχηματισμό του μοριακού ιόντος.

π.χ. $CH_3OH + e^- \rightarrow CH_3OH^+ + 2e^-$

m/e = 32

Συνήθως το μοριακό ιόν αποικοδομείται μέσα σε 10^{-10} - 10^{-13} sec, για να δώσει ένα θετικό φορτισμένο θραύσμα και μια ρίζα.

π.χ.

$CH_3OH^+ \rightarrow CH_2OH^+ + H.$, m/e = 31

$CH_3OH^+ \rightarrow CH_3^+ + OH.$, m/e = 15

$CH_2OH^+ \rightarrow CHO^+ + H_2$, m/e = 29

Το φάσμα μαζών μιας ουσίας είναι συνεπώς το σύνολο των μαζών - θραυσμάτων (θετικά φορτισμένων ιόντων) που προκύπτουν από τη θραύση των μορίων της ουσίας σε συνάρτηση με τη σχετική παρουσία (αφθονία) του καθενός.

Προσδιορισμός μοριακού τύπου ένωσης από το φάσμα μαζών αυτής

Ο ακριβής προσδιορισμός του μοριακού τύπου μιας ένωσης επιτυγχάνεται μόνο με το φασματογράφο μαζών διπλής εστίασης με τον οποίο μπορεί να γίνει πλήρης διαφοροποίηση μεταξύ π.χ. των ενώσεων CO, N_2, CH_2N και C_2H_4 που όλες έχουν το αυτό Μ.Β. = 28. Αυτό γίνεται δυνατό με ακριβή ανάλυση των ισοτόπων στοιχείων της καθεμιάς ένωσης, δηλ. οι μάζες των παραπάνω στοιχείων είναι:

^{12}C = 12.000	$^{14}N_2$ =28.0062	^{12}C = 12.000	$^{12}C_2$ = 24.0000
^{16}O = 15.9949		$^{1}H_2$ = 2.0156	$^{1}H_4$ = 4.0312
		^{14}N = 14.0031	
27.9949	28.0062	28.0187	28.0312

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ:

Έστω ότι ελήφθη το φάσμα με:

m/e	% αφθονία θραυσμάτων - ισοτόπων
150 (M)	100
151 (M+1)	10.2
152 (M+2)	0.88

Η κορυφή μοριακού ιόντος έχει m/e = 150, που ισούται με το Μ.Β. της αναλυόμενης ουσίας. Από τον Πίνακα 3.6 φαίνεται πως αν υπήρχε στο μόριο S,Cl ή Br, θα υπήρχε σημαντική συνεισφορά του ιόντος (M+2) οφειλόμενη στα αντίστοιχα ισότοπα στοιχεία αυτών. Ακόμη η παρουσία στοιχείων όπως P,F και I

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

μπορεί να διαφανεί από την χαρακτηριστική μικρή κορυφή του ιόντος (M+1), συγκριτικά με την αντίστοιχη κορυφή του ιόντος M.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6

Ισότοπα στοιχείων

στοιχείο		αφθονία	
άνθρακας	^{12}C 100	^{13}C 1.08	
υδρογόνο	^{1}H 100	^{2}H 00.16	
άζωτο	^{14}N 100	^{15}N 0.38	
φθόριο	^{19}F 100	^{17}O 0.04	^{18}O 0.20
πυρίτιο	^{28}Si 100	^{29}Si 5.10	^{30}Si 3.35
φώσφορος	^{31}P 100		
θείο	^{32}S 100	^{33}S 0.78	^{34}S 4.40
χλώριο	^{35}Cl 100	^{37}Cl 32.5	
βρώμιο	^{79}Br 100	^{81}Br 98.0	
ιώδιο	^{127}I 100		

Για παρουσία μόνο των στοιχείων C,H,O,N,P,F και I σε μια ένωση οι αναμενόμενες % (M+1) και % (M+2) τιμές μπορούν να υπολογιστούν από τους τύπους:

$$\%(M+1) = 100\left[\frac{I(M+1)}{I(M)}\right] \cong 1.1 \times N^{o}_{\underline{o}}\ C + 0.36\ N^{o}_{\underline{o}}\ N \qquad (3.36)$$

$$\%(M+2) = 100\left[\frac{I(M+2)}{I(M)}\right] \cong \frac{(1.1 N^{o}_{\underline{o}} C)^2}{200} + 0.20\ N^{o}_{\underline{o}}\ O \qquad (3.37)$$

όπου I(M), I(M+1) και I(M+2) είναι η ένταση των κορυφών M, (M+1) και (M+2) αντίστοιχα.

Με εφαρμογή των (3.36) και (3.37) για τα δεδομένα της συγκεκριμένης ουσίας λαμβάνεται:

$10.2 = 1.1 \times N^{o}_{\underline{o}}\ C + 0.36\ N^{o}_{\underline{o}}\ N$

και $0.88 = \frac{(1.1\ N^{o}_{\underline{o}}\ C)^2}{200} + 0.20 \times N^{o}_{\underline{o}}\ O$

για N = 0 → C = 9 → O = 2	9×12+2×16+10×1 = 150
για N = 2 → C = 8 → O = 2	8×12+2×16+2×14 = 156 > 150
για N = 4 → C = 8 → O = 2	8×12+2×16+4×14 = 196 >150

άρα ο μοριακός τύπος της αναλυόμενης ουσίας είναι $C_9H_{10}O$

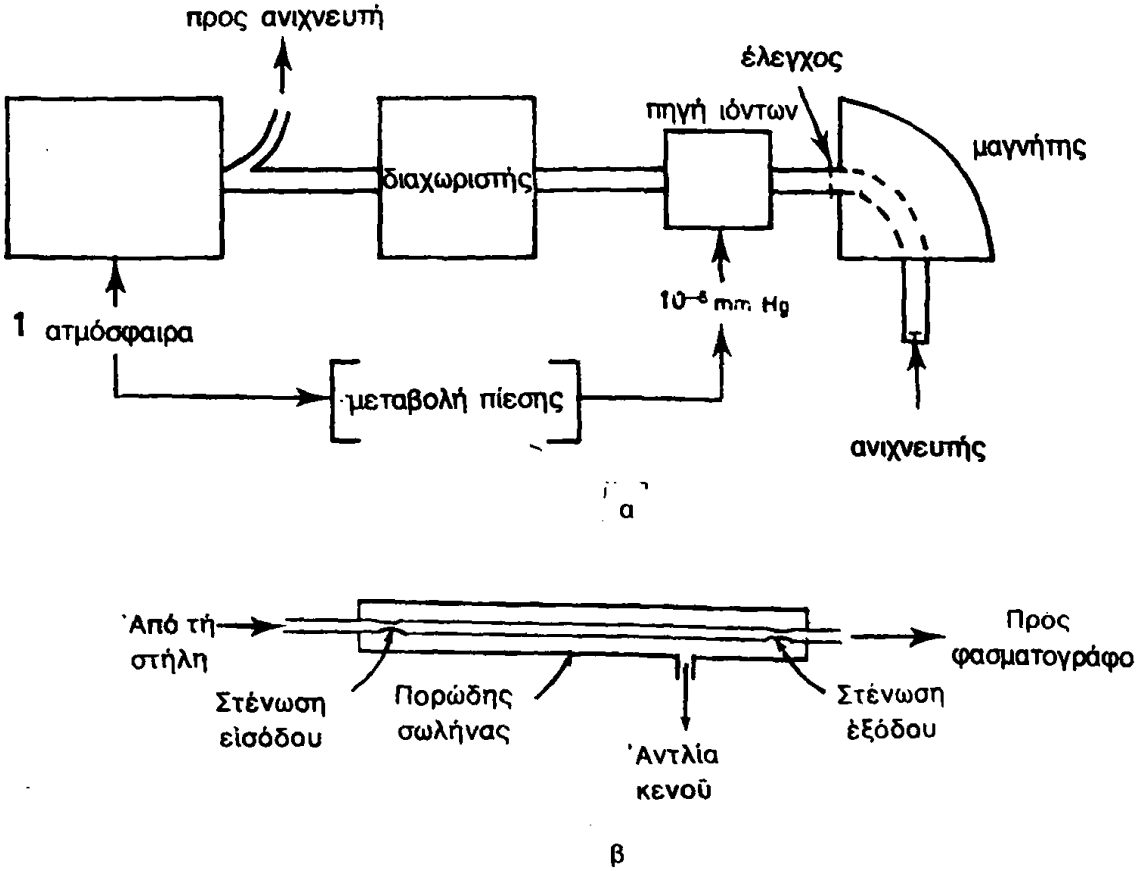
Για τον αριθμό ατόμων N ισχύει ο εξής κανόνας:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Για άρτιο Μ.Β. το μόριο περιέχει άρτιο αριθμό ατόμων Ν και για περιττό Μ.Β. το μόριο περιέχει περιττό ή 0 αριθμό ατόμων Ν. Προφανώς η ταυτοποίηση μιας οργανικής ένωσης από το φάσμα μαζών της δεν εξαντλείται με όσα αναφέρθηκαν εδώ. Κρίθηκε εν τούτοις πως η πλήρης θεωρία ταυτοποίησης εκφεύγει του σκοπού του βιβλίου αυτού.

Δ. Συνδυασμός αερίου χρωματογραφίας - Φασματογραφίας μαζών

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα ο συνδυασμός αερίου χρωματογράφου με φασματογράφο μαζών. (σχ. 3-33α)



Σχ. 3-33. (α) Σύνδεση αερίου χρωματογράφου/φασματογράφου μαζών (β) διαχωριστής μορίων (τύπος πορώδους σωλήνα).

Μετά την εκλουσή της, από τη στήλη του αερίου χρωματογράφου, η κάθε ουσία μέσω του διαχωριστή (interphase separator) εισέρχεται στο θάλαμο ιονισμού του φασματογράφου μαζών, όπου σύμφωνα με τα προηγούμενα γίνεται η πλήρης ταυτοποίησή της. Εννοείται πώς ο χρόνος σάρωσης στο φασματογράφο μαζών είναι αρκετά γρήγορος, ώστε να επιτυγχάνεται η λήψη του φάσματος μαζών της καθεμιάς από τις εκλουόμενες στον χρωματογράφο ουσίας. Ο διαχωριστής επιτελεί την εξής λειτουργία: Κάθε ουσία εκλουόμενη συνοδεύεται από πολύ μεγάλη ποσότητα φέροντος αερίου (He). Ο διαχωρι-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στής (σχημ. 3-33β) του δείγματος λόγω της ειδικής κατασκευής του από πορώδες γυαλί, και με τη βοήθεια αντλίας κενού απομακρύνει το φέρον αέριο με πολύ μεγαλύτερη ταχύτητα απ' ότι το δείγμα πριν αυτό εισέλθει στο θάλαμο ιονισμού. Έτσι επέρχεται εμπλουτισμός της οργανικής ουσίας που πρόκειται να ταυτοποιηθεί.

Ε. Εφαρμογές

Κατ' αρχήν θα πρέπει το τονιστεί ότι η φασματοσκοπία μαζών χρησιμοποιείται κυρίως για ποιοτική παρά για ποσοτική ανάλυση. Ο δεύτερος σκοπός επιτυγχάνεται πολύ εύκολα με τη χρήση του συνδυασμού φασματογράφου μαζών/αερίου χρωματογράφου που προηγουμένως περιγράφηκε.

Η κύρια εφαρμογή της φασματοσκοπίας μαζών/αέριας χρωματογραφίας στα τρόφιμα είναι στον προσδιορισμό της γεύσης και οσμής (flavor) που έχουν ή αναπτύσσουν τα περισσότερα απ' αυτά κατά τη διάρκεια των διαφόρων κατεργασιών που υφίστανται.

Το άρωμα των τροφίμων είναι σχεδόν πάντοτε πολύπλοκο μίγμα πτητικών οργανικών ενώσεων όπως εστέρες, αλκοόλες, καρβονυλικές ενώσεις, ετεροκυκλικές ενώσεις περιέχουσες N, S, κ.ά. (βλ. κεφ. 20.3).

Ο συνδυασμός των τεχνικών της GC/MS έχει χρησιμοποιηθεί: Στον προσδιορισμό σειράς πτητικών προϊόντων (δικετόνες, δ-λακτόνες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, πυρρόλιο, θειοφαίνιο) σε νωπό και θερμασμένο γάλα[136]· στον προσδιορισμό πτητικών συστατικών (εστέρες, οξέα, α,β-πινένιο, βενζαλδεύδη,σεσκιτερπένια) σε whisky[137,138], ούζο[139] και κρασί[140]· πτητικών συστατικών (ακετόνη, προπανάλη, εξανάλη και πεντανάλη) σε βρασμένο ρύζι και προϊόντα του καλαμποκιού[141]· αρωματικών συστατικών σε βρώσιμα φυτικής προέλευσης λάδια[142]· αρωματικών συστατικών (2-πεντανόνη, ακεταλδεύδη, οξικός αιθυλεστέρας, 2-πεντανόλη, αιθυλβουτυλεστέρας) φρούτων, όπως μπανάνας[143], μήλου[144]· των αιθερίων ελαίων της φράουλας[145] και του πορτοκαλιού[146], αχλαδιών[147], γκρεϊπφρούτ[148]. Στον προσδιορισμό των αρωματικών συστατικών (τολουόλιο, ξυλόλιο, τερπένια, 2 εξενάλη, φουρφουράλη), του καφέ, τσαγιού και κακάου[149]· ενδιάμεσων προϊόντων της αντίδρασης Maillard που δίνει χαρακτηριστικό χρώμα και γεύση κατά την αμαύρωση του φυτικού ιστού[150]· αλκοολών στο βούτυρο του κακάου[151]· ανεπιθύμητων οσμών (γεοσμίνη, 5-OH-CH_3 φουρφουράλη, παράγωγα της φουρανόνης, 2,3-πεντανοδιόνη, επτάνιο) σε ψάρια[152], κρέας[153,154], χυμούς[155], μπύρα[156], κ.ά. Ακόμα στον προσδιορισμό τοξικών ουσιών που επιμολύνουν τα τρόφιμα κατά την παραγωγή π.χ. εντομοκτόνα[157] ή την συσκευασία π.χ. μονομερή[158] (βινυλοχλωρίδιο) ή κατάλοιπα διαλυτών[159](τολουόλιο, μεθυλο-αιθυλοκετόνη). Στο σχήμα 3-34 και πίνακα 3-7 δίνονται αντίστοιχα το φάσμα μαζών και τα μοριακά θραύσματα για

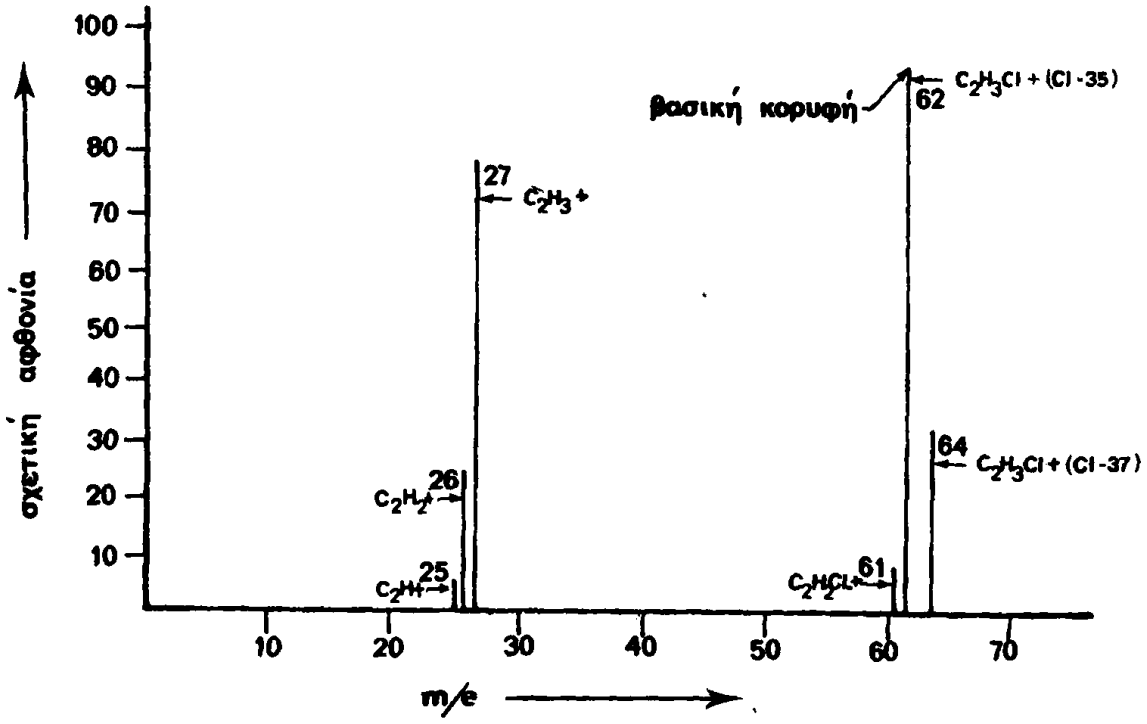
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

το βινυλοχλωρίδιο που ανιχνεύτηκε σε λάδι συσκευασμένο σε πλαστική φιάλη από πολυβινυλοχλωρίδιο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7

Δεδομένα φάσματος μαζών του βινυλοχλωριδίου

m/e	σχετική αφθονία (%)	Ιόντα
25	5.7	$C_2H^+(CH{=}C^+)$
26	22	$C_2H_2^+$ $(CH_2{=}C^+)$
27	77	$C_2H_3^+$ $(CH_2 = CH^+)$
61	8.7	C_2H_2Cl $(CH_2{=}CCl)$
62	100	C_2H_3Cl $(CH_2{=}CHCl)$ Cl-35
64	31	$C_2H_3Cl^+(CH_2 = CHCl^+)$ Cl-37



Σχ. 3-34. Φάσμα μαζών του βινυλοχλωριδίου

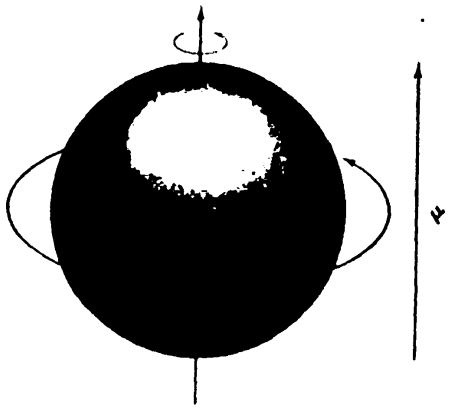
3.7. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance)

Α. Εισαγωγή

Είναι ουσιαστικά μια άλλη μορφή φασματοφωτομετρίας απορρόφησης, όπως η αντίστοιχη UV και IR. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες, ένα δείγμα μπορεί να

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

απορροφήσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία* στην περιοχή του φάσματος που αντιστοιχεί στα ραδιοκύματα. Η απορρόφηση αυτή είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων ορισμένων πυρήνων του μορίου που αναλύεται. Στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό καταγράφονται μεταπτώσεις μαγνητικών πυρήνων μεταξύ ορισμένων ενεργειακών σταθμών, όταν οι μαγνητικοί αυτοί πυρήνες βρίσκονται υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Η καταγραφή επιτυγχάνεται με μέτρηση των συχνοτήτων (ή ποσοτήτων ενέργειας) που απορροφούμενες από τους πυρήνες προκαλούν τις παραπάνω μεταπτώσεις. Είναι γνωστό πως όλοι οι πυρήνες φέρουν φορτίο. Η περιστροφή ενός πρωτονίου γύρω από τον άξονά του (σχ. 3-35) δημιουργεί μαγνητικό πεδίο μαγνητικής ροπής (magnetic moment), κατά μήκος του άξονα αυτού. Η αυτοστροφή ή spin (I), μέτρο της αναπτυσσόμενης γωνιακής στροφορμής (angular momentum) του πρωτονίου μπορεί να πάρει τις τιμές 0, 1/2, 1, 3/2 κ.ο.κ. Τιμή π.χ. I=0 σημαίνει ότι δεν υπάρχει spin στον πυρήνα. Σ' έναν πυρήνα που περιέχει πρωτόνια και νετρόνια το spin I είναι το αλγεβρικό άθροισμα του spin των επί μέρους σωματιδίων. Αν το άθροισμα των πρωτονίων και νετρονίων είναι άρτιος αριθμός το συνολικό spin παίρνει τιμές (0, 1, 2,



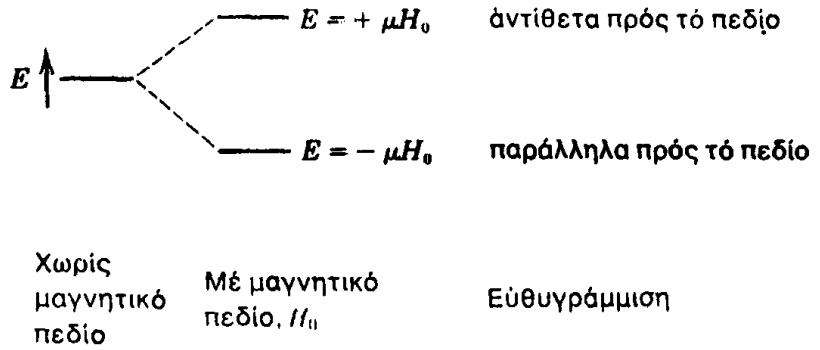
Σχ. 3-35. Δημιουργία μαγνητικού πεδίου ροπής μ, με περιστροφή του φορτίου στον πυρήνα

3,....). Αν πάλι είναι περιττός αριθμός το spin παίρνει τιμές (1/2, 3/2, 5/2). Τέλος αν ο αριθμός των νετρονίων και των πρωτονίων είναι άρτιος τότε το I = 0. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα ^{12}C και ^{16}O και δεν δίνουν σήμα NMR. Πυρήνες όπως (^{1}H, ^{19}F, ^{13}C, και ^{31}P) έχουν I = 1/2 και παρουσιάζουν σφαιρική κατανομή του ηλεκτρικού τους φορτίου (σχ. 3-35). Πυρήνες με I ⩾ 1 π.χ. ^{2}H και ^{14}N παρουσιάζουν μη σφαιρική κατανομή φορτίου πράγμα που μεταβάλλει τη συμπεριφορά τους σε σχέση με γειτονικούς πυρήνες. Ο αριθμός spin (I)

* Συγκριτικά αναφέρονται τα ποσά ενέργειας που απορροφούμενα προκαλούν ηλεκτρονικές (240 KJ/mol), δονητικές (12KJ/mol), περιστροφικές (0.12 KJ/mol) και πυρηνικές μαγνητικές (1.2 x 10^{-5}KJ/mol) μεταπτώσεις.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

καθορίζει τον αριθμό των πιθανών προσανατολισμών του πυρήνα υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου σύμφωνα με τον τύπο: 2I+1. Εφαρμογή του τύπου αυτού για τα ισότοπα στοιχεία ^{1}H, ^{19}F, ^{13}C και ^{31}P που έχουν I = 1/2 δίνει 2 δυνατούς προσανατολισμούς (σχ. 3-36)) Έναν παράλληλο με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και ένα αντιπαράλληλο. Ο πρώτος προσανατολισμός αντιστοιχεί σε κατάσταση χαμηλής ενέργειας (μεγάλης σταθερότητας) ενώ ο δεύτερος σε κατάσταση υψηλής ενέργειας (μικρής σταθερότητας).



Σχ. 3-36. Καταστάσεις αυτοστροφής πρωτονίου με την επίδραση μαγνητικού πεδίου

Οι τιμές των δύο αυτών ενεργειακών σταθμών είναι συνάρτηση αφ' ενός μεν της τιμής της μαγνητικής ροπής (μ) που δημιουργεί η περιστροφή των πρωτονίων, αφ' ετέρου δε της ισχύος του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Είναι τώρα δυνατόν προσφερόμενου κάποιου ποσού Ενεργείας (E= hν) να επιτευχθεί μετάπτωση από την κατάσταση χαμηλής ενέργειας προς την αντίστοιχη υψηλής ενέργειας υπό την επίδραση πάντα εξωτερικού μαγνητικού πεδίου ισχύος Ho. Η σχέση της συχνότητας (ν) της προσφερόμενης ενέργειας προς την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου δίνεται από τον τύπο:

$$\nu = \gamma Ho/2\pi \qquad (3.38)$$

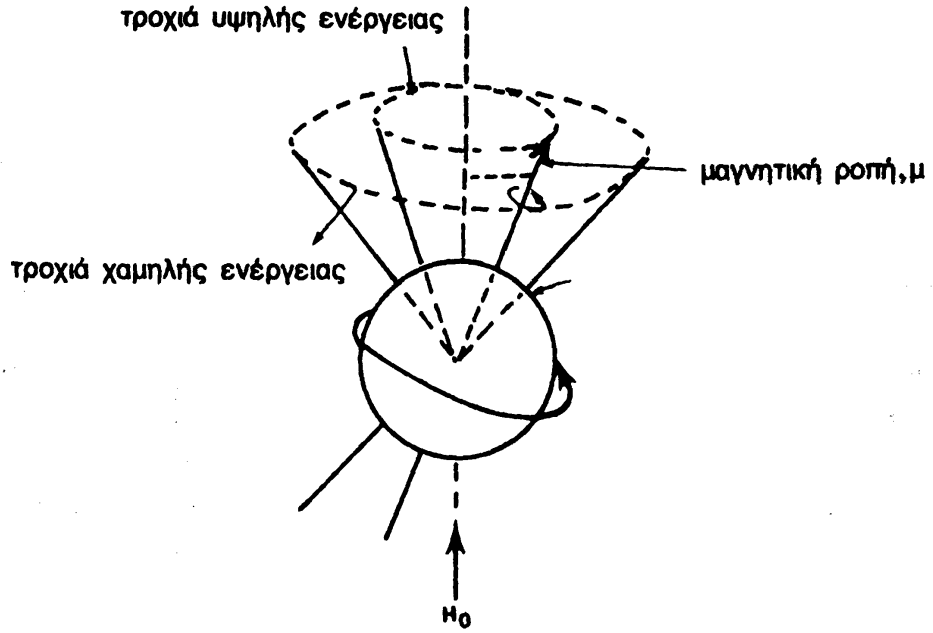
όπου γ = γυρομαγνητικός λόγος, χαρακτηριστική ιδιότητα κάθε πυρήνα.
Είναι δε: $\gamma = 2\pi\mu/hI$ (3.39) ή με συνδυασμό των (3.38) και (3.39)

$$\rightarrow \nu = 2\pi\mu Ho/hI2\pi = \mu Ho/hI \qquad (3.40)$$

Οι εξισώσεις (3.38) και (3.40) είναι οι θεμελιώδεις εξισώσεις για το NMR γιατί ορίζουν την συνθήκη συντονισμού του πυρήνα. Πριν προχωρήσει κανείς στην περιγραφή της οργανολογίας, με την οποία επιτυγχάνονται οι παραπάνω μεταπτώσεις, πρέπει να θεωρήσει την ιδιότυπη συμπεριφορά ενός μαγνήτη που περιστρέφεται μέσα σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο: Δηλαδή ο άξονας του περιστρεφόμενου πρωτονίου (μαγνήτη) θα μετατοπιστεί ως προς την κατεύθυνση του εξωτερικού πεδίου και θα κινηθεί κατά την τροχιά που

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

διαγράφει περιστρεφόμενη «σβούρα» υπό την επίδραση της βαρύτητας (σχ. 3-37). Οι δύο προηγουμένως αναφερθείσες ενεργειακές στάθμες αντιστοιχούν στις δύο διαφορετικές τροχιές του σχημ. 3-37.



Σχ. 3-37. Τροχιές περιστρεφομένου πρωτονίου σε πεδίο, Η.

Οι παραπάνω μεταπτώσεις όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως απαιτούν ενέργεια της τάξης των 10^{-6} Kcal/mol, που αντιστοιχεί σε συχνότητα της τάξης των 60 MHz με ισχύ εξωτερικού πεδίου της τάξης των 14,100 Gauss. Για ισχύ πεδίου 23,500 Gauss απαιτείται συχνότητα 100 MHz.
Με προσφορά συνεπώς, ενέργειας στην περιοχή των ραδιοκυμάτων οι πυρήνες ορισμένων ατόμων όπως το Η διεγείρονται απορροφώντας ενέργεια. Το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας μετρείται σ' έναν ανιχνευτή και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης NMR.

Β. Οργανολογία

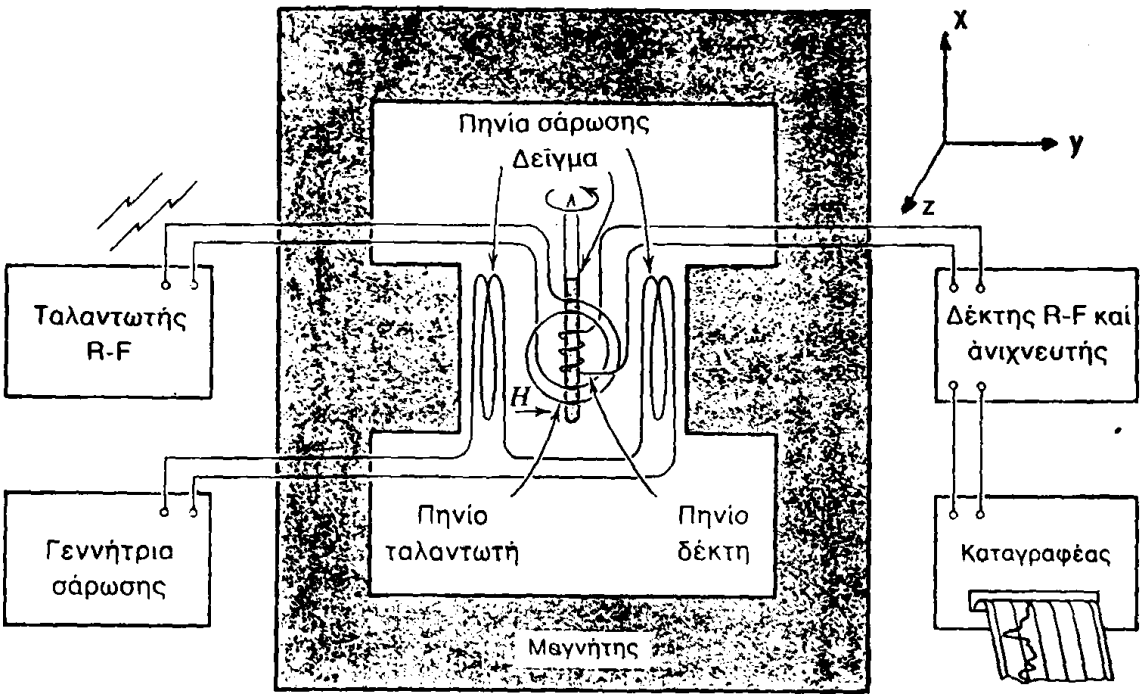
Το φασματοφωτόμετρο NMR, απλή διάταξη του οποίου φαίνεται στο σχήμα 3-38, αποτελείται από τα εξής βασικά στοιχεία:

1. Μαγνήτη
2. Πηγή ραδιοσυχνοτήτων
3. Ανιχνευτή ραδιοσυχνοτήτων
4. Καταγραφέα - Παλμογράφο

Συνολικά στη φασματοφωτομετρία NMR απαιτούνται τρία πεδία κάθετα ανά δύο μεταξύ τους όπως φαίνεται στο σχήμα 3-38.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το πρώτο που εφαρμόζεται κατά τον άξονα Χ είναι το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο που θα προκαλέσει την ελλειψοειδή κίνηση του πυρήνα. Το δεύτερο που εφαρμόζεται κατά τον άξονα Ζ είναι το πεδίο των εναλλασσόμενων ραδιοσυχνοτήτων (R-F oscillator). Το πεδίο αυτό έχει σκοπό να παράγει



Σχ. 3-38. Σχηματικό διάγραμμα φασματόμετρου n.m.r.

συχνότητες όμοιες με τις αντίστοιχες του περιστρεφόμενου πυρήνα έτσι ώστε να επιτευχθεί η μετάπτωση από την τροχιά χαμηλής στην τροχιά υψηλής ενέργειας. Το τρίτο επίπεδο που εφαρμόζεται κατά τον άξονα Υ είναι εκείνο που «μετράει» τον αριθμό των πρωτονίων που μεταπήδησαν από την τροχιά χαμηλής στην τροχιά υψηλής ενέργειας, αφού ξεχωρήσει το σήμα που αρχικά εκπέμπεται από την πηγή ραδιοσυχνοτήτων. Ο ανιχνευτής ραδιοσυχνοτήτων (R-F receiver and detector) αποτελείται από πηνίο στα άκρα του οποίου δημιουργείται κάποια τάση όταν ακριβώς παρατηρηθεί η παραπάνω μετάπτωση των πυρήνων. Η μικρή αυτή τάση ενισχύεται και το σήμα καταγράφεται στον καταγραφέα-παλμογράφο.

Αντίστροφα απώλεια της ενέργειας που απορροφήθηκε από τους πυρήνες έχει σαν αποτέλεσμα την επιστροφή τους στην κατάσταση χαμηλής ενέργειας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή σαν «πορεία επαναφοράς» (relaxation process) και επιτυγχάνεται είτε με μεταβίβαση της ενέργειας σε γειτονικούς πυρήνες (επαναφορά spin-spin) είτε με μεταβίβαση στο περιβάλλον σαν θερμική ενέργεια (επαναφορά spin-πλέγματος, spin-lattice relaxation). Ακο-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

λουθεί εκ νέου διέγερση των πυρήνων από την κατάσταση χαμηλού spin στην κατάσταση υψηλού spin, κατόπιν απορρόφησης ενέργειας κ.ο.κ.
Για τη λήψη του φάσματος NMR μπορεί θεωρητικά είτε να μεταβληθεί η συχνότητα της πηγής ραδιοκυμάτων διατηρούμενης σταθερής της ισχύος του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου είτε να μεταβληθεί η ισχύς του πεδίου διατηρουμένης σταθερής της συχνότητας ραδιοκυμάτων.
Στην πράξη εφαρμόζεται δεύτερη τεχνική με τη χρήση γεννήτριας σάρωσης (sweep generator). Το φάσμα που θα ληφθεί στον καταγραφέα θα είναι η γραφική παράσταση του ηλεκτρικού σήματος που φτάνει στον ανιχνευτή συναρτήσει της ισχύος του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.
Το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που διεγείρονται.
Για υγρές ουσίες χρησιμοποιείται όγκος δείγματος που κυμαίνεται από 0.01-0.5 ml. Για στερεές ουσίες συνήθως διαλύονται 50 mg ουσίας σε 0.3 ml περίπου διαλύτη. Συνήθως δοκιμάζονται οι διαλύτες τετραχλωράνθρακας ή διθειάνθρακας γιατί δεν εισάγουν παρεμποδίσεις λόγω απουσίας Η. Στη συνέχεια δοκιμάζονται δευτεριωμένοι διαλύτες με το νερό σαν τελευταία επιλογή. Το δείγμα τοποθετείται σε γυάλινους σωλήνες μικρής διαμέτρου (~ 5 mm διαμ.).
Συνήθως στο σωλήνα με το δείγμα τοποθετείται γνωστή ουσία σαν εσωτερικό πρότυπο που συνήθως είναι το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Τέλος εφαρμόζεται περιστροφή του σωλήνα με το δείγμα μέσα στο μαγνητικό πεδίο πράγμα που εξουδετερώνει τις τυχόν ανομοιογένειες του πεδίου κατά τον άξονα Χ.

Γ. Προστασία πυρήνων Υδρογόνου

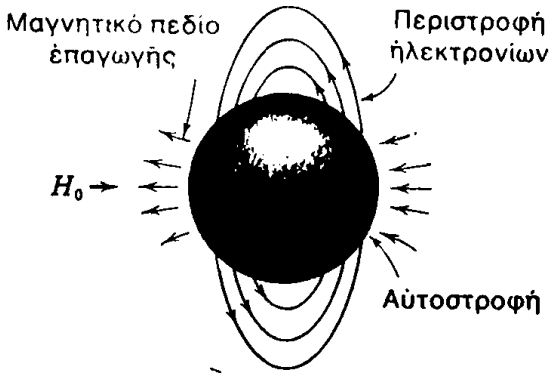
Εάν όλοι οι πυρήνες του υδρογόνου απορροφούσαν ενέργεια της αυτής συχνότητας κάτω από την ίδια τιμή ισχύος μαγνητικού πεδίου τότε η φασματοσκοπία NMR θα χρησίμευε μόνο για ποσοτική ανάλυση των πρωτονίων. Στη πράξη αποδεικνύεται πως η ισχύς του πεδίου που απαιτείται για την απορρόφηση ενέργειας από δοσμένο πρωτόνιο εξαρτάται από το άμεσο περιβάλλον του πρωτονίου, και συνεπώς με διαφοροποίηση του κάθε Η ανάλογα με τη μοριακή δομή στο άμεσο περιβάλλον του επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση ουσιών.
Το εξωτερικό πεδίο προκαλεί τη ροή ηλεκτρονίων γύρω από το πρωτόνιο σε επίπεδο κάθετο προς το εξωτερικό πεδίο, Ηο (σχ. 3-39). Με τη σειρά του το περιστρεφόμενο φορτίο δημιουργεί μαγνητικό πεδίο εξ επαγωγής, Ηεπ που είναι συνήθως αντίθετης φοράς ως προς το εξωτερικό πεδίο. Τα περιστρεφόμενα ηλεκτρόνια «προστατεύουν» (shielding effect) το πρωτόνιο από την επίδραση του εξωτερικού πεδίου αν τα δύο πεδία είναι αντίρροπα ενώ το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

«ενισχύουν» (dishielding effect) αν τα πεδία είναι ομόρροπα.
Αποτέλεσμα είναι ότι κάθε πρωτόνιο υφίσταται την επίδραση «συνολικού» πεδίου που ισούται:

$$H_{συν} = H_{εξωτ.} - H_{επαγ.} \quad (3.41)$$

Ο βαθμός προστασίας ενός πυρήνα θα εξαρτάται συνεπώς από την ηλεκτρονική πυκνότητα που περιβάλλει τον συγκεκριμένο πυρήνα.
Για παράδειγμα τα πρωτόνια στο CH_3I «προστατεύονται» περισσότερο από τα πρωτόνια του μεθυλίου της CH_3OH επειδή η ηλεκτραρνητικότητα του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη εκείνης του I. Το οξυγόνο απομακρύνει με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα τα ηλεκτρόνια απ' ότι το ιώδιο και συνεπώς ελαττώνει περισσότερο την ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από το CH_3.



Σχ. 3-39. Η επαγόμενη περιστροφή των ηλεκτρονίων δημιουργεί ένα τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετο προς το H_0. (Διαμαγνητική θωράκιση).

Δ. Χαμηλή μετατόπιση

Επειδή ο βαθμός προστασίας του πρωτονίου, όπως ελέχθει εξαρτάται από το χημικό του περιβάλλον, οι τιμές ισχύος του εξωτερικού πεδίου που αντιστοιχούν στην απορρόφηση ενέργειας από τα διάφορα πρωτόνια εμφανίζονται «χημικά μετατοπισμένες» (chemical shifting) σε σχέση με αντίστοιχες κάποιου πρότυπου του οποίου η δομή δεν επιτρέπει την εμφάνιση του φαινομένου της μετατόπισης. Το πρότυπο αυτό είναι, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα το τετραμεθυλσιλάνιο [$(CH_3)_4.Si$] ή TMS.
Μια και όλα τα πρωτόνια στο TMS είναι ισοδύναμα, το μόριο εμφανίζει απορρόφηση σε μία μόνο συχνότητα και μια και το Si είναι πολύ λιγότερο ηλεκτραρνητικό από τα άτομα που απαντούν στις οργανικές ενώσεις (O, N, P, S, X, C) πολύ λίγοι πυρήνες H απορροφούν στη συχνότητα που απορροφά το TMS. Γιαυτό η κορυφή του TMS βρίσκεται στο δεξί άκρο του φάσματος πράγμα που το καθιστά εύχρηστη πρότυπη ουσία.
Μ' άλλα λόγια η χημική μετατόπιση ενός συγκεκριμένου πυρήνα H είναι η διαφορά μεταξύ της ισχύος του πεδίου στην οποία το πρωτόνιο αυτό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΠΑΤΡΩΝ

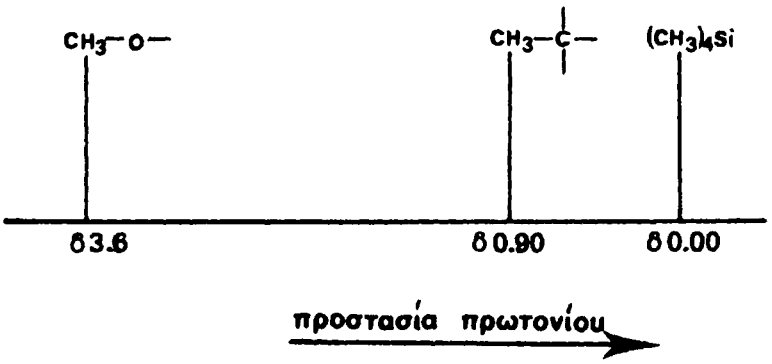
απορροφά και της ισχύος του πεδίου στην οποία απορροφούν τα πρωτόνια του TMS. Για τη μέτρηση της χημικής μετατόπισης χρησιμοποιείται η κλίμακα ΔΕΛΤΑ (δ) όπου:

$$\delta = \frac{\text{παρατηρηθείσα μετατόπιση (Hz)} \times 10^6}{\text{ραδιοσυχνότητα φασματογράφου (Hz)}} \quad \text{(ppm)} \qquad (3.42)$$

Παλαιότερα χρησιμοποιήθηκε η κλίμακα (τ). Οι μονάδες τ μετατρέπονται σε μονάδες δ με τη σχέση:

$$\delta = 10 - \tau \qquad (3.43)$$

Στο σχήμα 3-40 φαίνεται καθαρά το φαινόμενο της χημικής μετατόπισης για τρεις διαφορετικές μεθυλομάδες.



Σχ. 3-40. Χημική μετατόπιση πρωτονίων μεθυλίων συνδεμένων σε διαφορετικά ετεροάτομα.

Τα πρωτόνια της μεθυλομάδας του CH_3O– είναι λιγότερο προστατευμένα στην απώλεια ηλεκτρονίων από τα πρωτόνια της CH_3-C- και αυτά με τη σειρά τους λιγότερο προστατευμένα από τα πρωτόνια της CH_3-Si. Οι περισσότεροι πυρήνες Η απορροφούν σε τιμές $\delta > 0.5$ και $\delta < 12$. (Πίνακα 3.8)
Η χημική μετατόπιση πρωτονίων στις αλκοόλες (–O–H) βρίσκεται στη περιοχή τιμών δ μεταξύ 5-0.5. Η συγκεκριμένη τιμή εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας και οφείλεται στο σχηματισμό υδρογονοδεσμών ενώ ελαττώνεται με την αραίωση του διαλύματος. Πρωτόνια συνδεμένα με άζωτο και θείο μπορούν επίσης να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου και συνεπώς οι τιμές χημικής μετατόπισής τους εξαρτώνται από τη συγκέντρωση αλλά σε μικρότερο βαθμό απ' ότι εκείνα που συνδέονται με το οξυγόνο.

Δ. Σύζευξη spin-spin

Έστω πρωτόνιο Hb που βρίσκεται σε κατάσταση συντονισμού σε ορισμένη ισχύ εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (Ho) και εμφανίζει απλή κορυφή σε ορισμένη τιμή δ (σχ. 3.41α). Αν σε γειτονικό άτομο άνθρακα σε σχέση προς το Hb προστεθεί ένα δεύτερο πρωτόνιο Ha, τότε το πρωτόνιο Hb θα δεχθεί πλήν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

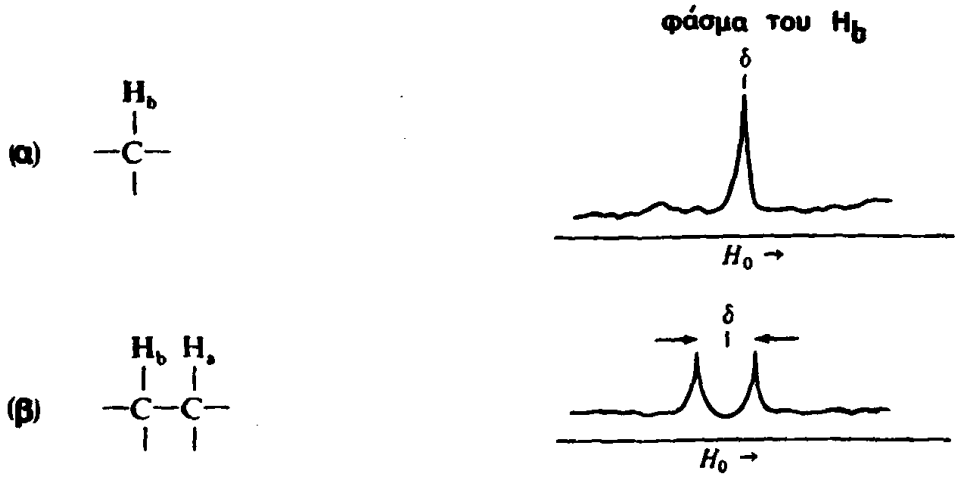
ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8

Παραδείγματα τιμών χημικής μετατόπισης πρωτονίων άμεσα συνδεμένων με άτομα

πρωτόνιο	χημική μετατόπιση, δ.	πρωτόνιο	χημική μετατόπιση, δ.
		αλειφατ. αλκοολ.	
$Si(CH_3)_4$	0.000	-O-H	0.5 (H, μονομερικό)
CH_4	0.22	-O-H	5.0-0.5 (H, υδρογονο-δεσμού)
CH_3-C-	0.95-0.85		
		αλκυλαμιν.	
$-CH_2-$	1.35-1.20	H	
-CH-	1.6-1.4	-N-H	1.6-0.6 (σε άπειρη αραίωση)
CH_3-C-x^a	1.9-1.2	-N-H	0.5-0.3 (σε άπειρη αραίωση)
		αλειφατ. θειολ.	
$CH_3 - x^a$	5.0-2.8	-S-H-	1.7-1.3 (σε άπειρη αραίωση)

x^a = F. Cl. Br, I, OH, OR, OAr, N.

του Ho και την επίδραση του πεδίου του οφειλόμενου στο Ha. Το πεδίο του Ha ανάλογα με το αν είναι παράλληλο ή αντιπαράλληλο προς το εξωτερικό πεδίο Ho, θα αυξήσει ή θα ελαττώσει το συνολικό πεδίο που δέχεται το πρωτόνιο Hb. Συνεπώς η κορυφή συντονισμού του Hb, θα μετατοπίζεται προς τα αριστερά ή προς τα δεξιά σύμφωνα με τον προσανατολισμό του πεδίου του Hb. Επειδή σ' ένα δείγμα υπάρχει τεράστιος αριθμός πρωτονίων Ha και Hb, υποτίθεται πως η κατανομή μεταξύ των δύο προσανατολισμών είναι συσιαστι-



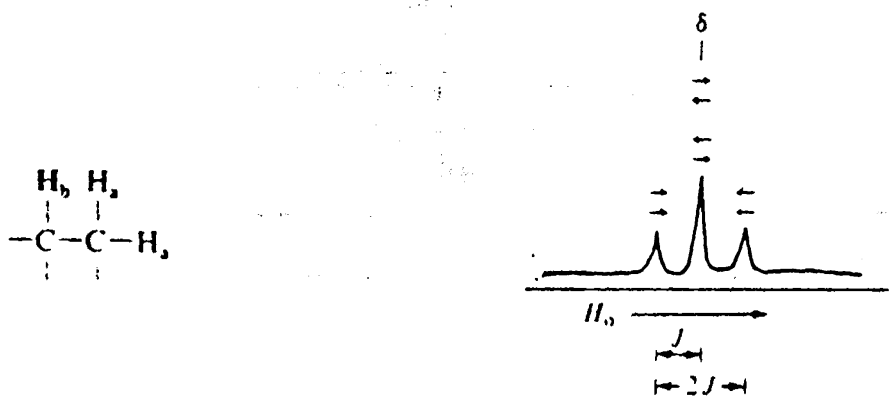
Σχ. 3-41. Σύζευξη spin-spin του Hb (α) απουσία γειτονικών πρωτονίων και (β) παρουσία ενός γειτονικού πρωτονίου, Ha.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κά ίδια. Έτσι παρατηρούνται και οι δύο μετατοπίσεις σαν μία διπλή κορυφή (σχ. 3.41β).

Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα της σύζευξης των γειτονικών πρωτονίων (spin-spin coupling) και οφείλεται στην μετακίνηση ασύζευκτων δεσμικών ηλεκτρονίων κατά μήκος των δεσμών. Μέτρο του διαχωρισμού των δύο απλών/μιας διπλής κορυφής αποτελεί η σταθερά σύζευξης (coupling constent, J) η οποία μετρείται σε Hertz. Η σταθερά σύζευξης παίρνει την τιμή Ο αν τα Hb και Ha απέχουν μεταξύ τους κατά τρεις ή περισσότερους δεσμούς.

Αν τώρα στο άμεσο περιβάλλον του Hb βρίσκονται δύο ισοδύναμα πρωτόνια Ha (σχ. 3.42) τότε υπάρχουν 4 δυνατοί συνδυασμοί spin από τα δύο γειτονικά Ha τιου επιδρούν στο Hb: (1) και τα δύο παράλληλα προς το Ho (2) ένα παράλληλο και ένα αντιπαράλληλο (3) ένα αντιπαράλληλο και ένα παράλληλο και (4) και τα δύο αντιπαράλληλα. Επειδή οι συνδυασμοί (2) και (3) είναι μη διακρίσιμοι μεταξύ τους στο φάσμα ο συντονισμός θα εμφανισθεί σαν τριπλή κορυφή με αναλογία εμβαδών 1:2: 1 (ή μεσαία κορυφή θα έχει εμβαδόν διπλάσιο από τις άλλες δύο επειδή αντιστοιχεί στους δύο ισοδύναμους συνδυασμούς (2) και (3).



Σχ. 3-42. Σύζευξη spin-spin του Hb με 2 Ha

Κατά τον ίδιο τρόπο αποδεικνύεται ότι αν στο άμεσο περιβάλλον του Hb υπάρχουν 3 ισοδύναμα Ha, το φάσμα του Hb θα δείξει τετραπλή κορυφή με λόγο εμβαδών 1:3:3:1.

Από τα παραπάνω προκύπτει ο κανόνας: Αν πρωτόνιο (Hb) έχει ισοδύναμα πρωτόνια (Ha) σε γειτονικά άτομα C, το φάσμα του θα δώσει κορυφή (n+1) πολλαπλότητας.

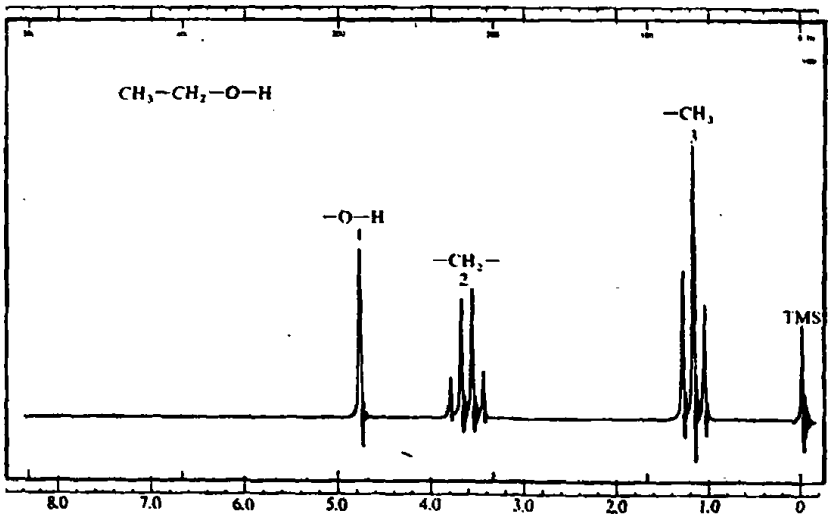
Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται ή πολλαπλότητα στις περιπτώσεις που η χημική μετατόπιση έχει τιμή πολύ διαφορετική από τη σταθερά σύζευξης. Αν οι δύο παραπάνω τιμές πλησιάζουν η μία την άλλη τότε ο προσδιορισμός της πολλαπλότητας γίνεται πολυπλοκώτερος. Ο βαθμός πολλαπλότητας των

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

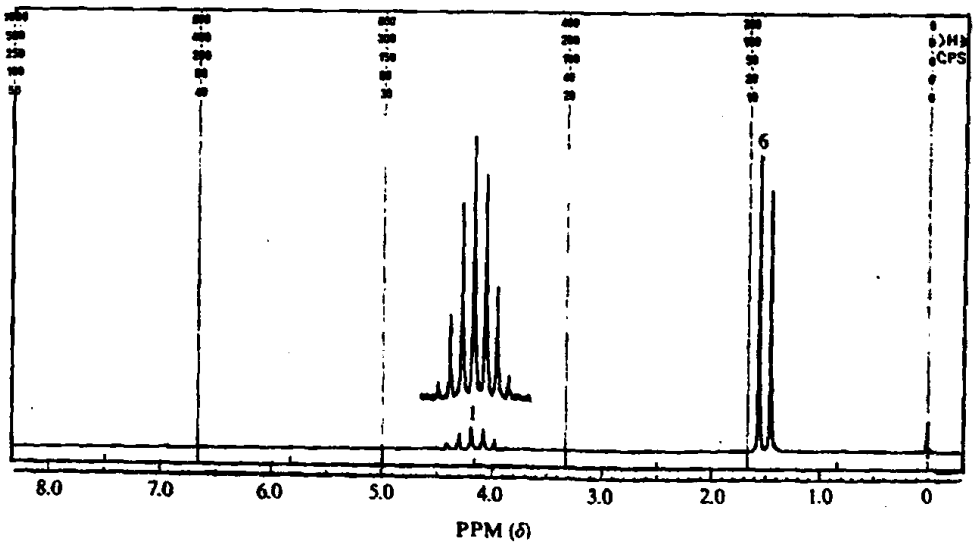
λαμβανομένων κορυφών είναι ανεξάρτητος της ισχύος του εξωτερικού πεδίου. Είναι συνάρτηση της απόστασης και του είδους των γειτονικών, ως προς δοσμένο, πρωτονίων.
Ισοδύναμα καλούνται τα πρωτόνια που «βλέπουν» το ίδιο περιβάλλον π.χ. το μεθάνιο έχει 4 ισοδύναμα πρωτόνια, το αιθάνιο έχει 6.

Ε. Ερμηνεία φάσματος NMR.

Μια και οι πυρήνες των ατόμων σε διαφορετικές ενώσεις βρίσκονται συνήθως σε διαφορετικά μαγνητικά περιβάλλοντα θα απαιτούν διαφορετική ισχύ



(α)



(β)

Σχ. 3-43. Φάσμα NMR αιθανόλης (α) και χλωροπροπανίου (β)

εξωτερικού πεδίου για να επιτύχουν το συντονισμό για δοσμένη συχνότητα

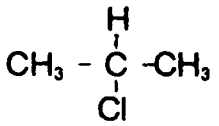
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

της πηγής ραδιοκυμάτων. Για το λόγο αυτό το φάσμα NMR αποτελεί δακτυλικό αποτύπωμα κάθε μορίου. Χαρακτηριστικό φάσμα για την αιθανόλη δίνεται στο σχήμα 3-43α.

Στο δεξί άκρο του φάσματος εμφανίζεται η κορυφή του προτύπου TMS σε δ=0.0. Σε δ=1.2 εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή, σε δ=3.6 μια τετραπλή και σε δ=4.8 μια απλή. Σύμφωνα με τον κανόνα της πολλαπλότητας στο μεθύλιο θα αντιστοιχεί (2+1) = 3, τριπλή κορυφή (δ=1.2) στο μεθυλένιο (3+1) = 4, τετραπλή κορυφή (δ=3.6) και στο υδρογόνο του υδροξυλίου (0+1) = 1, απλή κορυφή (δ=4.8). Με σύνδεση του φασματογράφου NMR προς ολοκληρωτή παρατηρείται πως το σχετικό εμβαδόν της απλής κορυφής (δ 4.8) είναι 1, της τετραπλής (δ 3.6) είναι 2 και της τριπλής (δ 1.2) είναι 3 όσα δηλ. και τα υδρογόνα στην αντίστοιχη ομάδα. Σύζευξη του –OH με το $-CH_2$ δεν παρατηρείται.

Αυτό συμβαίνει επειδή το πρωτονίο του O έχει μεγάλη κινητικότητα και δεν εντοπίζεται για όσο χρονικό διάστημα απαιτείται για να παρατηρηθεί σύζευξη.

Εστω δοσμένη ένωση: το 2-χλωροπροπάνιο. Ζητείται να προβλεφθεί το φάσμα NMR για την ουσία αυτή.



Προφανώς στην ένωση υπάρχουν δύο είδη πρωτονίων, 6 ισοδύναμα πρωτόνια των CH_3 και 1 πρωτόνιο του C_2. Το φάσμα συνεπώς θα αποτελείται από δυο ομάδες κορυφών: αυτές των πρωτονίων των μεθυλίων με εμβδόν 6 (δ=1.5) και πολλαπλότητα (1+1) (διπλή κορυφή) και αυτές του πρωτονίου του C_2 με εμβαδόν 1 (δ=4.0) και πολλαπλότητα (6+1)=7(επταπλή κορυφή). Βάσει των παραπάνω αναγνωρίζεται εύκολα το φάσμα του 2-χλωροπροπανίου στο Σχ. 3-3β.

Η ερμηνεία των φασμάτων NMR δεν εξαντλείται στα δύο αυτά παραδείγματα. Εντούτοις η πλήρης κάλυψη της αντίστοιχης θεωρίας ξεφεύγει του σκοπού του βιβλίου αυτού. Συμπερασματικά το φάσμα NMR μιας ουσίας δίνει τριών ειδών πληροφορίες:

(1) η χημική μετατόπιση μιας πολλαπλής κορυφής δίνει πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον του εξεταζόμενου πρωτονίου.

(2) το εμβαδόν κάθε κορυφής δίνει τον αριθμό των πρωτονίων σε κάθε ομάδα και

(3) η πολλαπλότητα δίνει τον αριθμό των γειτονικών, προς το εξεταζόμενο, πρωτονίων.

ΣΤ. Τεχνικές NMR

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

1. Τεχνική απορρόφησης πλατειάς ζώνης (Wide line NMR)

Για υγρά δείγματα το φάσμα NMR δίνει μικρού εύρους κορυφές, πλάτους λίγων miliGauss λόγω της δυνατότητας ταχείας κίνησης των μορίων προς όλες τις κατευθύνσεις, με αποτέλεσμα, τα αναπτυσσόμενα από τους πυρήνες πεδία να παίρνουν πολύ σύντομα την τελική τους τιμή. Αντίθετα στα στερεά οι πυρήνες βρίσκονται «πακτωμένοι» σε σχέση με γειτονικούς πυρήνες και συνεπώς ένας δοσμένος πυρήνας βρίσκεται σε εντελώς διαφορετικό πεδίο σε σχέση με τους άμεσους γείτονές του. Αυτό σημαίνει ότι για κάθε πυρήνα απαιτούνται διαφορετικές συχνότητες συντονισμού και οι προκύπτουσες κορυφές απορρόφησης (εύρος φασματικών γραμμών) θα είναι αρκετά πλατειές, της τάξης των εκατοντάδων Gauss. Η διαφορά αυτή στο εύρος των ζωνών απορρόφησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό π.χ. υγρασίας παρουσία στερεών συστατικών.

2. Τεχνική μετασχηματισμού σήματος κατά Fourier (Fourier Transform NMR)

Στην τεχνική αυτή αντί συνεχούς σήματος εκπομπής ραδιοσυχνοτήτων χρησιμοποιείται περιοδικό σήμα (pulse) που καλύπτει όλη την περιοχή συχνοτήτων μέσα στην οποία οι πυρήνες απορροφούν ενέργεια. Μετά τη διέγερση, οι πυρήνες επανέρχονται στη θεμελιώδη κατάστασή τους (πυρηνική επαναφορά) αποβάλλλοντας κάποιο συγκεκριμένο ποσό ενέργειας το οποίο με κατάλληλη μετατροπή διημιουργεί το σήμα κατά Fourier. Ένα σύνολο από εκατοντάδες αρχικά περιοδικά σήματα, συνολικής διάρκειας ολίγων λεπτών, δημιουργούν στον ανιχνευτή το συνολικό σήμα κατά Fourier, το οποίο με τη βοήθεια κομπιούτερ μετατρέπεται σε κλασσικό φάσμα NMR. Η τεχνική εφαρμόζεται στην περίπτωση ιδιαίτερα ασθενών σημάτων και γιαυτό το δείγμα που χρησιμοποιεί κυμαίνεται μεταξύ 10 - 50 μg.

Ζ. Εφαρμογές NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για ποιοτικούς αλλά και για ποσοτικούς σκοπούς. Ένα μεγάλο μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί το πολύ υψηλό κόστος του οργάνου NMR και σε συνδυασμό με τον ποιοτικό της χαρακτήρα δεν έχει βρει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση των τροφίμων. Μερικές από τις σπουδαιότερες εφαρμογές του NMR είναι:

(α) Υγρασία

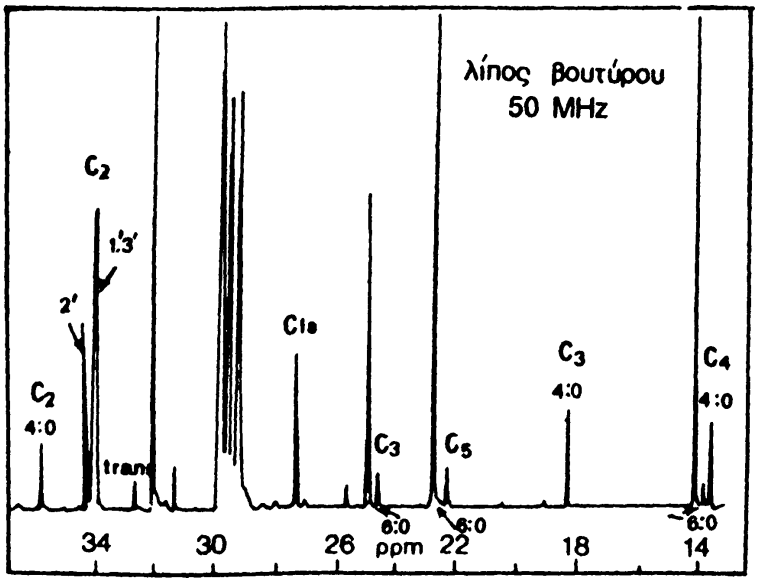
Στον προσδιορισμό υγρασίας με την τεχνική της απορρόφησης πλατειάς ζώνης σε αφυδατωμένες πατάτες[159], είδη αρτοποιίας[160] κ.ά.· στον προσδιορισμό του «χημικά δεσμευμένου νερού» σε αλεύρι και ζύμες[161]· στη μελέτη προσρόφησης νερού από πρωτείνες όπως κολλαγόνο[162], ζελατίνη[163], ωοαλ-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

βουμίνη[164] και το αμινοξύ γλυκίνη καθώς και την κινητική συμπεριφορά του προσροφημένου νερού στα προϊόντα αυτά[165]. Στη μελέτη του βαθμού δέσμευσης του νερού σε ψάρια[166], στον προδιορισμό του υγρού νερού σε κατεψυγμένα ψάρια[167]· στη μελέτη συμπεριφοράς του νερού κηπευτικών σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες[168]. Στην μελέτη εφυδάτωσης υδατανθράκων όπως τη ζελατινοποίηση του αμύλου[169], άγαρ[170], δεξτρανών[171]· στη μελέτη ικανότητας δέσμευσης νερού από το άμυλο[172] και την κυτταρίνη[173].

(β) Λίπη και έλαια

Στον προσδιορισμό του περιεχόμενου λίπους ελαιούχων σπόρων όπως καλαμπόκι[174], σόγια[175] και στον προσδιορισμό λίπους της σοκολάτας[176] του κρέατος[177], τυριών[178] και υδατικών διαλυμάτων[179]. Στην ανάλυση των λιπαρών οξέων και cis/trans ισομερών του βουτύρου και ηλιανθέλαιου[180] (σχ. 3-44). Στη μελέτη της σχέσης αριθμού ιωδίου και ακορεστότητας λιπαρών υλών[181]· στην επίδραση των πολυακορέστων λιπαρών οξέων στις φυσικές ιδιότητες του βουτύρου[182]· στον προσδιορισμό της ακορεστότητας σε πυρήνες καλαμποκιού[183]· στη διαφοροποίηση της θέσης 2 από τις θέσεις 1,3 με την τεχνική του ^{13}C[184] κ.ά.



Σχ. 3-44. Φάσμα NMR (C-13) αλειφατικών ατόμων άνθρακα στα λιπαρά οξέα του βουτύρου

(γ) στερεό περιεχόμενο λιπών και λαδιών (solid content)

Στον προσδιορισμό του στερεού περιεχόμενου προϊόντων όπως βούτυρο και μαργαρίνη[185-187] με βάση τη σχέση (3.44).

$$C = \frac{S_1(T_1+273.16)}{S_2(T_2+273.16)} \times 100$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

όπου: C = % στερεό περιεχόμενο στο λιπαρό δείγμα

S_1 = σήμα NMR του δείγματος στη θερμοκρασία T_1

S_2 = σήμα για το υγροποιημένο δείγμα στη θερμοκρασία T_2

Στον προσδιορισμό του υγρού λίπους σε αφρόγαλα[188]. Στη μελέτη της κρυστάλλωσης του λίπους στο βούτυρο[189]· στον προσδιορισμό του στερεού περιεχομένου μερικώς κρυσταλλωμένων λιπών[190] και του στερεού περιεχομένου του λίπους της σοκολάτας[191], του κρέατος[192], σπορελαίων[192] κ.ά.

(δ) Διάφορα

Στον προσδιορισμό της περιεχόμενης αλκοόλης σε αλκοολούχα ποτά όπως κρασί[193] κ.ά.· στην ταυτοποίηση λακτονών σε αυτοξειδωμενα λάδια[194] και τερπενικών σωμάτων σε πορτοκαλέλαιο[195]· στον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχόμενου τροφίμων όπως κρέας[196], σόγια[197] κ.ά. Τέλος στον προσδιορισμό ενώσεων όπως αλειφατικά αρωματικά οξέα (C_1-C_{10}) σε ευφραντικά όπως ο καφές[198] σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία (πίν 3.9).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.9

Σύσταση πτητικών οξέων στον καφέ Κολομβίας και Βραζιλίας

	ΚΟΛΟΜΒΙΑ		ΒΡΑΖΙΛΙΑ	
	έντονο καβούρντισμα	μέτριο καβούρντισμα	έντονο καβούρντισμα	μέτριο καβούρντισμα
% υγρασία	3.96	4.30	3.27	4.00
πτητικά οξέα	% οξέα στον καφέ (επί ξηρής βάσης)			
C_1	0.072	0.092	0.066	0.079
C_2	0.31	0.31	0.30	0.33
C_3	0.011	0.0092	0.0063	0.0056
C_4	0.0076	0.0052	0.0069	0.0068
C_5	ίχνη	ίχνη	ίχνη	ίχνη
C_6	0.0010	0.00071	0.0019	0.0019
C_{7x}	0.00074	0.0014	0.0012	0.0015
C_7	0.0061	0.0063	0.010	0.0094
C_{8x}	0.0013	0.00083	0.00074	0.00023
C_8	0.00028	0.00022	0.0016	0.0032
C_9	0.00025	0.00083	0.0013	0.0013
C_{10x}	0.0020	0.0017	0.0028	0.0015
C_{10}	0.00051	0.00010	0.0028	0.0015
C_1 έως C_{10} (σύνολο)	0.41	0.43	0.40	0.44

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης.** Μέρος Α', Εθνικόν Τυπογραφείο, Αθήνα (1972).
2. **Doro B.** Boll. Lab. Chim. Provinciali 16, 450 (1965)
3. **Rego M del C., Carballido A** and **Villanua Villanua L** Anal. Bromat 16, 405 (1964)
4. **Cook HR** J Ass Off. Agric Chem 45, 10 (1962)
5. **Roy NK** Indian J. Technol 4, 176 (1966)
6. **Shoeb ZE** Grasas aceit. 20, 4 (1969)
7. **Norby J.G.** Acta Chem Scand. 14, 2057 (1960)
8. **Paliota U.** Riv. Ital. Sostanze Grasse 42, 587 (1965)
9. **Γαλανού Δ.Σ. και Βουδούρη ΕΚ.**, Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων. Εκδ. Παν/μίου Αθηνών, Αθήνα (1975)
10. **Spiteri J. Castang J., Pamarola H.** and **Solere M.** Ann. Falsif. Expert Chim 55, 12 (1962)
11. **De Gori R., Cantagalli P.** and **Grandi F** Boll. Lab. Chim. Provinciali 13, 319 (1962).
12. **Kohler M. Sommer PF, Bollinger HR, Semidli B.** and **Vecchi M.** Vitam and Hormon 20, 407 (1962)
13. **Nystrom E** and **Sjorall J** J Chromatog 24, 212 (1966)
14. **Walker GH, Green MS** and **Fenn CE** J Ass. Publ Analysts 2,2 (1964)
15. **Ford MA**, Analyst 91, 15 (1966)
16. **Phillips MA** and **Hinkel RD** J. Agric Food Chem 5, 379 (1957)
17. **Roos JB** Fleischwistschaft 11, 667 (1959)
18. **Fritzw** Nahrung 12, 639 (1968)
19. **Gacher EP** C.r. Acad Bulg Sci 19, 751 (1966).
20. **Drawert F** and **Kupfer G Z.** Analyt Chem. 211, 89 (1965)
21. **Zitko V** and **Rosik J.** Nahrung 5, 491 (1961)
22. **Smith R.F.** Analyst 89, 146 (1964)
23. **Howard G.A.** J. Inst. Brew 74, 249 (1968)
24. **Darbishire O.B.** Analyst 90, 439 (1965)
25. **Rother H.** Riechstoffe u. Aromen 12, 87 (1962)
26. **Singh B.S., Yadav P.C.** and **Pathak R.C.** Indian J. Dairy Sci 16, 121 (1963)
27. **Lehmann G.** and **Hans H.G.**, Z. Analyt Chem 238, 445 (1968)
28. **Dahghetta A.** and **Amelotti G.**, Riv Ital Sostanze Grasse 45, 735 (1968)
29. **Meduri P., Rota A.** and **Bino N.**, Boll Lab. Chim. Provincialli 15, 455 (1964)
30. **Lauber E.**, Mitt. Lebensmit. H. Hyg. Bern. 50, 553 (1959)
31. **Synodinos E.**, Riv. Ital. Sostanze Grasse 42, 325 (1965)
32. **Gibois H.D.**, J. Biol Chem. 72, 649, (1927)
33. **Szalkowski C.R.** and **Garber J.B.**, J. Agric. Food Chem. 10, 491 (1962)
34. **Filipic V.J.** and **Ogg. C.L.**, J. Ass. off Ageric. Chem. 43, 795 (1960)
35. **Yu T.C.** and **Sinuhuber R.D.**, J. Amer. Oil Chem. Soc. 1, 540 (1964)
36. **Bergner K.G.** and **Petri H.R.**, Z. Lebensmit H. Untersuch 111, 454 (1960)
37. **Ashurst P.R. an Mac William I.C.**, J. Inst. Brew 69, 394 (1963)
38. **McLeod. A.J.** Instrumental Analysis of Foods, Paul Elek. Sci. Bouhs Lid, London (1973)
39. **Ashworth U.S.** and **Choudry MA.**, J. Dairy Sci 45, 952 (1962)
40. **Folsaac L.** Chim. Analyt 49, 649 (1967)
41. **Wierzchowski J.** and **Fuks T.** Milt Geb. Lebensmittelunters u. Hyg. 58, 266 (1967)
42. **Ostrorskii Y.M.** and **Gvozdera M.A.** Byul. Eksperiment Biol i Med 48, 120 (1959)
43. **Sharif M.A.H.** Pakistan J. Sci Ind. Res. 1, 160 (1958)
44. **McLeod A.J.** Instrumental Analysis of Foods, Paul Elek Sci Books Ltd., London (1973)
45. **Ibid**
46. **Cooper AH Hudson JA** and **MacWilliam IC** J. Inst. Brew 67, 432 (1961)
47. **Ashley MG**, Analyst 84, 692 (1959)
48. **Gutenmann WH, Saint John LE, Barry DL, Jones ED** and **Lisk DJ.** J. Agric Food Chem

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

9, 50 (1961)
49. **Alfonso N** and **Lopez E. Z.** Lebensmitt Untersuch 111:410 (1960)
50. **Freeman NK** J. Amer. Oil Chem. Soc. 45, 798 (1968)
51. **Jacini G, de Zotti G, Capella P** and **Arpino A.** Olii Min. 37, 419 (1960)
52. **Pallota K.** and **Matarese L.** Riv. Ital. Sostanze Grasse 38, 387 (1961)
53. **Provredi F.** Riv. Ital. Sostanze Grasse 42, 319 (1965)
54. **Franconi MA** and **Franconi U.** Boll. Lab. Chim. Provinciali 15, 327 (1964)
55. **Holman RT, Euer S** and so **Edmon PR.** Arch. Biochem. Biophys 80, 72 (1959)
56. **Cleverly B.** Analyst Chem 32, 128 (1960)
57. **Fenton AJ** and **Crisler RO.** J. Amer. Oil Chem Soc. 36, 620 (1959)
58. **Bartlet JG.** and **Mahon JH** J. Ass. Off Agric. Chem. 41, 450 (1958)
59. **Pallota U.** Riv. Ital. Sostanze Grasse 38, 191 (1961)
60. **De Ruig WG** Ned. Melk-en Zuireltijdschr 22, 104 (1968)
61. **Cleverley B.** and **Dawes SN.** N.Z.J. Sci 6, 555 (1963)
62. **Krummel G. Z.** Lebensmitt. Untersuch 124, 194 (1964)
63. **Brogioni M.** and **Franconi U.** Boll Lab. Chim. Provinciali 14, 135 (1963)
64. **Suzuki M., Nakamura E.** and **Nagase Y. J.** Pharm. Soc: Japan 79, 1116 (1959)
65. **Suzuki M. Nakamura E.** and **Nagase Y.** Ibid. 79, 1209 (1959)
66. **Suzuki M. Nakamura E** and **Nagase Y** Ibid. 80, 916 (1960)
67. **Oi N. and Inaba E.** J. Pharm. Soc. Japan 87, 741 (1967)
68. **Chen. T. and Gould J.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 51, 878 (1968)
69. **Pizzoli EM, de Marco O** and **Notarnicola C.** Riv. Ital. Sostanze Grasse 44, 62 (1967)
70. **Luck H** and **Kohn R.** Milchwissenschaff 20, 455 (1965)
71. **Gracian Tous J.** and **Martel J.** Grasas aceit. 19, 99 (1968)
72. **Beynon KI and Elgar KE** Analyst 91, 143 (1966)
73. **Abbott DC** and **Egan H.** Analyst 92, 475 (1967)
74. **Eisenbrand J.** and **Emrich K.** Dt Lebensmittel Rdschm. 65, 45, (1969)
75. **Kliman PG** and **Pallansch MJ.** J. Dairy Sci 48, 859 (1965)
76. **Morris WW** and **Haenni EO** J. Ass. Off Agric Chem. 45, 92 (1962)
77. **Newhall WF** and **Ting SV.** J. Agric. Food Chem. 13, 281, (1965)
78. **Oi N** and **Inaba E** J. Pharm. Soc. Japan 87, 640 (1967)
79. **Chon TC** and **Tharp BW** J. Dairy Sci 46, 237 (1963)
80. **Narziss L, Kieninger M** and **Reicheneder E,** Brawsissenschaft 19, 284 (1966)
81. **Bergert KH, Kohler M** and **Schumacher H.** Z. Analyst Chem. 208, 44 (1965)
82. **Fritz W** Naturwissenschaften 53, 132 (1966)
83. **Βουδούρη Ε.** και **Κοντομηνά Μ.:** Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων, Ιωάννινα, 1985
84. **Ayrest JT** and **Sinnhuber R:O** J. Am. Oil Chem. Soc. 43, 423 (1966)
85. **Pons WA, Robertson JA** and **Goldblatt LA** J. Am. Oil Chem. Soc. 43, 665 (1966)
86. **Gassmann B.** and **Taufel K.** Nahrung 2, 450 (1958)
87. **Toepfer EW. MacArthur Polansky M.** and **Hewston EM,** Analyt. Biochem. 2, 463 (1961)
88. **Shaw WHC** and **Bessell CJ** Analyst 85, 389 (1960)
89. **Weeks CE** and **Deutsch MJ.** J Ass. Off Anal. Chem. 50, 793 (1967)
90. **Provvedi F.** Boll Lab. Chim. Provincialli 11, 3 (1960)
91. **McCarthy WJ** and **Winefordner JD** J Assoc. Off. Agric. Chem. 48, 915 (1965)
92. **Moye HA** J. Ass. Off Anal. Chem. 51, 1260 (1968)
93. **Elliott RP.** J. Ass. Off Agr. Chem. 44, 493 (1961)
94. **Mohler K** and **Mayrhofer OL** Z. Lebensmittelunters and Forsch 135, 313 (1968)
95. **Tappel AL.** Anal. Biochem. 23, 466 (1968)
96. **Werner JP** and **Taylor L.** J. Inst. Brew 75, 195, (1969)
97. **Meranger JC** and **Sommers E.** J. Assoc. Off Anal. Chem. 51, 922 (1968)
98. **Roth F.** and **Gilbert E.** Mitt. Rebe Wein. Obstb. Fruechtverwert 19, 11 (1969)
99. **Meranger SC.** Bull Env. Cont. Tox. 5, 271 (1970)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

100.**Szarski P.** Food Tech. in Austr. May, 216 (1971)
101.**Wolff JP.** Chim. Analyt. 50, 18 (1968)
102.**Rastelli R.** and **Amati A.** Riv. Ital. Sostanze Grasse 46, 62 (1969)
103.**Notevarp O., Chahine MH** J. Am. Oil. Chem. Soc. 49, 274 (1972)
104.**Persmark U. Toregard B.** Ibid 48, 650 (1971)
105.**Blonda G., Gurio R.** and **Bilno VJ.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 49, 1 (1966)
106.**Gorsuch T.J.** Analyst 84, 135 (1959)
107.**Ssekaalo H., Johnson RM.** J. Sci Food Agric. 20, 581 (1969)
108.**Rebman H. Hoth. HJ.** J. Milchwissenschaft 26, 411 (1971)
109.**Wong PN. Lacroix DE** and **Alford JA** J. Amer. Diet. Assoc. 72, 608 (1978)
110.**Willis JB** Austr. J. Dairy Tech. June 70, (1964)
111.**Simpson GR., Blay RA** Food Trade Rev. 36 (8), 35 (1966)
112.**Uthe JF., Armostrong FAJ, Tam KC** J. Assoc. Off. Anal. Chem 54, 866 (1971)
113.**Pagenkopf GK Newman DR, Woodriff R** Anal. Chem. 44, 2248 (1972)
114.**Gudzinowich BJ** and **Luciano VJ** J. Assoc. Off Anal. Chem. 49, 1 (1966)
115.**Potter AL, Ducay ED** and **McCready RM** J. Assoc. Off. And Chem. 51, 748 (1968)
116.**Koch J.** and **Hess D.** Z. Lebensmittelunters u. Forsch. 126, 25 (1964)
117.**Culver BR, Lech JF** and **Pradhan NK** Food Tech. March, 16 (1975)
118.**Meuran HJ.** J. Ass. Off Agr. Chem. 46, 299 (1963)
119.**Sanz Pedrero P.** An. Bromat. 14, 235 (1962)
120.**Perring MA** J. Sci Food Agr. 15, 752 (1964)
121.**Boland FE.** J. Ass. Off Agr. Chem. 48,521 (1965)
122.**Boland FE.** Ibid 49, 617 (1966)
123.**Zonneveld H.** Z. Lebensmittel u. Forsch. 133, 273 (1967)
124.**Assaf SA** and **Bratzler LJ** J. Agric. Food Chem 14, 487 (1966)
125.**Creminiejewski CP, Shank CW, Bechtel WG** and **Bradley WB** Cereal Chem. 41, 65 (1964)
126.**Carruthers A.** and **Oldfield JFT** Inst. Sug. J. 63, 103, (1961)
127.**Bench E.** Riechstoffe Arom. Korperpflegemittel 18, 126, 128, 132, 134 (1968)
128.**Wenner VR** J Dairy Sci 41, 761 (1958)
129.**Lu BS** and **Niketic C** Food Res. 24, 305 (1959)
130.**Brown JR, Jaris AA** and **Tiefenbach B.** Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 1309 (1961)
131.**Rutkowska K.** and **Tadensiak W.** Rocrn. Panst Zakl. Hig 18, 669 (1967)
132.**Porcelli G.** Annali Ist. Sup. Sanita 1, 335 (1965)
133.**Smith RI, Giaccio LL** and **Lipchus RL** J. Agric Food Chem 15, 408 (1967)
134.**Varley JA** and Analyst 91, 119 (1966)
135.**Brandt PJ** and **Vant Riet** Analyt. - Chem. 38, 1790 (1966)
136.**Shibamoto J, Mihara S, Nishimura O., Kamiya Y, Aitoku A** and **Hayashi J.** "Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages, G. Charalambous (edit). Academic Press. New York (1980)
137.**Kahn JH. Laroe EG** and **Lonner HA** J. Food Sci 33, 395 (1968a)
138.**Kahn JH, Shipley PA, Laroe EG** and **Conner HA** J. Food Sci 34, 587 (1969)
139.**Kontominas MG** J. Agr. Food Chem. 34, 847 (1986)
140.**Noble AC** in Analysis of Foods and Beverages G Charalambous (edit): Academic Press, New York (1978)
141.**Legendre MG, Dupuy HP, Ory RL** and **Mclrath wo** J. Agr. Food Chem. 26 (5), 1035 (1978)
142.**Evans JD** and **Selke E.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 49 (2), 106 (1972)
143.**Wick EL, Yamanishi T, Kobayhishi A, Valenzuela S.** and **Issenberg P.** J. Agr. Food Chem. 17, 751 (1969)
144.**Turk A, Smock RM** and **Taylor TI** Food Tech. 5, 58 (1951)
145.**Teranishi R, Corse JW, McFadden WIt, Black DR** and **Morgan AI** J. Food Sci 28, 478 (1963)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

146.**Teranishi R., Lundin RF, McFadden WH, Mon TR, Schultz TH, Sterens KL, Wasserman J.** 150th ACS, Atlantic City N.J., Sept. 12 (1965)
147.**Jennings WG** J. Food Sci. 26, 564 (1961)
148.**Macleod WD, Bulgues NM** J Food Sci 29, 565 (1964)
149.**Vitztham O.G.** and **Werkhoff P.** in "Analysis of Foods and Beverages" G. Charalambous (edit), Academic Press, New York (1978)
150.**Moll N. Vinh T.,** and **Bondoux G** in "Instrumental Analysis of Foods" G. Charalambous (edit) Vol. 1, Academic Press, New York (1983)
151.**Staphylakis K.** and **Geglou D. Ibid.**
152.**Flick 67, Burnette JA, Legendre MG, Angelo AJ** and **Ory RL** in "Analysis and Control of Less besirable Flavors in Foods and Beverage" G. Charalambous (edit), Academic Press N.Y. (1980)
153.**Bailey ME, Dupuy HP** and **Legendre MG** Ibid.
154.**Nonaka M., Black DR** and **Pippen EL.** J. Agr. Food Chem. 15, 713 (1967)
155.**Nagy S. One Ronseff R.** in "Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages," 6 Charalambous (edit), Academic Press N.Y. (1980)
156.**Tressl R., Bahri D.** and **Kossa M.** Ibid
157.**Tressl G., Wessely K., Hewlett-Packard** Co. GC/MS Application Note AN 176-22
158.**Rosen. JD., Morano JR, Pareles R, Giacin JR** and **Gilbert SG** J. Amer. Off Anal. Chem. 58 (4), 699 (1975)
159a.**Kontominas M.G.** and **Voudouris E.K.**Chim Chron. (New Series) 11, 215 (1982)
159b.**Shaw TM** and **Elsken RH** J. Appl. Phys. 26, 313 (1955)
160.**Conway TF, Whee RF** and **Smith RJ.** Food Eng. 29, 80 (1957)
161.**Toledo R, Steinberg MP** and **Nelson AI** J. Food Sci 33, 315 (1968)
162.**Berendsen HJ.** J. Chem. Phys. 36, 3297 (1962)
163.**Abezedarshaya LA, Miftakhutdinova FG, Fedatov** VD: "Molecular Biology" New York (1967)
164.**James TL and Gillen KT** Biochem. Biophys. Acta 286, 10 (1972)
165.**Weisser H. Z.** f. Lebensmittel - Technologie und Verfahrenstechnik 28 (3), 97 (1977)
166.**Suzuki T** and **Takenchi J.** Food Sci and Tech. (Japan) 17, 110 (1970)
167.**Sussman MV** and Chin 1, Science 151, 324 (1966)
168.**Mank, W, Ovtscharenko F** and **Krotow EG** Pist Schew. Technol. 1, 41 (1975)
169.**Jaska E.** Cereal Chem. 48, 437 (1971)
170.**Duckworth RB** and **Kelly CE:** J. Food Technol. 8, 105 (1973)
171.**Fedin EI, Tsitsi-shvili V** and **Grinberg:** Carbohydrate Res. 39, 193 (1975)
172.**Monsseri J., Steinberg MP, Nelson I.** J. Food Sci 39, 114 (1974)
173.**Ogiwara Y, Kubota H, Hayaschi S.** J. Appl. Polym. Sci 14, 303 (1970)
174.**Conway TF** and **Smith RJ** Devel. Appl. Spectroscopy 2, 115 (1963)
175.**Collins FJ. Alexander DE, Rodgers RC** and **Silvela SL** 5. Amer. Oil Chem. Soc. 44, 708 (1967)
176.**Qref I.** J. Amer. Oil Chem. Soc 43, 425 (1965)
177.**Casey JC** and **Miles CA** J. Sci Food Agr. 25, 1151 (1974)
178.**Moisin, T, Timonen E.** and **Kreula M.** Milchwissenschaft 27, 73 (1972)
179.**Shanbhag S., Steinberg MP** and **Nelson AI** J. Amer. Oil. Chem. Soc. 48, 11 (1971)
180.**Shoolery J.N.** Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectors. 11, 79 (1977)
181.**Nielsen LV** Milchwissenschaft 31 (10), 598 (1976)
182.**Wood FW, Murphy MF** and **Dunkley WL** J. Daily Sci 58, 839 (1975)
183.**Conway TF, Johnson LF** Science 164, 827 (1969)
184.**Soon NG.** Lipids 19(1), 56 (1984)
185.**Taylor JR, Pohle WD** and **Gregory RL** J. Amer. Oil Chem. Soc. 41, 177 (1964)
186.**Pohle WD, Taylor JR** and **Gregory RL** Ibid 42, 1075 (1965)
187.**Bosin WA** and **Marmor RA** Ibid. 45, 335 (1968)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

188.**Samuelsson EG** and **Vikelse J.** Milchwissenschaft 26(10), 621 (1971)
189.**Johnson H.** and **Anderson K.** Milchwissenschaft 31(10), 593 (1976)
190.**Van Putte K., Van Enden J.** J. of Phys. E. Sci Instr. 6, 910 (1973)
191.**Orel I.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 425 (1965)
192.**Swindells CE** and **Ferguson PA** J. Inst. Can. Sci Technol. Aliment 5(2), 82 (1972)
193.**Anders. U. Tittgemeir F.** and **Haller G.** Z. Lebensm. Unters. Forsh. 162 (1), 21 (1976)
194.**Floriti JA, Krampl. V.** and **Sims RJ.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 44, 534 (1967)
195.**Teranishi R, Flath RA** and **Mon. TR.** J. Chromatog. 4, 77 (1966)
196.**Wright RG, Milward RC** and **Coles BA** Food Tech 12 (Dec), 47 (1980)
197.**Coles B.A.** J. Amer. Oil. Chem. Soc. July, 202 (1980)
198.**Kung JT. McNaught RP** and **Yeràsian JA** J. Food Sci 32, 455 (1967)

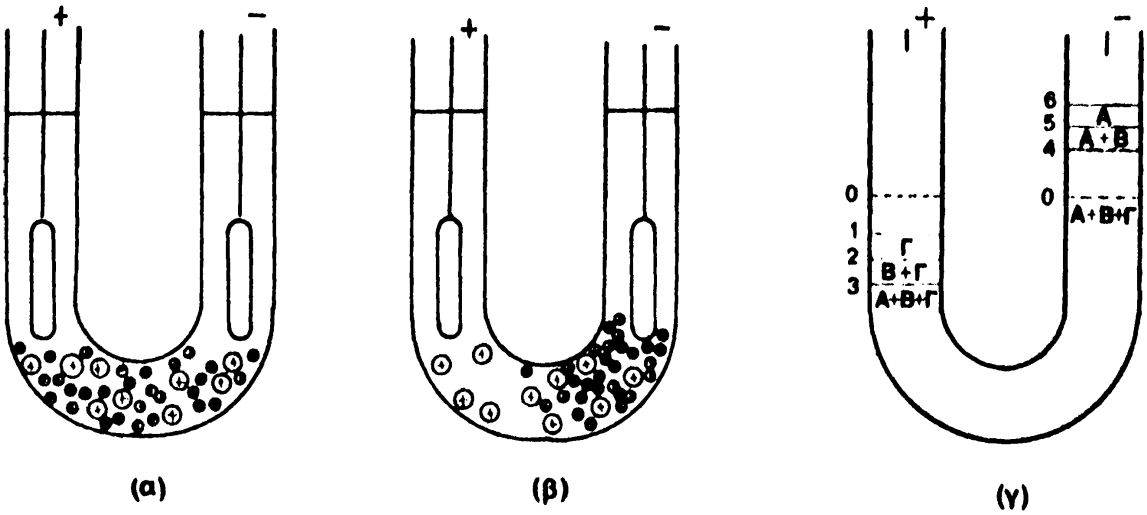
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

4.1. Εισαγωγή

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί πολύ χρήσιμη μέθοδο διαχωρισμού μίγματος στα συστατικά του με τη βοήθεια του ηλεκτρικού ρεύματος. Προϋπόθεση για τον διαχωρισμό των συστατικών είναι η δυνατότητα ιονισμού των σε διάλυμα. Ο «πρόχειρος» αυτός ορισμός της ηλεκτροφόρησης φέρνει στο νου την ηλεκτρόλυση, από την οποία η πρώτη διαφέρει κατά το ότι τα διαχωριζόμενα συστατικά δεν λαμβάνονται πάνω στα δύο ηλεκτρόδια της χρησιμοποιούμενης συσκευής, αλλά σε κάποια ενδιάμεσα σημεία μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων (Σχημ. 4.1 α,β). Έτσι μπορεί να πει κανείς ότι η ηλεκτροφόρηση είναι ένα είδος ατελούς ηλεκτρόλυσης.



Σχ. 4-1. Αρχή της ηλεκτροφόρησης (α,β). Ηλεκτροφόρηση ελεύθερου μετώπου (γ). Τα μικρότερου μεγέθους ιόντα κινούνται ταχύτερα των μεγαλυτέρων. Για λόγους απλοποίησης σημειώνονται μόνον τα θετικά ιόντα.

Οι Picton και Linder το 1892 χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά δοχεία σχήματος V και U για να μελετήσουν τη μετακίνηση ανοργάνων ενώσεων και της πρωτεΐνης αιμογλοβίνης σε διάλυμα. Αργότερα στη δεκαετία του 1930 ο Theorell διαμόρφωσε τη διαδικασία διαχωρισμού αριθμού ενζύμων με βάση την ηλεκτροφορητική τους συμπεριφορά. Αυτές ήταν οι πρώτες εφαρμογές της **ηλεκτροφόρησης ελεύθερου ή κινούμενου μετώπου** (moving boundary) (βλ. κεφ. 4.3 Α). Το είδος αυτό της ηλεκτροφόρησης είναι εξαιρετικά χρήσιμο για τον προσδιορισμό ισοηλεκτρικών σημείων (βλ. κεφ. 4.4.), συντελεστών διάχυσης και ηλεκτροφορητικών ευκινησιών διαφόρων καθαρών συ-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

στατικών. Βασικά μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι (1) ότι απαιτεί αρκετά ακριβά όργανα και αυστηρά καθορισμένες συνθήκες για ορθή εφαρμογή και (2) ότι δεν παρέχει ευκολία στη μελέτη των διαχωριζόμενων κλασμάτων, γιατί τα τελευταία δεν μπορούν να απομονωθούν.
Για τους λόγους αυτούς αναπτύχθηκε στο δεύτερο ήμισυ της δεκαετίας του '40 η λεγόμενη **ηλεκτροφόρηση ζώνης** (βλ. κεφ. 4.3.Β) με σκοπό τη σταθεροποίηση του μετώπου σε «ζώνη», (zone) έτσι ώστε τα διαχωριζόμενα κλάσματα να είναι δυνατόν να απομονωθούν και να μελετηθούν καλύτερα. Σήμερα η ηλεκτροφόρηση ζώνης βρίσκει πολύ περισσότερες εφαρμογές από την ηλεκτροφόρηση ελευθέρου μετώπου, κυρίως στην ανάλυση των πρωτεϊνών.
Στην ηλεκτροφόρηση ζώνης χρησιμοποιείται συγκεκριμένο υπόστρωμα, όπως χαρτί, οξική κυτταρίνη, άμυλο, ακρυλαμίδιο ή πηκτές από άγαρ μέσα σε στήλες, ή πάνω σε πλάκες. Η τεχνική αυτή απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος και έχει μεγαλύτερη ευαισθησία (μg) από την ηλεκτροφόρηση ελεύθερου μετώπου.

4.2. Θεωρία ηλεκτροφόρησης

Τα άτομα της ύλης συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς που μπορεί να είναι ομοιοπολικοί (CCl_4) ή ετεροπολικοί ($CH_3COO^-H^+$, $[CH_3NH_3]^+OH^-$). Ουσίες, τα άτομα των οποίων συγκρατούνται με ετεροπολικούς δεσμούς όταν βρεθούν σε διάλυμα διίστανται σε ιόντα. Οταν στο διάλυμα αυτό εφαρμοστεί ηλεκτρικό ρεύμα, τα φορτισμένα σωματίδια (ιόντα) θα μετακινηθούν προς το ηλεκτρόδιο του αντιθέτου σήματος αντίστοιχα. Ουσίες τα άτομα των οποίων συγκρατούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς δεν εμφανίζουν τα παραπάνω φαινόμενα και συνεπώς δεν μπορούν να μελετηθούν με ηλεκτροφόρηση.
Ο βαθμός διάστασης των μορίων σε ιόντα μέσα σε υδατικό διάλυμα είναι συνάρτηση (1) του pH του διαλύματος και (2) της σταθεράς διάστασης της συγκεκριμένης ουσίας. Η κατάσταση ισορροπίας ($HA \rightleftharpoons H^+ A^-$) περιγράφεται από την εξίσωση (4.1) των Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \qquad (4.1)$$

όπου: pK_a =αρνητικός λογάριθμος της σταθεράς διάστασης του ασθενούς οξέος HA
$[A^-]$= η συγκέντρωση του ιονισμένου άλατος
[HA]= η συγκέντρωση του ασθενούς οξέος.
Σύμφωνα με την εξίσωση (4.1) όταν pH= pK_a τα μόρια της ουσίας βρίσκονται

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σε διάσταση κατά 50%. Όταν η τιμή του pH είναι κατά 1 μονάδα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του pK_a τα μόρια της ουσίας βρίσκονται σε διάσταση κατά 90% και όταν η τιμή του pH είναι κατά δύο μονάδες μεγαλύτερη της αντίστοιχης του pK_a τα μόρια της ουσίας βρίσκονται σε διάσταση κατά 99%. Συνεπώς το pH του διαλύματος επηρεάζει άμεσα τον αριθμό των σχηματιζόμενων ιόντων. Για παράδειγμα τα αμινοξέα που αποτελούν τους δομικούς λίθους των πρωτεϊνών, ανάλογα με το pH του διαλύματος, μπορεί να βρίσκονται σε μία από τις τρείς παρακάτω μορφές:

$$NH_3^+ - \overset{\overset{R}{|}}{CH} - COOH \underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} {}^+NH_3 - \overset{\overset{R}{|}}{CH} - COO^- \underset{H^+}{\overset{OH^-}{\rightleftharpoons}} NH_2 - \overset{\overset{R}{|}}{CH} - COO^-$$

$$pK_a = 2.4 \qquad\qquad pK_b = 9.6$$

Στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) η πρωτεΐνη είναι ηλεκτρικά ουδέτερη και δεν μετατοπίζεται με επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Σε pH μικρότερο του pI η πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη και συνεπώς μετατοπίζεται προς την κάθοδο, ενώ σε pH μεγαλύτερο από το pI, η πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη και μετατοπίζεται προς την άνοδο.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΗΡΕΑΖΟΝΤΕΣ ΤΗ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Οι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η μετακίνηση φορτισμένων σωματιδίων σε διάλυμα περιλαμβάνουν: τη συγκέντρωση της ουσίας, το βαθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ ουσίας και ηλεκτροφορητικού μέσου, την πτώση τάσης μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων, την ένταση του εφαρμοζομένου ρεύματος, τη θερμοκρασία, το βαθμό εξάτμισης του μέσου, καθώς και από γεωμετρικούς παράγοντες όπως το μέγεθος, το σχήμα και η πυκνότητα των σωματιδίων κ.ο.κ. Βασικό ρόλο στο διαχωρισμό παίζει το μέγεθος του φορτίου των σχηματιζόμενων ιόντων και το μέγεθός τους. Τα δύο αυτά μεγέθη έχουν αντίθετη μεταξύ τους επίδραση. Δηλαδή μεγάλο μέγεθος ιόντος επιβραδύνει τη μετακίνησή του, ενώ μεγάλο ηλεκτρικό φορτίο επιταχύνει τη μετακίνηση. Έστω σωματίδιο φορτίου (q) μέσα σε διάλυμα που δέχεται την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ισχύος (H). Επ' αυτού αναπτύσσεται δύναμη (F), ίση προς:

$$F = q.H \qquad (4.2)$$

η οποία το επιταχύνει. Όταν η επιτάχυνση εξισορροπηθεί από τη δύναμη τριβής τότε το σωματίδιο αποκτά σταθερή ταχύτητα (v). Η κίνηση του σωματιδίου περιγράφεται τότε από την εξίσωση (4.3)

$$qH = \frac{RTv}{D} \qquad (4.3)$$

όπου: D= συντελεστής διάχυσης του σωματιδίου κάτω από τις συγκεκριμένες

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πειραματικές συνθήκες
R= σταθερά Boltzman
T= απόλυτη θερμοκρασία
Αν (Z) είναι το σθένος του σωματιδίου τότε:

$$q=Z.e \qquad (4.4)$$

οπότε η (4.3) γίνεται:

$$\frac{v}{H} = \frac{qD}{RT} = \frac{ZeD}{RT} \qquad (4.5)$$

Η αντίσταση στη μετακίνηση λόγω τριβής (f) δίνεται από τη σχέση (4.6)

$$f= 6\pi\, n\, r\, v \qquad (4.6)$$

όπου: n= ιξώδες μέσου
r= ακτίνα στην περίπτωση σφαιρικού σωματιδίου.

Στην κατάσταση σταθερής ταχύτητας θα ισχύει η σχέση (4.7):

$$qH=f \qquad (4.7)$$

Η ηλεκτροφορητική ευκινησία (μ), που ορίζεται σαν η ταχύτητα του σωματιδίου κάτω από κανονικές συνθήκες (π.χ. H=1V/cm) δίνεται από τη σχέση:

$$\mu = \frac{v}{H} \qquad (4.8)$$

η τελευταία βάσει της (4.3) και (4.6) γίνεται:

$$\mu = \frac{q}{6\pi n r} \qquad (4.9)$$

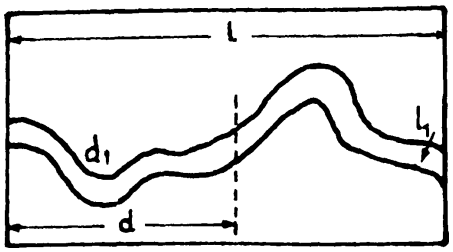
Από την εξίσωση (4.9) φαίνεται πως η μετακίνηση του σωματιδίου εξαρτάται από το μέγεθός του, το συνολικό φορτίο του και από τις ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου. Η εξίσωση (4.9) ισχύει για άπειρη αραίωση, δηλαδή σε κατάσταση που η αλληλεπίδραση του ιόντος με τα γειτονικά του ιόντα είναι ασήμαντη. Η παρουσία άλλων ιόντων συνεπάγεται την ελάττωση της κινητικότητας του ιόντος. Στην ηλεκτροφόρηση ελεύθερου μετώπου η ευκινησία του σωματιδίου ακολουθεί τη σχέση (4.10)

$$\mu = \frac{dl}{tV} \qquad (4.10)$$

όπου: V= τάση μεταξύ ηλεκτροδίων
t= χρόνος διέλευσης ηλεκτρικού ρεύματος
d= απόσταση που διανύει το σωματίδιο
l= απόσταση μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων

Στην ηλεκτροφόρηση ζώνης, π.χ. χαρτιού, όπου το σωματίδιο κινείται πάνω σε υπόστρωμα, είναι αναγκασμένο να διανύει μεγαλύτερη απόσταση κιαυτό γιατί θα πρέπει να ακολουθήσει κάποιο «κανάλι» μεταξύ των ινών του χαρτιού. Η πορεία του σωματιδίου σ' αυτήν την περίπτωση φαίνεται στο σχήμα (4-2)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 4-2. Κίνηση σωματιδίου στο χαρτί.

Από τό σχήμα 4-2 προκύπτει ότι: $\frac{l_1}{l} = \frac{d_1}{d} \Rightarrow d_1 = d\left(\frac{l_1}{l}\right)$ (4.11)

οπότε η εξίσωση (4.10) $\Rightarrow \mu_\varphi = \frac{dl}{tV}$ (4.12)

όπου: μ_φ = φαινομένη ή μετρούμενη ευκινησία

και βάσει της (4.11) $\Rightarrow \mu_{\pi\rho} = \frac{d_1 l_1}{tV}$ (4.13)

όπου: $\mu_{\pi\rho}$ = πραγματική ευκινησία

από τις (4.12) και (4.13) $\Rightarrow \frac{dl}{\mu_\varphi} = \frac{d_1 l_1}{\mu_{\pi\rho}} \Rightarrow \mu_{\pi\rho} = \mu_\varphi\left(\frac{d_1 l_1}{dl}\right)$ (4.14)

η (4.14) βάσει της (4.11) $\Rightarrow \mu_{\pi\rho} = \mu_\varphi\left[\frac{d(l_1/l)}{dl}\cdot l_1\right] = \mu_\varphi\left(\frac{l_1}{l}\right)^2$ (4.15)

Συνεπώς η παρατηρούμενη ευκινησία πρέπει να πολλαπλασιαστεί επί τον παράγοντα $(l_1/l)^2$ για να δώσειτην πραγματική ευκινησία. Η ηλεκτροφορητική ευκινησία εξ άλλου εξαρτάται άμεσα από την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται. Διαλύματα χαμηλής ιοντικής ισχύος επιτρέπουν υψηλές ταχύτητες μετακίνησης με χαμηλές τιμές παραγόμενης θερμότητας. Διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος δίνουν χαμηλές ταχύτητες μετακίνησης. Στην περίπτωση αυτή, για την αύξηση της ταχύτητας μετακίνησης των ιόντων απαιτείται εφαρμογή υψηλής κλίσης δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων. Με αύξηση του δυναμικού (V), αυξάνεται η ένταση του ρεύματος (i) που διαρρέει το κύκλωμα, με αποτέλεσμα να προκαλείται παραγωγή σημαντικού ποσού θερμότητας. Η θερμότητα μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση του δείγματος (πρωτεϊνών), απώλεια πτητικών συστατικών και αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος λόγω εξάτμισης. Γιαυτό στην πράξη ψύχεται το σύστημα (βλ. 4.3 Β 1β) για τη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Ακόμη εφαρμόζονται τιμές κλίσης δυναμικού περίπου ίσες προς 4V/cm (Για υπόστρωμα μήκους π.χ. 30cm αυτό αντιστοιχεί σε εφαρμογή V=120V στα άκρα του υποστρώματος). Με τις τιμές αυτές επιτελείται ο πληρέστερος διαχωρισμός στον ελάχιστο δυνατό χρόνο, ενώ ταυτόχρονα αποφεύγεται η έκλυση σημαντικών ποσών θερμότητας. Εννοείται πως για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό φορτισμένων σωματιδίων απαιτείται η εφαρμογή συνεχούς

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ρεύματος για τη σταθερή προς μια φορά, μετακίνηση εκάστου σωματιδίου, ανάλογα με το πρόσημο του φορτίου του.
Η ηλεκτροφορητική ευκινησία εξαρτάται επίσης από τη φύση των σωματιδίων (κρυσταλλικά ή κολλοειδή). Κολλοειδή ή μακρομοριακά σωματίδια έχουν την τάση να προσροφώνται στο υπόστρωμα με αποτέλεσμα να αφήνουν «ουρά» κατά μήκος της πορείας διαχωρισμού τους. Για τέτοια σωματίδια ελαττώνεται σημαντικά η ευκινησία. Αντίθετα μικρά κρυσταλλικά σωματίδια δεν αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα και διατηρούν αυξημένη ευκινησία.
Ακόμη η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται επηρεάζει την ευκινησία των ιόντων. Γενικά αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος ελαττώνει την ευκινησία των ιόντων. Ακόμη αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος συνεπάγεται αύξηση της αγωγιμότητας και συνεπώς ισχυρότερη θέρμανση με τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα που αναπτύχθηκαν προηγουμένως.
Εάν η συγκέντρωση του προς διαχωρισμού δείγματος είναι υπερβολικά μεγάλη, παρατηρείται συνήθως διάσπαση στη συνέχεια της σχηματιζόμενης ζώνης. Δηλαδή τα άκρα της ζώνης κινούνται ταχύτερα απ' ότι το μεσαίο τμήμα της ζώνης, λόγω χαμηλότερης συγκέντρωσης της ουσίας σ' αυτά. Το φαινόμενο καλείται αυτοπέδηση (selfslowing) και παρατηρείται στην περίπτωση υπερφόρτωσης του υποστρώματος με υπερβολική ποσότητα δείγματος.
Τέλος σ' έναν ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στον παράγοντα «περιβάλλον» για τον εξής λόγο: Όταν δύο διαφορετικές ουσίες, δηλαδή το υπόστρωμα (π.χ. χαρτί) και το νερό έλθουν σε επαφή φορτίζονται σε σχέση προς άλληλα. Συγκεκριμένα το νερό φορτίζεται θετικά σε σχέση με το χαρτί. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, καθώς το χαρτί είναι ακινητοποιημένο ενώ το νερό είναι ελεύθερο να κινηθεί, το τελευταίο κινείται προς την κάθοδο μεταφέροντας φυσικά μαζί του όλες τις διαλυμένες σ' αυτό ουσίες. Δηλαδή ανεξάρτητα από τη φύση των διαλυμένων ουσιών παρατηρείται μια κίνησή τους προς την κάθοδο. Και όσες μεν από τις ουσίες φέρουν θετικό φορτίο επιταχύνονται προς την κάθοδο λόγω της ιδιαίτερης αυτής ροής του νερού, όσες δε φέρουν αρνητικό φορτίο επιβραδύνονται προς την άνοδο για τον ίδιο λόγο. Από τις τελευταίες θα κατορθώσουν να πλησιάσουν την άνοδο μόνο όσες ουσίες έχουν ταχύτητα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του νερού που είναι αντίθετης φοράς. Ουσίες που δεν φέρουν ηλεκτρικό φορτίο (περίπτωση αμφολυτών στο ισοηλεκτρικό τους σημείο) θα κινηθούν προς την κάθοδο συμπαρασυρόμενες από την κίνηση του νερού. Η κίνηση αυτή του μέσου (νερού) καλείται **ηλεκτροσμωτική ροή (electrosmotic flow).**
Η κίνηση του ηλεκτρολύτη εκφράζεται από τη σχέση (4.16)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$$\mu_e = \frac{z.E}{4\pi n} \qquad (4.16)$$

όπου: μ_e= ηλεκτροσμωτική ευκινησία

z= δυναμικό ζήτα

E= διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

Τα διαχωριζόμενα φορτισμένα σωματίδια παρουσιάζουν την τάση να προσελκύουν στην επιφάνεια τους τα αντιθέτου φορτίου σωματίδια. Η τάση αυτή εμφανίζεται ενισχυμένη στα κολλοειδή, λόγω μεγάλης έκτασης. Έτσι γύρω από το κολλοειδές σχηματίζεται μια εκτεταμένη στοιβάδα αντιθέτου προς αυτό φορτίου, γνωστή σαν **ηλεκτρική διπλή στοιβάδα** (electrical double layer). Η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ σωματιδίου και διπλής στοιβάδας καλείται **δυναμικό** z (zeta potential), αντιστοιχεί δε προς το έργο που απαιτείται για να φτάσει η μονάδα φορτίου από το άπειρο στην εξωτερική επιφάνεια του περιβαλλόμενου από διαλύτη σωματιδίου.

Στην πράξη υπολογίζεται η σχετική ευκινησία (μ_r) του σωματιδίου που ορίζεται σαν το πηλίκον $\mu_r = \frac{\mu_u}{\mu_{st}}$, όπου: μ_u= ευκινησία άγνωστης ουσίας, μ_{st}= ευκινησία πρότυπης ουσίας

Η σχετική ευκινησία λαμβάνει υπ' όψιν το φαινόμενο της ηλεκτρόσμωσης. Τέλος πρέπει να τονιστεί ότι με την τοποθέτηση του δείγματος πάνω στο υπόστρωμα (π.χ. χαρτί), αρχίζει η διάχυση η οποία εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος των φορτισμένων σωματιδίων. Η διάχυση που εξαρτάται επίσης από τον χρόνο, περιορίζεται σημαντικά αν η κλίση δυναμικού (V/cm) είναι μεγάλη, έτσι ώστε ο χρόνος διαχωρισμού να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό.

4.3 Τεχνικές Ηλεκτροφόρησης

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή του κεφαλαίου, η ηλεκτροφόρηση δυνατόν να είναι:

(Α) Ελεύθερου μετώπου

(Β) Ηλεκτροφόρηση ζώνης

(Α) Ηλεκτροφόρηση ελεύθερου μετώπου

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί δοχείο σχήματος U (Σχ. 4-1γ) και πηγή συνεχούς ρεύματος.

Το δοχείο περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα και στα δύο άνω άκρα του φέρει βυθισμένα δύο ηλεκτρόδια που είναι συνδεμένα με την πηγή ρεύματος. Η πηγή τροφοδοτεί το σύστημα με σταθερή κλίση δυναμικού (constant voltage gradient). Το δείγμα τοποθετείται στον πυθμένα του δοχείου το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε υδρόλουτρο (Θ=1°C), έτσι ώστε η θερμοκρασία εντός του δοχείου U να διατηρείται γύρω στους 4°C (όπου d_{H_2O}= max). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μικρές διακυμάνσεις θερμοκρασίας να προκαλούν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ελάχιστη μεταφορά μάζης. Κατά τη δίοδο του, το ηλεκτρικό ρεύμα μέσω δείγματος που περιέχει τα συστατικά Α, Β και Γ, θα δημιουργήσει, ύστερα από χρόνο t τα μέτωπα 1,2 και 3 στο αριστερό τμήμα του δοχείου και τα μέτωπα 4,5 και 6 στο δεξιό τμήμα (Σχ. 4-1 γ). Με το Ο σημειώνεται το αρχικό ύψος του διαλύματος (ρυθμιστικού + δείγματος) στα δύο τμήματα του δοχείου. Όπως φαίνεται ο σχηματισμός των μετώπων γίνεται κατά την κατακόρυφο κατεύθυνση με βάση την πυκνότητα κάθε μετώπου. Δηλαδή τα ελαφρύτερα μέτωπα βρίσκονται πάνω από τα πυκνότερα μέτωπα. Έτσι το συστατικό Γ είναι ελαφρύτερο του μίγματος (Β+Γ) και αυτό ελαφρύτερο εκείνου με συστατικά (Α+Β+Γ). Αντίστοιχα για το δεξιό τμήμα του δοχείου το διάλυμα του συστατικού Α είναι ελαφρύτερο εκείνου των συστατικών (Α+Β) και αυτό αντίστοιχα ελαφρύτερο του διαλύματος των συστατικών (Α+Β+Γ). Η ευκινησία των συστατικών Α,Β και Γ ακολουθεί τη σειρά Α>Β>Γ. Με την παραπάνω πειραματική διάταξη δύνανται να απομονωθούν σε καθαρή κατάσταση μόνο το ταχύτερα κινούμενο συστατικό Α και το βραδύτερο κινούμενο συστατικό Γ. Αυτό αποτελεί το βασικό μειονέκτημα όλων των μετωπικών διαχωρισμών και γιαυτό το είδος αυτό της ηλεκτροφόρησης δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Διακοπή της διέλευσης του ηλεκτρικού ρεύματος στην παραπάνω διάταξη θα καταστρέψει προφανώς τα σχηματισμένα μέτωπα. Η κίνηση των μετώπων παρακολουθείται μέσω κατάλληλου οπτικού συστήματος με βάση τη μεταβολή του δείκτη διάθλασης των μετώπων, κατά τη μετάβαση από αραιότερο σε πυκνότερο διάλυμα.

(Β) Ηλεκτροφόρηση ζώνης

Είναι η τεχνική που χρησιμοποιεί στερεό ή ημιστερεό υπόστρωμα πάνω στο οποίο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός.

Η τεχνική αυτή παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της ηλεκτροφόρησης ελευθέρου μετώπου, όπως: (1) χρησιμοποιεί απλά και φτηνά όργανα που επιτρέπουν ταυτόχρονη ανάλυση αρκετών δειγμάτων (2) επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών του δείγματος πάνω στο υπόστρωμα. (3) Χρησιμοποιεί απλή τεχνική εμφάνισης των ζωνών (4) προσαρμόζεται τόσο για παρασκευαστικούς όσο και για μικροαναλυτικούς σκοπούς. (5) Χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, έργο πολύ δύσκολο για την ΗΕΜ. Μοναδικό μειονέκτημα της ηλεκτροφόρησης ζώνης είναι η ελαττωμένη ακρίβεια και επαναληπτικότητα των αποτελεσμάτων.

Με βάση το συγκεκριμένο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή, ή ηλεκτροφόρηση ζώνης διακρίνεται σε:

(1) Ηλεκτροφόρηση χαρτιού

(2) Ηλεκτροφόριση οξικής κυτταρίνης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

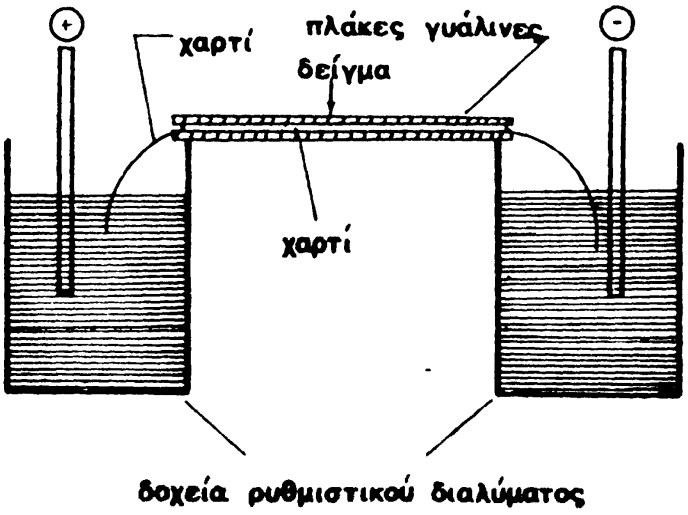
(3) Ηλεκτροφόριση πηκτής (αμύλου, άγαρ, πολυακρυαμιδίου)

(1) Ηλεκτροφόρηση χαρτιού

Το χαρτί χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην ηλεκτροφόρηση στο τέλος της δεκαετίας του '30, αλλά διαδόθηκε μόνο μετά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας χαρτιού οπότε και κατανοήθηκε η σημασία του για τους διαχωρισμούς.

(α) Τεχνική χαμηλής τάσης

Το δείγμα τοποθετείται πάνω σε νοητή ευθεία, εγκάρσια στον κύριο άξονα λουρίδας χαρτιού (Whatman No1, διαστάσεων περίπου 10 x 30 cm) εμποτισμένου με ρυθμιστικό διάλυμα. Τα άκρα του χαρτιού είναι εμβαπτισμένα στους χώρους των δύο ηλεκτροδίων (θετικού και αρνητικού) αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο σχήμα 4-3. Η προσθήκη του δείγματος γίνεται με μικροσιφώνιο (20 μl δείγματος/6 cm πλάτος χαρτιού).

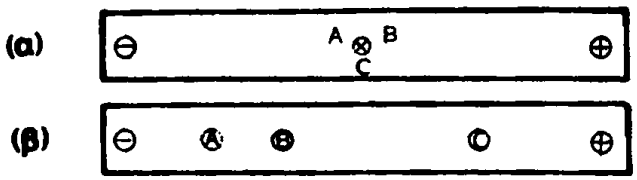


Σχ. 4-3. Ηλεκτροφόρηση χαρτιού.

Στη συνέχεια εφαρμόζεται μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων τάση σταθερής κλίσης π.χ. 5-10 V/cm (συνεχές ρεύμα 1-2 m A/cm), οπότε τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται σε ζώνες με βάση την ηλεκτροφορητική τους ευκινησία. Μετά τον διαχωρισμό των κλασμάτων του δείγματος σε ζώνες (8-16 hrs), το χαρτί απομακρύνεται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου από τη συσκευή ξηραίνεται στους 100°C επί 10 min, για την απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος και την καλύτερη στερέωση ή αδιαλυτοποίηση των κλασμάτων. Ακολουθεί χρώση του χαρτιού με χρωστικές, ανάλογα με τη φύση των κλασμάτων. Έτσι τα κλάσματα καθίστανται έγχρωμα, οπότε και προσδιορίζονται ποσοτικά κατόπιν τοποθέτησης σε σαρωτή (scanner) που λειτουργεί με βάση την πυκνομετρία. Ο σαρωτής συσχετίζει την πυκνότητα του χρώματος κάθε ζώνης με την συγκέντρωσή της. Τα αποτελέσματα ενός

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τέτοιου διαχωρισμού φαίνονται στο σχήμα 4-4.

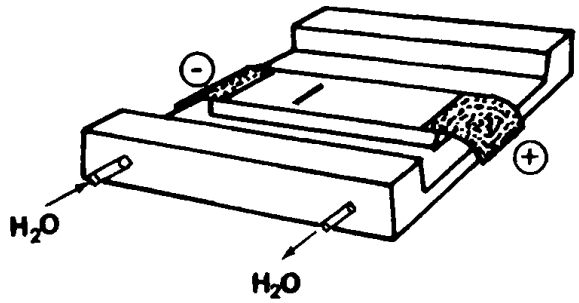


Σχ. 4-4 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός συστατικών A, B και C σε χαρτί.

Με την τεχνική της χαμηλής τάσης διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες του ορού, αμινοξέα, νουκλεοτίδια και υδατάνθρακες.

β) Τεχνική υψηλής τάσης

Στην τεχνική αυτή η εφαρμοζόμενη κλίση δυναμικού είναι μεγαλύτερη από 20 V/cm. Δηλαδή για λουρίδα χαρτιού μήκους 30 ή 40cm η τάση συνολικά υπερβαίνει το 1 KV. Το βασικό πρόβλημα εδώ είναι το αρκετά υψηλό ποσό της εκλυόμενης θερμότητας, που οδηγεί σε ταχεία εξάτμιση του ρυθμιστικού διαλύματος από το χαρτί, πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα τη σύγχιση στις ζώνες των διαχωριζόμενων κλασμάτων. Για το λόγο αυτό το υπόστρωμα (χαρτί) πρέπει να ψύχεται κατά τη διάρκεια της διέλευσης του ηλεκτρικού ρεύματος δια μέσου της συσκευής. Η ψύξη γίνεται με τοποθέτηση του χαρτιού μεταξύ δύο ψυχόμενων μεταλλικών πλακών (σχημ. 4-5).



Σχ. 4-5. Σύστημα ψύξης υποστρώματος (χαρτιού) στην ηλεκτροφόρηση.

Η πιό συνηθισμένη εφαρμογή της τεχνικής υψηλής τάσης είναι ο διαχωρισμός πεπτιδίων και αμινοξέων. Ο διαχωρισμός είναι πλήρης, επιτυγχάνεται σε πολύ μικρό διάστημα και τα αποτελέσματα είναι παρόμοια εκείνων της χρωματογραφίας χαρτιού. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι έστω και ελάχιστη διαφορά στο φορτίο μεταξύ δύο συστατικών (π.χ. αμινοξέων είναι ικανή για το διαχωρισμό τους με την εφαρμογή υψηλής τιμής τάσης.

Η τεχνική αντεδείκνυται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών διότι οι τελευταίες υφίστανται μετουσίωση στις σχετικά υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσο-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νται. Για την ταυτοποίηση πεπτιδίων χρησιμοποιείται ευρέως ο συνδυασμός χαρτοηλεκτροφόρησης και χαρτοχρωματογραφίας. Με τον συνδυασμό των μεθόδων αυτών ταυτοποιήθηκαν οι: ινσουλίνη, ριβονουκλέαση, αλκαλική φωσφατάση, κλάσματα της γ-γλοβουλίνης και αλβουμίνης του ορού κ.α.

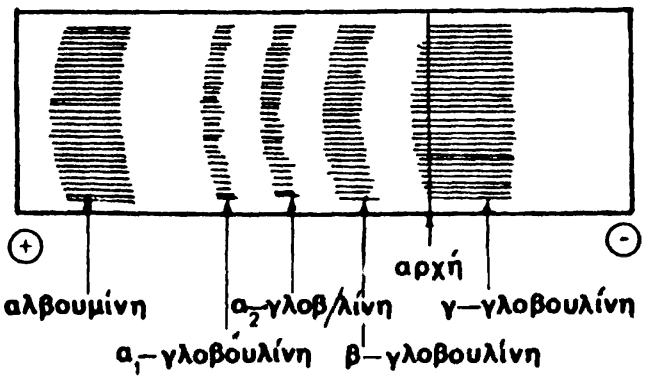
(2) Ηλεκτροφόρηση οξικής κυτταρίνης

Κατά την ηλεκτροφόρηση χαρτιού είναι αναπόφευκτη η προσρόφηση μέρους του δείγματος στους πόρους του χαρτιού πράγμα που παρεμποδίζει μερικά τον διαχωρισμό. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό χρησιμοποιούνται πλάκες από οξική κυτταρίνη η οποία λόγω πλήρους εστεροποίησης των υδροξυλίων στο μόριο της, είναι ουσιαστικά αδρανής.

Ακόμη παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μετά τό τέλος του διαχωρισμού ύστερα από κατεργασία με παραφινέλαιο ή 5-15% οξικό οξύ σε αιθανόλη, διαφανοποιείται. Έτσι μετά τη χρώση των ζωνών τα διαχωρισμένα συστατικά ξεχωρίζουν καλύτερα σε διάφανο φόντο. Τα χρησιμοποιούμενα φύλλα οξικής κυτταρίνης, διαστάσεων 2.5 × 12 cm ή 5 × 20 cm, πάχους 120 μm είναι αδιάλυτα στο νερό, την αλκοόλη και τον αιθέρα και διαλυτά στη φαινόλη, την ακετόνη και σε μίγμα $CHCl_3/C_2H_5OH$ (9:1).

Η συσκευή στην τεχνική αυτή είναι παρόμοια εκείνης που χρησιμοποιείται στην ηλεκτροφόρηση χαρτιού. Για λουρίδα οξικής κυτταρίνης πλάτους 2.5cm προστίθεται δείγμα βάρους 700μg (μέγιστου όγκου 10 μl) σε προσημειωμένη με μολύβι ευθεία. Στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση 6-8 V/cm (0.4 mA/cm, σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=8.6. Μετά την παρέλευση 5-7 hrs για λουρίδα μήκους 20 cm, διακόπτεται η παροχή ρεύματος, τοποθετείται προς ξήρανση η λουρίδα στο φούρνο (100°C, 10 min) και ακολουθεί χρώση των ζωνών, ξήρανση και παρατήρηση.

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών του ορού λαμβάνεται προφίλ του σχήματος 4-6.



Σχ. 4-6. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών του ορού.

Σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με εκείνα της χαρτοηλεκτροφόρησης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

των ιδίων δειγμάτων δείχνει πως με οξική κυτταρίνη λαμβάνονται πιο οξείες ζώνες και καλύτερος διαχωρισμός σε σημαντικά συντομότερο χρόνο.
Η ηλεκτροφόρηση οξικής κυτταρίνης βρίσκει σχεδόν αποκλειστική εφαρμογή στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού.

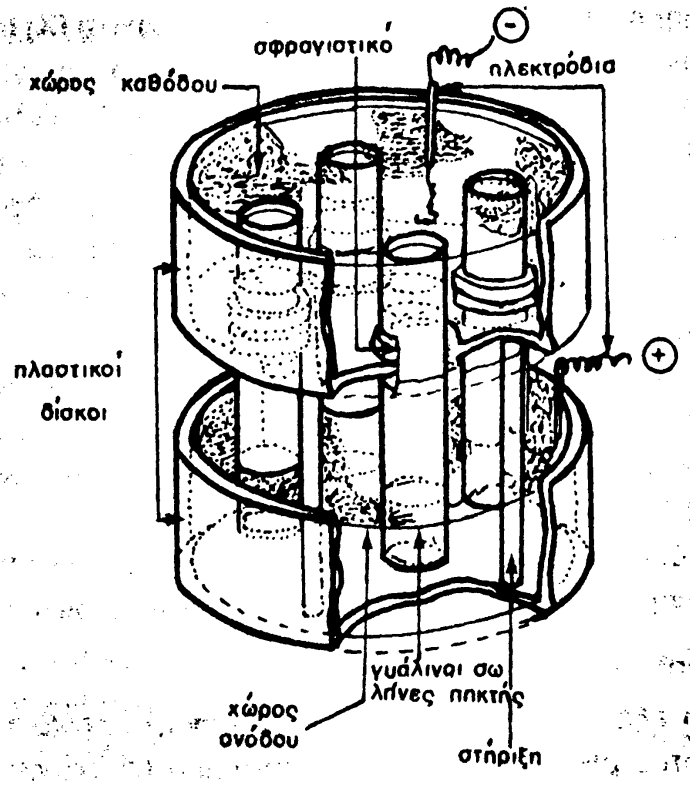
(3) Ηλεκτροφόρηση πηκτής (gel electrophoresis)

Στις αρχές της δεκαετίας του '50 διαπιστώθηκε πως αν τα φύλλα χαρτιού ή οξικής κυτταρίνης αντικατασταθούν από πηκτή (συνθετική ή βιοπολυμερική) αυξάνει κατά πολύ η διαχωριστική ικανότητα του συστήματος.
Σαν πρώτη ύλη για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιούνται τα: άμυλο, άγαρ και πολυακρυλαμίδιο. Η χρησιμοποιούμενη συσκευή είναι παρόμοια με εκείνη του σχημ. 4-3. Η πηκτή παρασκευάζεται χωριστά σε ειδικό γυάλινο δοχείο (perspex) το οποίο προσαρμόζεται όπως φαίνεται στη συσκευή του σχημ. 4-3. Στη συνέχεια χαράσσεται άνοιγμα στο επάνω μέρος του δοχείου της πηκτής για την τοποθέτηση του δείγματος και ξανασφραγίζεται το δοχείο με κερί. Μετά τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και την επίτευξη του διαχωρισμού το δοχείο με την πηκτή αποσυνδέεται από τη λοιπή συσκευή και αποκόπτονται με ειδικό «κόφτη», τα τμήματα του υποστρώματος που φέρουν από μία ζώνη. Οι ζώνες ταυτοποιούνται σύμφωνα με όσα αναπτύχθηκαν προηγουμένως.
Προκειμένου περί αμύλου και άγαρ ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με V=220 V με ρυθμιστικό διάλυμα pH=8.7 σε χρόνο 7-9 hrs,ενώ με το πολυακρυλαμίδιο ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με V=500V(i= 50-60 m A) για πηκτή διαστάσεων 6.5 x 30 cm x 3 mm σε 2hrs.Το σύστημα αυτό απαιτεί ψύξη λόγω σημαντικής αύξησης της θερμοκρασίας. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου δίνει πολύ καλύτερους διαχωρισμούς σε πολύ μικρότερους χρόνους απ' ότι το άμυλο και το άγαρ. Το πολυακρυλαμίδιο για την παρασκευή της αντίστοιχης πηκτής (προϊόν Cyanogum 41) διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα, προστίθεται καταλύτης, αναδεύεται και αφήνεται (2-3 hrs) μέχρις ότου μεταγγιστεί στο ειδικό δοχείο όπου στερεοποιείται σε 3 περίπου hrs. Η τεχνική της πηκτής χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ειδικών ενζύμων,λιποπρωτεϊνών καθώς και για τον καθαρισμό ορισμένων πρωτεϊνικών κλασμάτων.

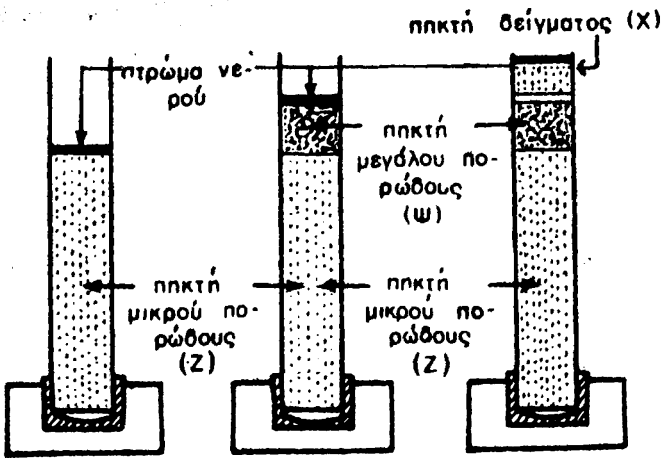
Ηλεκτροφόρηση δίσκου (disk electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής με τη συσκευή που χρησιμοποιήθηκε παραπάνω έχει το βασικό μειονέκτημα ότι είναι χρονοβόρα. Για το λόγο αυτό επινοήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης δίσκου που διαφέρει από την προηγούμενη ως προς τη συσκευή που χρησιμοποιεί (σχ. 4-7α).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



(α)



(β)

Σχ. 4-7. Ηλεκτροφόρηση δίσκου: (α) συνολική συσκευή (β) επί μέρους σωλήνες.

Εδώ ο διαχωρισμός λαβαίνει χώρα κατά την κατακόρυφο κατεύθυνση σε γυάλινους κυλινδρικούς σωλήνες διαστάσεων 6.5 cm x 5mm (διαμ). Σε κάθε σωλήνα παρασκευάζονται τρεις διαφορετικές πηκτές (σχ. 4-7β).

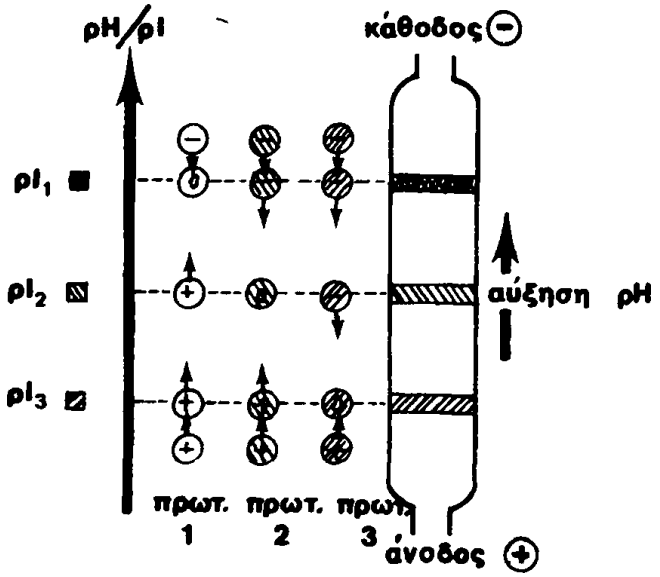
Από κάτω προς τα πάνω παρασκευάζεται πρώτα η πηκτή (Ζ) -μικρού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πορώδους, η πηκτή (Ψ) -μεγάλου πορώδους και η πηκτή (Χ) που περιέχει το προς διαχωρισμό δείγμα. Το δείγμα προστίθεται σε διάλυμα μονομερούς π.χ. ακρυλαμίδιου και αφήνεται να πολυμεριστεί (πηκτή Χ). Τέλος προστίθεται στρώμα νερού στον κάθε σωλήνα που αποκλείει το O_2 το οποίο δρα σαν αναστολέας του πολυμερισμού. Στην πηκτή (Ζ) που δρα, λόγω της μικροπορώδους δομής της σαν «κόσκινο» επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του δείγματος σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (20-30 min), λόγω της «συγκέντρωσης» του τελευταίου σε πολύ μικρή επιφάνεια (δίσκου).
Μετά το τέλος του διαχωρισμού αδειάζονται οι πηκτές από τους σωλήνες με τη βοήθεια λεπτού σύρματος και ακολουθεί χρώση και ταυτοποίηση των ζωνών. Για δείγμα πρωτεΐνης ορού η τεχνική των δίσκων έδωσε 30 συστατικά, ενώ η χαρτοηλεκτροφόρηση έδωσε 7 μόνο συστατικά.
Η τεχνική της δισκοηλεκτροφόρησης βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση αμινοξέων (θρυψίνη, χυμοθριψίνη) και ενζύμων όπως οι φωσφατάσες κ.α.

Γ. Ισοηλεκτρική εστίαση (Electrofocusing)

Είναι η τεχνική εξέτασης των πρωτεϊνών στο ισοηλεκτρικό τους σημείο σε διάλυμα βαθμωτού pH, το οποίο επηρεάζεται από την παρουσία ηλεκτρικού πεδίου. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στο τέλος της δεκαετί-



Σχ. 4-8. Διαχωρισμός τριών πρωτεϊνών (1, 2, 3) σε στήλη με την μέθοδο της ισοηλεκτρικής εστίασης.

ας του '60. Η κλίση του pH (βαθμίδα) δημιουργείται με τη διέλευση συνεχούς ρεύματος μέσω του συστήματος που αυξάνει σταθερά την τιμή του pH από την άνοδο προς την κάθοδο. Το φαινόμενο της ισοηλεκτρικής εστίασης παρατηρείται μόνο σε διάλυμα αμφολυτών, όπως π.χ. οι πρωτεΐνες, οι οποίοι ανά-

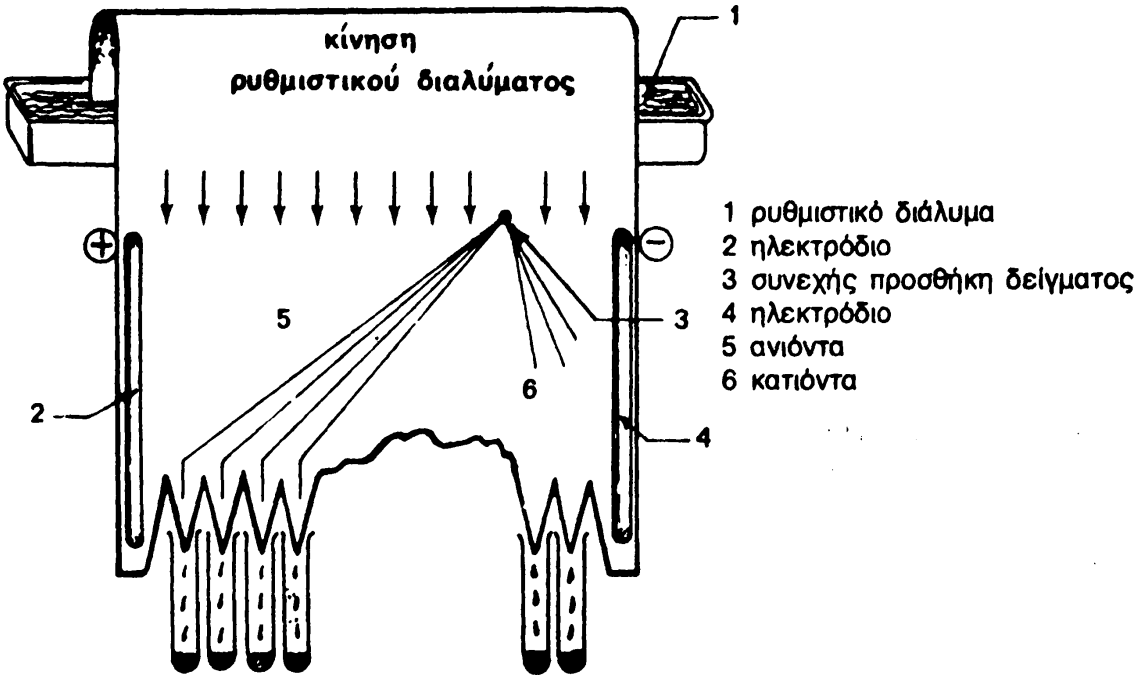
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

λογα με το συνολικό φορτίο τους μετατοπίζονται στο σημείο εκείνο της κλίσης του pH όπου pH=pI όπου pI=ισοηλεκτρικό σημείο του αμφολύτη. (σχ. 4- 8).

Η εφαρμοζόμενη τάση κυμαίνεται μεταξύ 200-1200 V (i≃10 mA). Ο διαχωρισμός (κλασμάτωση) κάτω από αυτές τις συνθήκες επιτυγχάνεται σε 24-72 hrs. Στο τέλος του διαχωρισμού τα κλάσματα συλλέγονται μέσω τριχοειδούς σωλήνα σε ξεχωριστούς συλλέκτες. Στην πράξη ο διαχωρισμός δύο κλασμάτων στο ισοηλεκτρικό σημείο προϋποθέτει ΔpI=0.02 μονάδες pH. Βασικά μειονεκτήματα της τεχνικής είναι (1) η καταστροφή ορισμένων δειγμάτων, όπως οι λιποπρωτεΐνες οι οποίες υφίστανται μετουσίωση και (2) η ελάχιστη διαλυτότητα των αμφολυτών στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Για την αύξηση της διαλυτότητας των αμφολυτών προστίθεται στο διάλυμα ουρία ή αυξάνεται η ιοντική ισχύς του αμφολύτη.

Δ. Ηλεκτροφόρηση συνεχούς ροής (continuous electrophoresis)

Στην περίπτωση κατεργασίας μεγάλων όγκων δείγματος, όπου όλες οι παραπάνω τεχνικές χωλαίνουν χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόριση συνεχούς ροής η οποία είναι συνδυασμός χρωματογραφίας και ηλεκτροφόρησης. (σχ. 4-9).



Σχ. 4-9. Συνεχής ηλεκτροφόρηση.

Η τεχνική χρησιμοποιεί χαρτί με τη βοήθεια του οποίου επιτελείται κατερχόμενη χρωματογραφία. Η τροφοδοσία του ηλεκτρολύτη γίνεται εκ των άνω μέσω σκαφιδίου. Το δείγμα από ρεζερβουάρ μέσω φυτιλιού προστίθεται συνεχώς στο πάνω μέρος του χαρτιού. Καθώς το μίγμα ηλεκτρολύτη-δείγματος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κατέρχεται, δέχεται την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι θετικά φορτισμένα ιόντα θα οδεύσουν προς το ηλεκτρόδιο της καθόδου, ενώ αρνητικά φορτισμένα ιόντα θα οδεύσουν προς την άνοδο. Τα διαχωρισμένα κλάσματα λαμβάνονται σε ξεχωριστούς υποδοχείς στο κάτω άκρο του χαρτιού.
Η τεχνική βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην παρασκευή μεγάλων ποσοτήτων καθαρών ουσιών σε πολύ μικρό χρόνο.

4.4 Εφαρμογές

Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται κυρίως για αναλυτικούς και λιγότερο για παρασκευαστικούς σκοπούς ή για τον προσδιορισμό διαφόρων φυσικών σταθερών. Χρησιμοποιείται δε περισσότερο στην ποσοτική παρά στην ποιοτική ανάλυση μια και μεγάλος αριθμός ενώσεων παρουσιάζουν το ίδιο προφίλ μετακίνησης παρουσία ηλεκτρικού πεδίου.
Οι κύριες εφαρμογές της είναι στην κλινική εξέταση βιολογικών υγρών, όπως των πρωτεϊνών του ορού του αίματος, της ουρίας, των υγρών της σπονδυλικής στήλης, του γαστρικού υγρού κ.α. Επίσης χρησιμοποιείται στην ανάλυση τροφίμων, κυρίως στην μελέτη των πρωτεϊνών τους.
Έχει χρησιμοποιηθεί στην κλασμάτωση των πρωτεϊνών του σιταριού με τις τεχνικές της χαρτοηλεκτροφόρησης[1], της ηλεκτροφόρησης πηκτής αμύλου[2] και πολυακρυλαμιδίου[3] και της ηλεκτροφόρησης δίσκου με πηκτή πολυακρυλαμιδίου[4]. Για την διαφοροποίηση των πρωτεϊνών των δημητριακών π.χ. διαφοροποίηση σιταριών, ανάλογα με την τοπική προέλευσή τους[5]. Για την διαφοροποίηση σιταριών χειμερινής/ανοιξιάτικης σποράς και σκληρών από μαλακά σιτάρια με ηλεκτροφόρηση κινούμενου μετώπου[6]. Για τη διαφοροποίηση μεταξύ διαφόρων ποικιλιών κριθαριού με ηλεκτροφόρηση πηκτής αμύλου[7]. Για τη διαπίστωση της προσθήκης κριθαριού σε αλεύρι από σιτάρι[8] και τον προσδιορισμό μαλακού σιταριού σε σιμιγδάλι και μακαρόνια[9] με την ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου.
Για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των καζεϊνών του γάλακτος με ηλεκτροφόρηση πηκτής[10]. Με την τεχνική αυτή μπορούν να διαφοροποιηθούν δείγματα γάλακτος που έχουν υποστεί διαφορετική θερμική κατεργασία, π.χ. (ωμό γάλα, παστεριωμένο, αποστειρωμένο κ.τ.λ.). Για την ανίχνευση ζελατίνης στο γιαούρτι με χαρτοηλεκτροφόρηση[12].
Για την ανάλυση των πρωτεϊνών του λευκού του αυγού με χαρτοηλεκτροφόρηση[13]. Για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου αυγού σε χυλοπίτες, με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου[14].
Για την ανίχνευση νοθείας σε πρωτεϊνούχα τρόφιμα, π.χ. την νοθεία ανθρώπινου γάλακτος με γάλα αγελάδας, με μέτρηση της περιεκτικότητας σε

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αλβουμίνη/καζεΐνη με χαρτοηλεκτροφόρηση[15]. Της νόθευσης μέχρι ποσοστού 1% αιγείου γάλακτος με αγελαδινό με ηλεκτροφόρηση πηκτής (ακρυλαμιδίου ή αμύλου)[16]. Της νόθευσης, μέχρι ποσοστού 5% γάλακτος βουβάλου με γάλα αγελάδας, πρώτης ύλης για την παρασκευή τυριών τύπου Mozzarella[17]. Της νόθευσης τυριού Roquefort (γάλα προβάτου) με τυρί Bleu (γάλα αγελάδας)[18].

Για τη διαφοροποίηση μεταξύ των πρωτεϊνών διαφόρων ψαριών(ανώτερης/κατώτερης ποιότητας) με ηλεκτροφόρηση δίσκου σε υδατικό εκχύλισμα ωμού ψαριού[19] και θερμικά κατεργασμένου ψαριού[20]. Για τη διαφοροποίηση μεταξύ των πρωτεϊνών κρεάτων (χοιρινό, πρόβειο, βοδινό κ.τ.λ.) με ηλεκτροφόρηση δίσκου αμύλου[21].

Για την ανίχνευση ισταμίνης (όριο ανίχνευσης 0.3 μg) στο κρασί με χαρτοηλεκτροφόρηση[22].

Για τον διαχωρισμό και προσδιορισμό των βιταμινών: θειαμίνη, πυριδοξάλη, ριβοφλαβίνη, νικοτιναμίδιο με χαρτοηλεκτροφόρηση[23].

Για τον διαχωρισμό των βιταμινών του συμπλέγματος B_6 με χαρτοηλεκτροφόρηση[24] κ.α.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Zentner H** Chem and Ind. 317,1 (1960)
2. **Woychik JH, Boundy JA** and **Bimler RJ** Arch Biochem Biophys 94,477 (1961)
3. **Nimmo CC, O'Sullivan MT, Mohammad A** and **Pence JW** Cereal Chem. 40,390 (1963)
4. **Narayan KA, Vogel M** and **Lawrence JM** Analyt Biochem 12,526 (1965)
5. **Koenig VL, Ogrins A, Trimbo HB** and **Miller BS** J. Sci. Food Agric. 15,492 (1964)
6. **Kelley JJ** and **Koenig VL**, J. Sci. Food Agric 14,29 (1963)
7. **Enari TM, Mikola J** and **Nummi M.** Brauwissenschaft 16,189 (1963)
8. **Silano V, d'Errico AM, Muntoni F** and **Pocchiari F** Ann. Inst. Sup. Sanita 3,753 (1967)
9. **Silano V, d'Errico AM Pocchiari F, Tassi Mico C** and **Muntoni F** Ann. Inst. Sup. Sanita 4,641 (1968)
10. **Klermeir F** and **Kirchineir O** Z. Lebensmittelunters u. Forsch. 125,341 (1964)
11. **Bagnulo R, Crisuolo A** and **Pane D** Igiene San. Pubbl. 17,469 (1961)
12. **Padmoyo M** and **Miserez A** Mitt. Geb Lebensmittelunters u. Hyg. 56,110 (1965)
13. **Γαλανού Δ** και **Βουδούρη Ε** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων Αθήνα (1975)
14. **Silano V, d'Errico AM, Micco C, Muntoni F.** and **Pocchiari F** J. Ass. Off. Anal. Chem. 51,1213 (1968)
15. **Padmoyo M** and **Hôgl O** Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. Bern. 50,110 (1959)
16. **Aschattenburg R** and **Dance JE** J. Dairy Res. 35,383 (1968)
17. **Albonico F** and **Resmini P** Boll. Lab. Chim Provinciali 18,143 (1967)
18. **Assenat L.** Lait 47,495 (1967)
19. **Chu. R.** J. Ass. Off Anal. Chem 51,743 (1968)
20. **Mackie IM** Analyst 93,458 (1968)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

21. **Thompson RR** J. Ass. Off Anal. Chem. 51,746 (1968)
22. **Maier HG.** J. Analyt. Chem. 244, 256 (1969)
23. **Chakraborty M** and **Dutta SK** J. Proc. Inst. Chem. India 37,114 (1965)
24. **Aksenova OV** Lab. Delo 10,219 (1964)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

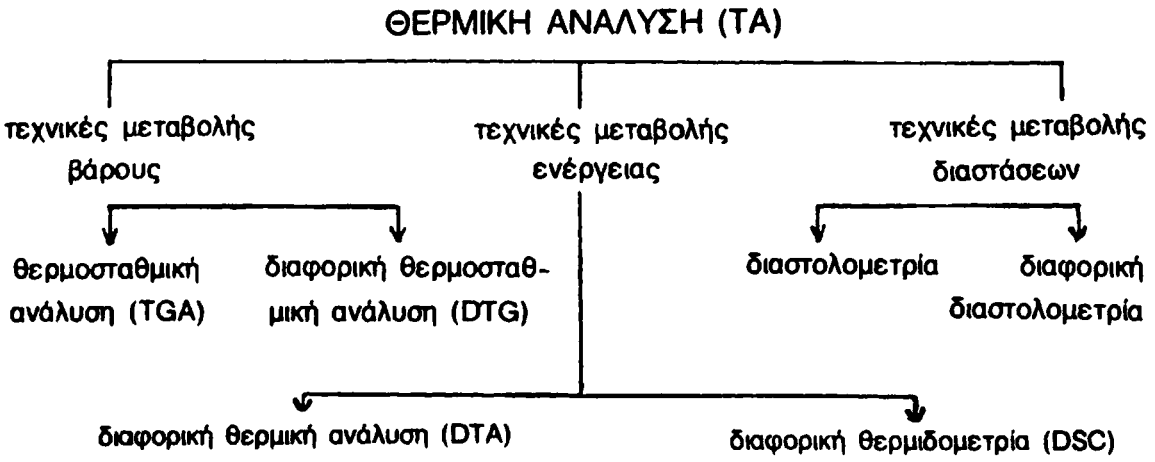
ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

5.1 Εισαγωγή

Η θερμική ανάλυση ανήκει στις νεότερες μεθόδους ανάλυσης των τροφίμων και χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό τα τελευταία 30 χρόνια. Η θερμική ανάλυση περιλαμβάνει τεχνικές ανάλυσης που στηρίζονται στη μέτρηση μεταβολών: (α) ενέργειας (β) βάρους και (γ) διαστάσεων (μήκος, όγκος), που υφίσταται το δείγμα όταν θερμαίνεται. Η κατάταξη των τεχνικών αυτών φαίνεται στον Πίνακα 5.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1

Κατάταξη κυριοτέρων τεχνικών θερμικής ανάλυσης



Το συνθετικό «διαφορική» προστίθεται όταν η τεχνική περιλαμβάνει ταυτόχρονη εξέταση δείγματος και προτύπου, οπότε η χρησιμοποιούμενη συσκευή καταγράφει τη διαφορά σήματος μεταξύ των δύο.

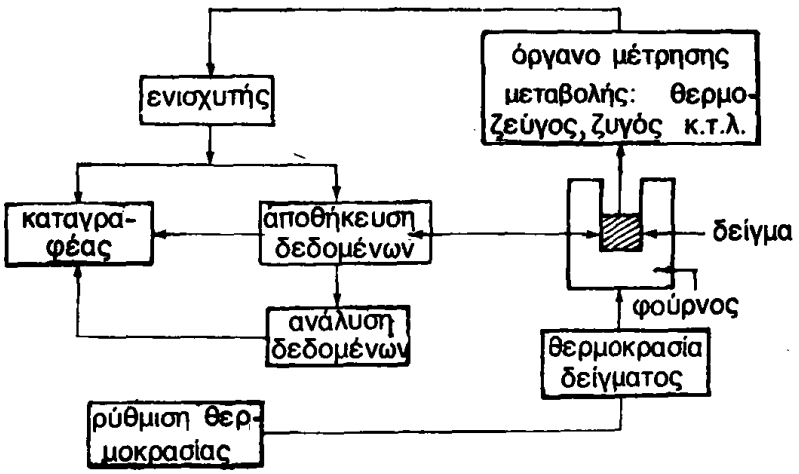
Από τις παραπάνω τεχνικές στην εξέταση των τροφίμων χρησιμοποιούνται κυρίως οι: (1) η διαφορική θερμιδομετρία (DSC, differential scanning calorimetry) και (2) η θερμοσταθμική ανάλυση (TGA, thermogravimetric analysis). Η DSC μετρά το ποσόν της ενέργειας που απαιτείται για να επιτευχθεί εξίσωση θερμοκρασιών ($\Delta T=0$) μεταξύ ενός δείγματος και ενός προτύπου συναρτήσει του χρόνου ή της θερμοκρασίας, όταν αυτά θερμαίνονται ή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ψήχονται ομοιόμορφα. Το ηλεκτρικό σήμα που δημιουργεί το ποσόν της ενέργειας αυτής μετατρέπεται σε κορυφή πάνω σε καταγραφικό χαρτί. Το εμβαδόν κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογο της μεταβολής του θερμικού περιεχόμενου (ενθαλπίας) του δείγματος, ενώ η απόκλιση της κορυφής, θετική ή αρνητική, σε σχέση με την ευθεία εκκίνησης της βελόνας του καταγραφέα δείχνει αντίστοιχα το εξώθερμο ή το ενδόθερμο της μεταβολής. Η TGA μετρά την πρόσληψη ή απώλεια βάρους που υφίσταται το δείγμα συναρτήσει της θερμοκρασίας. Χρησιμοποιείται συνεπώς σε περιπτώσεις όπου το υπό μελέτη τρόφιμο χάνει ή προσλαμβάνει πτητικές ενώσεις προς ή από το περιβάλλον ή ακόμη παρουσιάζει αύξηση του μοριακού του βάρους σαν συνέπεια χημικής αντίδρασης στο σύστημα, π.χ. πολυμερισμός στις λιπαρές ύλες κ.α.

5.2 Οργανολογία

Η βασική διάταξη μιας συσκευής θερμικής ανάλυσης φαίνεται στο Σχήμα 5-1.



Σχ. 5-1. Σύγχρονη συσκευή θερμικής ανάλυσης.

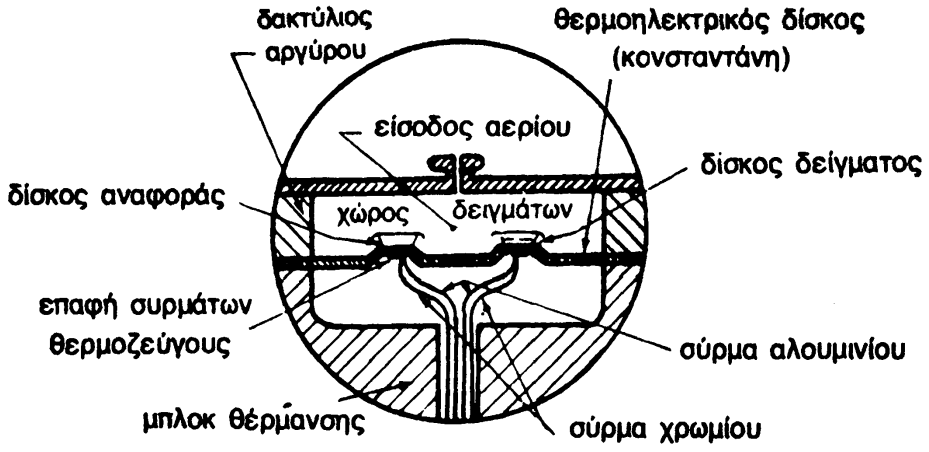
Το όργανο μέτρησης της συγκεκριμένης μεταβολής για μεν την DSC είναι θερμοζεύγος, για δε την TGA αναλυτικός ζυγός.

Α. Διαφορική θερμιδομετρία, (DSC)

Συνήθως το σύστημα θέρμανσης και μέτρησης της ενεργειακής μεταβολής βρίσκονται στον ίδιο χώρο γνωστό σαν κύτταρο DSC (Σχ. 5-2)

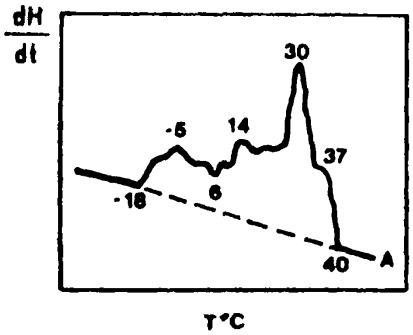
Το κύτταρο DSC χρησιμοποιεί δίσκο από Κονσταντάνη μέσω του οποίου παρέχεται θερμότητα στο δείγμα και το πρότυπο αντίστοιχα. Τα τελευταία, σε ποσότητα 1-50 μg, τοποθετούνται σε ευρύλαιμους υποδοχείς που στηρίζονται στον δίσκο Κονσταντάνης. Η θερμότητα διαβιβάζεται στο δείγμα και το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 5-2. Κάτοψη κυττάρου DSC.

πρότυπο, ενώ η διαφορική θερμική ροή προς το δείγμα και το πρότυπο ελέγχονται με τη βοήθεια θερμοζευγών από χρώμιο/αλουμίνιο που συνδέονται με τη βάση των υποδοχέων. Η διαφορά του σήματος (dH/dt) που προκύπτει από τα διαφορετικά ποσά ροής θερμότητας προς ή από το περιβάλλον μεταξύ των δύο υλικών, κατόπιν ενίσχυσης, τροφοδοτείται στον καταγραφέα όπου μετατρέπεται σε φάσμα κορυφών γνωστό σαν **θερμόγραμμα.** Το πείραμα μπορεί να γίνει ισόθερμα ή με πρόγραμμα μεταβαλλόμενης θερμοκρασίας που κυμαίνεται από 0.1°C/min μέχρι 300°C/min. Στο Σχήμα 5-3 φαίνεται το θερμόγραμμα που αντιστοιχεί στη θέρμανση ζωϊκού λίπους με ρυθμό θέρμανσης 16°C/min.



Σχ. 5-3. Καμπύλη DSC για ζωικό λίπος (λαρδί) με προγρ. θέρμανσης 16°C/min.

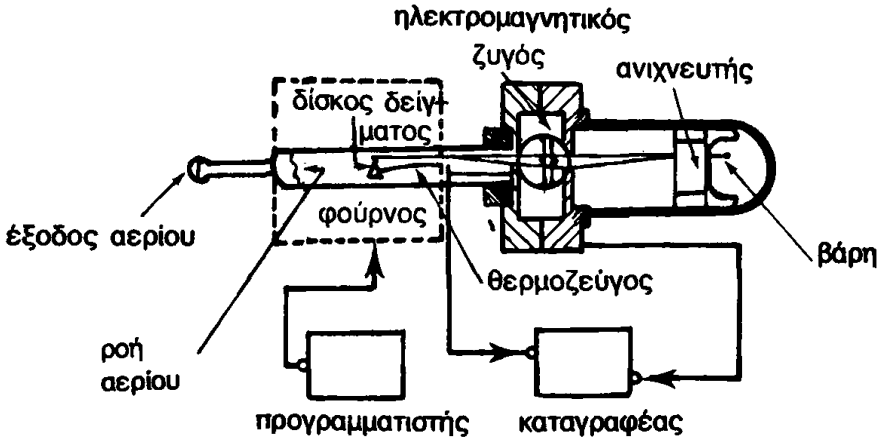
Οι διάφορες κορυφές του σχήματος 5-3 αντιστοιχούν στις θερμοκρασίες τήξης των περιεχομένων στο δείγμα πλήρως κορεσμένων ή μονοακόρεστων τριγλυκερίδων.

Β. Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί σαν οργανολογία το θερμοζυγό, βασική διάταξη

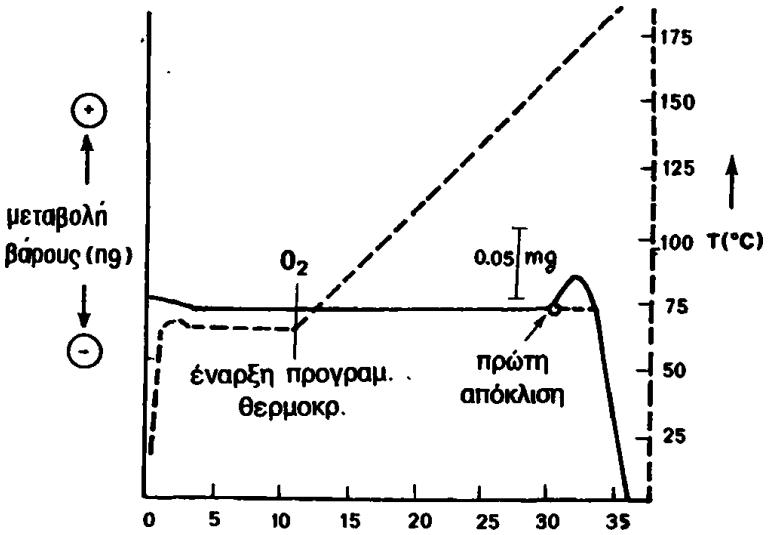
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

του οποίου φαίνεται στο Σχήμα 5-4



Σχ. 5-4. Σχηματική παράσταση θερμοσταθμικού αναλυτή.

Στο θερμοζυγό αντί θερμοζευγών, οι υποδοχείς του δείγματος και του πρότυπου συνδέονται με αναλυτικό ζυγό ο οποίος καταγράφει κάθε χρονική στιγμή το βάρος των παραπάνω υλικών σε σχέση με τη θερμοκρασία. Και εδώ η θέρμανση μπορεί να γίνει ισόθερμα ή με πρόγραμμα ανύψωσης ή ταπείνωσης της θερμοκρασίας. Στο Σχήμα 5-5 δίνεται το θερμόγραμμα για την αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων σε ταγγισμένο σπορέλαιο.



Σχ. 5-5. Μέτρηση της σταθερότητας στην οξείδωση φυτικών λαδιών με θερμοσταθμική ανάλυση. Βάρος δείγματος: 25mg, προγρ. Θερμ: 5°C/min.

Από Burros, 1986

Η αύξηση του βάρους στο δείγμα (Σχ. 5-5), οφείλεται στο σχηματισμό των υδροϋπεροξειδίων, ενώ η επακόλουθη ελάττωση, του βάρους στο δείγμα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

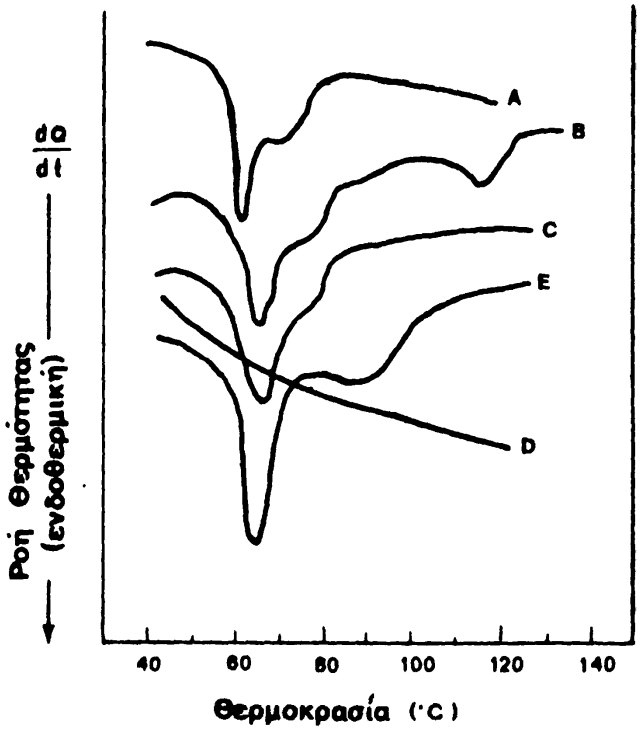
οφείλεται στη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων προς σχηματισμό αλδεϋδών κετονών, αλκοολών και πτητικών υδρογονανθράκων.

5.3 Εφαρμογές

Από τις δύο παραπάνω τεχνικές η διαφορική θερμιδομετρία βρίσκει σαφώς περισσότερες εφαρμογές στην εξέταση των τροφίμων.

Α. Αμυλούχα τρόφιμα

Μία από τις βασικές αντιδράσεις του αμύλου είναι η ζελατινοποίηση η οποία είναι αρκετά σύνθετο φαινόμενο. Περιλαμβάνει την πρόσληψη μορίων νερού από τις κρυσταλλικές περιοχές του αμύλου, με αποτέλεσμα τη διόγκωση των κόκκων του τελευταίου[1]. Στη μορφή αυτή το άμυλο μπορεί να υδρολυθεί από ένζυμα προς γλυκόζη. Αν συνεπώς τρόφιμα πλούσια σε άμυλο δεν θερμανθούν επαρκώς (ατελής ζελατινοποίηση), δημιουργούν προβλήματα πέψης στον οργανισμό. Η ζελατινοποίηση είναι ενδόθερμη μεταβολή που επιτελείται γύρω στους 60°C, συνοδευόμενη από μεταβολή ενθαλπίας της τάξης 2-5 Kcal /g. Ανάλογα με τα λοιπά συστατικά του αμυλούχου τροφίμου και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις των συστατικών αυτών με το άμυλο, θα επηρεάζεται η θερμοκρασία και η μεταβολή της ενθαλπίας για τη ζελατινοποίηση[2-4] (Σχημ. 5-6). Σε άλλες πάλι περιπτώσεις η κορυφή που αντιστοιχεί στην



Σχ. 5-6. Θερμογράμματα DSC απολιπασμένων δειγμάτων άμυλου. [A] πατάτας [B] καλαμποκιού (μη απολιπασμένου) [G] καλαμποκιού [D] ζελατινοποιημένου, καλαμποκιού [E] αρακά.

Από Biliaderis,
Food Chem, 10, 239 (1983)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ζελατινοποίηση πιθανόν να αλληλοεπικαλύπτεται με άλλα φαινόμενα μεταβολών όπως τον πολυμορφισμό των λιπαρών ή τη μετουσίωση των πρωτεϊνών.[4]

Β. Λιπαρά τρόφιμα

Τα λίπη, που συνήθως χρησιμοποιούνται σε προϊόντα όπως σοκολάτα, μαργαρίνη, είδη ζαχαροπλαστικής, γαλακτοκομικά προϊόντα κ.α., για τη βελτίωση της γεύσης και της υφής, αποτελούνται από περισσότερες της μιας κρυσταλλικές μορφές. Οι θερμοδυναμικά ασταθείς μορφές μεταπίπτουν στις αντίστοιχες σταθερές μετά την πάροδο κάποιου χρόνου, πράγμα που αν συμβεί μετά την παραγωγή των τροφίμων μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα ανεπιθύμητες μεταβολές στα οργανοληπτικά κυρίως χαρακτηριστικά των προϊόντων αυτών. Ο πολυμορφισμός αυτός των λιπών μελετάται με διαφορική θερμιδομετρία, αφού το θερμόγραμμα θα δείξει την ενδόθερμο της τήξης κάθε φάσης καθώς και το εξώθερμο της μετάβασης από τη μία μορφή στην άλλη.[5,6]. Το εμβαδόν κάτω από κάθε καμπύλη είναι ανάλογο της εκατοστιαίας περιεκτικότητας κάθε μορφής στο δείγμα. Κατ' επέκταση των παραπάνω μπορεί να υπολογιστεί ο δείκτης SFI (Solid Fat Index), ο οποίος δίνει το ποσοστό στερεού/υγρού κλάσματος στη λιπαρή ύλη σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Ο δείκτης αυτός χρησιμοποιείται στον ποιοτικό έλεγχο των πρώτων υλών στη βιομηχανία των λιπαρών σαν κριτήριο αποδοχής ή απόρριψης αυτών.[7,8]

Ακόμη με τη διαφορική θερμιδομετρία γίνεται μελέτη της οξειδωτικής σταθερότητας των λιπών και ελαίων[9], οπότε από το θερμόγραμμα προσδιορίζεται η περίοδος επώασης στην αυτοξείδωση. Έτσι ο αναλυτής μπορεί εύκολα να προτείνει συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό για την προστασία της αντίστοιχης λιπαρής ύλης.

Γ. Πρωτεϊνούχα τρόφιμα

Αν και η μετουσίωση των πρωτεϊνών αποτελεί θερμικό φαινόμενο μικρής έντασης (3-6 Kcal/g), με την διαφορική θερμιδομετρία είναι δυνατή η διαφοροποίηση των πρωτεϊνών βάσει των ενδόθερμων μετουσίωσής τους.[10] Ακόμη είναι δυνατή η κινητική μελέτη της μετουσίωσης ενζύμων και ο υπολογισμός του χρόνου θερμικής αδρανοποίησης πολλών απ' αυτά. Το τελευταίο έχει άμεση σχέση με την σταθερότητα των τροφίμων.[10]

Δ. Μελέτη της μεταβολής φάσεων του νερού σε τρόφιμα

Η τήξη του πάγου (80 Kcal/g), είναι θερμικό φαινόμενο μεγάλης έντασης και γιαυτό η μελέτη του ενδείκνυται με διαφορική θερμιδομετρία. Συγκεκριμένα με την DSC προσδιορίζεται το ποσοστό του «ελεύθερου» σε σχέση με το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

«δεσμευμένο» ποσό νερού σε δείγματα τροφίμων. Είναι γνωστό ότι συστατικά όπως το άμυλο, τα κόμμεα, τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες, οι γαλακτοματοποιητές κ.α. «δεσμεύουν» το νερό τροποποιώντας τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των τροφίμων. Το εμβαδόν της ενδόθερμου που λαμβάνεται στην DSC με τη θέρμανση κατεψυγμένου δείγματος, είναι μέτρο του ποσού του «ελεύθερου» νερού που περιέχεται στο δείγμα.[11]

Ε. Στα πλαστικά συσκευασίας τροφίμων

Η διαφορική θερμιδομετρία έχει τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της σύστασης των μηχανικών ιδιοτήτων και της θερμικής σταθερότητας πολλών πολυμερών υλικών που χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στη συσκευασία των τροφίμων[12].

Με την τεχνική αυτή προσδιορίζονται παράμετροι, όπως το σημείο τήξης, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και το ποσοστό κρυσταλλικής δομής πλαστικών υλικών συσκευασίας, όπως το πολυστυρόλιο, ο πολυ(αιθυλενοτερεφθαλικός) εστέρας[13] κ.ο.κ. ανεξάρτητα από ή σε συνάρτηση με τα περιεχόμενα σ' αυτά τα τρόφιμα.

Αλλά και η θερμοσταθμική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί σε συστήματα τροφίμων των οποίων η ποιότητα είναι άμεσα συνδεμένη με τη γεύση και την οσμή (πτητικά συστατικά). Η παραπάνω τεχνική επιτρέπει την παρακολούθηση της απώλειας των πτητικών συστατικών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.[14] Ακόμη με τη μέθοδο αυτή προκύπτουν πολύτιμες πληροφορίες για το ποσό του «δεσμευμένου» νερού σε διάφορα τρόφιμα[15].

Κατά την αυτοξείδωση των λιπαρών με το μηχανισμό των ελεύθερων ριζών η αλλυλική αλυσίδα προσλαμβάνει μοριακό οξυγόνο που έχει σαν συνέπεια την αύξηση του μοριακού βάρους της λιπαρής ύλης. Ακολούθως τα σχηματιζόμενα υδροϋπεροξείδια διασπώνται για να σχηματίσουν πτητικά προϊόντα, όπως αλδεΰδες, κετόνες, αλκοόλες κ.τ.λ. με συνέπεια την ελάττωση του μοριακού βάρους της λιπαρής ύλης[9]. Αντίστοιχα με TG και DTG μελετώνται μηχανισμοί αποικοδόμησης πολυπεπτιδίων[16] που περιλαμβάνουν τα στάδια της αφυδάτωσης και αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων τους.

Ακόμη η θερμική ανάλυση χρησιμοποιείται για τη μελέτη διεργασιών όπως αφυδάτωση, αποκαρβοξυλίωση και θερμική αποικοδόμηση οργανικών οξέων που απαντούν σε φυτικά τρόφιμα όπως τα: κιτρικό, τρυγικό, μηλικό[17] κ.α. Τέλος χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό του μηχανισμού θερμικής αποικοδόμησης σακχάρων[18], όπως γλυκόζης, φρουκτόζης κ.α., στη μελέτη της θερμικής αποικοδόμησης της καφεΐνης και θεοβρωμίνης στον καφέ και το κακάο κατά το καβούρντισμα[19], στη μελέτη αποικοδόμησης συνθετικών χρωστικών, όπως το μετά Na άλας του βενζοσουλφονικού οξέος[20], στον προσδιο-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ρισμό της τέφρας τροφίμων σε θερμοκρασία από 1000°–1200°C[21], στον προσδιορισμό της υγρασίας κρεάτων, αλλαντικών και γαλακτοκομικών προϊόντων[22], στον προσδιορισμό του λίπους τυριών και τυροπήγματος[22], σοκολάτας[22] καθώς και του περιεχόμενου σε σάκχαρα ειδών αρτοποιΐας και ζαχαροπλαστικής[22].

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Olkku J** and **Rha C.K.** Food Chem 3, 293 (1978)
2. **Lund D** "Influence of Time, Temperature, Moisture, Ingredients and Processing Conditions on Starch Gelatinization, CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition (20)4, 249 (1984)
4. **Biliaderis CG** J Food Sci 45, 1669 (1980)
5. **Huyghebaert AH** and **Hendricks H** Leben. Wiss und Tech. 4, 59 (1971)
6. **Adenier H** Sci des Aliments 4, 213 (1984)
7. **Walker RC** and **Bosin WA** J.Am. Oil Chem Soc. 48, 50 (1971)
8. **Lambelet P.** Leben Wiss und Tech 15(4), 200 (1983)
9. **Hassel R.L.** J. Am. Oil Chem. Soc 53, 179 (1976)
10. **Wright D.J.** The Study of Protein Behavior in Foods. North America Thermal Analysis Society Notes 15(1), 36, (1983)
11. **Reid D.S** and **Charoenreim S.** DSC Studies of the Starch Water Interaction in the Gelatinization Process, Proc. Thermal Analysis and Food Chem Symp. 14th North Amer. Therm. Anal. Soc. Conf. San Francisco, Sept 15, (1985)
12. **Turi EA** (edit) "Thermal Characterization of Polymeric Materials." Academic Press, N.Y. (1981)
13. **Galli E.** Properties, Testing: Thermal Analysis Plast. Compounds 5, 15 (1984)
14. **Burros BC** Int. Lab. April, 18 (1986)
15. **Berlin E** J. Dairy Sci 54, 300 (1982)
16. **Lorant N.** Nahrung 9,38 and 9,573 (1965)
17. **Wendlandt WW** and **Holberg J A** Anal. Chim. Acta 28, 506 (1963)
18. **Lorant B** and **Boros M** Z. Lebensmittelunters u. Forsch 128,22 (1965)
19. **Lorant B** Nahrung 12, 351 (1968b)
20. **Lorant B** Gordian 68, 483 (1968 c)
21. **Lorant B** Z. Ernähr Wiss.8, 258 (1976 b)
22. **Lorant B** in "Differential Thermal Analysis", Mackenzie RC (edit) Vol II Chp. 44 Academic Press, London (1972)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

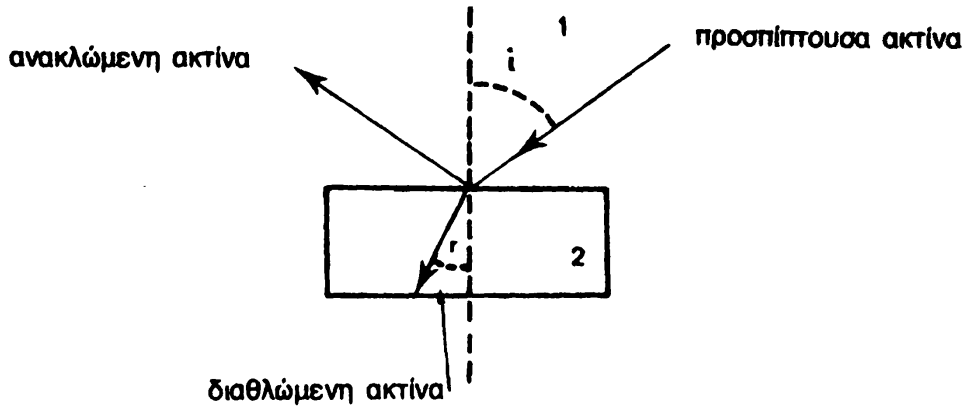
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΔΙΑΘΛΑΣΙΜΕΤΡΙΑ

6.1. Εισαγωγή - Θεωρία Διαθλασιμετρίας

Ο δείκτης διάθλασης, μαζί με το σημείο πήξης και το σημείο ζέσης, αποτελούν χαρακτηριστικές σταθερές των χημικών ενώσεων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στην ποιοτική ανάλυση. Ειδικά η διαθλασιμετρία χρησιμοποιείται επί πλέον στην ποσοτική ανάλυση, στον προσδιορισμό δηλαδή της συγκέντρωσης συστατικού ή συστατικών σε διάλυμα.

Όταν μια ακτίνα φωτός προσπέσει στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ δύο μέσων διαφορετικής οπτικής πυκνότητας 1 και 2, ένα μέρος αυτής θα υποστεί ανάκλαση και το υπόλοιπο θα διέλθει μέσω του μέσου 2, με σύγχρονη αλλαγή διεύθυνσης. Το τελευταίο αυτό φαινόμενο καλείται διάθλαση (σχ. 6-1).



Σχ. 6-1. Ανάκλαση και διάθλαση

Ο λόγος του ημιτόνου της γωνίας πρόσπτωσης, i (incidence angle) προς το ημίτονο της γωνίας διάθλασης, r (refraction angle) καλείται δείκτης διάθλασης, n (refractive index) και ισούται με τον λόγο των ταχυτήτων του φωτός στα δύο μέσα (εξισ. 6.1).

$$n_{2,1} = \frac{n\mu_i}{n\mu_r} = \frac{C_1}{C_2} \qquad (6.1)$$

Το φαινόμενο της διάθλασης εξηγήθηκε από τον Huygens, με την παραδοχή πως κατά την διάθλαση του φωτός επέρχεται μεταβολή στην ταχύτητα του τελευταίου καθώς τούτο διέρχεται από το ένα μέσον στο άλλο. Αυτό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αποδείχτηκε πειραματικά πολύ αργότερα.
Ο δείκτης διάθλασης εξαρτάται από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και συγκεκριμένα αυξάνει με την ελάττωση του. Για το λόγο αυτό οι τιμές του δείκτη διάθλασης στη βιβλιογραφία δίνονται για μονοχρωματικό φως Νατρίου μήκους κύματος 589 nm και για θερμοκρασία 20 ή 25°C και συμβολίζονται με n_D^{20} ή n_D^{25} αντίστοιχα.
Εάν αντί μονοχρωματικής ακτινοβολίας χρησιμοποιηθεί λευκό φως, τούτο θα αναλυθεί σε διαφορετικά χρώματα, αφού η κάθε μία από τις επί μέρους ακτινοβολίες του θα υποστούν διαφορετική εκτροπή. Το φαινόμενο αυτό καλείται σκέδαση (dispersion).
Σημαντική επίδραση στον δείκτη διάθλασης έχει και η θερμοκρασία. Συγκεκριμένα αυξανομένης της θερμοκρασίας, ο δείκτης διάθλασης ελαττώνεται. Για τα υγρά η μεταβολή του δείκτη διάθλασης ανά μονάδα θερμοκρασίας (°C) είναι της τάξης: 4×10^{-4}. Για τα στερεά η μεταβολή του(η)θεωρείται αμελητέα. Για τους παραπάνω λόγους η πειραματικά προσδιοριζόμενη τιμή του δείκτη διάθλασης πρέπει να διορθώνεται στη θερμοκρασία αναφοράς 20 ή 25°C. Στον Πίνακα 6.1 δίνονται οί δείκτες διάθλασης χαρακτηριστικών ουσιών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.1

Δείκτες διάθλασης χαρακτηριστικών ουσιών

ουσία	n_D^{20}	ουσία	n_D^{20}
Μεθανόλη	1.3288	n-Εξάνιο	1.3749
Νερό	1.3328	Κυκλοεξάνιο	1.4266
Ακετόνη	1.3588	Λάδια (φυτικά)	1.4670-1.4800
Αιθανόλη	1.3590	Τολουόλιο	1.4979
Οξικό οξύ	1.3698	Βενζόλιο	1.4979
Οξικός αιθυλ.	1.3701	Πυριδίνη	1.5095

Για τα στερεά (οργανικά) ο δείκτης διάθλασης κυμαίνεται μεταξύ 1.3 και 2.5.
Η προσπάθεια εργασίας με μεγέθη ανεξάρτητα της θερμοκρασίας οδήγησε στον ορισμό της ειδικής διάθλασης r_D (specific refraction):

$$r_D = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{\rho} \qquad (6.2)$$

όπου ρ= πυκνότητα της εξεταζόμενης ουσίας.
Το γινόμενο της ειδικής διάθλασης μιας ουσίας επί το μοριακό της βάρος καλείται μοριακή διάθλαση, R (molar refraction):

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{MB}{\rho} \qquad (6.3)$$

Η μοριακή διάθλαση είναι προσθετική ιδιότητα και είναι αποτέλεσμα των επί μέρους «εκτροπών» κάθε ατόμου ή ομάδας στο μόριο της ουσίας. (Πίνακας 6.2)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.2

Χαρακτηριστικές ατομικές διαθλάσεις

Ομάδα	R	Ομάδα	R
H	1.100	N (τριτοτ. αλειφ. αμιν.)	2.840
C	2.418	N (πρωτοτ. αρωματ. αμιν.)	3.21
C=C	1.733	N (δευτεροτ. αρωματ. αμιν.)	3.59
C≡C	2.398	N (τριτοτ. αρωματ. αμιν.)	4.36
O (καρβονυλ.)	2.211	N (αμιδικ.)	2.65
O (υδροξυλ.)	1.525	αρωματ. αζωτοομάδα	7.30
O (αιθερ.,εστερ.)	1.643	νιτριλομάδα	5.46
S (θειοκαρβονυλ.)	7.97	F	1.00
S (θειολ.)	7. 69	Cl	5.967
N (πρωτοτ. αλειφ. αμιν.)	2.322	Br	8.865
N (δευτεροτ. αλειφ. αμιν.)	2.499	I	13.900

Για το νερό π.χ. από τον Πίνακα 6.2 μπορεί να υπολογιστεί η μοριακή διάθλαση
R=2×1.1 + 1.525 = 3.725

Εφόσον είναι γνωστά το ΜΒ και η πυκνότητα του νερού, από την εξίσωση 6.3 υπολογίζεται ο δείκτης διάθλασης του: n_D^{20} = 1.333 (ταυτοποίηση ουσίας).

Οριακή γωνία διάθλασης

Όταν το φως περνά από αραιότερο σε πυκνότερο οπτικό μέσον, η γωνία διάθλασης αυξάνει με τη γωνία πρόσπτωσης μέχρις ότου η προσπίπτουσα ακτινοβολία συμπέσει με τη διαχωριστική επιφάνεια των δύο μέσων (î=90°). Η τιμή της γωνίας διάθλασης για την οποία η γωνία πρόσπτωσης παίρνει την τιμή 90° καλείται οριακή τιμή γωνίας διάθλασης (critical angle). Είναι δέ:

$$n_{2,1} = \frac{\eta\mu\ 90}{\eta\mu r} = \frac{1}{\eta\mu r} \qquad (6.4)$$

Για οποιαδήποτε τιμή της γωνίας πρόσπτωσης μεγαλύτερης από 90° δεν συμβαίνει διάθλαση, αλλά ολική ανάκλαση.

Η αρχή της οριακής γωνίας διάθλασης χρησιμοποιείται στη μέτρηση του δείκτη διάθλασης στα περισσότερα διαθλασίμετρα.

6.2 Διαθλασίμετρα

Τα διαθλασίμετρα είναι τριών τύπων:

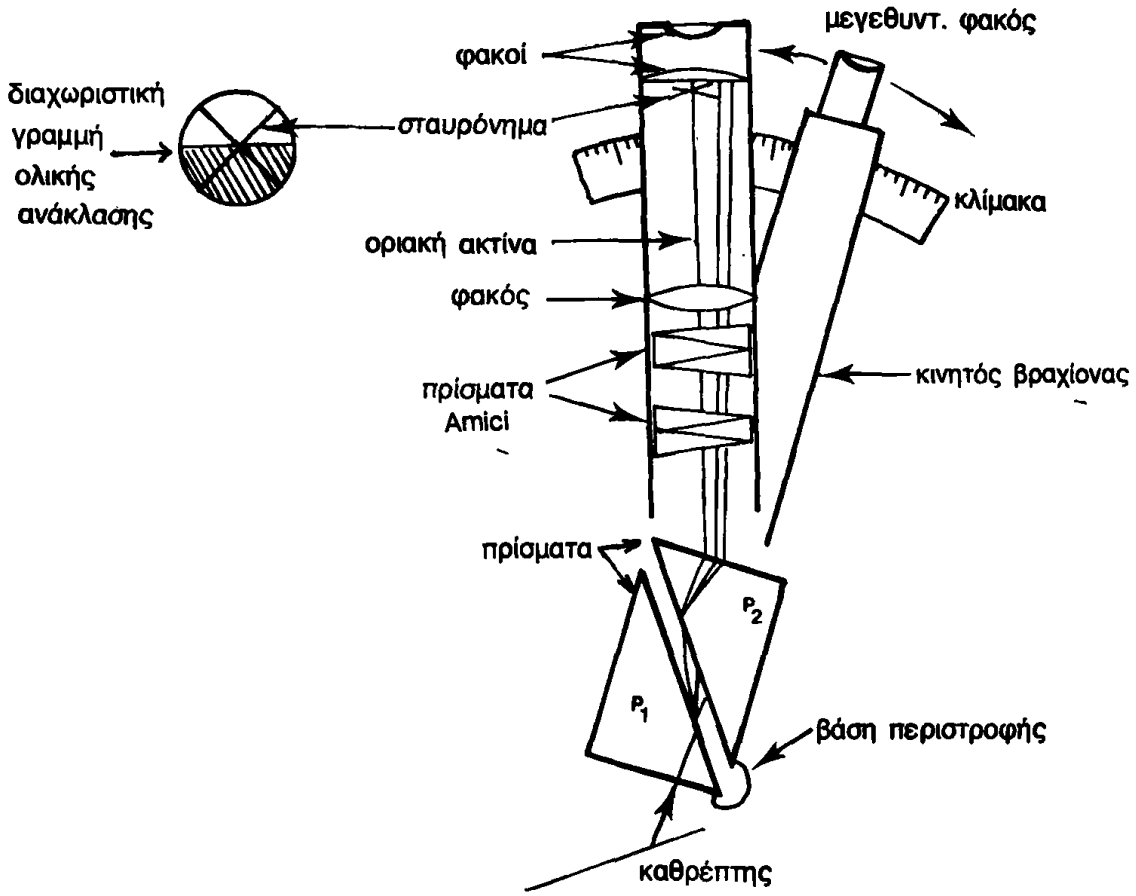
(Α) τύπου Abbé (Β) τύπου Pulfrich και (Γ) τύπου εμβαπτιζόμενου (immersion

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

refractometer).
Απ' αυτά το πρώτο είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο.

(Α) Διαθλασίμετρο Abbé

Το όργανο αποτελείται από: (α) περιστρεφόμενο σύστημα δύο γυάλινων πρισμάτων τοποθετημένων σε μεταλλικά περιβλήματα, μέσω των οποίων κυκλοφορεί νερό για τη διατήρηση της θερμοκρασίας σε σταθερή τιμή. (β) κάτοπτρο που χρησιμεύει σαν πηγή φωτός και (γ) ρυθμιζόμενο προσοφθάλμιο σύστημα στο οποίο παρατηρείται το ποσό του διαθλωμένου φωτός (σχ. 6-2)



Σχ. 6-2. Διαθλασίμετρο Abbé

Το δείγμα, υπό μορφή σταγόνας, προστίθεται στον μεταξύ των δύο πρισμάτων χώρο και τα δύο πρίσματα έρχονται σε επαφή.
Το λευκό φως που ανακλάται πάνω στο κάτοπτρο διέρχεται κάθετα μέσω του πρίσματος (P_1) και προσπίπτει πάνω στο δείγμα. Εκεί υφίσταται μία πρώτη διάθλαση και στη συνέχεια μια δεύτερη, διερχόμενο μέσω του πρίσματος (P_2). Αποτέλεσμα των διαθλάσεων αυτών είναι να μην φωτίζεται όλο το πεδίο στο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

προσοφθάλμιο σύστημα, αλλά μέρος μόνον αυτού. Το όριο διαχωρισμού του φωτεινού από το σκοτεινό τμήμα του πεδίου αντιστοιχεί στην ακτίνα με τη μεγαλύτερη δυνατή τιμή της γωνίας πρόσπτωσης (οριακή γωνία).
Η τιμή της οριακής γωνίας διαφέρει από υλικό σε υλικό, ανάλογα με το δείκτη διάθλασης του καθενός. Έτσι αν βαθμολογηθεί κατάλληλα το οπτικό πεδίο του προσοφθάλμιου συστήματος, όπου δηλαδή φθάνει το διαθλώμενο φως, η οριακή γωνία επιτρέπει τη μέτρηση του δείκτη διάθλασης.
Σε ορισμένα όργανα η μέτρηση πραγματοποιείται με μετακίνηση της διόπτρας του οργάνου μέχρις ότου η διαχωριστική γραμμή μεταξύ φωτεινού και σκοτεινού τμήματος του πεδίου διχοτομήσει τη γωνία του σταυρονήματος. Η θέση της διόπτρας πάνω στην κλίμακα του οργάνου δίνει την τιμή του δείκτη διάθλασης.
Η κλίμακα της διόπτρας καλύπτει την περιοχή τιμών δ.δ. από 1.300 μέχρι 1.700.
Αν και σαν πηγή φωτός χρησιμοποιείται λευκό φως, εν τούτοις με τη βοήθεια δύο πρισμάτων Amici που παρεμβάλλονται μεταξύ του προσοφθάλμιου συστήματος και των κυρίως πρισμάτων P_1 και P_2, απομονώνεται η γραμμή D του Νατρίου που είναι και η μόνη λειτουργική ακτινοβολία, ενώ οι λοιπές αφού υποστούν διάθλαση δεν φθάνουν στο προσοφθάλμιο σύστημα.
Παραλλαγές του διαθλασίμετρου Abbé αποτελούν:
(1) Το βουτυροδιαθλασίμετρο που χρησιμοποιείται για την εξέταση των λιπών και λαδιών και καλύπτει την περιοχή δ.δ. 1.42–1.49.
(2) Το γαλακτοδιαθλασίμετρο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του γάλακτος σε λίπος και καλύπτει την περιοχή δ.δ. 1.33–1.42 και
(3) Το σακχαροδιαθλασίμετρο που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των διαλυμάτων σε καλαμοσάκχαρο και η κλίμακα του είναι υποδιαιρεμένη σε εκατοστιαία περιεκτικότητα σε καλαμοσάκχαρο.

(Β) Διαθλασίμετρο Pulfrich.

Είναι και αυτό διαθλασίμετρο οριακής γωνίας, η δε κλίμακα του καλύπτει την περιοχή δ.δ. 1.30–1.86.

(Γ) Εμβαπτιζόμενο διαθλασίμετρο.

Το διαθλασίμετρο αυτό είναι σχεδόν όμοιο με εκείνο του Abbé.
Το προς μέτρηση υγρό π.χ. σακχαρούχο διάλυμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσης και θερμαίνεται σε υδρόλουτρο με γυάλινο πυθμένα, σε σταθερή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

θερμοκρασία. Στη συνέχεια εμβαπτίζεται το τμήμα του διαθλασίμετρου που φέρει τα πρίσματα μέσα στο δείγμα και με τη βοήθεια καθρέπτη που τοποθετείται κάτω από το υδρόλουτρο, κατευθύνεται το φως δια μέσου του δείγματος προς το πρίσμα του διαθλασίμετρου. Τέλος κατόπιν λεπτής ρύθμισης στο προσοφθάλμιο σύστημα, γίνεται η ανάγνωση πάνω στην κλίμακα του οργάνου. Η περιοχή δ.δ. που καλύπτει η κλίμακα είναι στενή π.χ. 1.3254-1.3664 και εξαρτάται από τα εκάστοτε χρησιμοποιούμενα πρίσματα.
Προ της χρήσης του το διαθλασίμετρο ρυθμίζεται με πρότυπη ουσία π.χ. βρωμοναφθαλένιο ή 1,2 διχλωροβενζόλιο, γνωστού δ.δ. σε ορισμένη θερμοκρασία. Οι επιφάνειες των πρισμάτων πρέπει απαραίτητα να καθαρίζονται ύστερα από κάθε μέτρηση με αλκοόλη ή ξυλόλιο. Ακόμη πρέπει να προφυλάσσονται από πιθανό γραντζούνισμα.
Τέλος σε περιπτώσεις όπου απαιτείται πολύ μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό του δείκτη διάθλασης, της τάξης του 5×10^{-6}, χρησιμοποιείται το διαφορικό διαθλασίμετρο το οποίο μετράει τη διαφορά στον δείκτη διάθλασης του δείγματος και ενός πρότυπου. Το όργανο, αν και ακριβό, χρησιμοποιείται στην εξέταση κλασμάτων έκλουσης χρωματογραφικής στήλης κ.ο.κ.

6.3 Εφαρμογές

Ο προσδιορισμός του δείκτη διάθλασης βρίσκει σημαντικό αριθμό εφαρμογών τόσο στην ποιοτική, όσο και στην ποσοτική ανάλυση των τροφίμων.
Στις λιπαρές ύλες ο δ.δ. αποτελεί κριτήριο ταυτότητας και ποιότητας τους. Στις τελευταίες ο δ.δ. αυξάνει ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων και προς τον αριθμό ιωδίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της υδρογόνωσης των ακόρεστων λιπαρών υλών[1] όπως π.χ. το βαμβακέλαιο, ηλιανθέλαιο κ.α. Από τη σχέση 6.5 όταν είναι γνωστός ο δ.δ. μιας λιπαρής ύλης υπολογίζεται ο αριθμός ιωδίου (I.V) αυτής:

$$n_D^{40} = 1.4515 + 0.0001171\ I.V. \qquad (6.5)$$

Ακόμη ο δ.δ. χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό του βαθμού οξειδωτικής τάγγισης λιπών και ελαίων[2]. Συγκεκριμένα ο δ.δ. αυξάνει με την πρόοδο της αυτοξείδωσης, πιστεύεται δε πως η μεταβολή του αποτελεί ένδειξη της ολοκλήρωσης της επώασης (πρώτο στάδιο αυτοξείδωσης των λιπαρών υλών). Εξ άλλου ο δ.δ. διαλύματος μεταβάλλεται, μέσα σε όρια, αναλόγως προς την συγκέντρωση του διαλύματος $\frac{w}{v}$ έτσι ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση συστατικών του διαλύματος π.χ. το σάκχαρο[3] με την βοήθεια πινάκων. Έτσι ο δ.δ. χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης σακχάρου σε χυμούς φρούτων[4] και σε αλκοολούχα ποτά. Ακόμη γίνεται χρήση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

του δείκτη διάθλασης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υδατοδιαλυτών υδατανθράκων[5] (άμυλο, κόμμεα, αμυλόκολλα) σε προϊόντα όπως σιρόπια[6], μαρμελάδες[7], τοματοχυμό, τοματοπολτό και πάστα ντομάτας[8] (μπελντέ).
Γενικώτερα ο δ.δ. χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαλυτών στερεών σε προϊόντα όπως τα διαλύματα των πρωτεϊνών, η μπύρα, ο χυμός των εσπεριδοειδών[9,10] και τα γαλακτοκομικά προϊόντα,[11] καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου λίπους σε σπόρους,[12] όπως ο βαμβακόσπορος, ο ηλιόσπορος κ.α.
Είναι προφανές ότι τέτοιου είδους προσδιορισμοί καθίστανται δύσκολοι όταν πρόκειται για αδιάλυτα στερεά ή αιωρήματα στερεών. Στις περιπτώσεις αυτές δεν λαμβάνεται σαφής διαχωρισμός του φωτεινού/σκοτεινού πεδίου στο προσοφθάλμιο σύστημα του οργάνου. Για το λόγο αυτό πριν από τη μέτρηση μεσολαβεί διήθηση του προϊόντος προς λήψη διαυγούς υγρού.
Η διήθηση γίνεται με μη απορροφητικό ύφασμα και όχι διηθητικό χαρτί, γιατί το τελευταίο δίνει εσφαλμένο δ.δ. Αντί διήθησης μπορεί να εφαρμοστεί και η υπερφυγοκέντριση.
Για την περίπτωση προσδιορισμού διαλυτών στερεών παρουσία αδιαλύτων στερεών π.χ. μαρμελάδα ισχύει η σχέση:

$$X = \frac{A(100-B)}{100} \qquad (6.6)$$

όπου: X=% διαλυτά στερεά στο προϊόν
A=% διαλυτά στο νερό στερεά, όπως προσδιορίζονται με το διαθλασίμετρο.
B=% αδιάλυτα στερεά

Για τους χυμούς εσπεριδοειδών, τα κιτρικό οξύ και ιμβερτοσάκχαρο επηρεάζουν τα αποτελέσματα του δ.δ. Γι' αυτό είναι αναγκαίο στις περιπτώσεις αυτές να χρησιμοποιούνται συντελεστές διόρθωσης (χρήση πινάκων). Για τα προϊόντα αυτά καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται με το αραιόμετρο Brix (βλ. κεφ. 8).
Για το διήθημα προϊόντων τομάτας (πολτός, χυμός κτλ.) ισχύει ό,τι και για τα σακχαρούχα διαλύματα. Ο δ.δ. δηλαδή αυξάνει αναλογικά με τη συγκέντρωση των στερεών μέχρι 20-25%, και πάνω από το 25% εκθετικά. Ο δ.δ. των λιπαρών, όπως ήδη αναφέρθηκε μετρείται με το βουτυροδιαθλασίμετρο στους 25° C για τα λάδια και στους 40° C για τα λίπη.
Ο προσδιορισμός της % περιεκτικότητας των τροφίμων σε λίπος, στηρίζεται στο γεγονός ότι διάλυμα λιπαρής ύλης σε διαλύτη με υψηλό δ.δ. παρουσιάζει ελάττωση του δ.δ αναλογικά με το ποσό του λίπους που περιέχει το διάλυμα.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Επιλέγεται συνήθως διαλύτης με υψηλό σημείο ζέσης για να αποφευχθεί η εξαέρωση του τελευταίου κατά την εκχύλιση. Κατά καιρούς έχουν προταθεί σαν διαλύτες τα: χλωροφόρμιο, βενζυλική αλκοόλη, τετραϋδροναφθαλένιο, βενζόλιο, χλωροβενζόλιο και α-βρωμοναφθαλένιο.
Η εκχύλιση του λίπους γίνεται σε τεμαχισμένο και ομογενοποιημένο δείγμα (2-5g) με την προσθήκη του οργανικού διαλύτη, συνήθως α-βρωμοναφθαλενίου, νέα ομογενοποίηση, διήθηση και μέτρηση δ.δ. σταγόνων του διηθήματος στο διαθλασίμετρο[13]. Το επί τοις εκατό λίπος (Λ%) δίνεται από τη σχέση 6.7

$$\Lambda\% = \frac{100\ V \cdot d(n_1 - n_2)}{w\ (n_2 - n)} \qquad (6.7)$$

όπου: V= όγκος α-βρωμοναφθαλενίου
d= πυκνότητα λίπους (συνήθως 0.91 gr/ml)
n_1= δ.δ. α-βρωμοναφθαλενίου
n_2= δ.δ. δείγματος
n= δ.δ. λίπους (1.469 στους 25°C)
w=βάρος δείγματος σε gr.

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε το λίπος σε κρεατοσκευάσματα[14], σούπες[15] κ.α. Ακόμη διαθλασιμετρικά είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η αλκοόλη σε αλκοολούχα ποτά όπως κρασί[16] και μπύρα[17] με την προϋπόθεση πως έχει γίνει η απαιτούμενη ρύθμιση του συστήματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται εμβαπτιζόμενο διαθλασίμετρο και αραιόμετρο που δίνει την πυκνότητα του δείγματος. Από τον δ.δ. και την πυκνότητα, βάσει πινάκων προσδιορίζεται το περιεχόμενο σε αλκοόλη.

Δείκτης διάθλασης μιγμάτων ή διαλυμάτων

Η μέτρηση αυτή είναι σημαντική γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αναλογίας κάθε συστατικού σε μίγμα ή διάλυμα. Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό των προϊόντων έκλουσης χαρτιού, στήλης ή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, όπου το δείγμα είναι αναμιγμένο με διαλύτη. Ο δ.δ. του μίγματος θα μεταβάλλεται γραμμικά με το μοριακό κλάσμα κάθε συστατικού. Επειδή όπως αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου οι δείκτες ειδικής και μοριακής διάθλασης είναι προσθετικές ιδιότητες είναι δυνατόν να υπολογιστεί ο δείκτης ειδικής διάθλασης μίγματος από τους αντίστιχους δείκτες των συστατικών Α και Β μίγματος με εφαρμογή της εξίσωσης (6.8).

$$z.r_\mu = xr_A + yr_B \qquad (6.8)$$

όπου: x = βάρος συστατικού A(gr), ειδικής διάθλασης r_A
y = βάρος συστατικού B(gr), ειδικής διάθλασης r_B

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

z = βάρος μίγματος (gr) ειδικής διάθλασης r_μ

Παράδειγμα:
20 ml μίγματος ξυλολίου και τετραχλωράνθρακα έχει πυκνότητα 1.2156 και n_D^{25} =1.4338. Το καθαρό ξυλόλιο έχει πυκνότητα 0.8570 και n_D^{25}=1.4915. Ενώ ο καθαρός τετραχλωράνθρακας έχει πυκνότητα 1.5816 και n_D^{25}= 1.4562. Να υπολογιστεί η % σύσταση του μίγματος.
Κατ' αρχήν υπολογίζονται οι δείκτες ειδικής διάθλασης για καθεμιά από τις καθαρές ουσίες, με βάση την εξίσωση 6.2:

για το ξυλόλιο: $$r = \frac{(1.4915)^2-1}{(1.4915)^2+2} \times \frac{1}{0.8570} = 0.3382$$

για τον τετραχλωράνθρακα: $$r = \frac{(1.4562)^2-1}{(1.4562)^2+2} \times \frac{1}{1.5816} = 0.1719$$

για το μίγμα: $$r = \frac{(1.4738)^2-1}{(1.4738)^2+2} \times \frac{1}{1.2156} = 0.2311$$

Αν x τα gr τετραχλωράνθρακα και y τα gr του ξυλολίου τότε:
gr μίγματος = 20 ml × 1.2156 =24.31 gr
συνεπώς x+y=24.31 (6.9)
ακόμη από τη εξίσωση 6.8 είναι:
0.1719 x + 0.3382 y=(24.31) (0.2311) = 5.618 (6.10)
Από τις (6.9) και (6.10) → x =15.66 gr και y = 8.65 gr ή 64.4% τετραχλωράνθρακας και 35.6% ξυλόλιο.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Pickering G.F.** and **Cowlishaw G.E.** J. Soc. Chem. Ind. 41, 74 (1922)
2. **Arya SS. Ramanyjan S** and **Vijayaraghavan PK** J.Amer. Oil Chem. Soc. 46, 28 (1969)
3. **Glover F.A.** and **Goulden J.D.** Nature 200, 1165 (1963)
4. **Buss C.D.** Food Tech 15, 327 (1961)
5. **Bellingham** and **Stanley Ltd** pamphlet, Polyfract works, Longfield Rd, Tunbridge Wells, Kent, TN 2 3 EY, England
6. **AOAC** Assoc. of Off. Anal. Chem. Horwitz W (edit) Wash DC (1975)
7. **Macava T.** Analyst 56, 391 (1931)
8. **Lamb F.C.** J. Assoc. Off Agr. Chem 50, 690 (1967)
9. **Higby WK and Ricke AA** Food Tech (17)5, 138 (1963)
10. **Scott W.C., Morgan D.A** and **Veldhuis M.K.** Food Tech. 14, 423 (1960)
11. **Goulden J.D.S.** J Dairy Res. 30, 411 (1963)
12. **Zeleny L. J** Assoc Off. Agr. Chem. 20, 421 (1937)
13. **Ασκήσεις Χημείας Τροφίμων**, Τμήμα Χημείας, Παν/πιο Ιωαννίνων (1985)
14. **Rudischer S.** Z Lebensmittelunters u. Forsch 128, 1 (1965)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

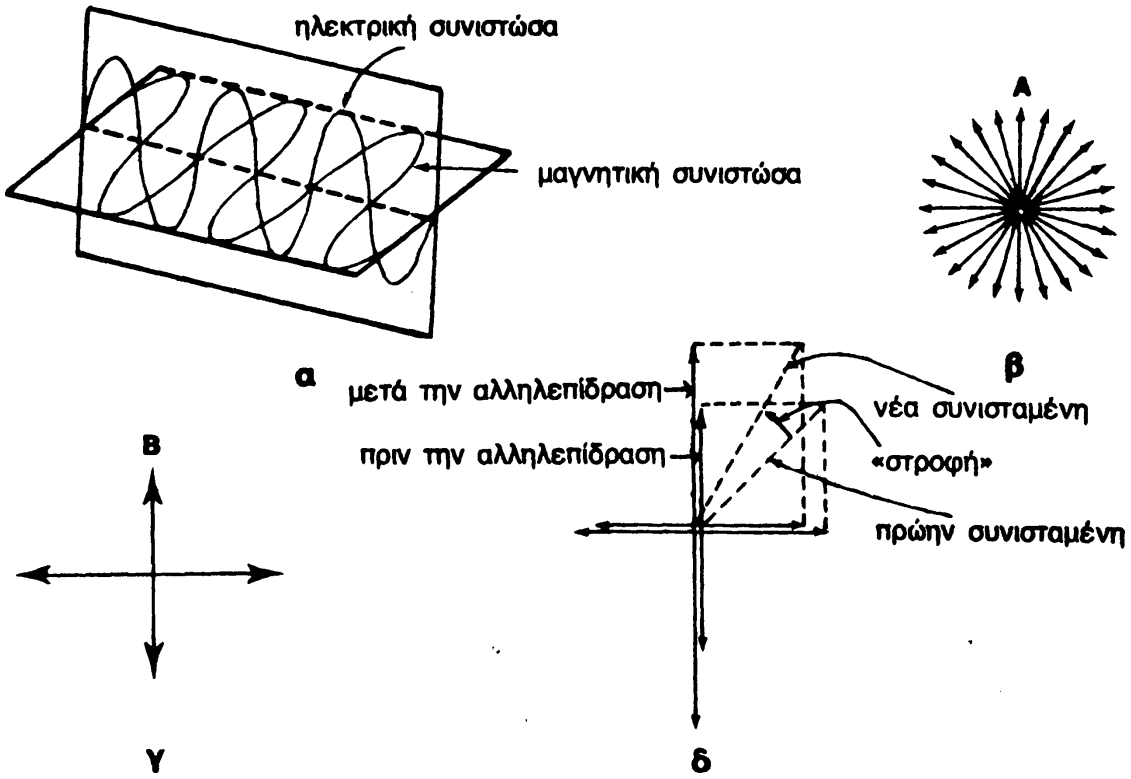
15. **Eberhardt Kh. and Bognar A** Dt. Lebensmittel Rdsch. 62, 145 (1966)
16. **Dixon BE, Sexton GE and Mayne TG.** Chem. and Ind. 1873 (1963)
17. **Vasarhelyi G and Kasco F** Brauwissenschaft 16, 148 (1963)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΟΛΩΣΙΜΕΤΡΙΑ

7.1. Θεωρία

Είναι γνωστό πως η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελείται από δύο συνιστώσες, την ηλεκτρική και την μαγνητική, οι οποίες συμπεριφέρονται σαν να βρίσκονται υπό ορθή γωνία μεταξύ τους (σχ. 7-1α)

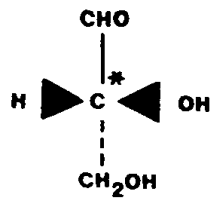


Σχ. 7-1. (α) Συνιστώσες της ακτινοβολίας (β) μη πολωμένη ακτινοβολία (γ) πολωμένη ακτινοβολία (δ) στροφή της ακτινοβολίας

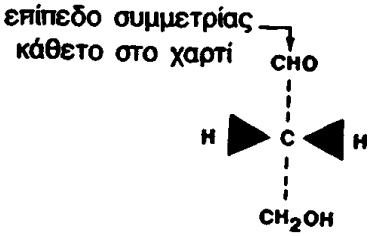
Στην πραγματικότητα το φως που εκπέμπει π.χ. ένας λαμπτήρας αποτελείται από ακτίνες με άπειρες κατευθύνσεις των δύο παραπάνω συνιστωσών του φωτός. Η ακτινοβολία αυτή ονομάζεται μη πολωμένη (Σχ. 7-1β). Αν όμως απομενωθούν όλες οι ακτίνες πλήν εκείνων προς μία κατεύθυνση π.χ. την κατακόρυφη ή την οριζόντια τότε η ακτινοβολία καλείται πολωμένη ως προς επίπεδο (plane polarized) (Σχ. 7-1γ).

Έχει δειχτεί πως οργανικά μόρια, όπως η D-γλυκεριναλδεΰδη η οποία έχει ασύμμετρο άτομο άνθρακα και επί πλέον δεν έχει κανένα στοιχείο συμμετρίας στρέφουν το επίπεδο πόλωσης του πολωμένου φωτός (σχ. 7-1 δ). Αντίθετα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



D-γλυκεριναλδεΰδη



3-υδροξυ-προπανόλη

ενώσεις όπως η 3-υδροξυπροπανόλη η οποία έχει στοιχεία συμμετρίας δεν στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Για την εξήγηση του φαινομένου της στροφής του επιπέδου του πολωμένου φωτός προτάθηκε η αλληλεπίδραση του ταλαντουμένου ηλεκτρικού πεδίου του φωτός με το ηλεκτρικό πεδίο το παραγόμενο από τα ηλεκτρόνια της μελετώμενης ουσίας. Ενώσεις που στρέφουν το επίπεδο πολωμένου φωτός καλούνται οπτικώς ενεργοί (optically active). Αυτές που το στρέφουν δεξιά (κοιτάζοντας την πηγή του φωτός) καλούνται δεξιόστροφες (dextrorotatory) και συμβολίζονται με (+), εκείνες δε που το στρέφουν αριστερά καλούνται αριστερόστροφες (levorotatory) και συμβολίζονται με (−). Οπτικώς ενεργά είναι τα σάκχαρα (τριόζες, τετρόζες, πεντόζες και εξόζες), ορισμένα αμινοξέα, τερπενικά σώματα, στεροειδή κ.α.

Α. Βασική εξίσωση της πολωσιμετρίας

Η γωνία στροφής του επιπέδου του πολωμένου φωτός από διάλυμα οπτικά ενεργού ουσίας εξαρτάται: (α) από το μήκος κύματος της χρησιμοποιουμένης ακτινοβολίας, (β) από το πάχος του διαλύματος της ουσίας μέσω της οποίας διέρχεται η ακτινοβολία, (γ) από τη φύση της μετρούμενης ουσίας και του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και (δ) από τη θερμοκρασία. Σαν **ειδική στροφή** (specific rotation) ορίζεται η γωνία σε μοίρες κατά την οποία στρέφεται το επίπεδο του πολωμένου φωτός από διάλυμα ουσίας συγκέντρωσης (1g/ml), όταν το πάχος της χρησιμοποιούμενης κυψελίδας είναι 10 cm. Συμβολίζεται δε:

$$[\alpha]_{\lambda}^{T^{\circ}} = \frac{100\alpha}{c \cdot l} = \frac{100\alpha}{\rho \cdot d \cdot l} \qquad (7.1)$$

όπου: α= η παρατηρούμενη γωνία στροφής

l= πάχος διαλύματος (dm)

c= συγκέντρωση ουσίας (g/100ml)

T°= θερμοκρασία μέτρησης (συνήθως T = 20°C)

λ= μήκος κύματος του στοιχείου, η μονοχρωματική ακτινοβολία του ο-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ποίου χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση (συνήθως λ=η γραμμή D του Na)

p = % περιεκτικότητα ουσίας στο διάλυμα (w/v)

d = πυκνότητα διαλύματος (g/ml)

Αντίστοιχα σαν μοριακή στροφή $[M]_\lambda^T$ ορίζεται το γινόμενο:

$$[M]_\lambda^T = [\alpha]_\lambda^T \cdot \frac{MB}{100} \qquad (7.2)$$

Στον Πίνακα 7.1 δίνονται οι ειδικές στροφές μερικών συνηθισμένων ουσιών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.1

Ειδικές στροφές χαρακτηριστικών ενώσεων

οπτικά ενεργή ένωση	διαλύτης	$[\alpha]_D^{20}$
β-D-γλυκόζη	νερό	+ 52.7
β-D-φρουκτόζη	νερό	- 92.4
β-λακτόζη	νερό	+ 55.4
β-μαλτόζη	νερό	+130.4
σακχαρόζη	νερό	+ 66.5
βιταμίνη D_2	χλωροφόρμιο	+ 52.0
βιταμίνη D_2	ακετόνη	+ 82.6
χοληστερόλη	χλωροφόρμιο	- 39.5

Από την εξίσωση (7.1) κατόπιν επίλυσης ως προς την συγκέντρωση c προκύπτει η εξίσωση (7.3)

$$c = \frac{100\alpha}{l \cdot [\alpha]_\lambda^T} \qquad (7.3)$$

Η σχέση αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης διαλύματος σε οπτικά ενεργή ουσία,

Συνήθως αποφεύγονται μετρήσεις σε διαλύματα με περιεκτικότητα μεγαλύτερη του 10%.

Β. Πολυστροφισμός

Κατά την μέτρηση της ειδικής στροφής διαλυμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν το φαινόμενο του πολυστροφισμού (mutarotation), η ιδιότητα δηλαδή ορισμένων ουσιών, όπως τα σάκχαρα, να στρέφουν κατ' αρχήν το επίπεδο του πολωμένου φωτός εντονώτερα απ' ότι μετά πάροδο 24 ωρών. Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας που επέρχεται μεταξύ των

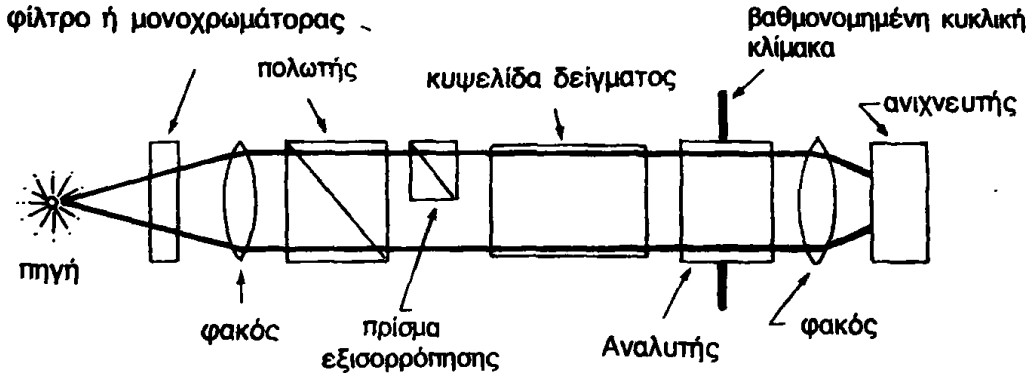
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στερεοΐσομερών μορφών σε διάλυμα, οι ειδικές στροφές των οποίων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, π.χ. σε διάλυμα η α-D-γλυκόζη παρουσιάζει ελάττωση της ειδικής στροφής της από +112° σε + 52.7°, όπου και σταθεροποιείται σε 4.5 ώρες. Ταυτόχρονα διάλυμα β-D-γλυκόζης παρουσιάζει αύξηση της ειδικής στροφής του από+18.7° σε + 52.7°, όπου και σταθεροποιείται. Ο χρόνος αυτός, ο απαραίτητος για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ των ισομερών μορφών των σακχάρων πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν στις μετρήσεις της ειδικής στροφής.

Ο πολυστροφισμός αίρεται με σύντομο βρασμό ή κατόπιν προσθήκης ολίγων σταγόνων NH_3 στο διάλυμα. Σε αλκαλικό περιβάλλον η επίτευξη της ισορροπίας γίνεται ταχύτατα.

7.2 Πολωσίμετρα

Το όργανο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της «οπτικής στροφής» καλείται πολωσίμετρο (polarimeter). Η βασική διάταξη του οργάνου αυτού φαίνεται στο σχήμα 7-2.



Σχ. 7-2. Σχηματικό διάγραμμα πολωσίμετρου

Το πολωσίμετρο αποτελείται από τα παρακάτω βασικά στοιχεία:

1. πηγή ακτινοβολίας
2. μονοχρωμάτορα
3. πολωτή
4. κυψελίδα δείγματος
5. αναλυτή
6. συστήματα ανίχνευσης (προσοφθάλμιο σύστημα).

1. Πηγή ακτινοβολίας

Ο βαθμός κατά τον οποίο στρέφεται το επίπεδο πόλωσης της ακτινοβολίας εξαρτάται μεταξύ άλλων και από το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης

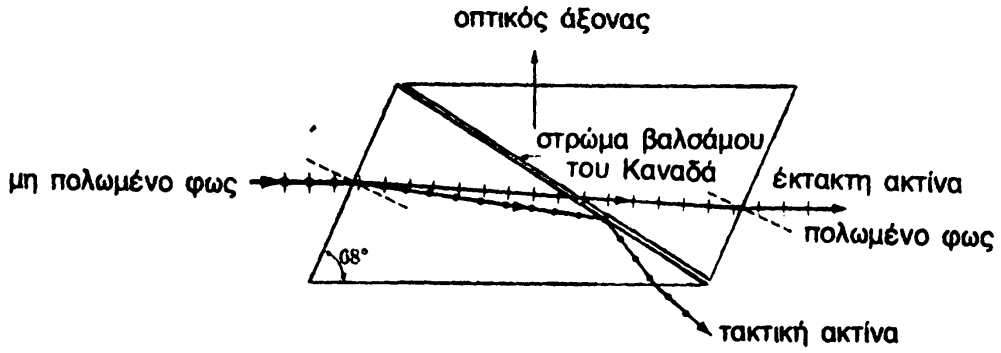
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ακτινοβολίας. Συνήθως χρησιμοποιείται η μονοχρωματική ακτινοβολία που εκπέμπει λυχνία ατμών νατρίου ή λυχνία ατμών υδραργύρου.

2. Μονοχρωμάτορας (βλ. κεφ. 3)

3. Πολωτής

Είναι συνήθως σύστημα πρισμάτων στο οποίο επιτυγχάνονται η πόλωση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πολωτών που στηρίζονται στο φαινόμενο της ανάκλασης, του διχρωϊσμού ή της διπλής διάθλασης. Στους τελευταίους ανήκουν τα πρίσματα Nicol, η αρχή λειτουργίας των οποίων φαίνεται στο σχήμα 7-3.



Σχ. 7-3. Πόλωση με πρίσμα Nicol

Όταν φυσικό (μη πολωμένο) φως προσπέσει υπό τυχαία γωνία πάνω σε ανισότροπο υλικό, κατά τη διάθλαση διαχωρίζεται σε δύο ακτίνες πολωμένες με επίπεδα ταλάντωσης κάθετα μεταξύ τους (διπλή διάθλαση, birefringence). Η μία ακτίνα, που καλείται τακτική (ordinary ray) έχει το ηλεκτρικό της πεδίο παράλληλο προς τον οπτικό άξονα του κρυστάλλου και η δεύτερη, που καλείται έκτακτη (extraordinary), έχει ηλεκτρικό πεδίο παράλληλο προς τον οπτικό άξονα του κρυστάλλου. Κατόιτιν κοπής του κρυστάλλου υπό ορισμένη γωνία και συγκόλησης των δύο τμημάτων με ειδική ισοτροπική ουσία (Canada balsam), η μεν τακτική ακτίνα υφίσταται ολική ανάκλαση στη διαχωριστική επιφάνεια των δύο τμημάτων του κρυστάλλου και έτσι μόνο η έκτακτη ακτίνα εξέρχεται του πρίσματος. Τα πρίσματα του πολωτή κατασκευάζονται συνήθως από κρυστάλλους quartz ή Calcite.

4. Κυψελίδα δείγματος

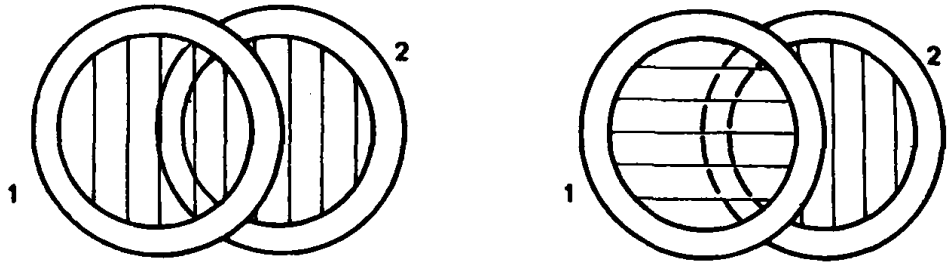
Για τις κυψελίδες δειγμάτων ισχύουν όσα αναπτύχθηκαν στο κεφάλαιο της φασματοφωτομετρίας. Επί πλέον εδώ εφαρμόζεται θερμοστάτιση με ακρίβεια (± 0.1°C) και σύστημα μόνιμα πακτωμένης κυψελίδας για την αποφυγή αποπόλωσης (depolarization) της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας. Έτσι η κυψελίδα αδειάζεται και γεμίζεται με τη βοήθεια σύριγγας. Για ακριβείς

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

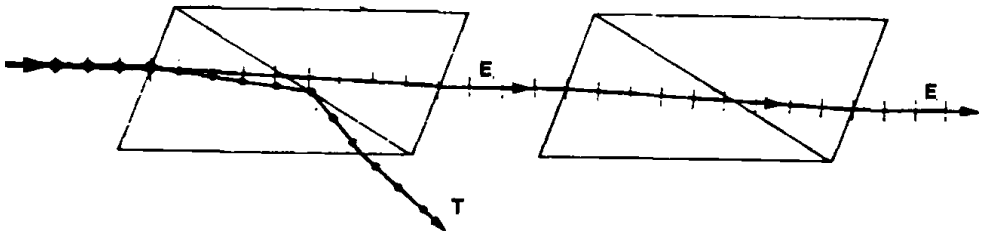
μετρήσεις τα χρησιμοποιούμενα διαλύματα πρέπει να είναι διαυγή.

5. Αναλυτής

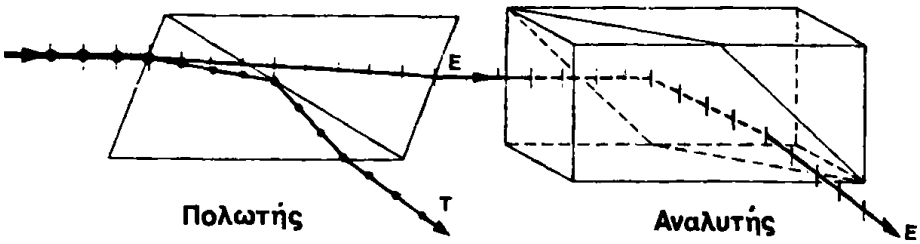
Είναι πρίσμα παρόμοιο με τον πολωτή, με επιπλέον δυνατότητα περιστροφής γύρω από τον νοητό άξονα που συνδέει την πηγή φωτός με τον ανιχνευτή. Αν φανταστεί κανείς δύο πρίσματα Nicol παράλληλα τοποθετημένα (σχ. 7-4α) τότε η έκτακτη ακτίνα του πρώτου είναι έκτακτη ακτίνα και για το δεύτερο και περνά μέσω αυτού αναλλοίωτη. Αν όμως τα δύο πρίσματα διασταυρωθούν (περιστραφεί το ένα σε σχέση με το άλλο κατά 90°) τότε η έκτακτη ακτίνα του πρώτου είναι τακτική για το δεύτερο και αποσβένεται. (σχ. 7-4 β).



1. Αναλυτής
2. Πολωτής



(α)



(β)

Σχ. 7-4. Ζεύγος πολωτή-αναλυτή. (α) παράλληλη τοποθέτηση (β) διασταυρωμένη τοποθέτηση. Το φως δεν διαπερνά τον αναλυτή.

Αν τώρα το εξερχόμενο από τον πολωτή φως διέλθει μέσω του δείγματος θα υποστεί κάποια στροφή στο επίπεδο πόλωσης του και διερχόμενο στη συνέχεια μέσω του αναλυτή, που βρίσκεται σε παράλληλη τοποθέτητση ως προς

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τον πολωτή, θα υποστεί σύμφωνα με τα παραπάνω κάποια απόσβεση. Με κατάλληλη περιστροφή του αναλυτή η ένταση του εξερχόμενου απ' αυτόν φωτός μπορεί να πάρει την μέγιστη δυνατή τιμή. Η γωνία στροφής του αναλυτή προσδιορίζει τη γωνία στροφής της πολωμένης ακτινοβολίας που οφείλεται στο δείγμα.

6. Σύστημα ανίχνευσης

Για μεν το ορατό τμήμα της ακτινοβολίας κατάλληλος ανιχνευτής είναι το μάτι ειδικά σε σκοτεινό χώρο και για μήκη κύματος ακτινοβολίας που αντιστοιχούν στο πράσινο. Για τις περιοχές του UV και IR κατάλληλα συστήματα ανίχνευσης είναι εκείνα που στηρίζονται σε φαινόμενα φωτοηλεκτρικά ή φωτοαγωγιμομετρικά.

7.3 Εφαρμογές

Η πολωσιμετρία βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη σακχαροβιομηχανία, όπου χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης σακχαρούχων διαλυμάτων. Η τεχνική της σακχαρομετρίας χρησιμοποιεί τροποποιημένο πολωσίμετρο γνωστό σαν σακχαρόμετρο (sacharimeter). Οι βασικές διαφορές μεταξύ του πολωσίμετρου και του σακχαρόμετρου είναι οι εξής:

(1) Στο σακχαρόμετρο χρησιμοποιείται λευκό, αντί μονοχρωματικού φωτός, γιατί το τελευταίο δεν δίνει ακτινοβολία ικανοποιητικής έντασης. (2) Χρησιμοποιείται σύστημα σφηνοειδών πρισμάτων από χαλαζία που τοποθετούνται μεταξύ κυψελίδας και αναλυτή για τη μέτρηση της οπτικής στροφής της οφειλόμενης στο διάλυμα. (3) Χρησιμοποιείται κυψελίδα δείγματος εφοδιασμένη με αυτόματο σύστημα απομάκρυνσης του μετρηθέντος δείγματος και επαναπλήρωσης της κυψελίδας με νέο δείγμα. Το προς μέτρηση δείγμα διαυγάζεται, διηθείται και μεταγγίζεται σύμφωνα με τα παραπάνω στην κυψελίδα. (4) Το σακχαρόμετρο φέρει εκατονταβάθμια κλίμακα που δίνει απ' ευθείας την εκατοστιαία περιεκτικότητα σε σάκχαρο.

Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας διαλύματος σε οπτικά ενεργό ουσία γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης, που χαράζεται με τη βοήθεια διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η σακχαρομετρία περιλαμβάνει προσδιορισμούς κυρίως σακχαρόζης, ραφινόζης, γλυκόζης. Επίσης επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσοτέρων του ενός συστατικών σε διάλυμα[1]. Έστω π.χ. μίγμα δύο συστατικών σακχάρων Α και Β.

Σύμφωνα με την βασική εξίσωση της πολωσιμετρίας (7.1) θα ισχύουν οι σχέσεις:

$$[\alpha]_{\lambda}^{T_1} C_A + [b]_{\lambda}^{T_1} C_B = 100\ \alpha_1 \quad \text{και} \quad [\alpha']_{\lambda}^{T_2} + C_A + [b']_{\lambda}^{T_2} C_B = 100\ \alpha_2$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

όπου: C_A και C_B οι συγκεντρώσεις των σακχάρων A και B στο διάλυμα αντίστοιχα, $[\alpha]_\lambda^{T_1}$ και $[\alpha']_\lambda^{T_2}$ οι ειδικές στροφές του σακχάρου A στις θερμοκρασίες T_1 και T_2 αντίστοιχα, $[b]_\lambda^{T_1}$ και $[b']_\lambda^{T_2}$ οι ειδικές στροφές του σακχάρου B στις θερμοκρασίες T_1 και T_2 αντίστοιχα και α_1 και α_2 οι γωνίες στροφής του διαλύματος που προσδιορίζονται πειραματικά. Κατόπιν επίλυσης του συστήματος των δύο εξισώσεων προκύπτουν τα C_A και C_B.

Ακόμη η πολωσιμετρία χρησιμοποιείται στους εξής προσδιορισμούς: Στον προσδιορισμό της σακχαρόζης σε παγωτά[2] με προηγούμενη θέρμανση με $Ba(OH)_2$ για την καταστροφή των αναγόντων σακχάρων. Στον προσδιορισμό του δείκτου σακχαρόζης στο μέλι[3], δηλαδή του ποσού της σακχαρόζης που υδρολύεται σε 1hr στους 40°C από τα ένζυμα που περιέχονται σε 100g προϊόντος. Στον προσδιορισμό της λακτόζης στο γάλα[4], γλυκόζης και μαλτόζης σε σιρόπι από άμυλο πατάτας[5]. Στον προσδιορισμό του αμύλου σε κρεατοσκευάσματα[6] σε ρύζι[7], σε σιτάρι[8] κατόπιν θέρμανσης του προϊόντος με διάλυμα $CaCl_2$ για την εκχύλιση του άμυλου και μέτρησης του διαυγασθέντος υγρού. Στον προσδιορισμό του γλυκογόνου με την ίδια μέθοδο σε οστρακοειδή[9]. Στον προσδιορισμό της σορβιτόλης (γλυκαντικής ύλης) σε είδη αρτοποιΐας[10], κομπόστες[11] κ.α. κατόπιν προσθήκης μολυβδαινικού αμμωνίου το οποίο σχηματίζει οπτικά ενεργό σύμπλοκο με την σορβιτόλη και αυξάνει την οπτική στροφή της. Με την ίδια μέθοδο προσδιορίζεται και η γλυκονο-δ-λακτόνη, στερεοποιητής που προστίθεται σε κρεατοσκευάσματα[12]. Στον προσδιορισμό των α-οξέων στο λυκίσκο για την εκτίμηση του βαθμού πικρότητας της μπύρας[13]. Τέλος στον προσδιορισμό της ενεργότητας (δραστηριότητας) του ενζύμου σακχαράσης[14] στο μέλι κατόπιν μέτρησης της γωνίας στρ ής σακχάρων πριν και μετά την ενζυματική αποικοδόμηση αυτών.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Heller WF** and **Fitts DD** Polarimetry in "Techniques of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry" (A. Weissberger Ed.) 3th edit, Vol 1, Wiley-Interscience, New York (1960).
2. **Reinhardt L.** Nahrung 4,533 (1960)
3. **Dulsberg H** and **Gebelein H** Z. Lebensmittel Unters u-Forsch 107, 489(1958)
4. **Biggs DA** and **Szijarto L** J. Dairy Sci 46,1196 (1963)
5. **Rychlik M** and **Fedorowska Z.** Chem. Abstr. 68, 94727 w (1968).
6. **Fraser JR** and **Holmes DC** Analyst **83, 371**(1958)
7. **Fraser JR** and **Holmes DC** J. Sci Food Agric. 9,511 (1958)
8. **Rootayel RI** J. Agric. Animal Sci. **25, 121** (1968)
9. **Frazer JR** and **Holmes DC** Analyst **86, 131 (1961)**
10. **Rotsch A** and **Freise G** Dt. Lebensmittel Rdsch. 60, 343 (1964)
11. **Turner A** Analyst 89, 115 (1964)
12. **Hamm R** and **Schneider F** Dt Lebensmittel Rdsch 64,207 (1968)
13. ***Report of the Analysis Committee of the Institute of Brewing:*** J. Inst. Brew. 70,156 (1964)

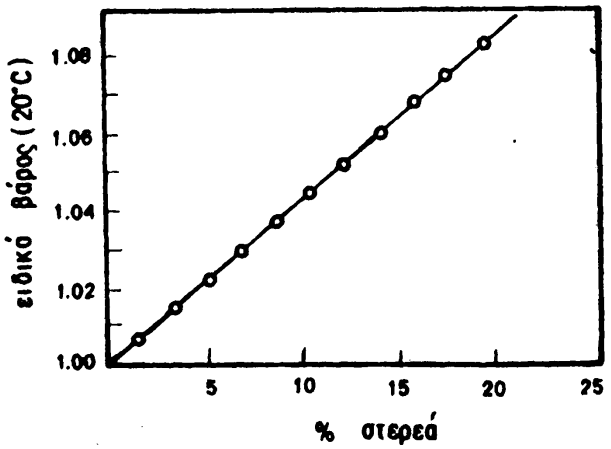
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΙΑ

8.1 Εισαγωγή

Σαν ειδικό βάρος (specific gravity) υλικού ορίζεται το βάρος του (gr*) ανά μονάδα όγκου (cm^3) του, σε ορισμένη θερμοκρασία. Αντίστοιχα σαν πυκνότητα (density) υλικού ορίζεται η μάζα του (gr) ανά μονάδα όγκου (cm^3) του σε ορισμένη θερμοκρασία. Μετρήσεις του ειδικού βάρους και της πυκνότητας διενεργούνται στα εδώδιμα λάδια, στα κρασιά, στους χυμούς, στα αναψυκτικά και σε άλλα τρόφιμα για τον χαρακτηρισμό και τον καθορισμό της ποιότητάς τους. Οι σταθερές αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των διαλυτών στερεών σε σιρόπια, αλατοδιαλύματα, χυμούς φρούτων, καθώς και για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης αλκοόλης σε κρασιά και γενικότερα σε αλκοολούχα ποτά. Οι μετρήσεις αυτές στηρίζονται στο γεγονός ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων στο νερό ουσιών αυξάνει αναλογικά το ειδικό βάρος του διαλύματος (σχ. 8-1).



Σχ. 8-1. Γραφική παράσταση ειδικού βάρους συναρτήσει συγκέντρωσης, τοματοπολτού σε υδατικό διάλυμα. Από Bigelow et al. (1950)

Αποτελούν συνεπώς το ειδικό βάρος και η πυκνότητα χαρακτηριστικές, για τις περισσότερες ουσίες, σταθερές και γιαυτό χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών απ' αυτές.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

8.2. Μέτρηση του ειδικού βάρους-πυκνότητας

Η συνηθέστερη μέθοδος μέτρησης του ειδικού βάρους/πυκνότητας για τα υγρά και τα αέρια είναι η μέτρηση του βάρους της εξεταζόμενης ουσίας που καταλαμβάνει γνωστό όγκο. Το βάρος μιας ουσίας υπολογίζεται εύκολα και με μεγάλη ακρίβεια. Σαν γνωστός εξ άλλου όγκος μπορεί να θεωρηθεί ο όγκος μικρής φιάλης (ληκύθου) που καθορίζεται με τη βοήθεια «προτύπου» υγρού π.χ. νερού ή υδραργύρου. Για τα στερεά το ειδικό βάρος/πυκνότητα υπολογίζεται έμμεσα με τη μέθοδο της εκτόπισης (βλ. κεφ. 2Β), αφού ο άμεσος υπολογισμός του όγκου των υλικών αυτών παρουσιάζει προβλήματα. Η μέτρηση της πυκνότητας/ειδικού βάρους γίνεται σε ορισμένη θερμοκρασία για κάθε κατηγορία τροφίμων. Αν για οποιονδήποτε λόγο χρησιμοποιηθεί άλλη θερμοκρασία, που είναι αρκετά πλησίον της κανονικής, μπορεί να γίνει διόρθωση της πυκνότητάς με εφαρμογή της σχέσης (8.1)

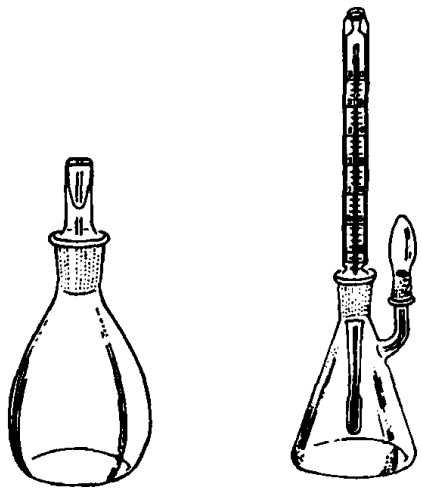
$$dT_2 = dT_1 + \alpha(T_2-T_1)dT_1 \qquad (8.1)$$

όπου dT_1 και dT_2 είναι οι πυκνότητες στις θερμοκρασίες T_1 και T_2 αντίστοιχα και α ο συντελεστής μετατροπής, που διαφέρει από τρόφιμο σε τρόφιμο.

Α. Μέτρηση ειδικού βάρους υγρών

1. Μέθοδος πυκνομέτρου (Άμεση μέθοδος)

Βασίζεται στη μέτρηση των σχετικών βαρών υγρών που καταλαμβάνουν ίσους όγκους σε ορισμένη θερμοκρασία. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικούς γυάλινους υποδοχείς, τα πυκνόμετρα (σχ. 8-2).



Σχ. 8-2. Πυκνόμετρα διαφορετικών τύπων (λήκυθοι).

Τα πυκνόμετρα έχουν καθορισμένη χωρητικότητα (25 ή 50 ml), ακριβώς σε

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ορισμένη θερμοκρασία (20°C).
Η διαδικασία της μέτρησης του ειδικού βάρους/πυκνότητας έχει ως εξής: Το πυκνόμετρο κατ' αρχήν καθαρίζεται προσεκτικά, πλένεται με αποσταγμένο νερό, ξηραίνεται και ζυγίζεται κενό (W_K).Κατόπιν γεμίζεται, μέχρι λίγο πιο πάνω από τη χαραγή με αποσταγμένο νερό, πρόσφατα βρασμένο και ψυγμένο (για την εκδίωξη του διαλυμένου αέρα), κλείνεται και εμβαπτίζεται σε λουτρό θερμοκρασίας ίσης προς την θερμοκρασία μέτρησης. Ύστερα από 1 min το επιπλέον της χαραγής νερό, απομακρύνεται με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού, σκουπίζεται το πυκνόμετρο και ζυγίζεται με το νερό (W_N). Στη συνέχεια το πυκνόμετρο αδειάζεται, ξεπλένεται επανειλλημμένα με το προς μέτρηση υγρό κι αφού γεμιστεί με αυτό, θερμοστατηθεί, κατά τα προηγούμενα και σκουπιστεί ζυγίζεται (W_Y).
Το ειδικό βάρος του υγρού Υ δίνεται από τον τύπο (8.2)

$$\varepsilon\beta = \frac{W_Y - W_K}{W_N - W_K} \qquad (8.2)$$

Συνήθη σφάλματα της μεθόδου του πυκνομέτρου περιλαμβάνουν: εξάτμιση του υγρού κατά την ζύγιση και διακυμάνσεις της θερμοκρασίας.

Β. Μέθοδος εκτόπισης (έμμεση μέθοδος)

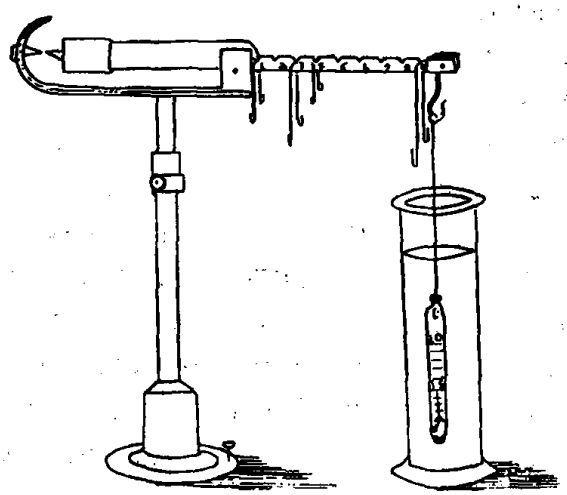
Στηρίζεται στην αρχή του Αρχιμήδη σύμφωνα με την οποία κάθε σώμα βυθιζόμενο σε υγρό υφίσταται άνωση ίση προς το βάρος του εκτοπιζόμενου υγρού.
Η αρχή αυτή εφαρμόζεται στη μέθοδο του υδροστατικού ζυγού (Westphal balance) για την περίπτωση πλήρως βυθιζομένου σώματος και στη μέθοδο του αραιόμετρου για την περίπτωση επιπλέοντος σώματος.

1. Μέθοδος ζυγού Westphal.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ειδικό ζυγό (σχ. 8-3) ο οποίος αποτελείται από κατακόρυφη βάση, οριζόντιο βραχίονα που φέρει κλίμακα και πλωτήρα ο οποίος εξαρτάται από την άκρη της κλίμακας.
Κατ' αρχήν ζυγίζεται ο πλωτήρας (W_Π) και στη συνέχεια βυθίζεται σε αποσταγμένο νερό και με μετακίνηση των βαρών πάνω στην κλίμακα του ζυγού προσδιορίζεται το βάρος του μέσα στο νερό (W_N). Τέλος βυθίζεται στο προς εξέταση υγρό (Υ) και με τον ίδιο τρόπο προσδιορίζεται το βάρος του πλωτήρα στο υγρό αυτό (W_Y). Το ειδικό βάρος του υγρού θα δίνεται από τον τύπο (8.3)

$$\varepsilon\beta = \frac{W_\Pi - W_Y}{W_\Pi - W_N} \qquad (8.3)$$

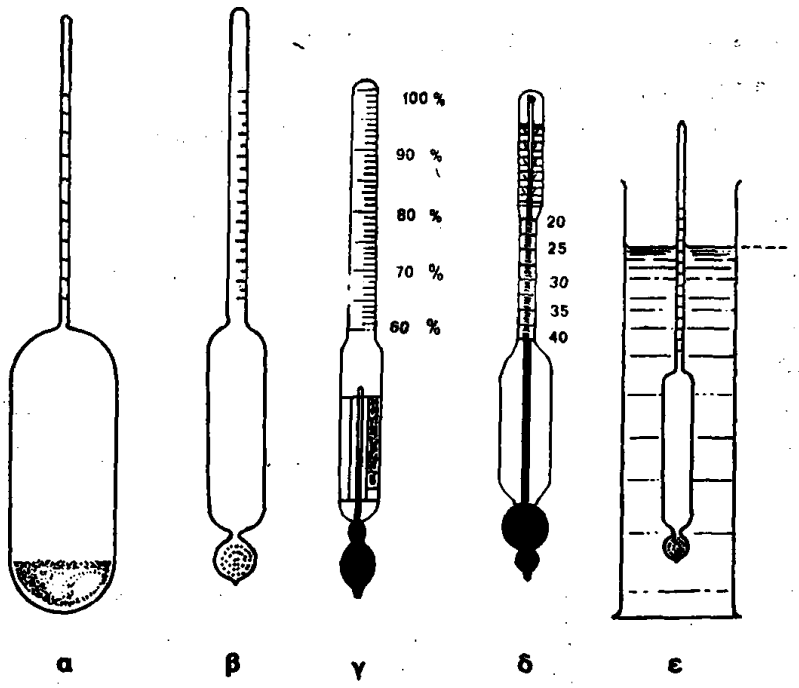
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 8-3. Υδροστατικός ζυγός (Westphal balance).

2. Μέθοδος αραιομέτρου

Στηρίζεται και αυτή στην αρχή του Αρχιμήδη. Χρησιμοποιεί ειδικό όργανο, το αραιόμετρο διαφορετικοί τύποι του οποίου φαίνονται στο σχήμα 8-4.



Σχ. 8-4. Αραιόμετρα διαφορετικών τύπων. γ) αλκοολόμετρο δ) γαλακτοαραιόμετρο.

Το αραιόμετρο στο κάτω μέρος του φέρει σφαιρική απόληξη που περιέχει Hg, ο οποίος λόγω υψηλού ειδικού βάρους διατηρεί το όργανο κατακόρυφο. Στο επάνω άκρο του φέρει κλίμακα βαθμολογημένη με υποδιαιρέσεις που δίνουν

απ' ευθείας το ειδικό βάρος του υγρού για το οποίο χρησιμοποιείται το όργανο. (π.χ. αλκοολόμετρο, γαλακτοαραιόμετρο κ.ο.κ.).
Στην κατάσταση ισορροπίας μέσα στο υγρό, το αραιόμετρο εκτοπίζει όγκους V_N και V_Y νερού και του προς εξέταση υγρού αντίστοιχα. Αν d_N και d_Y είναι οι αντίστοιχες πυκνότητες των δύο υγρών τότε:

$$V_N\, d_N = V_Y\, d_Y \qquad \text{ή} \tag{8.4}$$

$$\frac{d_N}{d_Y} = \frac{V_Y}{V_N} \tag{8.5}$$

Αλλά για την περίπτωση πλωτήρα κατακόρυφα αιωρούμενου στα δύο υγρά, ο εκτοπιζόμενος όγκος υγρού είναι ανάλογος του βάρους στο οποίο βυθίζεται ο πλωτήρας. Γιαυτό η σχέση 8.5 μπορεί να γραφεί:

$$\frac{d_N}{d_Y} = \frac{h_Y}{h_N} \tag{8.6}$$

Έτσι η πυκνότητα συνδέεται άμεσα με το βάθος στο οποίο θα φθάσει ο πλωτήρας μέσα στο προς εξέταση υγρό και μετρείται απ' ευθείας πάνω σε κλίμακα που φέρει ο τελευταίος (σχ. 8-4ε).
Η ευαισθησία της μεθόδου του αραιομέτρου εξαρτάται από το πηλίκον των όγκων νερού/υγρού που εκτοπίζει το αραιόμετρο βυθιζόμενο αντίστοιχα στα δύο υγρά.
Κατά τη μέτρηση του ειδικού βάρους/πυκνότητας με το αραιόμετρο πρέπει να δίνεται προσοχή ώστε: (1) το προς εξέταση υγρό να είναι ομοιογενές και (2) το σώμα του αραιομέτρου να είναι καθαρό ώστε το εκτοπιζόμενο υγρό να ανέρχεται ομοιόμορφα στον υποδοχέα.
Πηγή σφαλμάτων της μεθόδου του αραιομέτρου είναι η διακύμανση στην μετρούμενη τιμή λόγω διαφορών στην επιφανειακή τάση του υγρού.
Η επιφανειακή τάση που ασκείται από το υγρό στον κορμό του αραιόμετρου τείνει να αυξήσει την εκτόπιση του (θετικό σφάλμα). Ακόμη στην περίπτωση πυκνόρευστων υγρών, λόγω δυνάμεων συναφείας (αραιομέτρου/υγρού) παρατηρείται θετικό σφάλμα. Η θερμοκρασία και εδώ παίζει σημαντικό ρόλο. Γιαυτό ρυθμίζεται συνήθως στους 20°C.
Υπάρχουν διάφοροι τύποι αραιομέτρων που φέρουν διαφορετική κλίμακα ανάλογα με το υγρό που πρόκειται να εξεταστεί π.χ.:
Το αλκοολόμετρο GAY LUSSAC (σχημ. 8-4 γ) που δίνει την εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αλκοόλη (V/V) των αλκοολούχων ποτών.
Το αραιόμετρο Baumé που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία για τον προσδιορισμό του ειδικού βάρους σακχαρούχων διαλυμάτων, αλατοδιαλυμάτων κ.ο.κ.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τα αραιόμετρα Baumé είναι δύο τύπων: εκείνα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του ειδικού βάρους υγρών βαρύτερων του νερού και εκείνα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του ειδικού βάρους υγρών ελαφρύτερων του νερού.

Στα πρώτα:

0° Βé αντιστοιχούν στην τιμή 1.0 g/ml (πυκνότητα νερού, 15°C)

και 66°Βé αντιστοιχούν στην τιμή 1.842 g/ml (πυκνότητα μονοϋδρίτου του θειϊκού οξέος, 15°C)

Στα δεύτερα:

10° Βé αντιστοιχούν στην πυκνότητα διαλύματος 10% NaCl

και 47°Βé αντιστοιχούν στην πυκνότητα 0.745 g/ml (πυκνότητα απόλυτης αιθανόλης στους 15°C)

Οι βαθμοί Baumé (Βé) συνδέονται με το ειδικό βάρος με τις εξής σχέσεις:

$$\varepsilon\cdot\beta = \frac{145}{145-\text{Βé}} \qquad (8.7)$$ για υγρά βαρύτερα του νερού

$$\varepsilon\cdot\beta = \frac{140}{130+\text{Βé}} \qquad (8.8)$$ για υγρά ελαφρύτερα του νερού

Το γαλακτοαραιόμετρο (σχ. 7-4 δ) το οποίο φέρει υποδιαιρέσεις σε κλίμακα από 20-40. Η ένδειξη π.χ. 30 αντιστοιχεί σε ειδικό βάρος γάλακτος 1.030 στους 15°C.

Από την πυκνότητα μπορεί να υπολογιστεί το στερεό υπόλειμμα (Σ.Υ.%) του γάλακτος από πίνακες η από τον τύπο του Fleischman:

$$\Sigma.Υ.\% = 1.2Λ+2.665\,\frac{100d-100}{d}$$

όπου Λ = % λίπος του γάλακτος

d = πυκνότητα του γάλακτος στους 15° C

Το σακχαρόμετρο Brix που είναι βαθμολογημένο έτσι ώστε να δίνει απ' ευθείας το % ποσοστό σακχάρου w/w στους 17.5°C.

Το αλατόμετρο με το οποίο προσδιορίζεται άμεσα η περιεκτικότητα αλατοδιαλυμάτων σε NaCl.

Το ελαιόμετρο με το οποίο προσδιορίζεται η πυκνότητα των σπορελαίων και γενικά των φυτικών λαδιών που κυμαίνεται μεταξύ 0.870–0.897 g/ml κ.ο.κ.

Β. Μέτρηση ειδικού βάρους στερεών

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του ειδικού βάρους στερεών θεωρούνται λιγότερο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ακριβείς από τις αντίστοιχες των υγρών και αυτό λόγω της ανομοιογένειας των στερεών τροφίμων, της μερικής διαλυτότητάς τους στα υγρά, τον πιθανό εγκλωβισμό αερίων κ.ο.κ.

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στην βύθιση του εξεταζόμενου στερεού σε αδρανές υγρό, γνωστής πυκνότητας. Ο όγκος του στερεού, υπολογίζεται από τον όγκο του εκτοπιζόμενου υγρού. Από τον όγκο και το βάρος του στερεού υπολογίζεται η πυκνότητά του. Στην περίπτωση που το στερεό ούτε καταβυθίζεται, ούτε ανέρχεται στην επιφάνεια του υγρού αλλά αιωρείται τότε η πυκνότητά του ταυτίζεται με εκείνη του υγρού. Έτσι με την παρασκευή σειράς διαλυμάτων αυξανόμενης, γνωστής, πυκνότητας (π.χ. νερό/ζάχαρη, νερό/αλάτι, ξυλόλιο/τετραχλωράνθρακας κ.ο.κ) μπορεί να προσδιοριστεί το ε.β. του προς εξέταση στερεού.

8.3 Εφαρμογές

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το ειδικό βάρος/πυκνότητα χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό (ταυτοποίηση) των τροφίμων, όπως λίπη και λάδια, κρασιά, χυμοί φρούτων, αναψυκτικά κ.α.[1]

Το ειδικό βάρος των βρώσιμων λαδιών σχετίζεται με το βαθμό ακορεστότητας και τον αριθμό ατόμων C (MB) των λιπαρών οξέων που συνθέτουν τα τριγλυκερίδια του. Συγκεκριμένα το ειδικό βάρος αυξάνει αυξανομένης της ακορεστότητας και ελαττωμένου του μοριακού βάρους των λιπαρών οξέων[2] π.χ. για το ελαιόλαδο το ε.β. κυμαίνεται μεταξύ 0.910-0.915, για το καλαμποκέλαιο μεταξύ 0.916–0.921, για το βαμβακέλαιο και το ηλιέλαιο μεταξύ 0.916–0.918.

Το ειδικό βάρος πάλι των ζωικών λιπών (βούτυρο, λαρδί) διαφέρει σημαντικά εκείνου των φυτικών λιπών[3], κυμαινόμενο μεταξύ 0.936–0.961 ενώ το ειδικό βάρος του λίπους των θαλασσινών, κυμαίνεται μεταξύ 0.920-0.940. Ακόμη η μεταβολή στο ειδικό βάρος κατάλληλου διαλύτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του λίπους σε διάφορα τρόφιμα.[3] Στη μέθοδο αυτή το λίπος διαλύεται σε τετραχλωράνθρακα και στο διάλυμα προσδιορίζεται το ειδικό βάρος με το ζυγό Westphal.

Σημαντική εφαρμογή βρίσκει ο προσδιορισμός του ειδικού βάρους στη βιομηχανία επεξεργασίας της ντομάτας για τον καθορισμό των προδιαγραφών προϊόντων όπως τοματοχυμού, τοματοπολτού και πάστας τομάτας (πελντές)[4,5]. Ακόμη το ειδικό βάρος χρησιμοποιείται στην ποσοτική ανάλυση για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης διαλυτών στερεών σε: σιρόπια στην κονσερβοποιία φρούτων[6] (%σακχαρόζη), σε αλατοδιαλύσεις στη βιομηχανία παρασκευής τουρσιών, σε χυμούς φρούτων[7] και αναψυκτικά, σε αλκαλικά

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τροφίμων π.χ. διαλύματα αποφλοίωσης φρούτων, στο γάλα[8] καθώς και για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε αιθανόλη των κρασιών,[9] κονιάκ και γενικώτερα αποσταγμάτων.

Ακόμη το ειδικό βάρος χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους στην ανίχνευση της νοθείας στο γάλα. Είναι γνωστό ότι αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό αυξάνει το ειδικό βάρος του προϊόντος. Επίσης χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό της ωριμότητας προϊόντων όπως αρακάς, δαμάσκηνα,[10] αβοκάντο,[11] στη διαπίστωση της αποτελεσματικότητας του blanching (απομάκρυνση φυσαλίδων αέρα από το φυτικό ιστό) μήλων[12] και αρακά.[13]

Εξάλλου ο προσδιορισμός του ειδικού βάρους χρησιμοποιείται σαν μέτρο του περιεχόμενου αμύλου προϊόντων όπως πατάτας και αρακά και σαν κριτήριο ποιότητας του σιταριού.[14]

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Bauer N.** Determination of Density. In Physical Methods of Organic Chemistry Vol I Weissberger A (edit), Interscience Publ. New York (1945).
2. **Joglehar RB** and **Watson HE** J. Indian Inst. Sci A13, 119 (1930)
3. **Joslyn MA** (edit): Methods in Food Analysis. Academic Press. New York (1970)
3. **Bigelow WD, Smith HR** and **Greenleaf CA:** Tomaro Products Nat. Canners Assoc. Res. Lab. Bull 271, 1 (1950)
5. **National Canner's Association Research Laboratories:** Lab. Manual for Food Canners and Processors Vol II AVI. Publ. Co, Westport Conn. (1968)
6. **Fort CA** and **Mchaig Ind.** Eng. Chem Anal Ed. 8, 333 (1936)
7. **Scott WC** and **Veldhuis MK** Food Tech. 15, 388 (1961)
8. **Erb RJ** and **Manus LJ** J. Dairy Sci 46, 1373 (1963)
9. **Cartwright LL** Ind. Eng. Chem Anal. Ed. 14, 237 (1942)
10. **Lynch EJ, Mitchell RS** and **Casimir DJ** Adv. Food Res. 9, 99 (1959)
11. **Stahl AL.** Fla. Univ. Agr. Exp. St. (Gainsville/Bull. 259, 1 (1933)
12. **Cassimir DJ Mitchell RS** and **Moyer JC** Food Tech 21, 1042 (1967)
13. **Mitchell RS, Lynch LJ** and **Cassimir PJ.** Food Tech. 23, 812 (1969)
14. **U.S. Dept Agr.**: Grain Grading Primer, Misc. Publ. 749 U.S. Dept Agr, Wash. D.C.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ

9.1. Θεωρία και συσκευές εκχύλισης

Πολλές φορές στην ανάλυση ορισμένου ή ορισμένων συστατικών ενός τροφίμου απαιτείται η εκχύλιση, η μέθοδος δηλαδή διαχωρισμού στην οποία επιτυγχάνεται η ποσοτική παραλαβή στερεού ή υγρού συστατικού από το δείγμα με τη βοήθεια διαλύτη με σκοπό την συγκέντρωση και τη μελέτη του εν λόγω συστατικού π.χ. το αιθερικό εκχύλισμα των φυτικών προϊόντων χρησιμοποιείται σαν κριτήριο: του περιεχόμενου στο φυτό λίπους, της ποιότητας και ωριμότητας των περιεχόντων έλαια, σπόρων, φρούτων κτλ. Ακόμη το αδιάλυτο στην αλκοόλη στερεό κλάσμα των οπωροκηπευτικών χρησιμοποιείται σαν κριτήριο τρυφερότητας και ποιότητας στα προϊόντα αυτά. Τέλος διαδοχικές εκχυλίσεις με αλκοόλη, αιθέρα, νερό, αραιά και πυκνά οξέα χρησιμοποιούνται στο διαχωρισμό συστατικών των υδατανθράκων όπως είναι τα σάκχαρα, το άμυλο, οι ημικυτταρίνες, η κυτταρίνη, η λιγνίνη κ.τ.λ.

Η εκχύλιση ανάλογα με τη φύση του συστατικού των τροφίμων που παραλαμβάνεται, διακρίνεται σε εκχύλιση στερεού/υγρού και υγρού/υγρού. Ανάλογα με τη συσκευή που χρησιμοποιείται, η εκχύλιση μπορεί να είναι συνεχής και ασυνεχής ή κατ' αντιρροήν (counter current extraction.) Τόσο στην εκχύλιση στερεού/υγρού όσο και στην υγρού/υγρού, το φαινόμενο που λαβαίνει χώρα κατά τον διαχωρισμό είναι η κατανομή του προς εκχύλιση συστατικού μεταξύ του διαλύτη και ενός στερεού ή ενός δεύτερου υγρού (συνήθως νερού). Φυσικοχημικά αυτό εκφράζεται με το συντελεστή κατανομής (Kp, partition coefficient):

$$Kp = \frac{C_1}{C_2} \qquad (9.1)$$

όπου C_1 = συγκεντρ. συστατικού στο στερεό ή το νερό

C_2 = συγκεντρ. συστατικού στον διαλύτη.

Είναι ευνόητο πως για την εκχύλιση στερεού/υγρού ο συντελεστής κατανομής παίρνει αρκετά χαμηλές τιμές και συνεπώς για την ποσοτική μεταφορά του στερεού συστατικού στην υγρή φάση απαιτούνται μεγάλες ποσότητες διαλύτη. Αυτό συμβαίνει διότι είναι αρκετά δύσκολο να έλθει σε άμεση επαφή ο διαλύτης με την επιφάνεια του στερεού. Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό απαιτείται τεμαχισμός ή και άλεση του στερεού για τη μεγιστοποίηση της

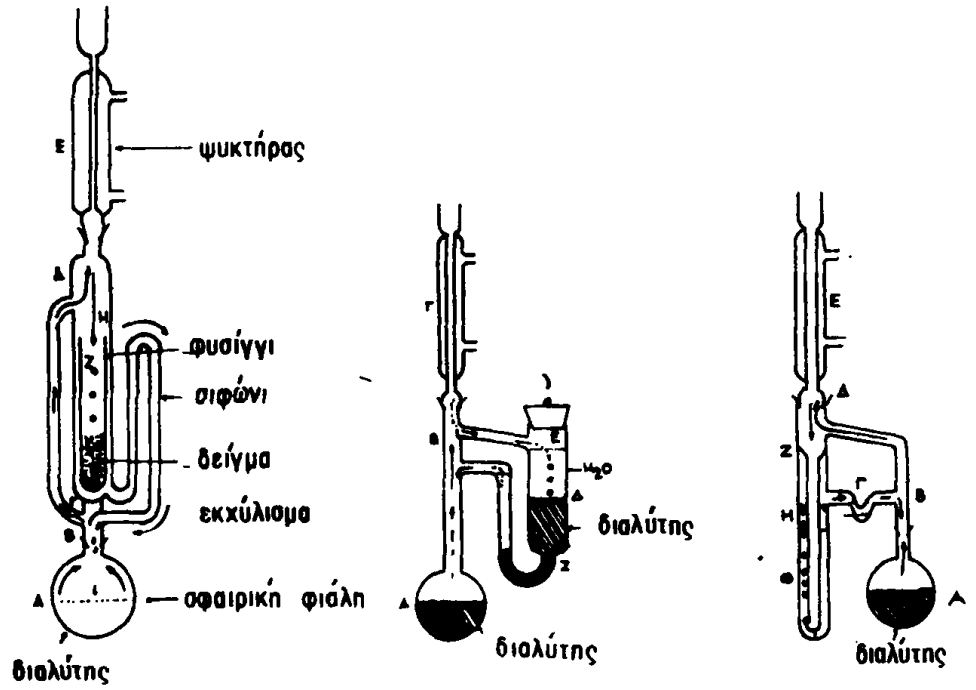
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

επιφάνειάς του, έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή επαφή μεταξύ των δύο. Είναι προφανές ότι με την εκχύλιση επιτυγχάνεται ποσοτική μεν, αλλά ποτέ ολοκληρωτική μεταφορά συστατικού από τη στερεή στην υγρή φάση, είτε λόγω ατελούς δράσης του διαλύτη, είτε λόγω συγκράτησης του μελετούμενου συστατικού στο στερεό υπόστρωμα με ισχυρούς δεσμούς κ.ο.κ.

Α. Συνεχής εκχύλιση

1. Στερεού/υγρού (εκχύλιση Soxhlet)

Το προς εκχύλιση τεμαχισμένο τρόφιμο τοποθετείται σε ειδικό χάρτινο φυσίγκιο το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται στον εκχυλιστήρα της συσκευής Soxhlet (σχημ. 9-1α).



Σχ. 9-1. Εκχύλιση Soxhlet (α) στερεού/υγρού (β) υγρού/υγρού, με διαλύτη βαρύτερο του νερού (γ) υγρού/υγρού, με διαλύτη ελαφρύτερο του νερού.

Ο εκχυλιστήρας φέρει στη μια πλευρά του μεγάλης διαμέτρου κυλινδρικό βραχίονα, ενώ στην άλλη σιφωνοειδή βραχίονα μικρής διαμέτρου. Στο επάνω μέρος ο εκχυλιστήρας συνδέεται με ψυκτήρα, ενώ στο κάτω μέρος με σφαιρική φιάλη που περιέχει τον διαλύτη. Ο διαλύτης, με τη βοήθεια θερμομανδύα, θερμαίνεται και οι ατμοί του ανέρχονται μέσω του βραχίονα ΒΔ, ψύχονται στον ψυκτήρα, υγροποιούνται και εισέρχονται, υπό μορφή σταγονιδίων, στο φυσίγκιο με το προς εκχύλιση στερεό. Έτσι ο διαλύτης συλλέγεται σταδιακά στον εκχυλιστήρα και μόλις το επίπεδο του διαλύτη ξεπεράσει το ύψος του σιφωνοειδούς βραχίονα επανέρχεται, μέσω αυτού,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στη σφαιρική φιάλη για να ανακυκλωθεί σύμφωνα με τα παραπάνω. Η εκχύλιση Soxhlet παρουσιάζει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι ο διαλύτης εκχυλίζει το στερεό αφού ψυχθεί και δεν προξενεί αλλοιώσεις στο τρόφιμο λόγω αυξημένης θερμοκρασίας. Για την θέρμανση του διαλύτη χρησιμοποιείται θερμομανδύας για να αποφευχθεί κίνδυνος ανάφλεξης λόγω πτητικότητας του διαλύτη. Άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η αρχική ποσότητα του διαλύτη ανακυκλώνεται και δεν απαιτούνται μεγάλες ποσότητες διαλύτη.

2. Εκχύλιση υγρού/υγρού

(α) με διαλύτη βαρύτερο του νερού

Ο διαλύτης τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη (σχ. 9-1β) και θερμαίνεται με θερμομανδύα. Οι ατμοί του ανέρχονται στο τμήμα Β της συσκευής και στη συνέχεια στον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνονται. Το προκύπτον υγρό, λόγω ύπαρξης του διαφράγματος Β, αναγκάζεται να περάσει στον εκχυλιστήρα Δ, οπότε διέρχεται μέσω της υδατικής στοιβάδας Ε και συλλέγεται στο σημείο Ζ. Η περίσσεια του διαλύτη με το εκχύλισμα υπερχυλίζει και επιστρέφει στη φιάλη Α.

(β) με διαλύτη ελαφρύτερο του νερού

Ο διαλύτης τοποθετείται στη φιάλη Α (σχημ. 9-1γ) και θερμαίνεται. Οι ατμοί του μέσω του σωλήνα Β ανέρχονται στο τμήμα Δ της συσκευής (δεν μπορούν να περάσουν στον σωλήνα Γ γιατί ο σωλήνας αυτός γεμίζει μετά τα πρώτα λίγα λεπτά της λειτουργίας της συσκευής με υγρό και από εκεί στον ψυκτήρα Ε όπου συμπυκνώνονται και επιστρέφουν υπό μορφή σταγονιδίων στο τμήμα Ζ. Εκεί συλλέγεται ο διαλύτης μέχρις ότου αποκτήσει τέτοια πίεση ώστε να εκδιωχθεί από το κάτω μέρος του σωλήνα Ζ και να διέλθει μέσω του προς εκχύλιση διαλύματος Θ. Ανερχόμενος ο διαλύτης με το συστατικό που έχει εκχυλίσει συλλέγεται στο τμήμα Η, απ' όπου η περίσσεια του, μέσω του σωλήνα Γ επιστρέφει στη φιάλη Α.

Έτσι το περιεχόμενο της φιάλης Α εμπλουτίζεται συνεχώς με το εξεταζόμενο συστατικό του τροφίμου. Η διάρκεια της εκχύλισης Soxhlet ποικίλει από 45 min μέχρι 24 hrs, ανάλογα με το μελετούμενο σύστημα τροφίμου/διαλύτη.

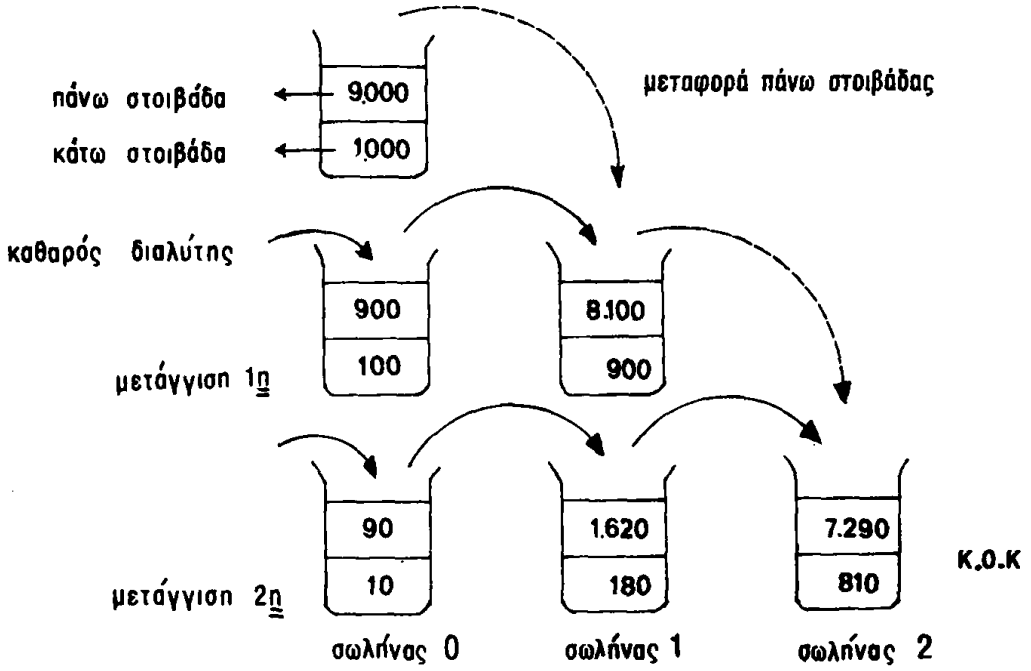
Β. Ασυνεχής ή κατ' αντιρροήν εκχύλιση

Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τον Craig το 1949 και προβλέπει διαδοχικές εκχυλίσεις του εξεταζόμενου υγρού τροφίμου για τη λήψη καθαρού συστατικού. Για να γίνει αντιληπτή η αρχή της τεχνικής δίνεται το εξής παράδειγμα:

Έστω δείγμα που περιέχει 10,000 μόρια του προς εκχύλιση συστατικού Α. Αν υποτεθεί ότι ο συντελεστής κατανομής του συστατικού Α μεταξύ διαλύτη π.χ. εξανίου και νερού είναι Κρ = 9/1 τότε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 10

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ml δείγματος και 10 ml διαλύτη, κατόπιν καλής ανάμειξης των δύο φάσεων θα παρατηρηθεί η εξής εικόνα για το συστατικό Α (σχημ. 9-2)



Σχ. 9-2. Εκχύλιση κατ' αντιρροή συστατικού Α από μίγμα.

Αν τώρα η κάτω στοιβάδα μεταγγιστεί (πρώτη μετάγγιση) σε νέο σωλήνα στον οποίο θα προστεθεί καθαρός διαλύτης τότε μετά την επίτευξη νέας ισορροπίας, το συστατικό Α θα κατανεμηθεί σε αναλογία 900/100 μεταξύ διαλύτη και δείγματος. Αντίστοιχα μετά τη δεύτερη μετάγγιση το συστατικό Α θα κατανεμηθεί σε αναλογία 90/10 μεταξύ διαλύτη και δείγματος. Αν παράλληλα η πάνω αρχικά σχηματιζόμενη στοιβάδα μεταγγιστεί στο σωλήνα 2 ο οποίος περιέχει νερό (υδατική στοιβάδα) το συστατικό Α θα κατανεμηθεί σε αναλογία 8100/900 μετά την πρώτη μετάγγιση, σε αναλογία 7290/810 μετά τη δεύτερη μετάγγιση κ.ο.κ. Χαρακτηρίζοντας τον πρώτο σωλήνα (Ο), τον δεύτερο (1) κ.ο.κ., είναι δυνατόν η παραπάνω διαδικασία να παρασταθεί μαθηματικά από την ανάπτυξη του διώνυμου $(p+q)^n$ όπου p=το κλάσμα της ολικής ποσότητας του συστατικού Α στη φάση του διαλύτη κάθε δοχείου, q=το αντίστοιχο κλάσμα στη φάση του δείγματος κάθε δοχείου και n= αριθμός των μεταφορών. Έτσι μπορούν να προσδιοριστούν τα p και q ύστερα από οσεσδήποτε μεταφορές.

Με την τεχνική των αλληλοδιαδοχικών εκχυλίσεων στον σωλήνα ν (π.χ. ν=200) επιτυγχάνεται η λήψη καθαρού του συστατικού Α. Η παραπάνω διαδικασία των αλληλοδιαδοχικών εκχυλίσεων γίνεται σε ειδικούς εκχυλιστή-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ρες (εκχυλιστήρες Craig).

Είναι γνωστό πως για δοσμένη ποσότητα διαλύτη, όσο περισσότερα είναι τα κλάσματα του διαλύτη που χρησιμοποιούνται σε κάθε εκχύλιση τόσο πιο ποσοτικός είναι ο διαχωρισμός του συγκεκριμένου συστατικού. Αυτό εκφράζεται μαθηματικά από την εξίσωση (9.2):

$$W_M = W \left(\frac{V_N}{K_p V_\Delta + V_N} \right)^n \qquad (9.2)$$

όπου: V_N και V_Δ: όγκος της στοιβάδας νερού και οργανικού διαλύτη αντίστοιχα

W_M=βάρος του συστατικού που τελικά θα παραμείνει στην υδατική στοιβάδα

W=αρχικό βάρος του συστατικού στην υδατική στοιβάδα

K_p=συντελεστής κατανομής συστατικού.

Γ. Εκλογή του διαλύτη εκχύλισης

Ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος διαλύτης για δείγματα τροφίμων είναι ο διαιθυλαιθέρας (σ.ζ.=34.6°C) ή ο πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ.=35-45°C). Από τους δύο αυτούς διαλύτες ο πετρελαϊκός αιθέρας έχει χαμηλότερο κόστος και δεν επηρεάζεται από ίχνη υγρασίας που πιθανόν να περιέχει το προς εκχύλιση τρόφιμο. Τέλος δεν προσλαμβάνει υγρασία κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Ο διαιθυλαιθέρας πάλι θεωρείται καλύτερος διαλύτης του λίπους, αλλά μειονεκτεί γιατί πριν χρησιμοποιηθεί πρέπει να απαλλαγεί από το νερό και την αλκοόλη άλλως, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης θα διαλύσει σάκχαρα και άλλες διαλυτές ουσίες οι οποίες θα δώσουν σφάλμα στο αιθερικό εκχύλισμα.

Η αφυδάτωση του αιθέρα επιτυγχάνεται κατόπιν κατεργασίας με μεγάλες ποσότητες χλωριούχου ασβεστίου ή θειϊκού νατρίου. Άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται ανάλογα με την συγκεκριμένη εφαρμογή δίνονται στον Πίνακα 9.1.

Δ. Προετοιμασία του δείγματος

Πέρα από τα όσα γενικά αναφέρθηκαν στο κεφ. 1 γύρω από την προετοιμασία του δείγματος που ισχύουν και εδώ, πρέπει να τονιστεί η ανάγκη ξήρανσης του προς εκχύλιση δείγματος, διαφορετικά το περιεχόμενο νερό θα προσληφθεί από τον αιθέρα και θα δώσει θετικό σφάλμα κατά την εκχύλιση. Η ξήρανση του τεμαχισμένου δείγματος γίνεται συνήθως πάνω σε διηθητικό χαρτί μέσα σε δίσκους ζύγισης από αλουμίνιο. Μετά την ξήρανση το διηθητικό χαρτί μεταφέρεται στο φυσίγκιο εκχύλισης και εκπλύνεται με αιθέρα για την

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.1

Μερικοί χρήσιμοι διαλύτες

Διαλύτης	Σημείο βρασμού °C	Σημείο πήξης, °C
Διαιθυλαιθέρας	35	-116
Διθειάνθρακας	46	-111
Ακετόνη	56	-95
Χλωροφόρμιο	61	-64
Μεθανόλη	65	-98
Τετραϋδροφουράνιο	66	-65
Διϊσοπροπυλαιθέρας	68	-60
Τετραχλωράνθρακας	76	-23
Οξικός αιθυλεστέρας	77	-84
Αιθανόλη	78	-117
Βενζόλιο	80	5.5
Κυκλοεξάνιο	81	6,5
Ισοπροπανόλη	82	-89
Νερό	100	0
Διοξάνη	102	12
Τολουόλιο	111	-95
Οξικό οξύ (παγόμορφο)	118	17
N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο	154	-61
Διαιθυλενο-γλυκόλη	245	-10

απομάκρυνση τυχόν ποσότητας λίπους που πιθανόν να προσροφήθηκε στο διηθητικό χαρτί.

9.2 Εφαρμογές της εκχύλισης

Α. Προσδιορισμός λίπους

Η πιο συνηθισμένη εφαρμογή που βρίσκει η εκχύλιση είναι στον προσδιορισμό του λίπους σε διάφορα ζωϊκά και φυτικά τρόφιμα. Το λίπος, με εξαίρεση ορισμένες στερόλες, κηρούς, της χλωροφύλλης και των καροτινοειδών, είναι το μόνο κύριο συστατικό των τροφίμων που είναι διαλυτό στην παραπάνω κατηγορία διαλυτών που αναφέρθηκε. Πολλές φορές ανάλογα με τη μορφή δέσμευσης του λίπους στο τρόφιμο, απαιτείται σύστημα διαλυτών που σε κάθε περίπτωση διαφέρει ως προς την πολικότητα. π.χ. για την περίπτωση των λιποπρωτεϊνών ή γλυκολιπιδίων[1] η εκχύλιση γίνεται πιο αποτελεσματική με διαλύτη υψηλής πολικότητας, όπως το νερό ή η αιθανόλη που καταστρέφουν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τους υπάρχοντες στο υπόστρωμα δεσμούς υδρογόνου. Τα ελεύθερα λιπίδια απ' εναντίας εκχυλίζονται με λιγότερο πολικούς διαλύτες όπως αιθέρα, εξάνιο κ.α. Τα δεσμευμένα λιπίδια εκχυλίζονται συνήθως με αζεοτροπικό μίγμα διαλυτών[2,3] π.χ. εξάνιο/απόλυτη αιθανόλη (79:21).
Φυτικά ξερά προϊόντα εκχυλίζονται κατ' αρχήν με θερμή αιθανόλη και στη συγέχεια με αιθέρα για πλήρη απομάκρυνση του λίπους τους. Σε πολλά προϊόντα αρτοποιίας, η απ' ευθείας εκχύλιση με αιθέρα δεν απομακρύνει όλο το λίπος λόγω δέσμευσης του τελευταίου από τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες. Στην περίπτωση αυτή το προϊόν θερμαίνεται παρουσία οξέος, οπότε υδρολύονται οι πρωτεΐνες και το άμυλο, καταστρέφεται η κυτταρική μεμβράνη του προϊόντος και ελευθερώνεται το λίπος.
Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, το λίπος αποτελεί αιώρημα τύπου λαδιού σε νερό (oil/water) και απαντά υπό μορφή σφαιριδίων που περιβάλλονται από στρώμα πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τη μέθοδο Babcock προστίθεται H_2SO_4 για να «κάψει» το πρωτεϊνικό στρώμα και να απελευθερώσει το λίπος. Το H_2SO_4 όμως καίει και τα σάκχαρα, γιαυτό πολλές φορές πραγματοποιείται απομάκρυνση των σακχάρων κατόπιν προηγουμένης θρόμβωσης της καζεΐνης (με H_2SO_4) και απόχυσης του σακχαρούχου διαλύματος. Στη συνέχεια προστίθεται κανονικά το οξύ.
Τα ελεύθερα λιπίδια στο αλεύρι σιταριού προσδιορίστηκαν κατόπιν εκχύλισης με εξάνιο, ενώ τα συνολικά λιπίδια με n-βουτανόλη κορεσμένη με νερό.[4] Τα φωσφολιποειδή κρέατος[5] προσδιορίστηκαν κατόπιν εκχύλισης με μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης.
Η δομή των ακόρεστων τριγλυκεριδίων από φυτικά λάδια[6] προσδιορίστηκε με χρήση της εκχύλισης κατ' αντιρροή, χρησιμοποιώντας 200 σωλήνες.

Β. Υδατικά και αλκοολικά εκχυλίσματα

Τα διαλυτά στο ζεστό ή ψυχρό νερό στερεά συστατικά χρησιμοποιούνται πολλές φορές σαν κριτήριο ποιότητας και ταυτότητας σε προϊόντα όπως ο καβουρντισμένος καφές, το τσάι, το αλεύρι σιταριού (άμυλο), τα φρούτα (σάκχαρα), τα δε διαλυτά σε αλκοόλη στερεά σαν αντίστοιχα κριτήρια σε προϊόντα όπως τα μπαχαρικά. Η μέθοδος προβλέπει την προσθήκη θερμού νερού, αλκοόλης ή μεθανόλης[7] σε μικρή ποσότητα του δείγματος (2-5 gr), ανάδευση, διήθηση και προσδιορισμό των διαλυτών συστατικών.στο διήθημα.

Γ. Στερεά αδιάλυτα στο νερό

Σε προϊόντα όπως οι μαρμελάδες, οι κομπόστες κλπ. το ποσό των στερεών των αδιάλυτων στο νερό έχει χρησιμοποιηθεί σαν μέτρο του περιεχόμενου φρούτου στο συγκεκριμένο προϊόν.[8] Η μέθοδος προβλέπει θέρμανση του δείγματος με νερό σε ατμόλουτρο, βρασμό επί 30min ή περισσότερο,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

έκπλυση του δείγματος με ζεστό νερό και ξήρανση του υπολείμματος.[9] Τα διαλυτά στερεά υπολογίζονται από τη διαφορά: [Συνολικά-αδιάλυτα].

Δ. Στερεά αδιάλυτα στην αλκοόλη

Το κλάσμα αυτό των στερεών χρησιμοποιείται κυρίως στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα (λαχανικά, καλαμπόκι κ.α.), σαν κριτήριο τρυφερότητας και ωρίμανσής τους. Κατά την ωρίμανση των φυτικών τροφίμων το % ποσοστό των σακχάρων ελαττώνεται, ενώ των λοιπών υδατανθράκων αυξάνει. Δηλαδή συμβαίνει μια συνεχής μετατροπή διαλυτών στερεών σε αδιάλυτα (άμυλο, δεξτρίνες, ημικυτταρίνες κ.α.). Κατεργασία του δείγματος με 80% αλκοόλη που διαλύει τα σάκχαρα αλλά όχι και τους λοιπούς υδατάνθρακες δίνει τον «δείκτη ωρίμανσης».[9] Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκαν οι πολυσακχαρίτες στον καφέ.[10] Διαδοχική εκχύλιση με αλκοόλη , αιθέρα, νερό, αραιά και πυκνά οξέα, χρησιμεύουν στον διαχωρισμό των υδατανθράκων σε σάκχαρα, άμυλο. ημικυτταρίνες, κυτταρίνη και λιγνίνη.[11]

Ε. Φυτική ίνα (Crude Fiber)

Σε προϊόντα όπως σιτηρά (αλεύρι, μακαρόνια, ψωμί), καρύδια, καφέ, κακάο και μπαχαρικά ο προσδιορισμός των διαλυτών συστατικών σε αραιά οξέα/βάσεις, αποτελεί δείκτη της περιεκτικότητάς τους σε κυτταρίνη ή λιγνίνη που είναι γνωστή σαν «φυτική ίνα». Το αδιάλυτο υπόλειμμα περιέχει κυτταρίνη και λιγνίνη σε ποσοτό 97%. Η περιεκτικότητα σε φυτική ίνα χρησιμοποιείται σαν κριτήριο νοθείας και ωριμότητας στα τρόφιμα. Υπερώριμα π.χ. φρούτα έχουν υψηλότερο ποσοστό «ίνας».

Η μέθοδος προβλέπει εκχύλιση ορισμένου βάρους προϊόντος με αιθέρα, βρασμό του υπολείμματος με H_2SO_4, διήθηση, έκπλυση με βραστό νερό μέχρις ουδέτερης αντίδρασης, νέο βρασμό με NaOH και διήθηση. Το υπόλειμμα ξηραίνεται και ζυγίζεται.[9] Η διαφορά βάρους πριν και μετά τη κατεργασία δίνει το ποσό της φυτικής ίνας.

Τέλος με εκχύλιση προσδιορίστηκαν φλαβονοειδή σε εσπεριδοειδή,[12] β-καροτίνιο σε καρρότα και γλυκοπατάτες[13] κατόπιν εκχύλισης με μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα/αλκοόλης και κατάλοιπα φυτοφαρμάκων σε λιπαρά[14] και μη λιπαρά τρόφιμα.[15]

9.3 Θεωρία Φυγοκέντρισης

Η φυγοκέντρηση χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό στερεών από υγρά, στοιβάδων υγρών που δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους, για την καταστροφή γαλακτωμάτων κ.ο.κ. Ιδιαίτερος τύπος της φυγοκέντρησης είναι η υπερφυγοκέντριση (φυγοκέντριση σε πολύ υψηλές τιμές γωνιακής ταχύτη-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τας, 20,000 rpm) η οποία χρησιμοποιείται για την αύξηση της συγκέντρωσης και τον προσδιορισμό υλικών υψηλού Μοριακού βάρους.

Α. Βασικές εξισώσεις

Σωματίδιο κινούμενο επί κυκλικής τροχιάς υφίσταται τη δράση της κεντρομόλου δύναμης (F_K) η οποία ισούται με:

$$F_K = m\omega^2 r \qquad (9.3)$$

όπου: m= μάζα σωματιδίου (gr)

ω= γωνιακή ταχύτητα σωματιδίου (rad/sec)

r= απόσταση σωματιδίου από τον άξονα περιστροφής (cm)

Η αντίστοιχη φυγόκεντρος δύναμη (F_φ), που υφίσταται το σωματίδιο λόγω περιστροφικής κίνησης θα ισούται με:

$$F_\varphi = \frac{m\,\omega^2\, r}{g} \qquad (9.4)$$

όπου: g= επιτάχυνση της βαρύτητας = 981 cm/sec^2

Συνήθως υπολογίζεται η τιμή της φυγόκεντρου δύναμης στο μέσον του βάθους του υγρού.

Λόγω του φαινομένου της άνωσης (αρχή του Αρχιμήδη) απαιτείται διόρθωση της τιμής της φυγόκεντρου δύναμης. Επειδή η πραγματική μάζα του σωματιδίου είναι $m_{\eta\rho}$=m-Vρ, ή διορθωμένη τιμή της φυγόκεντρου δύναμης (F_Δ) θα ισούται:

$$F_\Delta = (m - V\rho)\,\omega^2 r \qquad (9.5)$$

όπου: V=όγκος σωματιδίου

ρ= πυκνότητα υγρού

αν το σωματίδιο θεωρηθεί σφαιρικό τότε η (9.5) γίνεται:

$$F_\Delta = \left(\Delta\rho\,\frac{\pi}{6}\,D^3\right)\omega^2 r \qquad (9.6)$$

όπου Δρ= διαφορά πυκνότητας μεταξύ σωματιδίου/υγρού

D= διάμετρος σωματιδίου.

F_Δ είναι η δύναμη, υπό την επίδραση της οποίας κινείται το σωματίδιο μέσα στο υγρό μέσον.

Φυσικά κατά την καθίζηση των σωματιδίων αναπτύσσεται τριβή (F_T) που δίνεται από τον τύπο του Stokes:

$$F_T = 3\,\pi\,\eta\,D\,v_s \qquad (9.7)$$

όπου: η= ίξωδες του υγρού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

v_s= ταχύτητα κινουμένου σωματιδίου στο υγρό

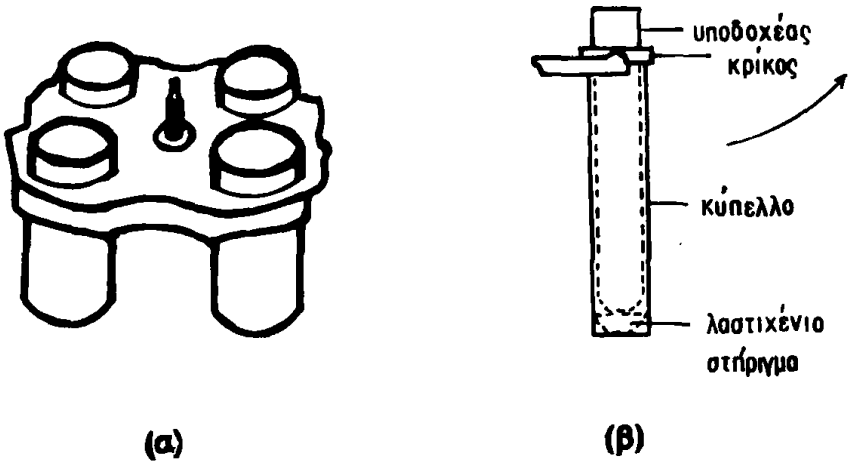
Με συνδυασμό των (9.6) και (9.7) προκύπτει:

$$v_s = \frac{\Delta\rho D^2 \omega^2 r}{18\eta} \qquad (9.8)$$

Από την (9.8) είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ταχύτητα U_s του σωματιδίου σε οποιαδήποτε απόσταση r από τον άξονα περιστροφής.

9.4 Οργανολογία

Οι συσκευές με τις οποίες επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων καλούνται φυγόκεντροι (centrifuges). Υπάρχουν δύο τύποι φυγοκέντρων: (1) εκείνες με κλειστά τοιχώματα όπου ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με καθίζηση και (2) εκείνες με διάτρητα τοιχώματα (φίλτρα), όπου το μέν στερεό συγκρατείται στις εσωτερικές επιφάνειες της φυγοκέντρου, ενώ η υγρή φάση απομακρύνεται από τους πόρους που βρίσκονται στην περιφέρεια. Στην πιο απλή της μορφή η φυγόκεντρος αποτελείται από κεφαλή που έχει τη δυνατότητα περιστροφής γύρω από κατακόρυφο άξονα. Ακτινωτά, η κεφαλή



Σχ. 9-3. (α) βασική διάταξη φυγοκέντρου (β) λεπτομέρεια.

φέρει θέσεις για υποδοχείς (σχ. 9-3α), μέσα στους οποίους τοποθετούνται ισάριθμοι δοκιμαστικοί σωλήνες με το προς φυγοκέντριση δείγμα.

Στις σύγχρονες φυγοκέντρους ρυθμίζονται οι παράμετροι: χρόνος, θερμοκρασία και ταχύτητα περιστροφής. Αυξανόμενης της ταχύτητας περιστροφής,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οι υποδοχείς από κατακόρυφοι τείνουν να οριζοντιοποιηθούν, θέση στην οποία και παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της φυγοκέντρισης. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κλασματική καθίζηση κατά μήκος του σωλήνα που περιέχει το δείγμα. Οι κοινές φυγόκεντροι αναπτύσσουν επιταχύνσεις μέχρι 5000 g. Έτσι μπορούν να διαχωρήσουν σωματίδια μεγέθους 1-50 nm. Για τη φυγοκέντριση κολλοειδών κυρίως συστημάτων[16] σε βιολογικά δείγματα (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες κ.α.) η συμβατική φυγόκεντρος δεν ενδείκνυται. Για τους σκοπούς αυτούς χρησιμοποιούνται οι υπερφυγόκεντροι (untracentrifuges) που στις 20,000 rpm αναπτύσσουν επιταχύνσεις μέχρι 500,000 g.

9.5 Εφαρμογές φυγοκέντρισης

Η φυγοκέντριση και κυρίως η υπερφυγοκέντριση χρησιμοποιούνται τόσο για αναλυτικούς όσο και για παρασκευαστικούς σκοπούς.

Α. Αναλυτική υπερφυγοκέντριση

Συνηθισμένη εφαρμογή της τεχνικής αυτής αποτελεί ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών (διαχωρισμός πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους). Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται υπερφυγόκεντρος με αυτόματη ρύθμιση θερμοκρασίας και ταχύτητας περιστροφής, θάλαμο υψηλού κενού για την ελάττωση των τριβών, οπτικό σύστημα για τη μέτρηση της ταχύτητας μετακίνησης καθεμιάς πρωτεΐνης προς τον πυθμένα του υποδοχέα με το δείγμα καθώς και σύστημα μέτρησης και καταγραφών της διαφοράς συγκεντρώσεων σε διάφορες αποστάσεις από το κέντρο περιστροφής συναρτήσει του χρόνου.

Ειδικά για αναλυτικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται οι τεχνικές: (1) Ισορροπίας καθίζησης (sedimentation equilibrium) και (2) ταχύτητας καθίζησης (sedimentation velocity).

Στην πρώτη τεχνική προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις των κλασμάτων του δείγματος (π.χ. πρωτεΐνης) σε διαφορετικούς χρόνους στην επιφάνεια και κοντά στον πυθμένα του υποδοχέα με το δείγμα. Το μοριακό βάρος, στην κατάσταση ισορροπίας, τους δείγματος θα ισούται:

$$MB = \frac{2RT \ln\left(\frac{c_1}{c_2}\right)}{\omega^2 (1-\rho/\sigma)(x_1^2-x_2^2)} \qquad (9.10)$$

όπου: R= σταθερά των αερίων

T= απόλυτη θερμοκρασία

c_1, c_2= συγκεντρώσεις του δείγματος σε αποστάσεις x_1 και x_2

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αντίστοιχα από τον άξονα περιστροφής της φυγοκέντρου

ρ= πυκνότητα του διαλύτη

ο= πυκνότητα του δείγματος

ω= γωνιακή ταχύτητα περιστροφής.

Η διαδικασία μέτρησης διαρκεί από 45-70 min. Η τεχνική βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό εκτός των πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων και ιών. Η δεύτερη τεχνική χρησιμοποιεί υψηλές ταχύτητες περιστροφής οπότε η καθίζηση επιτυγχάνεται ταχέως. Τα μόρια της υπό εξέταση ουσίας (π.χ. πρωτεΐνης) απομακρύνονται από τον άξονα περιστροφής και δημιουργείται ένα σαφές όριο μεταξύ του καθαρού διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας. Η παρατήρηση της μετακίνησης του ορίου αυτού προς την περιφέρεια με ειδικό οπτικό σύστημα αποτελεί τη βάση για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της εξεταζόμενης ουσίας με την τεχνική αυτή. Η ταχύτητα καθίζησης εκφράζεται με τη σταθερά καθίζησης S που παριστάνει την ταχύτητα ανά μονάδα φυγοκέντρου δύναμης και έχει διαστάσεις χρόνου. Συνήθως η τιμή της S κυμαίνεται από 1-200 $\times 10^{-13}$ sec.

Β. Παρασκευαστική υπερφυγοκέντριση

Η μέθοδος χρησιμοποιεί συνήθως την τεχνική της βαθμωτής πυκνότητας (density gradients) που ελαχιστοποιεί τη διάχυση των σωματιδίων και έτσι συντελεί στη λήψη σαφώς διαχωριζόμενων κλασμάτων. [18,19].

Στην τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ο σχηματισμός βαθμίδων πυκνότητας η οποία αυξάνει ανάλογα με την απόσταση των διαχωριζόμενων σωματιδίων από τον άξονα περιστροφής. Έτσι τα σωματίδια διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, πάντα σε παρασκευαστική κλίμακα.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των βαθμίδων πυκνότητας πρέπει να είναι χημικώς αδρανή, μη τοξικά, διαλυτά στο νερό και NaCl, να έχουν υψηλό μοριακό βάρος και πυκνότητα και χαμηλό ιξώδες. Συνήθη, για το σκοπό αυτό υλικά είναι η σακχαρόζη ή υδατοδιαλυτά κολλοειδή όπως το Ficoll (MB=50,000) που συμπεριφέρεται σαν πολυσακχαρίτης και έχει πυκνότητα και ιξώδες χαμηλότερα εκείνων της σακχαρόζης.

Η φυγοκέντριση βαθμωτής πυκνότητας χρησιμοποιείται κυρίως για τις πρωτεΐνες.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Wootton M** J. Sci. Food Agr. 17, 297 (1966)
2. **Glam I** and **Dugan LR** Jr J. Food Sci 30, 262 (1965)
3. **Honig DH, Sessa D.J., Hoffman RL** and **Rackis JJ** Food Technol 23, 803(1969)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

4. **Mekillican ME, Sims RPA, Johnston FB** and **Mea JC** Cereal Chem 45, 512 (1968).
5. **Hagen SN, Murphy G.W.** and **Skelly LM** J. Assoc. Offic Anal. Chem. 50, 250 (1967)
6. **Evans CP, McConnell D.G., Scholfield CR** and **Dutton JH** J. Amer. Oil Chem. Soc. 43, 345 (1966)
7. **Swain T** and **Hillis WE** J. Sci. Food Agr. 10, 63 (1959)
8. **Sale JW** Assoc. Off Agric. Chem. 21:502 (1938)
9. **Joslyn M.A.** Methods in Food Analysis, Academic Press, New York (1970)
10. **Thaler H** and **Arneth** Z. Lebensmittel Untersuch. Forsch. 138:26 (1968)
11. **Barr CO** Plant Physiol. 14, 737 (1939)
12. **Thomas F, Carpena O** and **Abrisquesta C** Ann. Bromat 18, 393 (1966)
13. **Association of Vitamin Chemists** Methods in Vitamin Assay. 3th edit. Interscience NY (1966)
14. **Johnson LY** J. Assoc. Offic. Agr. Chem 48, 250 (1967)
15. **Mills PA. Onley JH** and **Gaither RA** J. Assoc. Offic. Agric. Chem 46, 186 (1963)
16. **Williams JW** Ultracentrifugal Analysis in Theory and Experiment, Academic Press, New York (1963)
17. **Trautman R** Ultracentrifugation. In Instrumental Methods in Experimental Biology D.W. Newman (edit.) MacMillan Publ. Co, New York (1964)
18. **Anderson N.G.** J. Phys. Chem 66, (1984)
19. **Szybalski W** Fractions 1, 1 (1968)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ

10.1 Εισαγωγή

Από τα συστατικά των τροφίμων, το σε μεγαλύτερη αναλογία εμφανιζόμενο, είναι το νερό. Η υγρασία των τροφίμων κυμαίνεται μεταξύ ευρέων ορίων, από τα φρούτα όπως το καρπούζι και πεπόνι (92-94%), το γάλα (87-91%), τα εσπεριδοειδή (86-90%), τα αυγά (74%), οι πατάτες (78%), το κρέας (50-70%), τα τυριά (40-75%), το ψωμί (35-45%), οι μαρμελάδες (35%), το μέλι (20%), το αλεύρι 10-13%, τα ζυμαρικά (9%), μέχρι τη σκόνη αυγού (5%) και τη σκόνη γάλακτος (4%).

Ο προσδιορισμός της υγρασίας παίζει βασικό ρόλο σε πολλές εργαστηριακές και βιομηχανικές εφαρμογές. Μια και για δοσμένο βάρος τροφίμου, το ποσό των στερεών συστατικών αυτού είναι αντιστρόφως ανάλογο του περιεχομένου σ' αυτό νερού, ο παραπάνω προσδιορισμός έχει επί πλέον οικονομικό ενδιαφέρον, τόσο για τον παρασκευαστή του τροφίμου, όσο και για τον καταναλωτή.

Μεγαλύτερης ακόμη σημασίας είναι το ποσό του νερού σε σχέση με τη σταθερότητα και την υγιεινή κατάσταση των τροφίμων. Αυξημένη περιεκτικότητα σε νερό έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη αλλοίωση του τροφίμου, λόγω ανάπτυξης μικροοργανισμών, προσέλκυσης εντόμων κ.τ.λ.

Έχει βρεθεί πως ο ρυθμός αμαύρωσης σε αφυδατωμένα οπωροκηπευτικά αυξάνει με την αύξηση της περιεκτικότητας των προϊόντων αυτών σε νερό. Ακόμη απαιτείται η γνώση της περιεχόμενης στα τρόφιμα υγρασίας για τον καθορισμό της θρεπτικής τους αξίας, την επιλογή των καλύτερων συνθηκών βιομηχανικής τους επεξεργασίας κ.τ.λ.

10.2 Μορφές του νερού που απαντούν στα τρόφιμα.

Το νερό στα τρόφιμα απαντά σε τρεις μορφές:

(α) ελεύθερο νερό, στους διακυτταρικούς χώρους και στους πόρους του τροφίμου. Ο τύπος αυτός διατηρεί όλες τις φυσικές ιδιότητες του χημικά καθαρού νερού.

(β) φυσικά προσροφημένο νερό, ο τύπος αυτός του νερού απαντά στην επιφάνεια μακρομοριακών συστημάτων όπως, άμυλου, κυτταρίνης και πρωτεΐ-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νών. Η συγκράτηση του νερού αυτού στις παραπάνω επιφάνειες γίνεται με δυνάμεις τύπου Van der Waals και με δεσμούς υδρογόνου.
(γ) νερό χημικά δεσμευμένο στη μάζα του τροφίμου.
Προφανώς οι όροι ελεύθερο, φυσικά προσροφημένο και χημικά δεσμευμένο νερό είναι σχετικοί και τα όρια τους αλληλοεπικαλύπτονται. Στην πραγματικότητα το νερό παρουσιάζει συνεχές φάσμα ιδοτήτων των τριών παραπάνω κατηγοριών.

10.3 Προσδιορισμός υγρασίας

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της υγρασίας στα τρόφιμα δύνανται να καταταγούν σε άμεσες και έμμεσες.
Στις άμεσες μεθόδους το νερό απομακρύνεται από το τρόφιμο μέσω ξήρανσης, απόσταξης, εκχύλισης ή άλλης φυσικοχημικής μεθόδου και η υγρασία υπολογίζεται με ζύγιση ή άλλο άμεσο τρόπο. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται συνήθως στο εργαστήριο και έχουν μεγάλη ακρίβεια.
Στις έμμεσες μεθόδους η υγρασία δεν απομακρύνεται από το τρόφιμο αλλά μετρείται κάποια ή κάποιες παράμετροι του τροφίμου που εξαρτώνται άμεσα από το ποσόν του νερού που περιέχει. Οι μετρήσεις εδώ είναι αυθαίρετες και πρέπει να συσχετίζονται με τις αντίστοιχες τιμές που προκύπτουν από τις άμεσες μεθόδους. Οι άμεσες μέθοδοι είναι συνήθως χρονοβόρες, εκτελούνται χειρονακτικά και είναι ασυνεχείς. Οι έμμεσες μέθοδοι είναι συνήθως γρήγορες, χρησιμοποιούν σχετικά σύνθετες συσκευές και όργανα, είναι συνεχείς και χρησιμοποιούνται κυρίως για αυτόματο ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία.

Α. Άμεσες μέθοδοι προσδιορισμού υγρασίας

1. Ξήρανση σε πυριατήριο

(Ονομάζεται, εσφαλμένα ίσως, έμμεση επειδή η υγρασία προκύπτει έμμεσα από την απώλεια βάρους του θερμανθέντος δείγματος τροφίμου).
Σύμφωνα με τη μέθοδο κατάλληλος προζυγισμένος υποδοχέας (σχ. 10-1), κάψα, φιαλίδιο ζύγισης κ.α.) γεμίζεται με το προς ξήρανση δείγμα ($\leq$10g) και ζυγίζεται. Ακολουθεί ξήρανση του δείγματος σε πυριατήριο σταθερής θερμοκρασίας (T=105°C). Στη συνέχεια ψύχεται ο υποδοχέας του δείγματος σε ξηραντήρα και επαναζυγίζεται μέχρι σταθερού βάρους.
Η υγρασία του δείγματος υπολογίζεται από τη σχέση 10.1

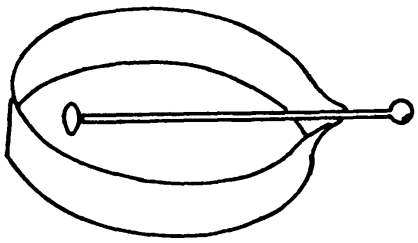
$$W_N = W_A - W_T \qquad (10.1)$$

όπου:

W_N= βάρους υγρασίας δείγματος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

W_A= βάρος αρχικού δείγματος και υποδοχέα
W_T =βάρος τελικό ξηραμένου δείγματος και υποδοχέα.



Σχ. 10-1. Κάψα προσδιορισμού της υγρασίας.

Στη βιομηχανία σήμερα υπάρχουν όργανα που διενεργούν όλες τις παραπάνω διεργασίες αυτόματα. Ένα τέτοιο όργανο είναι ο φούρνος υγρασίας Brabender. Η συσκευή αποτελείται από αναλυτικό ζυγό ενσωματωμένο σε φούρνο που διαθέτει ειδικό κυκλοφορητή για την διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας σε όλα τα σημεία του. Σε προκαθορισμένα διαστήματα ξήρανσης ο υποδοχέας με το δείγμα ζυγίζεται αυτόματα και η ένδειξη της υγρασίας δίνεται σε ψηφιακή κλίμακα.
Κατά την ξήρανση υποτίθεται ότι το μόνο συστατικό που απομακρύνεται από το δείγμα είναι η υγρασία. Στην πράξη όμως εκτός από την υγρασία, απομακρύνονται πτητικά συστατικά, αέρια, καθώς και συστατικά που προκύπτουν από μερική θερμική αποικοδόμηση του δείγματος κατά τη θέρμανση. Τέλος επέρχεται μεταβολή στο βάρος του δείγματος λόγω πιθανών οξειδώσεων. Τα παραπάνω φαινόμενα εισάγουν σφάλμα στη μέθοδο αυτή προσδιορισμού της υγρασίας.
Ο ρυθμός απομάκρυνσης του νερού από το τρόφιμο εξαρτάται από την έκταση της επιφάνειάς του, τη θερμοκρασία και την τιμή της τάσης ατμών του νερού πάνω από το δείγμα.
Η θερμοκρασία ξήρανσης κυμαίνεται μεταξύ 70-155°C, ανάλογα με το συγκεκριμένο δείγμα. Ο χρόνος ξήρανσης κυμαίνεται μεταξύ 1-6 hrs. Η ξήρανση συνεχίζεται μέχρις ότου δύο διαδοχικές ζυγίσεις δώσουν διαφορά βάρους $\leq$ 2 mg για 5g δείγματος.

2. Ξήρανση υπό κενό

Παραλλαγή της προηγούμενης μεθόδου, αποτελεί η ξήρανση υπό κενό. Το δείγμα θερμαίνεται σε πυριατήριο κενού σε θερμοκρασία μεταξύ 60-70°C. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για τρόφιμα θερμοευαίσθητα, για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα αποικοδόμησης του δείγματος. Εφαρμόζεται σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα π.χ. φρουκτόζη. Εδώ ο ρυθμός απομά-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κρυνσης του νερού αυξάνει με την μείωση της τάσης ατμών του νερού στο περιβάλλον, με την εφαρμογή του κενού. Οι τιμές του κενού κυμαίνονται μεταξύ 25-35 mm Hg.

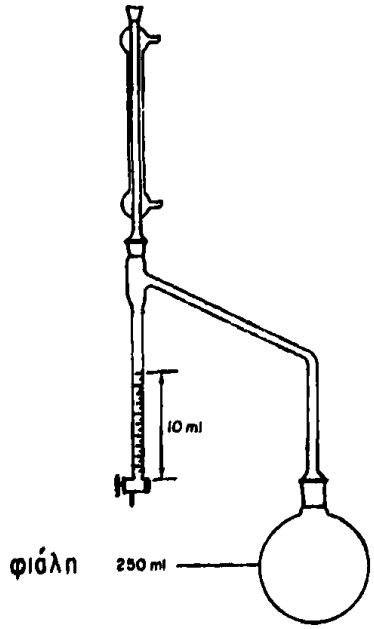
Συνηθισμένη πηγή σφαλμάτων στις μεθόδους αυτές προσδιορισμού της υγρασίας, αποτελεί ο σχηματισμός κρούστας στην επιφάνεια του ξηραινόμενου τροφίμου που εμποδίζει την απομάκρυνση του συνόλου της υγρασίας από το δείγμα. Το πρόβλημα ξεπερνιέται με ανάμιξη του δείγματος με άμμο, οπότε αυξάνεται κατά πολύ η επιφάνεια του τελευταίου χωρίς να σχηματίζεται κρούστα.

3. Θερμοσταθμικές μέθοδοι (Thermogravimetric methods)

Αποτελούν βελτίωση της μεθόδου ξήρανσης σε πυριατήριο. Εδώ χρησιμοποιείται θερμοζυγός (thermobalance) ο οποίος καταγράφει αυτόματα, ενώ αυτό θερμαίνεται, τη μεταβολή στο βάρος του δείγματος, συναρτήσει της θερμοκρασίας και του χρόνου. Για λεπτομέρειες της μεθόδου βλ. Κεφ. 5. Το νερό απομακρύνεται συνεχώς μέχρις επίτευξης σταθερού βάρους. Έτσι με ένα μόνον πείραμα προκύπτουν πληροφορίες για την υγρασία, τον τρόπο σύνδεσης του νερού με το τρόφιμο και την κινητική της διαδικασίας ξήρανσης.

4. Μέθοδοι απόσταξης

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται το φαινόμενο της αζεοτροπίας του νερού. Το νερό δηλαδή συναποστάζει με άλλο αναμίξιμο υγρό μικρότερου ή μεγαλύτερου ειδικού βάρους σε σταθερή αναλογία, π.χ. για το νερό σ.ζ. = 100°C) και το τολουόλιο (σ.ζ. = 110°C), το αζεοτροπικό μίγμα νερού/τολουο-



Σχ. 10-2. Συσκευή απόσταξης Dean-Stark

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΠΑΤΡΩΝ

λίου, σε αναλογία 20:80, βράζει στους 85°C.

Η συσκευή απόσταξης αποτελείται από κωνική ή σφαιρική φιάλη,(σχ. 10-2), ειδικό βαθμολογημένο υποδοχέα Bidwell-Sterling και κατακόρυφο ψυκτήρα. Το τρόφιμο τοποθετείται στην κωνική ή σφαιρική φιάλη που θερμαίνεται με θερμομανδία μαζί με το κατάλληλο υγρό (τολουόλιο, ξυλόλιο, τετραχλωράνθρακα) και τίθεται σε λειτουργία η συσκευή. Το αποστάζον και συμπυκνούμενο μίγμα νερού/υγρού συλλέγεται στο κάτω μέρος του ειδικά βαθμολογημένου υποδοχέα. Το νερό σαν βαρύτερο καταλαμβάνει την κάτω στοιβάδα, ενώ το υγρό (τολουόλιο) σαν ελαφρύτερο καταλαμβάνει την πάνω στοιβάδα και επειδή είναι πολύ περισσότερο σε όγκο υπερχυλίζει την απόληξη του υποδοχέα και επιστρέφει στον βραστήρα. Μετά το τέλος της εκχύλισης (1/2-1 hr) η βαθμολογημένη κλίμακα του υποδοχέα δίνει κατ' ευθείαν το ποσό του νερού σε ml.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται:

(α) Ο άμεσος προσδιορισμός του νερού και όχι εκ διαφοράς βάρους

(β) Η μεγαλύτερη ακρίβεια λόγω δυνατότητας χρησιμοποίησης μεγαλύτερου δείγματος.

(γ) Η ταχύτητα. Η μέθοδος απαιτεί 1/2 - 1 hr.

(δ) Η χρήση απλής συσκευής.

(ε) Η υγρασία του περιβάλλοντος δεν υπεισέρχεται στον προσδιορισμό.

(στ) Η μέθοδος ενδείκνυται για ευαίσθητα και ευοξείδωτα τρόφιμα.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται:

(α) Η κατακράτηση σταγόνων νερού στα εσωτερικά τοιχώματα του βραστήρα και του ψυκτήρα. Γιαυτό πρέπει τα σκεύη αυτά να καθαρίζονται επισταμένως πριν από κάθε προσδιορισμό.

(β) Η πιθανή συναπόσταξη και άλλων υδατοδιαλυτών, εκτός του νερού, ουσιών, π.χ. αιθανόλη, ποιι θα δώσουν θετικό σφάλμα στον προσδιορισμό.

(γ) Ο κίνδυνος πυρκαγιάς από τα πτητικά υγρά που χρησιμοποιούνται π.χ. τολουόλιο, ξυλόλιο κ.τ.λ.

(δ) Το πιθανό σφάλμα ανάγνωσης του όγκου του νερού στον υποδοχέα.

5. Χημικές μέθοδοι

(α) Μέθοδος Karl Fischer

Βασίζεται στην αντίδραση αναγωγής του I_2 από SO_2 παρουσία νερού:

$$2H_2O + SO_2 + I_2 \rightarrow H_2SO_4 + 2HI$$

Αργότερα τροποποιήθηκε η μέθοδος με την προσθήκη (i) πυριδίνης που ελαχιστοποιεί τις απώλειες του SO_2 και (ii) CH_3OH που δρα σαν διαλυτικό μέσον.

Η αντίδραση γίνεται σε δύο στάδια:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$C_6H_5N.I_2 + C_6H_5.SO_2 + C_6H_5N + H_2O \rightarrow 2C_6H_5N.HI + C_6H_5N.SO_3$ (10.3)

$C_6H_5N.SO_3 + CH_3OH \rightarrow C_6H_5N\ (H)\ SO_4\ CH_3$ (10.4)

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω αντιδράσεις για κάθε 1 mol νερού που καταναλίσκεται απαιτούνται: 1mol I_2, 1 mol SO_2, 1 mol CH_3OH και 3 mol πυριδίνης. Το αντιδραστήριο Karl Fischer αποτελείται από δύο διαλύματα. Το διάλυμα Α (SO_2/πυριδίνη/CH_3OH) και το διάλυμα Β (I_2 σε CH_3OH). Η πρώτη περίσσεια του I_2 κατά την ογκομέτρηση δίνει το γνωστό καφέ-κίτρινο χρώμα του ελεύθερου I_2, ενδεικτικό του τελικού σημείου. Προσθήκη δείκτη κυανού του μεθυλενίου δίνει πράσινο χρώμα στο τελικό σημείο.

Για να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή προσδιορισμού της υγρασίας, το τρόφιμο πρέπει να βρίσκεται σε ρευστή κατάσταση. Πυκνόρευστα υγρά και πάστες αραιώνονται και ομογενοποιούνται με τον κατάλληλο διαλύτη. Στερεά είτε ομογενοποιούνται με διαλύτη, ώστε να περάσουν από κόσκινο 40 Mesh ή ογκομετρούνται σαν αιωρήματα. Κοκκώδη υλικά αλέθονται και ογκομετρούνται σαν αιωρήματα. Συχνά για την ογκομέτρηση όλου του ποσού του νερού του τροφίμου, απαιτείται εκχύλιση του νερού με μεθανόλη υπό κατακόρυφο ψυκτήρα. Ο προσδιορισμός απαιτεί μισή περίπου ώρα.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται:

(1) Η αδυναμία πλήρους εκχύλισης του νερού από το δείγμα

(2) Η υψηλή καθαρότητα των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του αντιδραστηρίου Karl Fischer

(3) Η δυσκολία καθορισμού του τελικού σημείου.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό υγρασίας πλούσιων σε σάκχαρα τροφίμων, π.χ. μέλι, πρωτεϊνών, ειδών αρτοποιΐας κ.τ.λ.

Η μέθοδος παρέχει μεγάλη ακρίβεια και γιαυτό χρησιμοποιείται με επιτυχία και στον προσδιορισμό ιχνών υγρασίας σε λιπαρά τρόφιμα.

6. Αέρια Χρωματογραφία

Η μέθοδος βασίζεται στην εκχύλιση της υγρασίας με οργανικό διαλύτη και προσδιορισμό του νερού με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης μέσα σε αεριοχρωματογραφική στήλη. Εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που το νερό (i) εκχυλίζεται ποσοτικά (ii) το εκχύλισμα δεν περιέχει ουσίες, οι κορυφές των οποίων συμπίπτουν με εκείνη του διαλύτη ή του νερού στο χρωματογράφημα. Συνήθως ποσότητα 15 g δείγματος τροφίμου αλέθεται σε blender με 100 ml απόλυτης CH_3OH και λίγα ml βουτανόλης. Το μίγμα αφίνεται να ισορροπίσει και με την βοήθεια μικροσύριγγας εισάγονται 2-5 μl υπερκείμενου υγρού στον αέριο χρωματογράφο. Η χρησιμοποιούμενη στήλη είναι συνήθως Porapak Q, ενώ ο ανιχνευτής είναι θερμικής αγωγιμότητας (TCD). Η ανάλυση απαιτεί 5-10 min. Η μέθοδος εφαρμόζεται για τρόφιμα με υγρασία 8- 65%.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

7. Διαθλασιμετρία

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την απλότητα, την ταχύτητα και τη σχετική ακρίβεια. Το δείγμα ομογενοποιείται με άνυδρο διαλύτη π.χ. ισοπροπανόλη και κατόπιν εξισορρόπισης προσδιορίζεται ο δείκτης διάθλασης του υπερκείμενου υγρού. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα σε υγρασία στο δείγμα υπολογίζεται με σύγκριση του δείκτη διάθλασης προτύπων διαλυμάτων νερού/διαλύτη με εκείνον του δείγματος. Ο προσδιορισμός απαιτεί χρόνο 5-10 min.

Β. Έμμεσες μέθοδοι

1. Φασματοσκοπία IR

Το φάσμα υπερύθρου μιας οργανικής ένωσης είναι πιθανόν η πιο χαρακτηριστική φυσικής της ιδιότητα. Αποτελεί, όπως κι αλλού έχει αναφερθεί (κεφ. 3) το δακτυλικό αποτύπωμα της ένωσης. Είναι ακόμη γνωστό ότι το φάσμα IR του νερού παρέχει τη βάση για ποσοτικό προσδιορισμό του σε διάφορα τρόφιμα. Η περιοχή του φάσματος από 0.7–3.0 μm είναι η πλέον κατάλληλη για τους εν λόγω προσδιορισμούς, μια και το νερό παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στα μήκη κύματος 0.76, 0.97, 1.18, 1.45 και 1.94 μm. Το ποσό του νερού στο δείγμα υπολογίζεται κατόπιν σύγκρισης του εμβαδού της κορυφής στο φάσμα, με το αντίστοιχο εμβαδόν γνωστής ποσότητας νερού. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, όπως τα δημητριακά, το αλεύρι κ.τ.λ. Στην περιοχή αυτή των συγκεντρώσεων νερού η ευαισθησία της μεθόδου είναι μεταξύ 1-5 ppm. Για αύξηση της ευασθησίας σαν πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λαμπτήρας Βολφραμίου, ανιχνευτής $PbSO_3$ και μονοχρωμάτορας φράγματος.

Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, ποσότητα δείγματος περίπου 2g αλέθεται και αναμειγνύεται με 1.5-2.0 ml CCl_4. Μετρείται δε η διαφορά απορρόφησης στα λ=1.94 και λ=2.08 μm. Πάχος δείγματος ίσο προς 1.5 mm δίνει ΔΑ = 0.04 για διαφοροποίηση στην υγρασία του προϊόντος της τάξης του 1%.

2. Φασματοσκοπία NMR

Η μέθοδος βασίζεται περισσότερο στις πυρηνικές ιδιότητες των υδρογονοατόμων στο μόριο του νερού, παρά στις ιδιότητες του ίδιου του μορίου του νερού. Η διέλευση ακτινοβολίας μήκους κύματος στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων μέσω του δείγματος (βλ. κεφ. 3.7) συνοδεύεται από απορρόφηση ενέργειας, που καταγράφεται από κατάλληλη διάταξη. Έχει δειχτεί πως υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του ποσού της υγρασίας και της ένδειξης του οργάνου σε millivolts. Το φασματόμετρο NMR μετράει μ' αυτό τον τρόπο ελεύθερο νερό. Με υψηλής διακριτικής ικανότητας (high resolution) NMR διαφοροποιείται το ελεύθερο από το χημικά δεσμευμένο νερό. Ο απαιτούμενος χρόνος για τον προσδιορισμό είναι της τάξης μερικών sec. Η μέθοδος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

εφαρμόζεται για τρόφιμα με υγρασία μεταξύ 5-100% (αλεύρι, ρύζι, ζάχαρη, άμυλο, γλυκά, τυριά κ.τ.λ.) έχει δε ακρίβεια 0.2%.
Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν το πολύ υψηλό κόστος του οργάνου NMR και το γεγονός ότι δεν μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος.

3. Αγωγιμομετρία στο συνεχές και εναλλασόμενο ρεύμα.

Έχει δειχτεί ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της περιεχόμενης σε ένα τρόφιμο υγρασίας με την αγωγιμότητα διαλυμάτων του ή την αντίσταση που συναντά το συνεχές ή εναλλασόμενο ρεύμα κατά τη διέλευσή του, μέσω των διαλυμάτων των τροφίμων. Αυξανόμενης της υγρασίας, ελαττώνεται η αντίσταση ή αύξάνεται η αγωγιμότητα του μέσου στο οποίο βρίσκεται το δείγμα του τροφίμου. Για την περιεκτικότητα σε υγρασία μεταξύ 5-30%, ο λογάριθμος της αντίστασης είναι γραμμική συνάρτηση του ποσοστού υγρασίας. Σε πολύ υψηλά ποσοστά υγρασίας έχει δειχτεί ότι οι αγωγιμότητες στο συνεχές και εναλλασόμενο ρεύμα είναι περίπου ίσες, ενώ σε πολύ χαμηλά επίπεδα υγρασίας η αγωγιμότητα στο συνεχές είναι σημαντικά χαμηλώτερη της παρατηρούμενης στο εναλλασόμενο ρεύμα.
Για τον προσδιορισμό της υγρασίας, το διάλυμα του δείγματος σε ηλεκτρολύτη, τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων και το ρεύμα που διαρρέει το τρόφιμο μετρείται σαν μεταβολή στην ηλεκτρική αντίσταση. Για την ακρίβεια της μεθόδου, σημαντικό ρόλο παίζουν η ομοιόμορφη κατανομή του νερού στο δείγμα, η καλή επαφή δείγματος-ηλεκτροδίων, η σταθερότητα της θερμοκρασίας (T=20-25°C) καθώς και η ομοιόμορφη κατανομή του χρησιμοποιούμενου ηλεκτρολύτη στο περιβάλλον μέσον.
Η μέθοδος είναι γρήγορη και μη καταστρεπτική για το δείγμα, μετράει δε μόνο το ελεύθερο νερό.

4. Μέθοδος διηλεκτρικής σταθεράς (χωρητικότητας)

Η διακύμανση της διηλεκτρικής σταθεράς των τροφίμων που περιέχουν υγρασία ακολουθεί γραμμική σχέση μόνο στην περιοχή υγρασίας από πολύ χαμηλή μέχρι και 30% περίπου. Η διηλεκτρική σταθερά του νερού είναι 81 ενώ η αντίστοιχη των διαφόρων ξηρών οργανικών υλικών κυμαίνεται από 2.2 – 4.0. Θεωρητικά αύξηση της υγρασίας κατά 1%, επιφέρει αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς κατά 0.8 μονάδες.
Η μέθοδος μετράει το ελεύθερο και το μεγαλύτερο μέρος του δεσμευμένου νερού.
Το προς μέτρηση δείγμα τοποθετείται μεταξύ δύο μεταλλικών πλακών ευρισκομένων σε δοχείο που περιέχει ηλεκτρολύτη. Η εισαγωγή του δείγματος στον μεταξύ των πλακών χώρο δημιουργεί πόλωση και προσανατο-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

λισμό των πολικών μορίων (του νερού) μέσα στό ηλεκτρικό πεδίο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του φορτίου των πλακών και συνεπώς της χωρητικότητας τους. Η μεταβολή της χωρητικότητας των πλακών συνεπάγεται τη μεταβολή της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου που μεταφράζεται σαν ηλεκτρικό ρεύμα. Αυτό με τη σειρά του μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα που δίνει απ' ευθείας την % υγρασία του δείγματος στην ψηφιακή οθόνη του οργάνου.
Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού επηρεάζονται από την παρουσία των ηλεκτρολυτών, την πυκνότητα του δείγματος και τη θερμοκρασία.

5. Απορρόφηση ενέργειας στην περιοχή των μικροκυμάτων
Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του διπόλου του μορίου του νερού να απορροφά πολύ υψηλότερα ποσά ενέργειας στην περιοχή των μικροκυμάτων από ότι οποιαδήποτε άλλη ένωση. Γιαυτό η περιοχή συχνότητας από 9-10 GHz χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της υγρασίας σε τρόφιμα, ειδικά σε προϊόντα με χαμηλή περιεκτικότητα υγρασίας. Έχει δειχτεί πως η ακρίβεια της μεθόδου αυτής είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ηλεκτρικών μεθόδων.

10.4 Σχετική υγρασία και ενεργότητα του νερού (a_w)

Σαν σχετική υγρασία (relative humidity, RH) ορίζεται το πηλίκον της τάσης ατμών του νερού στο περιβάλλον (P) προς την αντίστοιχη τάση ατμών κορεσμού στην ίδια θερμοκρασία (Po) εκφρασμένη σαν εκατοστιαία αναλογία (σχέση 10.5)

$$RH\ (\%) = (P/Po)_T \times 100 \qquad (10.5)$$

Ενεργότητα του νερού (water activity, a_w), είναι το μέτρο διαθεσιμότητας του νερού στο δείγμα, σχετίζεται με τη δυνατότητα χρησιμοποίησης του υγρού νερού για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και την διεξαγωγή διαφόρων βιοχημικών αντιδράσεων και ορίζεται σαν το πηλίκον της τάσης ατμών που εξασκεί το περιεχόμενο στο δείγμα νερό (P) προς την αντίστοιχη τάση ατμών ποιι εξασκεί το ελεύθερο νερό πάνω στην επιφάνεια του τροφίμου (Po) στην ίδια θερμοκρασία (σχέση 10.6)

$$a_w = (P/P_o)_T \qquad (10.6)$$

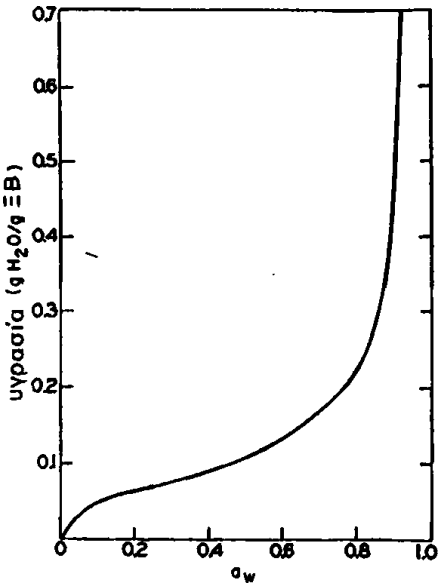
Τέλος σαν σχετική υγρασία στην κατάσταση ισορροπίας (equilibrium relative humidity, ERH) ορίζεται η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος το δείγμα χώρου στην οποία το δείγμα ούτε χάνει, ούτε προσλαμβάνει υγρασία.
Από τους παραπάνω ορισμούς προκύπτει η σχέση (10.7)

$$ERH(\%) = a_w \times 100 \quad \text{ή} \quad a_w = \frac{ERH}{100} \qquad (10.7)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Οι παραπάνω έννοιες έχουν άμεση σχέση με τη συντήρηση των τροφίμων κατά την αποθήκευση τους.

Τα τρόφιμα κατά την αποθήκευση τείνουν να εξισώσουν την σχετική τους υγρασία (ERH) προς εκείνη του χώρου (RH) στον οποίο βρίσκονται. Κατά συνέπεια αφυδατωμένα τρόφιμα έχουν χαμηλή τιμή ERH και κατά τη διάρκεια αποθήκευσής τους προσροφούν υγρασία ασυμπτωτικά μέχρις επίτευξης κατάστασης ισορροπίας με το περιβάλλον. Αντίστροφα νωπά τρόφιμα με μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία και τιμή ERH>90% αποβάλλουν υγρασία (ξεραίνονται) μέχρις ότου επιτύχουν αντίστοιχη κατάσταση ισορροπίας. Τα φαινόμενα αυτά της πρόσληψης ή αποβολής υγρασίας από δείγμα για την επίτευξη ισορροπίας με το περιβάλλον εκφράζονται γραφικά με τις ισόθερμες προσρόφησης. που δίνουν την a_w του δείγματος συναρτήσει της περιεχομενης στο δείγμα υγρασίας (σχ. 10-3).



Σχ. 10-3. Ισόθερμος προσρόφησης νερού σε τρόφιμα (20°C)

Η ενεργότητα του νερού (a_w) και συνεπώς η ERH (σχέση 10.7) μπορεί να προσδιοριστεί: (i) στατικά από τις διαφορές βάρους που παρουσιάζουν προζυγισμένα δείγματα τροφίμων όταν τοποθετηθούν σε ατμόσφαιρα μεταβαλλόμενης, αλλά γνωστής σχετικής υγρασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή μικρής ποσότητας (3g) του τροφίμου σε κλειστό δοχείο (ξηραντήρα) στη βάση του οποίου υπάρχουν κορεσμένα διαλύματα ειδικά επιλεγμένων αλάτων (Πίνακας 10.1) που καλύπτουν την περιοχή υγρασίας από 5 έως 98%. Ανάλογα με την τιμή του ERH (ή a_w) το τρόφιμο θα προσλάβει ή θα αποβάλλει υγρασία. Μετά από ορισμένο χρόνο π.χ. 24hrs, εξάγεται το δείγμα από τον

ξηραντήρα και ζυγίζεται. Η ενεργότητα νερού του δείγματος θα ισούται με την αντίστοιχη ενεργότητα του δοχείου εκείνου στο οποίο το δείγμα δεν αύξησε ούτε ελάττωσε το βάρος του.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10.1

Σχετική υγρασία κορεσμένων διαλυμάτων διαφόρων αλάτων στους 20°C

ουσία	σχετική υγρασία %	ουσία	σχετική υγρασία%
Υδροξείδιο νατρίου	5.5	Ιωδιούχο κάλιο	69
Οξικό κάλιο	20	Χλωριούχο νάτριο	76
Χλωριούχο μαγνήσιο	33	Χλωριούχο αμμώνιο	79.5
Νιτρώδες κάλιο	45	Θειϊκό αμμώνιο	81
Νιτρικό μαγνήσιο	56	Βρωμιούχο κάλιο	84
Νιτρικό αμμώνιο	64	Θειϊκό νάτριο	93
Νιτρώδες νάτριο	66	Νιτρικό κάλιο	93
Χλωριούχος χαλκός	68	Όξινο φωσφ. ασβέστιο	95
		Θειϊκό κάλιο	98

Από O'Brien (1948)[1]

και (ii), δυναμικά κατόπιν διέλευσης αερίου γνωστής σχετικής υγρασίας υπεράνω δείγματος τροφίμου που βρίσκεται σε κλειστό χώρο και μέτρησης του ποσού της υγρασίας που προσλαμβάνει ή αποβάλλει το τρόφιμο[2].

10.5 Εφαρμογές

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της υγρασίας με ξήρανση, ξήρανση υπό κενό [3,4,6,7] και αζεοτροπική απόσταξη [4,5,6,7] έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο φάσμα τροφίμων όπως σιτηρά, οπωροκηπευτικά, κρέας, ζαχαρώδη προϊόντα, μέλασσα, τυριά, μπαχαρικά, γαλακτοκομικά κ.α. Η μέθοδος Karl Fischer[8] έχει χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό μικρών ποσοτήτων υγρασίας σε αλεύρι, μαργαρίνη, μέλασσα, τσάι κ.α. Ακόμη έχει χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό ιχνών υγρασίας σε λίπη και λάδια[6].

Παρόμοια αποτελέσματα με τη μέθοδο αυτή δίνει η θερμοσταθμική ανάλυση[9,10]. Οι τεχνικές της διαθλασιμετρίας[11] και αέριας χρωματογραφίας[12,13,14] έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της υγρασίας σε προϊόντα όπως το κρέας και τα τυριά.

Η μέθοδος των μικροκυμάτων[15,16] χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

υγρασίας δημητριακών και προϊόντων κρέατος. Με NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας διαφοροποιήθηκε το ελεύθερο από το δεσμευμένο νερό σε διάφορα τρόφιμα[17]. Επίσης προσδιορίστηκε η υγρασία σε τρόφιμα όπως αλεύρι, ρύζι, ζάχαρη, άμυλο, καλαμπόκι, τυριά κ.τ.λ.

Ειδική Βιβλιογραφία

1. **O Brien EM** J. Scient. Instrum. 25(3), 73 (1948)
2. **Helen H.J.** and **Gilbert S.G.** J. Food Sci. 50, 454 (1984)
3. **Willits C.O.** Analyt, Chem 23, 1058 (1951)
4. **Karmas E** Food Tech. April, 52 (1980)
5. **Fetzer WR** Analyt Chem. 23, 1062 (1951)
6. **Pande A** Hand Book of Moisture Determination and Control Vols 1,2,3,4 Marcel Dekker N.Y. (1974, 1975)
7. **AOAC** Official Methods of Analysis 12th edit Assoc. Off Anal. Chem. Wash. D.C. (1975)
8. **Kviesitis B** J. Ass. Off Anal. Chem. 54, 1231 (1971)
9. **Biliaderis C** Food Chemistry 10, 239 (1983)
10. **Karmas E** and **Chen CC** Anal. Chem. 3, 489 (1974)
11. **Addis PB** and **Chudgar AS** J Food Sci 38, 354 (1973)
12. **Strange TE** J Amer Oil Chem. Soc. 53, 865 (1970)
13. **Khayat A** Can. Inst. Food Sci Tech. J. 7(1), 25 (1974)
14. **Reineccius GA** and **Addis PB** J Food Sci 38, 355 (1973)
15. **Okabe T, Huang MT** and **Okamura S.** J. Agr. Eng. Res. 18, 59 (1973)
16. **Pettinati JD** J Am Offic Anal. Chem. 58, 1188 (1975)
17. **Steinberg MP** and **Leung MK,** Water Relations of Foods, Duckworth RB (edit) Academic Press, New York (1975).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΦΡΑΣ ΚΑΙ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΥΛΩΝ

11.1 Ορισμοί-γενικά

Με ισχυρή θέρμανση στους 500-600°C τα τρόφιμα χάνουν το νερό και άλλα πτητικά συστατικά ενώ τα οργανικά τους συστατικά, καίγονται παρουσία O_2, προς CO_2, H_2O και οξείδια του αζώτου. Το περιεχόμενο θείο και ο φωσφόρος μετατρέπονται σε οξείδια. Τα περιεχόμενα μέταλλα παραμένουν σαν οξείδια, θειικά, φωσφορικά, πυριτικά ή χλωριούχα άλατα, ανάλογα με τις συνθήκες της καύσης και τη σύσταση του καιγόμενου δείγματος τροφίμου.

Το σύνολο αυτό των ανοργάνων συστατικών μαζί με τα προϊόντα αλληλεπίδρασης μεταξύ των συστατικών του δείγματος, τα προϊόντα οξείδωσης ορισμένων συστατικών και ενδεχομένως τα πτητικά προϊόντα του δείγματος που απομακρύνονται με τη θέρμανση, αποτελούν την **τέφρα. Τα ανόργανα στοιχεία** που απαντούν στην τέφρα διακρίνονται σε μακροστοιχεία (K, Na, Ca, Mg και P) και ιχνοστοιχεία (Al, Fe, Cu, Mn, Zn, As, I_2, F, Pb).

Το περιεχόμενο σε τέφρα διαφόρων τροφίμων ποικίλλει από 0% (αυγά, καθαρά λίπη και έλαια) μέχρι 6% (ελιές), για τα «ως έχει» προϊόντα και από 2-10% για προϊόντα «επί ξηρής βάσης».

Ο προσδιορισμός της τέφρας ενδιαφέρει την ανάλυση τροφίμων διότι:

(1) Το ποσοστό τέφρας αποτελεί ένδειξη πιθανής νοθείας του τροφίμου με συστατικά όπως σάκχαρα, άμυλο, πηκτινικές ουσίες που τα ίδια δίνουν διαφορετικές τιμές τέφρας

(2) αποτελεί ποιοτικό κριτήριο του προϊόντος αφού είναι γνωστό το ποσοστό της τέφρας των πρώτων υλών από τις οποίες παρασκευάζεται το προϊόν (π.χ. η τέφρα αποτελεί άριστο δείκτη της ποιότητας του αλευριού διότι η τέφρα του ενδοσπερμίου στον κόκκο του σιταριού διαφέρει κατά πολύ από την τέφρα του φλοιού (πίτυρου), έτσι ώστε με τον προσδιορισμό της να προκύπτουν συμπεράσματα για τη σύσταση του αλευριού. Ανάλογα ισχύουν σε προϊόνα όπως οι μαρμελάδες, κομπόστες, ζελέ φρούτων, όπου βγαίνει συμπέρασμα για το ποσό του φρούτου που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του συγκεκριμένου προϊόντος.

(3) Αποτελεί κριτήριο της ταυτότητας του τροφίμου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(4) Αποτελεί μέτρο του βαθμού επιμόλυνσης του προϊόντος με τα μεταλλικά κυρίως σκεύη με τα οποία το προϊόν έρχεται σε επαφή κατά τη διάρκεια της παρασκευής και συσκευασίας του π.χ. κουτί κονσέρβας κ.τ.λ.
Σύμφωνα με τα παραπάνω στο εργαστήριο εκτελούνται δύο είδη προσδιορισμού. Εκείνος της τέφρας και εκείνος των ανόργανων στοιχείων (K, Na, P, Ca κ.ο.κ.)

11.2 Είδη και προσδιορισμός τέφρας

Α. Συνολική τέφρα

Υπολογίζεται με προσδιορισμό της απώλειας βάρους που υφίσταται δείγμα κατά την πλήρη καύση του (αποτέφρωση). Η θέρμανση του δείγματος συνεχίζεται μέχρις ότου η σχηματιζόμενη τέφρα καταστεί ομογενής στην υφή, λευκή έως γκρίζα στο χρώμα χωρίς άκαυστα σωματίδια άνθρακα.

1. Προετοιμασία δείγματος

Η ποσότητα του τροφίμου που λαμβάνεται για τον προσδιορισμό της τέφρας ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του τροφίμου. Για ψάρια λαμβάνονται 2-3 g, για δημητριακά, γάλα, τυρί 3-5g, για σακχαρούχα προϊόντα, κρέατα και κηπευτικά 5-10 g προϊόντος, για οινοπνευματώδη ποτά 50ml, για χυμούς, φρούτα και κονσερβοποιημένα προϊόντα 25 g(ml), για μαρμελάδες, ζελέ ή αφυδατωμένα φρούτα 10g και για αναψυκτικά 10g στερεού υλικού μετά την απομάκρυνση του νερού.
Τρόφιμα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες νερού, εξατμίζονται προ της αποτέφρωσης. Προϊόντα με πολλά πηκτικά συστατικά π.χ. μπαχαρικά, θερμαίνονται κατ' αρχήν προσεκτικά ώστε να μην αναφλεγούν. Τρόφιμα περιέχοντα πολύ υψηλό ποσοστό λίπους π.χ. βούτυρο, μαργαρίνες, εκχυλίζονται με αιθέρα και στη συνέχεια αποτεφρώνεται το απολιπανθέν υπόλειμμα. Σακχαρούχα προϊόντα προκαλούν έντονο αφρισμό κατά την καύση. Για το λόγο αυτό θερμαίνονται κατ' αρχήν σε υδρόλουτρο προς εκδίωξη του νερού στους 100 °C, προστίθενται στο υπόλειμμα 2-3 σταγόνες ελαιολάδου (πρακτικά 0% τέφρα) και αποτεφρώνονται σε χαμηλή κατ' αρχήν, και σε υψηλή στη συνέχεια θερμοκρασία. Για την επιτάχυνση της αποτέφρωσης δυνατόν να προστεθούν στον υποδοχέα μικρά ποσά γλυκερίνης ή αλκοόλης. Συγκεκριμένα για τα δημητριακά προβλέπεται η διϋγρανση 3-5 g του προϊόντος με 5ml αλκοολικού διαλύματος $Mg(CH_3COO)_2$ και καύση στους 700°C (ξηρή αποτέφρωση).

2. Αποτέφρωση

Το πρώτο στάδιο της αποτέφρωσης προβλέπει καύση του δείγματος σε

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

χωνευτήρι που έχει προθερμανθεί σε υψηλή θερμοκρασία. Το χωνευτήρι είναι κατά προτίμηση από λευκόχρυσο, νικέλιο, χαλαζία ή και πορσελάνη χωρητικότητας 50-100 ml. Ο λευκόχρυσος (σ.τ. 1773°C) προτιμάται λόγω χημικής ουδετερότητας (αδράνειας), ειδικά όταν πρόκειται να ακολουθήσει προσδιορισμός μετάλλων στο δείγμα. Για προσδιορισμό μόνον της τέφρας η πορσελάνη δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η θέρμανση γίνεται κατ' αρχήν ήπια για να αποφευχθεί αφ' ενός μεν σύντηξη μερικών αλάτων που παγιδεύουν ποσότητα άνθρακα, ο οποίος στη συνέχεια δεν μπορεί να απανθρακωθεί και αφ' ετέρου εξαέρωση πτητικών αλάτων όπως NaCl και $FeCl_3$. Η κατά την καύση σχηματιζόμενη κρούστα στην επιφάνεια του δείγματος καταστρέφεται με τη βοήθεια σύρματος από λευκόχρυσο. Αφού απανθρακωθεί πλήρως το δείγμα (διακοπή έκλυσης καπνού) το χωνευτήρι μεταφέρεται σε φούρνο υψηλής θερμοκρασίας (500-600°C), για πλήρη αποτέφρωση. Αποφεύγεται η χρήση υψηλότερων θερμοκρασιών για την αποφυγή απωλειών διαφόρων πτητικών προϊόντων (χλωριούχα άλατα και οξείδια των αλκαλίων).

Μεγάλη περιεκτικότητα NaCl στο δείγμα εισάγει δυσκολίες στον προσδιορισμό της τέφρας διότι το NaCl αφενός μεν εξαερώνεται, αφ' ετέρου δε αυξάνει η αλκαλικότητα της τέφρας (βλ. κεφ. 11.2.Γ) λόγω αντίδρασης του NaCl με τους υδατάνθρακες του δείγματος. Οι απώλειες ελαττώνονται με προσθήκη ικανής ποσότητας Na_2CO_3 που σταθεροποιεί τα Cl^-.

Ο χρόνος αποτέφρωσης δεν είναι καθορισμένος. Κυμαίνεται από 2 ώρες έως αρκετές. Για σμίκρυνση του χρόνου αποτέφρωσης ενδείκνυται ορισμένες φορές η αύξηση της θερμοκρασίας και η χρήση O_2 σαν επιταχυντή της καύσης. π.χ. καύση στους 450°C παρουσία O_2, δίνει καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι καύση στους 650°C.

Κατά τη ζύγιση της τέφρας πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή σε πιθανές απώλειες υλικού από το χωνευτήρι. Συνήθως χρησιμοποιείται ύαλος ωρολογίου για την κάλυψη του χωνευτηρίου κατά τις μετακινήσεις. Η καύση γίνεται σε προζυγισμένο χωνευτήρι. Οι ζυγίσεις γίνονται μέχρι σταθερού βάρους, κατόπιν προηγούμενης ψύξης του χωνευτηρίου σε ξηραντήρα.

Β. Διαλυτή και αδιάλυτη τέφρα

1. Τέφρα υδατοδιαλυτού κλάσματος του προϊόντος

Χρησιμοποιείται στην εξέταση μαρμελάδων και κομπόστας, σαν κριτήριο του ποσοστού περιεχόμενου φρούτου. Για τον προσδιορισμό διαλύεται ορισμένη ποσότητα προϊόντος (100-150 g/lt) σε νερό και το διάλυμα βράζεται σε ατμόλουτρο επί 1hr. Ακολουθεί εξάτμιση 100ml διαλύματος μέχρι ξηρού και αποτέφρωση στους 525°C. Το αποτέλεσμα αποτελεί το παραπάνω κριτήριο.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

2. Αδιάλυτη στο νερό τέφρα.

Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πρόσθετων ανοργάνων συστατικών στο προϊόν. Για τον προσδιορισμό, κατόπιν ζύγισης της συνολικής τέφρας, προστίθενται 25 ml νερού στο χωνευτήρι το οποίο αφού σκεπαστεί με ύαλο ωρολογίου θερμαίνεται μέχρι βρασμού, διηθείται μέσω ηθμού (χωρίς τέφρα) και εκπλύνεται με ίσο όγκο θερμού νερού. Μεταφέρεται ο ηθμός με το υπόλειμμα σε χωνευτήρι, αποτεφρώνεται και ζυγίζεται. Από το βάρος υπολογίζεται η αδιάλυτη τέφρα και εκ διαφοράς η υδατοδιάλυτη τέφρα.

υδατοδιαλυτή τέφρα(%) = συνολική τέφρα(%) - αδιάλυτη τέφρα(%) (11.1)

Γ. Αλκαλικότητα τέφρας

Η τέφρα προϊόντων όπως τα φρούτα και κηπευτικά είναι αλκαλικής αντίδρασης, ενώ των κρεάτων και δημητριακών είναι όξινη. Η αλκαλικότητα οφείλεται σε άλατα οξέων όπως το τρυγικό, μηλικό, τα οποία με αποτέφρωση δίνουν ανθρακικά άλατα του Na και K (υδατοδιαλυτή τέφρα), του Ca και Mg (αδιάλυτη τέφρα), καθώς και οξείδια του Ca και Mg (ανάλογα με τη θερμοκρασία αποτέφρωσης). Για παράδειγμα, το K_2CO_3 σχηματίζεται από το τρυγικό οξύ των σταφυλιών σύμφωνα με την αντίδραση:

$$2KH\ (C_4H_4O_6) + 10\ O_2 \rightarrow K_2CO_3 + 5H_2O + 7O_2 \qquad (11.2)$$

Η αλκαλικότητα της τέφρας χρησιμοποιείται για τη διαπίστωση τυχόν νοθείας των τροφίμων με διάφορα μέταλλα, τη διαπίστωση της ταυτότητας ορισμένων τροφίμων π.χ. διάκριση μεταξύ ξυδιού από φρούτα και συνθετικού οξικού οξέος, καθώς και για τον προσδιορισμό της ισορροπίας οξέος/βάσης στα τρόφιμα. Το όξινο περιβάλλον οφείλεται στα: P, S και Cl, ενώ το βασικό στα: Na, K, Ca και Mg.

Η αλκαλικότητα της τέφρας εκφράζεται σαν ο όγκος 1N οξέος που απαιτείται για εξουδετέρωση της τέφρας που προκύπτει από 100 g δείγματος (ή τα ml N/10 οξέος από 1g δείγματος).

Για τον προσδιορισμό της αλκαλικότητας της τέφρας, προστίθεται στο χωνευτήρι με την τέφρα, γνωστή περίσσεια N/10 HCl ή H_2SO_4 (περίπου 10ml), μικρή ποσότητα βρασμένου νερού και θερμαίνεται το χωνευτήρι σε ατμόλουτρο. Μετά την ψύξη, προστίθενται σταγόνες δείκτη πορτοκαλί του μεθυλίου και ογκομετρείται η περίσσεια του οξέος με διάλυμα N/10 NaOH.

11.3 Είδη καύσης (αποτέφρωσης)

Για τον προσδιορισμό της τέφρας ακολουθούνται ανάλογα με την σύσταση του προϊόντος δύο τεχνικές: Α. Ξηρή αποτέφρωση και Β. Υγρή καύση.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Α. Ξηρή αποτέφρωση (dry ashing)

Περιλαμβάνει τη σταδιακή θέρμανση του δείγματος αρχικά για την εκδίωξη της υγρασίας ακολούθως για την απανθράκωση και τελικά για την αποτέφρωση σε φούρνο υψηλής θερμοκρασίας 500-600°C.

Η μέθοδος εφαρμόζεται για όλα τα τρόφιμα εκτός εκείνων που περιέχουν πολύ υψηλές ποσότητες λίπους (>50%). Αντεδείκνυται επίσης για τον προσδιορισμό Pb, As και Hg. Αν μετά από παραταμένη θέρμανση δεν ληφθεί τέφρα ελεύθερη από άνθρακα στο υπόλειμμα προστίθενται σταγόνες HNO_3, ή H_2O_2, για την καλύτερη καύση. Με την προσθήκη αυτής όμως μεταβάλλεται η σύσταση της τέφρας και απαιτείται διόρθωση των αποτελεσμάτων.

1. Αποτέφρωση για τον προσδιορισμό P

Πρίν από την αποτέφρωση προστίθεται στο χωνευτήρι περίσσεια καθαρού $CaCO_3$ή $MgCO_3$ που δρα σαν οξειδωτικό και δίνει απόλυτα λευκή τέφρα. Το υπόλειμμα διαλύεται εύκολα σε αραιό HNO_3 και προετοιμάζεται για την ανάλυση P.

2. Αποτέφρωση για τον προσδιορισμό Cl

Στο χωνευτήρι με το δείγμα (συνήθως φυτικό προϊόν) προστίθεται περίσσεια Na_2CO_3 για κατακράτηση του Cl^- Συνήθως απαιτούνται 20 ml διαλύματος Na_2CO_3 5%, για 5gr φυτικού προϊόντος. Ακολουθεί κανονική αποτέφρωση.

3. Αποτέφρωση για τον προσδιορισμό S

Για την συγκράτηση του S κατά την καύση, προστίθεται στο χωνευτήρι με το δείγμα $Mg(NO_3)_2$ σε αναλογία 0.6 g Mg/ 2g δείγματος.

Β. Υγρή καύση (wet digestion)

Δεν είναι ξεκαθαρισμένο ποιές αντιδράσεις λαβαίνουν χώρα κατά την υγρή καύση. Χρησιμοποιείται πάντως μίγμα H_2SO_4/HNO_3 ή H_2SO_4 / $HClO_4$ οξέων για την πλήρη οξείδωση του προϊόντος. Το δείγμα 2-5 g τοποθετείται σε φιάλη Kjeldahl και κατεργάζεται με οξύ μέχρις ότου το περιεχόμενο γίνει άχρωμο ή υποκίτρινο διάλυμα και σταματήσει η έκλυση λευκών ατμών SO_2. Για τον προσδιορισμό των Ca, Cu, Zn και Sn χρησιμοποιείται μίγμα H_2SO_4/HNO_3. Στην περίπτωση χρήσης $HClO_4$ η ποσότητά του πρέπει να κρατιέται στο ελάχιστο π.χ. για 4g δείγματος χρησιμοποιούνται 10ml 72% $HClO_4$. Για υγρά δείγματα π.χ. κρασί, χρησιμοποιείται 1ml $HClO_4$/25ml δείγματος. Η προσθήκη του $HClO_4$ πρέπει να γίνεται στην εστία με προστατευτικά γυαλιά.

Η υγρή καύση χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό μετάλλων.

Γ. Σύγκριση ξηρής αποτέφρωσης-υγρής καύσης.

Η ξηρή αποτέφρωση χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συνολικής τέφρας, της υδατοδιαλυτής και αδιάλυτης στο νερό τέφρας καθώς και στον προσδιορισμό των μετάλλων. Η μέθοδος είναι απλή αλλά χρονοβόρα. Στον προσδιορισμό ορισμένων ιχνοστοιχείων προκύπτει σφάλμα λόγω απορρόφησης μέρους αυτών από το υλικό της πορσελάνης. Υλικά με μεγάλη περιεκτικότητα σε Ρ δημιουργούν προβλήματα διότι ο Ρ πήκεται και παγιδεύει μεγάλο αριθμό ατόμων C που δεν καίγονται. Στην υγρή καύση χρησιμοποιούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες η οξείδωση είναι ταχεία, χρησιμοποιούνται όμως μεγάλες ποσότητες διαβρωτικών αντιδραστηρίων που απαιτούν διόρθωση στο αποτέλεσμα του προσδιορισμού.

11.4 Προσδιορισμός ανόργανων στοιχείων

Τα μάκρο-και ιχνοστοιχεία προσδιορίζονται στα τρόφιμα με ποικιλία μεθόδων. Οι σημαντικώτερες απ' αυτές είναι:

Α. Φλογοφωτομετρία (βλ. κεφ. 3.5) για τον προσδιορισμό Na και K.

Β. Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (βλ. κεφ. 3.5) για τον προσδιορισμό των στοιχείων: Mg, Ca, Na, Co, Ni, Fe, Cu, Hg, As, Pb, Se κ.τ.λ. Η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη (όριο ανίχνευσης για το Mg = 0.01 ppm), γρήγορη, χρησιμοποιεί όμως πολυδάπανες συσκευές και προϋποθέτει την αγορά μεγάλου αριθμού λυχνιών για τα διάφορα στοιχεία.

Γ. Ανάλυση μέσω ενεργοποίησης με νετρόνια (neutron activation analysis)

Εδώ το δείγμα υφίσταται βομβαρδισμό με νετρόνια. Η ένταση της παραγόμενης ραδιενέργειας του άγνωστου δείγματος συγκρίνεται με την αντίστοιχη ένταση πρότυπου δείγματος. Η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη (0.001-1ppm) και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ευρέως φάσματος στοιχείων.

Δ. Εκλεκτικά ηλεκτρόδια

Όταν λεπτή μεμβράνη γυαλιού τοποθετηθεί μεταξύ δύο διαλυμάτων δημιουργείται διαφορά δύναμικού στα άκρα του γυαλιού. Η τάση αυτή εξαρτάται από το είδος και τον αριθμό των ιόντων που βρίσκονται σε κάθε διάλυμα. Σήμερα, εκτός του υδρογόνου υπάρχουν εκλεκτικά ηλεκτρόδια για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης στοιχείων όπως Na, K, Ag, NH_4 κτλ.

Ε. Λοιπές μέθοδοι (ογκομετρικές, σταθμικές κ.τ.λ.)

11.5 Εφαρμογές

Τα στοιχεία Na και K ο ρόλος των οποίων είναι σημαντικός σε τρόφιμα όπως

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τυριά, κρεατοσκευάσματα, αλατισμένα βούτυρα, μαργαρίνες και διαιτητικά τρόφιμα (σούπες), έχουν προσδιοριστεί κυρίως με φλογοφωτομετρία[1] (βλ. κεφ. 3.5), με εκλεκτικά ηλεκτρόδια[2,3] μέσω ενεργοποίησης με νετρόνια[4] και άλλες διάφορες μεθόδους. Τα στοιχεία Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Co, Zn, Sn, τα μέταλλα Hg, Pb, Se, As και Cd έχουν προσδιοριστεί σε παντός είδους τρόφιμα με Φασματοφωτομετρία Ατομικής Απορρόφησης[1,5,6,7,8,9,10,11,12,13] (βλ. κεφ. 3.5) με ή και χωρίς φλόγα[14]. Ειδικά έχουν μελετηθεί τα τοξικά μέταλλα Hg, Pb, Se, As και Cd σαν επιμολύνσεις από το περιβάλλον [15,16,17] ή τα υλικά συσκευασίας των τροφίμων[14]. Προσδιορισμός του Cl κατόπιν καταβύθισής του με $AgNO_3$ και μέτρησης της περίσσειας αυτού με KSCN (μέθοδος Volhard)[1], και του P στην τέφρα κατόπιν σχηματισμού συμπλόκου με μολυβδαινικό αμμώνιο (μέθοδος φωσφομολυβδαινικού αμμωνίου) εφαρμόζεται σε ευρύ φάσμα τροφίμων, όπως τυριά, κρεατοσκευάσματα[18] κ.α.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Osborne DR** and **Voogt P:** Analysis of Nutrients in Foods, Academic Press, New York (1978).
2. **McNerney FG** J. Assoc. Off Anal. Chem 59, 1131 (1976)
3. **Greve H** and **Rehbein** J. Fluess. Obst. 46, 46 (1979)
4. **Grimanis A, Grimani MR** and **Kanias GD** "The Quality of Foods and Beverages' Vol 2 Charalambous G (edit) Academic Press (1981)
5. **Rowe CJ** Food Analysis by Atomic Absorption Spectroscopy, Varian Techtron Ltd, Springvale, Australia (1973)
6. **Culver BR, Lech JF** and **Pradhan NK** Food Tech. March, 16 (1975)
7. **Hankin L** J. Milk Food Tech. 35, 86 (1972)
8. **Heichel GM, Hankin L** and **Botsford RA** J Milk Food Tech. 37, 499 (1974)
9. **Holden AV** J Food Tech. 8, 1 (1973)
10. **Arthur D.**Can. Inst Food Sci Tech. J. 5(3), 165 (1972)
11. **Schulze H** and **Skegg C** Int. Lab. October, 24 (1984)
12. **O'Brien MT** Food Prod Dev Nov, 14(1975)
13. **Bibeau TC** and **Clydesdale FM** Food Prod Dev. May, 130 (1976)
14. **Takis PG** and **Chroneos J** Analyst 103, 122 (1978)
15. **Palmer IS, Herr A** and **Nelson T** J Food Sci 47, 1595(1982)
16. **Jaffray J** and **Deman JM** Can Inst. Food Sci Tech. J. 7(3), 159 (1974)
17. **Amer MA** and **Brisson GJ** J Inst. Can. Sci Tech Aliment. 6(3), 184 (1973)
18. **Wong NP, La Croix Dt** and **Alford JA** J. Amer. Diet. Assoc. 72, 608 (1978)

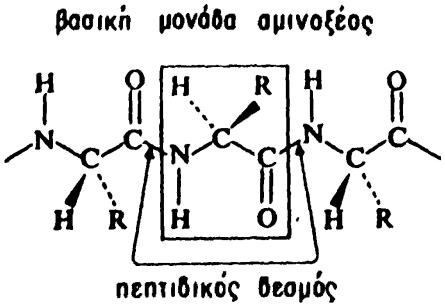
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

12.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες είναι φυσικά ή βιο-πολυμερή, αποτελούμενα από L-αμινοξέα. Τα αμινοξέα αυτά ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς (σχ. 12-1) σχηματίζοντας τις απλές πρωτεΐνες. Εκτός των αμινοξέων οι πρωτεΐνες δυνατόν να περιέχουν και ομάδες μη πρωτεϊνικές, όπως υδατάνθρακες, νουκλεϊνικά οξέα, λιπίδια ή και μέταλλα συνδεμένα στη βασική μονάδα με ομοιοπολικό ή άλλο δεσμό, οπότε καλούνται συζευγμένες πρωτεΐνες. Για τη συστηματική κατάταξη των πρωτεϊνών βλ. «ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ[1]» κεφ. 3.1. Οι πρωτεΐνες απαντούν μεταξύ των συστατικών κάθε ζώντος κυττάρου. Ο ρόλος τους σχετίζεται με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες, όπως η κατάλυση, η αναπνοή, η συστολή των μυών, η μεταφορά και αποθήκευση μετάλλων, ο μεταβολισμός και η ανάπτυξη.



Σχ. 12-1. Βασική δομή πρωτεΐνης (αλληλουχία αμινοξέων)

Στον Πίνακα 12.1 δίνεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ορισμένων τροφίμων. Οι πρωτεΐνες με μερική υδρόλυση δίνουν πεπτίδια, ενώ με ολική υδρόλυση δίνουν αμινοξέα. Το μοριακό τους βάρος (ΜΒ) κυμαίνεται από 6×10^3 - 5×10^7, ενώ το μέσο ΜΒ των αμινοξέων που προκύπτουν από τις πρωτεΐνες είναι 120. Επειδή οι περισσότερες πρωτεΐνες διαφέρουν μόνο ως προς τον αριθμό και την ακολουθία των αμινοξέων και όχι ως προς το είδος αυτών, οι φυσικές και χημικές τους ιδιότητες δεν διαφέρουν κατά πολύ μεταξύ τους και συνεπώς δυσχεραίνεται ο διαχωρισμός και η απομόνωσή τους σε καθαρή κατάσταση. Για την ανάλυση τους οι πρωτεΐνες ή τα παράγωγά τους κατ' αρχήν απομονώνονται από τα μη πρωτεϊνικά συστατικά του βιολογικού δείγματος. Αν το απομονωθέν δείγμα πρωτεΐνης αποτελείται από δύο ή περισσότερες

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 12.1

Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (Nx6.25%) ορισμένων τροφίμων[1]

ζωϊκής προέλ.	%πρωτεΐνη	φυτικής προέλ.	% πρωτεΐνη
Γάλα		ρίζι	7.5-9.0
πλήρες σκόνη	22-25	σιτάλευρο	9.8–13.5
αποβουτ. σκόνη	34-38		
μοσχάρι ψητό	72	σόγια	33-42
αυγό		φυστίκι	25-28
πλήρες, σκόνη	35	καρύδι	15-21
πλήρες, σκόνη,		πατάτα[2]	10-13
αποβουτυρ.	77		
ρέγγα[2]	81		

[1] ως έχει
[2] επί ξηρού

διαφορετικές πρωτεΐνες, τότε θα πρέπει να διαχωριστούν τα συστατικά-πρωτεΐνες με κλασμάτωση και να ακολουθήσει ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός καθενός συστατικού. Επειδή η κλασμάτωση και απομόνωση των πρωτεϊνών από το δείγμα είναι πολλές φορές επίπονη διαδικασία, αξιοποιείται κάποια φυσική, χημική ή βιολογική, ειδική όμως ιδιότητα, για την ταυτοποίηση μιας εκάστης πρωτεΐνης στο φυσικό μίγμα.

12.2 Προετοιμασία δείγματος πρωτεΐνης

Για τις πρωτεΐνες που απαντούν σαν συστατικό των ιστών καθώς και για τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες εφαρμόζεται η εκχύλιση τους από τα υπόλοιπα συστατικά. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει με αραιά οξέα, άνυδρα οργανικά διαλυτικά ή με επιφανειακά ενεργές ενώσεις. Προ της εκχύλισης συνήθως τεμαχίζεται και αλέθεται το υλικό κατά τα γνωστά (βλ. κεφ. 1.2). Για τις πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού (κερατίνη, ελαστίνη, κ.α.), η εκχύλιση διευκολύνεται αφού προηγουμένως διασπαστούν οι δεσμοί -S-S- των πρωτεϊνών, κατόπιν αναγωγής με SO_3^{2-} Για τις πρωτεΐνες που απαντούν σε διάλυμα π.χ. στο γάλα, δεν χρειάζεται καν εκχύλιση.

Για τη διατήρηση των βιολογικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών κατά την απομόνωση συνιστάται:

(1) η θερμοκρασία να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα.

(2) να αποφεύγονται υψηλές και χαμηλές τιμές pH.

(3) να ελέγχεται απόλυτα η ιοντική ισχύς του διαλύματος εκχύλισης.

(4) να διατηρείται σταθερή η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος στην

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

περίπτωση χρήσης υδατικών διαλυμάτων.
(5) η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερη.
Οι παραπάνω παράγοντες σχετίζονται με τις μεταβολές· όπως μετουσίωση, θρόμβωση, καταβύθιση, εξαλάτωση κλπ. που υφίστανται οι πρωτεΐνες σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος.
Μετά την απομόνωση αρχίζει η διαδικασία της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών.

12.3 Φυσικές και φυσικοχημικές μέθοδοι ανάλυσης των πρωτεϊνών

Οι μέθοδοι αυτές δεν έχουν καταστρεπτικό χαρακτήρα.Κατά την εφαρμογή τους μετρούνται διάφορες μοριακές παράμετροι των πρωτεϊνών, των πεπτιδίων ή και των αμινοξέων ακόμη.
Οι σπουδαιότερες από τις μεθόδους αυτές είναι:

Α. Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι

Στηρίζονται στην εξάρτηση της ηλεκτροφορητικής ευκινησίας των πρωτεϊνικών μορίων από το pH. Η διαφορετική ηλεκτροφορητική ευκινησία κάθε πρωτεΐνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, (βλ. κεφ. 4) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.

Β. Καθίζηση - ιξωδομετρία

Με την εφαρμογή των μεθόδων αυτών συνάγονται πληροφορίες για την καθαρότητα, το μέγεθος, την εφυδάτωση και το σχήμα των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνικών συστατικών ενός δείγματος επιτυγχάνεται με υπερφυγοκέντριση (βλ. κεφ. 9) κατά την οποία τα συστατικά διαχωρίζονται ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα. Για τη διαπίστωση του βαθμού καθαρότητας μιας πρωτεΐνης ή τον προσδιορισμό του αριθμού των συστατικών και της συνεισφοράς του κάθε συστατικού στο πρωτεϊνικό μίγμα, χρησιμοποιείται η μέθοδος της ταχύτητας καθίζησης (sedimentation velocity). Στον προσδιορισμό αυτό η βασική παράμετρος που μετρείται είναι η σταθερά καθίζησης που έχει χαρακτηριστική τιμή για κάθε είδος πρωτεΐνης, αφού ή κάθε πρωτεΐνη κινείται με ορισμένη ταχύτητα υπό την επίδραση δοσμένης φυγοκέντρου δύναμης. Η σταθερά καθίζησης εκφράζεται σε μονάδες S (όπου $1S=1\times10^{-13}$ sec).
Πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, το σχήμα και τον βαθμό εφυδάτωσης των πρωτεϊνών δίνει η μέτρηση του ιξώδους των διαλυμάτων τους. Ο συντελεστής ιξώδους ενός υγρού θεωρείται μέτρο της αντίστασης στη ροή όταν στο υγρό ασκηθεί κάποια διατμητική τάση. Από τη μεταβολή στο ιξώδες

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

που προκαλείται όταν σε διάλυμα προστεθεί γνωστός όγκος πρωτεΐνης, είναι δυνατόν να υπολογστεί το εσωτερικό ιξώδες (intrinsic viscosity, η_i), το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό κάθε είδους πρωτεϊνικού μορίου. Συνήθως οι τιμές ιξώδους συνδυάζονται με τις αντίστοιχες τιμές καθίζησης για τον πληρέστερο χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών.

Γ. Διαθλασιμετρία

Ο δείκτης διάθλασης (δ.δ.) είναι το μέτρο της κάμψης ακτίνας φωτός, όταν το τελευταίο μεταβαίνει από ένα οπτικό μέσο σε άλλο με διαφορετικό δ.δ.(βλ. κεφ. 6). Αν και οι δ.δ.των περισσοτέρων πρωτεϊνών κείνται αρκετά κοντά ο ένας στον άλλο, εντούτοις υπάρχει ικανή διαφορά για διαφοροποίηση κάθε είδους πρωτεΐνης.

Δ. Οπτική στροφή

Όλα τα διαλύματα των πρωτεϊνών ή των παραγώγων της υδρόλυσής τους, στρέφουν το επίπεδο πόλωσης του πολωμένου φωτός (βλ. κεφ. 7). Η στροφή οφείλεται στο άθροισμα των ατομικών συνεισφορών των ομάδων γύρω από τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα στα αμινοξέα και στην ασυμμετρία την οφειλόμενη στην τρισδιάστατη διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας του πρωτεϊνικού μορίου. Η ειδική στροφή των πρωτεϊνών είναι πάντοτε αρνητική και συνήθως αυξάνει με διαδικασίες όπως π.χ. η μετουσίωση. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στη μερική ή ολική καταστροφή της ελικοειδούς δομής της πρωτεϊνικής αλυσίδας και το σχηματισμό τυχαίας αλυσίδας (random coil). Πληροφορίες για τον υπολογισμό του ελικοειδούς περιεχόμενου των σφαιρικών πρωτεϊνών σε διάλυμα συνάγονται από την εφαρμογή της τεχνικής της οπτικής περιστροφικής διασποράς (optical rotatory dispersion), στην οποία μελετάται η μεταβολή στην οπτική στροφή συναρτήσει του μήκους κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός.

Ε. Φασματοφωτομετρία (χρωματομετρία)

Η μέθοδος στηρίζεται στην αλληλεπίδραση των μορίων των πρωτεϊνών, πεπτιδίων ή αμινοξέων σε διάλυμα με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η επίδραση της ακτινοβολίας μπορεί να προκαλέσει ηλεκτρονικές, δονητικές και περιστροφικές μεταβολές στο μόριο. Η συγκεκριμένη μεταβολή εξαρτάται από το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας. Στην περιοχή του υπεριώδους, διαλύματα πρωτεϊνών απορροφούν ακτινοβολία στα μήκη κύματος μεταξύ 180-380 nm. Ο πεπτιδικός δεσμός απορροφά στα 200 nm. Οι χρωμοφόρες ομάδες των αρωματικών υδρογονανθράκων της τυροσίνης, θρυπτοφάνης και φαινυλαλανίνης απορροφούν σε $\lambda > 250$ nm με μέγιστο το $\lambda=280$ nm. Στο ίδιο αυτό μήκος κύματος (A_{280}) γίνεται απ' ευθείας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών αν φυσικά δεν υπάρχει και άλλη ουσία που να απορροφά στο ίδιο μήκος κύματος.
Η μέθοδος συνήθως εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο και συνίσταται στον προσδιορισμό της ειδικής απορρόφησης $[A_{280}]^{1\%}_{1cm}$. Ακόμη μετρήσεις απορρόφησης διαλυμάτων πρωτεϊνών εφαρμόζονται στα 210 nm, όπου η ευαισθησία του προσδιορισμού αυξάνει κατά 10-20 φορές.
Η ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού (400-700 nm) απορροφάται μόνο από έγχρωμα διαλύματα πρωτεϊνών: τα φυσικώς έγχρωμα (αιμογλοβίνη) και εκείνα που καθίστανται έγχρωμα με κατάλληλες χημικές αντιδράσεις.
Στη δεύτερη αυτή περίπτωση ανήκει ο χρωματομετρικός προσδιορισμός της συνολικής πρωτεϊνης[2], (για την περιγραφή της μεθόδου βλ. κεφ. 12.4.Α).
Όπως ελέχθη και πιο πάνω οι πρωτεϊνες εμφανίζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις οφειλόμενες στον πεπτιδικό δεσμό. Το μήκος κύματος της απορρόφησης του –CO–NH– ή της –OH μεταβάλλεται στην περίπτωση συμμετοχής οποιασδήποτε από τις δύο ομάδες σε υδρογονοδεσμό. Η φασματοφωτομετρία IR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση υδρογονοδεσμών και γιαυτό βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής στερεών πρωτεϊνών, δηλαδή στον προσανατολισμό και διαμόρφωση στο χώρο των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Ακόμη το φάσμα IR δίνει χρήσιμες πληροφορίες για τις κρυσταλλικές και μη κρυσταλλικές περιοχές της δομής των ινωδών πρωτεϊνών.

ΣΤ. Νεφελομετρία

Το νεφέλωμα (turbidity) που παράγεται όταν αναμειχθεί πρωτεϊνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις με ένα από τα διάφορα μέσα καθίζησης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης της συγκέντρωσης της πρωτεϊνης. Σαν μέσα καθίζησης χρησιμοποιούνται το τριχλωροξικό οξύ, το σουλφοσαλυκιλικό οξύ κ.α. Η μέθοδος είναι γρήγορη, αλλά όχι πολύ ακριβής.

Ζ. Εκχύλιση

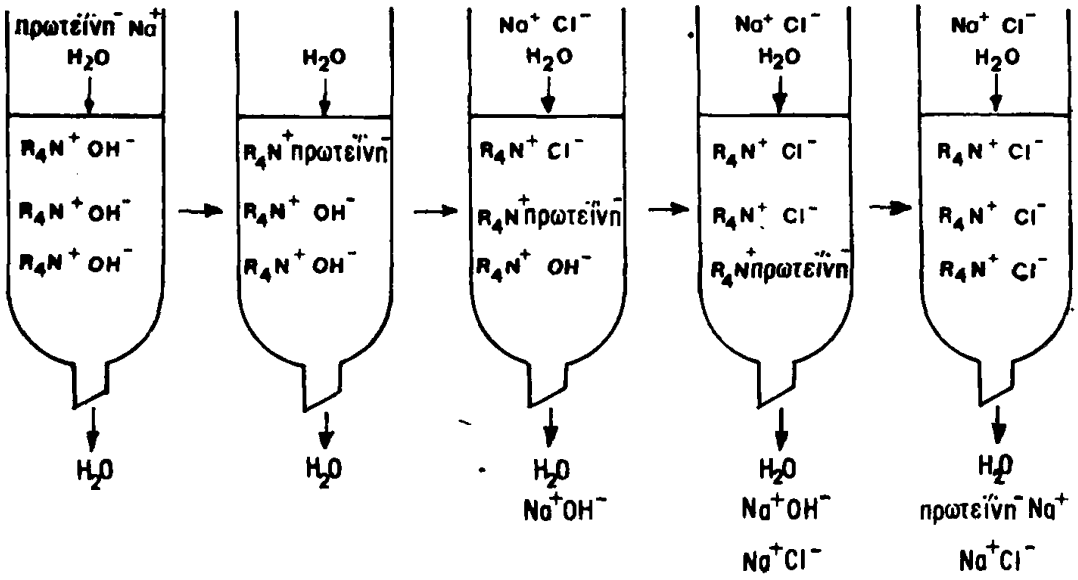
Με τη μέθοδο της κατανομής κατ' αντιρροή (CCD) (βλ. κεφ. 9) διαχωρίζονται τα αμινοξέα, τα παράγωγά τους, πεπτίδια και πολυπεπτιδικές πρωτεϊνες, όπως η ινσουλίνη, η ριβονουκλεάση κ.α.

Η. Χρωματογραφία

Χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της χρωματογραφίας στήλης σε συνδυασμό με ανάλυση του προϊόντος έκλουσης της στήλης με φασματοφωτομετρία UV, οπτική στροφική ικανότητα, διαθλασιμετρία ή ειδική χρωματομετρική ανάλυση με αντιδραστήρια όπως νινυδρίνη κ.α.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ακόμη χρησιμοποιείται η χρωματογραφία χάρτου και TLC για ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων και πεπτιδίων, αλλά όχι και πρωτεϊνών. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται εφ' όσον τα αμινοξέα και πεπτίδια μετατραπούν σε παράγωγα σταθερά και ταυτόχρονα πτητικά. Αυτό επιτυγχάνεται με εστεροποίηση του -COOH και ακυλίωση της $-NH_2$. Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής βρίσκει πλατειές εφαρμογές στην ανάλυση των πρωτεϊνών (βλ. κεφ. 2.4). Σαν υπόστρωμα ρητίνης χρησιμοποιούνται χημικά τροποποιημένες κυτταρίνες. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται όπως φαίνεται στο σχήμα 12-2.



Σχ. 12-2. Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε ιονανταλλακτική ρητίνη

Ακόμη χρησιμοποιείται η χρωματογραφία πηκτής (βλ. κεφ. 2.5) η οποία δίνει ικανοποιητικό διαχωρισμό πρωτεϊνών, πεπτιδίων και αμινοξέων με βάση το μέγεθος των διαχωριζομένων μορίων. Σαν υπόστρωμα διαχωρισμού χρησιμοποιούνται δεξτράνες (dextrans) διαφορετικού βαθμού διακλάδωσης, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται κατακράτηση στο δίκτυο των υλικών αυτών, πεπτιδίων ή πρωτεϊνών Μ.Β. μεταξύ 7×10^2-2×10^5. Εκτός από τις δεξτράνες, για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιούνται υλικά, όπως άγαρ, πολυακρυλαμίδιο κ.α.

Θ. Σταθμικές μέθοδοι

Σ' αυτές γίνεται απομόνωση και ζύγιση των πρωτεϊνών που περιέχονται στο δείγμα.

Οι εφαρμογές που βρίσκουν οι μέθοδοι αυτές είναι περιορισμένες, λόγω δυσκολίας απομόνωσης των πρωτεϊνών από τα μη πρωτεϊνικά συστατικά του δείγματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ι. Ανάλυση μέσω ενεργοποίησης με νετρόνια

Η μέθοδος προσδιορίζει το άζωτο που περιέχεται στο δείγμα και εξ αυτού το πρωτεϊνικό περιεχόμενο[2].

12.4 Χημικές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών, πεπτιδίων, αμινοξέων

Δυστυχώς δεν υπάρχει μια μοναδική μέθοδος χημικής ανάλυσης πρωτεϊνών μια και δεν υπάρχει αντίστοιχα μία μοναδική φυσική ή χημική ιδιότητα που να χαρακτηρίζει απόλυτα την πρωτεΐνη. Οι συνηθέστερες χημικές διαδικασίες ανάλυσης είναι εκείνες που στηρίζονται στον προσδιορισμό κάποιου στοιχείου, π.χ. N_2, ομάδας ή δεσμού που περιέχεται στο πρωτεϊνικό μόριο. Η χημική ανάλυση μιας πρωτεΐνης περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των: N, S, P, Ca, Fe, της υγρασίας και της τέφρας. Εντούτοις το πιο σημαντικό αναλυτικό αποτέλεσμα για μια πρωτεΐνη είναι η εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων που την αποτελούν, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός αυτών. Οι στόχοι αυτοί προϋποθέτουν χωριστή ανάλυση για κάθε αμινοξύ μετά από πλήρη υδρόλυση της πρωτεΐνης.

Η γενική μέθοδος ανάλυσης ενός πρωτεϊνικού κλάσματος προϋποθέτει την απομάκρυνση των αλάτων που συνοδεύουν την πρωτεΐνη. Αυτό επιτυγχάνεται με διαβίβαση της τελευταίας μέσω στήλης ιονανταλλαγής ή στήλης πηκτής (σχ. 12-2). Στη συνέχεια απομακρύνεται το νερό με εξάχνωση υπό κενό (lyophilization). Το υπόλειμμα της πρωτεΐνης εκχυλίζεται στη συνέχεια με οργανικό διαλύτη (αιθέρα, ακετόνη, αιθανόλη) για απομάκρυνση των λιπιδίων. Λόγω κινδύνου πιθανής μετουσίωσης, οι κατεργασίες αυτές γίνονται κατά το δυνατόν, σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Ακολουθεί στοιχειακή ανάλυση της πρωτεΐνης που μπορεί να περιέχει: Άνθρακα (45–55%), Υδρογόνο (6-8%), Οξυγόνο (19–25%), Αζωτο (14–20%), Θείο (0–4%) καθώς και πολύ μικρά ποσά P, Ca κ.α. Από τα παραπάνω στοιχεία το πλέον χαρακτηριστικό στις πρωτεΐνες είναι το N και ο προσδιορισμός αυτού αποτελεί μέτρο του πρωτεϊνικού περιεχόμενου των τροφίμων.

Α. Προσδιορισμός N_2

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η Kjeldahl και η Dumas. Στηρίζονται στην ολική μετατροπή των αρχικών μορφών του N σε στοιχειακό N ή αμμωνιακό άλας στην πλήρως ανοιγμένη του μορφή. Το τελικό στάδιο ανάλυσης προβλέπει τον προσδιορισμό του ενός ή του άλλου. Κατά τον προσδιορισμό του συνολικού οργανικού αζώτου εκτός του N των πρωτεϊνών

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συνπροσδιορίζεται και το N άλλων ενώσεων, όπως νουκλεϊνικών οξέων, αζωτούχων υδατανθράκων, αλκαλοειδών, αζωτούχων λιπιδίων και χρωστικών όπως πορφυρίνες κ.τ.λ.

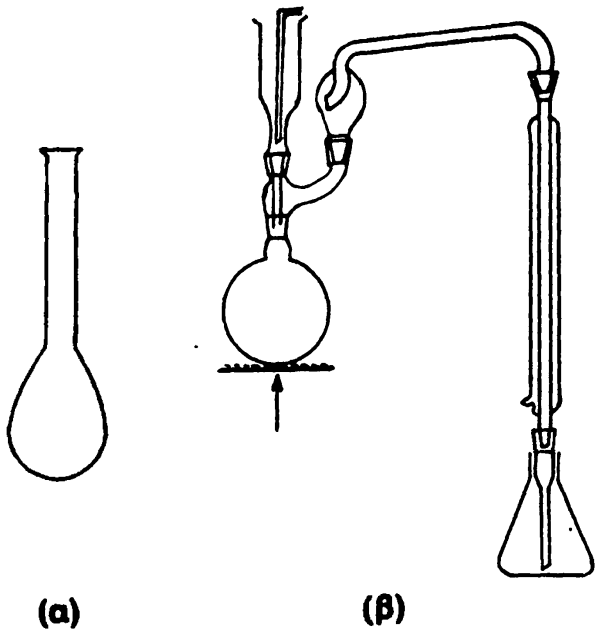
Η μέθοδος Dumas (Γαλλία, 1831) προέβλεπε την πλήρη αποτέφρωση του δείγματος στους 700–750 °C με προσθήκη οξειδίου του χαλκού. Στη συνέχεια ακολουθούσε ογκομετρικός προσδιορισμός του αερίου αζώτου που παραγόταν. Περισσότερο από τη μέθοδο Dumas, πλατειά εφαρμογή βρήκε η μέθοδος Kjeldahl (Δανία 1883)[3].

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή μικρή ποσότητα (1.5–2 g ή 10–200 ml) δείγματος φέρεται σε μακρύλαιμο φιάλη Kjeldahl (σχημ. 12-3α) προστίθεται μικρή ποσότητα (15g) K_2SO_4 και 0.5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (ο $CuSO_4$ δρα σαν καταλύτης της αντίδρασης οξείδωσης του δείγματος το δε K_2SO_4 για την ανύψωση του σ.ζ. του μίγματος και συνεπώς την επιτάχυνση της καύσης). Ακολούθως προστίθενται πέτρες βρασμού και πυκνό H_2SO_4 (25 ml) για την οξείδωση της οργανικής ύλης. Τοποθετείται η φιάλη υπό κλίση 40° και θερμαίνεται ήπια μέχρι παύσης του αφρισμού και πλήρους υγροποίησης του περιεχομένου. Ακολούθως το περιεχόμενο χωνεύεται με ισχυρό βρασμό και περιοδική ανάδευση μέχρι λήψης πρασινογάλαζου καθαρού διαλύματος. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση ο βρασμός συνεχίζεται επί 1.5 hr (ο συνολικός χρόνος χώνευσης δεν πρέπει να είναι μικρότερος των 2 hrs). Το περιεχόμενο της φιάλης ψύχεται στους 40°C, προστίθεται ποσότητα νερού (50ml) και μεταφέρεται δια συνεχών εκπλύσεων σε σφαιρική φιάλη (1lt). Σ' αυτήν προστίθενται ψήγματα ψευδαργύρου προς αποφυγήν αφρισμού και σι ›έεται η συσκευή απόσταξης (σχ. 12-3 β). Στον υποδοχέα (κωνική φιά ι) της απόσταξης προστίθεται 25 ml διαλύματος 0.1 N HCl. Τέλος στο περι ;όμενο της σφαιρικής φιάλης προστίθεται NaOH 33% (100 ml) και αρχίζει η απόσταξη. Λαμβάνονται 150–250 ml αποστάγματος. Στο απόσταγμα προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε οξύ κατόπιν ογκομέτρησης με διάλυμα N/10 NaOH.

Σαν δείκτης χρησιμοποιείται ερυθρό του μεθυλίου ή μπλέ του μεθυλενίου. Από το ποσόν του δεσμευθέντος οξέος υπολογίζεται το ποσόν της αποσταχθείσης αμμωνίας και απ' αυτήν το ποσόν του N στο αρχικό δείγμα. Η συνολική πρωτεΐνη του δείγματος βρίσκεται κατόπιν πολλαπλασιασμού του συνολικού αζώτου με τον εμπειρικό συντελεστή 6.25. Ο συντελεστής αυτός εξάγεται με βάση την εκδοχή ότι οι πρωτεΐνες περιέχουν 16% άζωτο (100/16 = 6.25). Ο συντελεστής αυτός ποικίλλει ανάλογα με το αναλυόμενο τρόφιμο, π.χ. για τα δημητριακά είναι 5.70, για τα γαλακτοκομικά 6.38, ενώ για το κρέας και τα προϊόντα του 6.25.

Για τον προσδιορισμό του συνολικού αζώτου χρησιμοποιείται ακόμη η

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 12-3. Συσκευή προσδιορισμού αζώτου κατά Kjeldahl (α) φιάλη χώνευσης (β) συσκευή απόσταξης.

αυτοματοποιημένη χρωματομετρική μέθοδος.
Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το δείγμα χωνεύεται με πυκνό θειϊκό οξύ, H_2O_2 και Hg σαν καταλύτη, για τη μετατροπή του οργανικού αζώτου σε αμμωνιακό άλας (NH_4^+). Στο αυτοματοποιημένο σύστημα η αμμωνία αντιδρά με φαινόλη και NaClO για να δώσει χαρακτηριστική μπλε χρώση, η ένταση της οποίας μετρείται στα 510 και 630 nm. Με τη διπλή αυτή μέτρηση καλύπτεται ολόκληρη η περιοχή από 0-100% N.

Β. Προσδιορισμός πρωτεϊνικού και μη πρωτεϊνικού αζώτου

Η μέθοδος[3] στηρίζεται στη χώνευση του δείγματος με νερό. Οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται με οξικό χαλκό, ενώ οι μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ενώσεις παραμένουν στο διάλυμα. Κατόπιν διήθησης προσδιορίζεται στο υπόλειμμα το άζωτο με τη μέθοδο Kjeldahl. Η τεχνική της μεθόδου έχει ως εξής:
Ζυγίζεται ποσότητα δείγματος (1-2 g ή 10-15 ml) και μεταφέρεται σε φιάλη Kjeldahl. Προστίθεται νερό (50 ml), πέτρες βρασμού και ένα μέσο κατά του αφρισμού (σιλικόνη). Το μίγμα χωνεύεται με ήπιο βρασμό για 1/2 hr. Στο τέλος της θέρμανσης προστίθεται διάλυμα 10% $KAl(SO_4)_2 \cdot 24\ H_2O$ (2 ml), υπό ανάδευση και το μίγμα φέρεται σε βρασμό πάλι. Ακολούθως προστίθεται διάλυμα 3% $Cu(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ (50ml) και το μίγμα αναμειγνύεται καλά. Μετά την ψύξη το περιεχόμενο της φιάλης διηθείται μέσω χωνιού Buchner. Η φιάλη και το ίζημα εκπλύνονται με νερό (50 ml). Για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού αζώτου μεταφέρεται ο ηθμός με το υπόλειμμα σε νεά φιάλη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Kjeldahl και προσδιορίζεται το N κατά τα γνωστά.
Για τον προσδιορισμό του μη πρωτεϊνικού αζώτου μεταφέρεται το διήθημα από την κωνική φιάλη Buchner σε νέα φιάλη Kjeldahl και προσδιορίζεται το N κατά τα γνωστά.

Γ. Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο φωσφόρος πρωτεΐνης ή οποιασδήποτε άλλης οργανικής ένωσης προσδιορίζεται κατόπιν μετατροπής του σε ανόργανο ορθοφωσφορικό άλας με την επίδραση H_2O_2/H_2SO_4. Με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου ο φωσφόρος σχηματίζει το σύμπλοκο φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο $[(NH_4)_6 . Mo_7O_{24} . 4H_2O]$ χαρακτηριστικού μπλε χρώματος που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά.[4]

Δ. Προσδιορισμός Θείου

Η στοιχειακή ανάλυση του θείου στις πρωτεΐνες δίνει το ποσόν του θείου, στα θειούχα αμινοξέα των πρωτεϊνών. Απαντά κυρίως στην σουλφυδριλο-ομάδα στην κυστεΐνη, στο δισουλφιδικό δεσμό στην κυστίνη ή στη μεθυλοθειοαιθερική ομάδα στη μεθειονίνη.
Η μέθοδος[5] προβλέπει την οξειδωτική καύση του δείγματος με O_2 παρουσία H_2O_2 και NaClO και ανάλυση του συνολικού ανόργανου SO_4^{2-} που παράγεται. Η ανάλυση των SO_4^{2-} μπορεί να γίνει σταθμικά, χρωματομετρικά, αγωγιμομετρικά ή με συμπλοκομετρική ογκομέτρηση.

12.5 Ποιοτική ανάλυση πρωτεϊνών

Α. Χρωστικές αντιδράσεις

1. Αντίδραση Millon

Το αντιδραστήριο Millon που προκύπτει κατόπιν θέρμανσης στοιχειακού Hg με περίσσεια HNO_3, δίνει ζωηρό κεραμέρυθρο χρώμα όταν θερμανθεί με πρωτεΐνη που περιέχει τυροσίνη (φαινολική ομάδα). Η αντίδραση είναι ειδική.

2. Ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση

Θέρμανση διαλύματος πρωτεΐνης με πυκνό HNO_3 δίνει την ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση και παράγει βαθύ κίτρινο χρώμα που προκύπτει από νίτρωση των αρωματικών αμινοξέων (θρυπτοφάνη, τυροσίνη).

3. Αντίδραση Acree-Rosenheim

Αντίδραση φορμαλδεΰδης με διάλυμα πρωτεΐνης παρουσία πυκνού H_2SO_4, δίνει μωβ-βιολετί χρώμα, χαρακτηριστικό της παρουσίας θρυπτοφάνης.

4. Αντίδραση Biuret

Είναι η πιο ειδική αντίδραση για την ανίχνευση των πρωτεϊνών. Απαιτεί τουλάχιστον την παρουσία δύο συνεχών πεπτιδικών δεσμών. Διάλυμα πρωτεΐ-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νης παρουσία Cu^{2+}σε αλκαλικό περιβάλλον δίνει σύμπλοκο χαρακτηριστικού ροζ-βιολετί χρώματος. Η αντίδραση χρησιμοποιείται και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών.

5. Αντίδραση νινυδρίνης

Κατόπιν βρασμού ουδέτερου διαλύματος πρωτεΐνης με μικρή ποσότητα νινυδρίνης εμφανίζεται κυανή χρώση. Την αντίδραση αυτή δίνουν όλα τα αμινοξέα, εκτός της προλίνης, όλα τα πεπτίδια και οι πεπτόνες. Δεν είναι ειδική γιατί παρέχεται και από άλλες ενώσεις, όπως αμίνες, αμμωνιακά άλατα κ.τ.λ.

6. Αντίδραση θειούχου μολύβδου

Κατόπιν βρασμού πρωτεΐνης με διάλυμα NaOH, παρουσία άλατος μολύβδου, σχηματίζεται μαύρο ίζημα ή καστανό μέχρι μαύρο χρώμα. Η αντίδραση οφείλεται στο θείο που απαντά σ' όλες τις πρωτεΐνες, εκτός των πρωταμινών και πεπτονών. Η αντίδραση δεν είναι ειδική.

7. Αντίδραση Hopkins και Cole

Κατόπιν προσθήκης μικρής ποσότητας (1-2 ml) γλυοξυλικού οξέος (ανηγμένο οξαλικό οξύ), 2ml πυκνού H_2SO_4 και σταγόνων διαλύματος 1% $FeCl_3$, σε μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος πρωτεΐνης εμφανίζεται έντονο κυανό χρώμα. Η αντίδραση οφείλεται στην παρουσία θρυπτοφάνης στο μακρομόριο της πρωτεΐνης.

8. Αντίδραση διουρίας

Για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε διάλυμα κατ' αρχήν προστίθεται NaOH ή KOH για να καταστήσει αλκαλικό το διάλυμα και στη συνέχεια αραιό διάλυμα $CuSO_4$. Παρουσία πρωτεϊνών εμφανίζεται στο διάλυμα ερυθροϊώδες χρώμα. Την αντίδραση αυτή δίνει και η διουρία, η οποία όμως δεν απαντά στη φύση.

Β. Αντιδράσεις καθίζησης

1. Πήξη με θέρμανση

Οι διαλυτές στο ψυχρό νερό αλβουμίνες και οι διαλυτές σε αραιά διαλύματα αλάτων γλοβουλίνες καταβυθίζονται από τα διαλύματά τους κατόπιν πήξης με θέρμανση.

2. Εξαλάτωση

Οι διαλυτές στο νερό πρωτεΐνες υφίστανται εξαλάτωση, αν σε διάλυμά τους προστεθεί κορεσμένο διάλυμα αλάτων, όπως NaCl, Na_2SO_4, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ κ.ο.κ. Από το θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα της εξαλάτωσης συνάγονται συμπεράσματα για την ταυτότητά της πρωτεΐνης.

3. Καθίζηση με αλκοόλη και ακετόνη

Οι περισσότερες από τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες καθιζάνουν με την

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

προσθήκη μίγματος αλκοόλης/ακετόνης από ουδέτερα ή ασθενώς όξινα διαλύματά τους. Η αντίδραση δεν είναι ειδική για τις πρωτεΐνες διότι και άλλες ουσίες π.χ. οι δεξτρίνες, καταβυθίζονται από υδατικά τους διαλύματα με την προσθήκη των παραπάνω αντιδραστηρίων.

4. Καθίζηση με ανόργανα οξέα

Ισχυρά οξέα όπως το H_2SO_4, το HNO_3, το HCl κ.α. καταβυθίζουν τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες.

5. Καθίζηση με άλατα μετάλλων

Τα άλατα ορισμένων μετάλλων όπως τα: $(CH_3COO)_2Pb$, $Hg(NO_3)_2$ κ.α. καταβυθίζουν τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Τα σχηματιζόμενα ιζήματα είναι συνήθως διαλυτά σε περίσσεια άλατος.

12.6 Χρωστικές αντιδράσεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών, πεπτιδίων και αμινοξέων, εκτός των όσων αναφέρθηκαν στο κεφ. 12.4 χρησιμοποιούνται και οι παρακάτω αντιδράσεις:

Α. Αντίδραση Biuret (βλ. κεφ. 12.5 Α4)

Β. Αντίδραση Folin-Ciocalteau-Lowry[6]

Η αντίδραση χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Folin και περιλαμβάνει:

(i) την οξείδωση των αρωματικών αμινοξέων σε αλκαλικό περιβάλλον, από το αντιδραστήριο φωσφοβολφραμικού/φωσφομολυβδαινικού, οξέος παρουσία Cu^{2+}σαν καταλύτη και

ii) την αναγωγή του παραπάνω αντιδραστηρίου από το διάλυμα της πρωτεΐνης, για τον σχηματισμό χαρακτηριστικής μπλε χρώσης.

Η πρωτεΐνη προσδιορίζεται στη συνέχεια χρωματομετρικά. Η μέθοδος έχει μεγάλη ευαισθησία και εφαρμόζεται σε πρωτεΐνες που περιέχουν τυροσίνη και θρυπτοφάνη.

Γ. Αντιδράσεις σχηματισμού συμπλόκου πρωτεΐνης/χρωστικής

Έχει δειχτεί ότι οι πρωτεΐνες συζεύγνυνται ποσοτικά με οργανικές χρωστικές για να σχηματίσουν σύμπλοκα πρωτεΐνης/χρωστικής. Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται στη συνέχεια έμμεσα με χρωματομετρικό προσδιορισμό τη περίσσειας της χρωστικής.[7-10]

Σαν χρωστικές χρησιμοποιούνται οι πορτοκαλί G και όξινο πορτοκαλί 12. Η μέθοδος είναι γρήγορη και ξεπερνά τα προβλήματα της μεθόδου Kjeldahl που χρησιμοποιεί διαβρωτικά αντιδραστήρια.

Δ. Μέθοδος Φορμόλης[11]

Όπως είναι γνωστό κατά την τιτλοδότηση διαλύματος αμινοξέων, πεπτιδίων ή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πρωτεΐνης, με οξύ ή άλκαλι, το pH μεταβάλλεται σταδιακά ούτως ώστε να μην μπορεί να προσδιοριστεί το τελικό σημείο της ογκομέτρησης. Αν στο ουδέτερο αυτό διάλυμα προστεθεί διάλυμα 6–9% φορμαλδεΰδης, τότε παρουσία φαινολοφθαλεΐνης ή θυμολφθαλεΐνης σαν δείκτη λαμβάνεται ευκρινής αλλαγή χρώματος στο τελικό σημείο. Η φορμαλδεΰδη αντιδρά με τις αμινομάδες των αμινοξέων και μετατοπίζει την τιτλοδότηση σε περισσότερο όξινο περιβάλλον.

12.7 Υδρόλυση των πρωτεϊνών

Με υδρόλυση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται αφ' ενός μεν η αλληλουχία των αμινοξέων στο μακρομόριο τους (πρωτοταγής δομή), αφ' ετέρου προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική τους αξία.
Η υδρόλυση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με την επίδραση οξέων, βάσεων ή ενζύμων.

Α. Υδρόλυση με οξέα (πλήρης υδρόλυση)

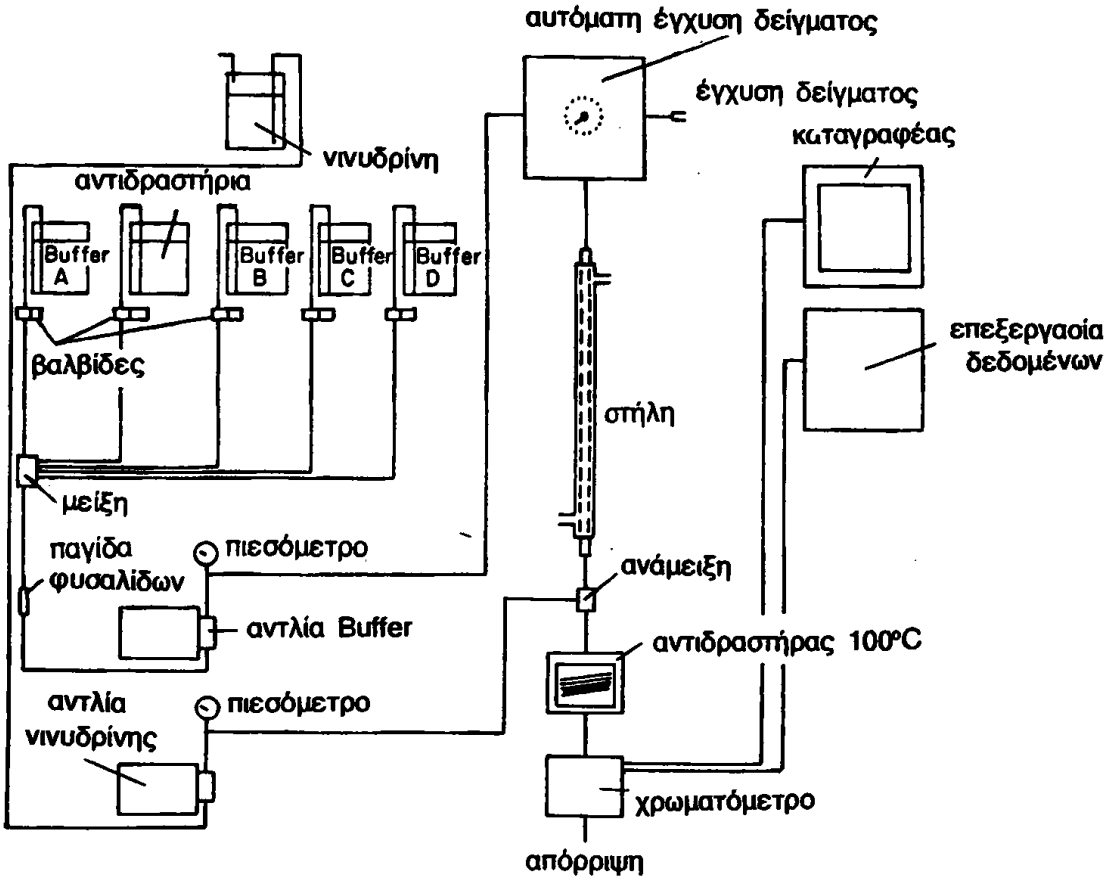
Μικρά δείγματα πρωτεΐνης (5g) κατεργάζονται με 1-2 ml διαλύματος HCl 6N το καθένα και σφραγίζονται σε γυάλινους σωλήνες υπό κενό. Στη συνέχεια θερμαίνονται στους 110°C το καθένα επί 24, 48, 72 hrs αντίστοιχα. Παρά τις παραπάνω optimum συνθήκες κατεργασίας, συχνά σχηματίζεται μαύρο αδιάλυτο πολυμερές η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από την περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε θρυπτοφάνη, η οποία καταστρέφεται έστω και κάτω από τις συνθήκες αυτές. Για πιστοποίηση της ολοκλήρωσης της υδρόλυσης προσδιορίζεται η αύξηση του N σε α-αμινομάδα μέχρι σταθερής τιμής. Το υδρολυμένο δείγμα εξατμίζεται υπό κενό στους 40-45°C σε εξατμιστή κενού, σχεδόν μέχρι ξηρού, ενώ η περίσσεια του οξέος απομακρύνεται με δύο ή περισσότερες επανεξατμίσεις κατόπιν προσθήκης μικρών ποσοτήτων νερού. Τέλος κατόπιν αραίωσης του δείγματος με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα γίνεται σ' αυτό προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων με διαφόρους μέθοδους, χρωματογραφικές, ενζυμικές και μικροβιολογικές.

1. Χρωματογραφική μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας των αμινοξέων πρωτεΐνης[3].

Σύμφωνα με τη μέθοδο το πρωτεϊνούχο δείγμα υδρολύεται με HCl/6N, σύμφωνα με τα παραπάνω. Όλα τα αμινοξέα πλήν των κυστίνη, κυστεΐνη και μεθειονίνη είναι σταθερά σε όξινο περιβάλλον. Ειδικά για τον προσδιορισμό των τριών αυτών αμινοξέων το δείγμα οξειδώνεται, αρχικά με υπερμυρμηκικό οξύ, οπότε αυτά μετατρέπονται σε κυστεϊνικό οξύ και στη σουλφόνη της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

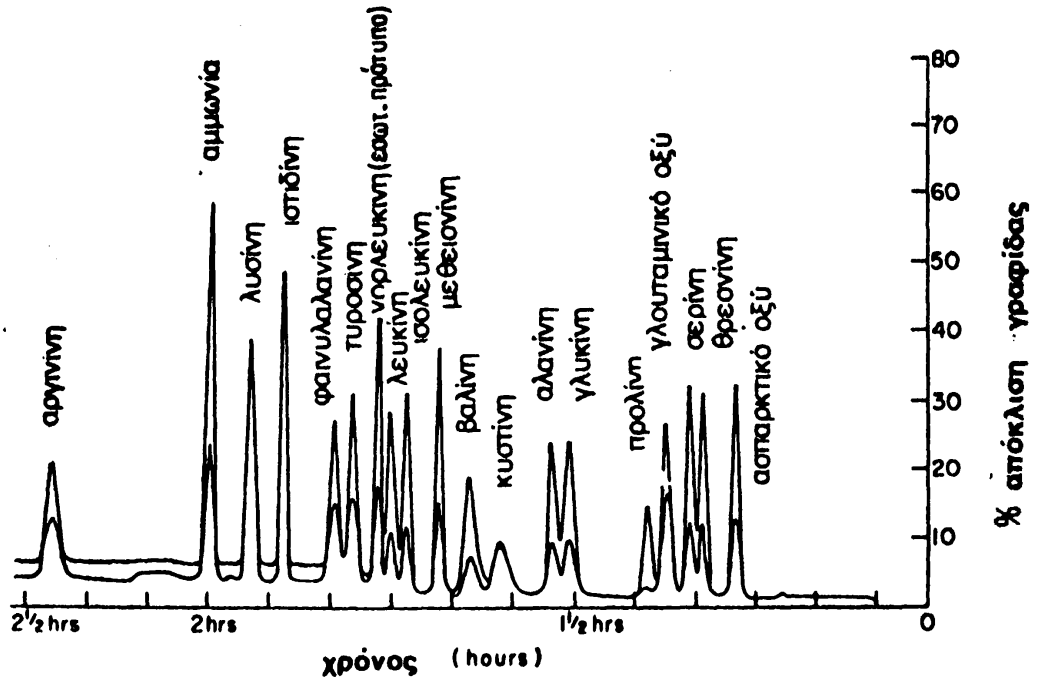
μεθειονίνης αντίστοιχα. Τα προϊόντα αυτά απομακρύνονται από το δείγμα κατά την υδρόλυση με HCl.
Ακόμη υδρόλυση του δείγματος με διάλυμα $Ba(OH)_2$, απουσία αέρα, απελευθερώνει ακέραια την περιεχόμενη θρυπτοφάνη.
Το προϊόν της όξινης υδρόλυσης της πρωτεΐνης αναλύεται σε αναλυτή αμινοξέων (σχ. 12-4).



Σχ. 12-4. Σχηματικό διάγραμμα αναλυτή αμινοξέων

Στη συσκευή αυτή τα διάφορα αμινοξέα κλασματώνονται διερχόμενα μέσω στήλης ιονανταλλακτικής ρητίνης, κατόπιν προγραμματισμένης έκλουσης με κατάλληλο σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το προϊόν έκλουσης της στήλης αντιδρά με νινυδρίνη και το μίγμα διέρχεται μέσω αντιδραστήρα/υδρόλουτρου στους 100°C όπου και παραμένει επί 15 min. Αμέσως μετά εισέρχεται αυτόματα σε χρωματόμετρο, όπου μετρείται η απορρόφηση του κάθε κλάσματος/αμινοξέος στα λ=570 και 440 nm. Το χρωματογράφημα μιας τέτοιας ανάλυσης φαίνεται στο σχήμα 12-5.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



Σχ. 12-5. Χρωματογράφημα μίγματος προτύπων αμινοξέων. Συγκέντρωση κάθε αμινοξέος: 0.04 μmole.

Β. Υδρόλυση με άλκαλι

Η χρήση βάσεων, όπως $Ba(OH)_2$ ή NaOH, είναι περιορισμένη, διότι προκαλεί ρακεμοποίηση, καθώς και πλήρη καταστροφή ορισμένων αμινοξέων.

Γ. Υδρόλυση με ένζυμα.

Με τη χρήση ενζύμων επιτυγχάνεται κυρίως μερική υδρόλυση, που είναι αρκετή για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες. Η σχέση του υποστρώματος (πρωτεΐνης) προς το ένζυμο είναι συνήθως (100:1) έως (350:1), έτσι ώστε οι παρεμποδίσεις του ενζύμου στην πρωτεΐνη να είναι αμελητέες. Η πρωτεόλυση λαβαίνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή και στους 37°C και διαρκεί 1-6 hrs. Αν χρησιμοποιηθεί ένα μόνον είδος ενζύμου, η διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών είναι πολύ περιορισμένη. Αν χρησιμοποιηθεί και δεύτερο είδος ενζύμου η υδρόλυση προχωρεί σε ποσοστό 50-70%.

Μερικά από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα είναι η θρυψίνη (πάγκρεας), η πεψίνη (στομάχι), η χυμοθρυψίνη (πάγκρεας), η βακτηριακή πρωτέαση (S. subtilis), η παπαΐνη (δένδρο παπαΐνης), οι καρβοξυπεπτιδάσες Α και Β (πάγκρεας) και η αμινοπεπτιδάση της λευκινης (έντερο).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

12.8 Υπολογισμός βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών κατόπιν προσδιορισμού του χημικού βαθμού αυτών (protein chemical score)

Η μέθοδος[3,12] εφαρμόζεται σε όλα τα τρόφιμα και είναι ημιποσοτική. Κατ' αρχήν προσδιορίζονται πειραματικά τα απαραίτητα* αμινοξέα (g/100 g πρωτεΐνης), στο υπό εξέταση δείγμα της πρωτεΐνης. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις αντίστοιχες της πρότυπης πρωτεΐνης (πρωτεΐνης του αυγού) και υπολογίζονται οι διαφορές των αντίστοιχων τιμών μεταξύ δείγματος και προτύπου. Στην συνέχεια εκφράζονται οι διαφορές αυτές σαν ποσοστό %, σε σχέση με τα ποσά των απαραίτητων αμινοξέων της πρότυπης πρωτεΐνης. Τέλος αφαιρείται το ποσοστό αυτό από την τιμή 100 για να δώσει τον χημικό βαθμό του υπό εξέταση δείγματος πρωτεΐνης.

Τα παραπάνω διευκρινίζονται καλύτερα στον Πίνακα 12.2 για τις πρωτεΐνες καζεΐνη και γλουτένη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12.2

Προσδιορισμός χημικού βαθμού πρωτεΐνης

απαραίτητα αμινοξέα* (ΕΑΑ)	ΕΑΑ στην πρότυπη πρωτεΐνη (πλήρες αυγό) (%)	ΕΑΑ στην καζεΐνη (%)	ΕΑΑ στην γλουτένη (%)	% διαφορά πρότυπης πρωτεΐνης/ καζεΐνης σε ΕΑΑ	% διαφορά πρότυπης πρωτεΐνης/ γλουτένης σε ΕΑΑ
	a	b	c	$\frac{b-a}{a} \times 100$	$\frac{c-a}{a} \times 100$
λευκίνη	8.9	9.8	6.9	+10	-22.5
ισολευκίνη	5.8	6.6	4.3	+18.8	-25.8
κυστεΐνη και μεθειονίνη	5.7	3.7	4.6	-35.1	-19.3
βαλίνη	7.4	8.7	5.3	+17.6	-25.7
θρυπτοφάνη	1.5	1.5	0.9	0.0	-40.0
φαινυλαλανίνη	5.6	5.4	5.4	- 3.6	- 3.6
λυσίνη	6.7	9.4	2.8	+36.2	-58.3
ιστιδίνη	2.1	3.0	2.2	+40.9	+44.9
θρεονίνη	5.0	4.6	2.8	- 8.0	-44.0
τυροσίνη	-	5.0	2.5	-	-

(1) Για την καζεΐνη, τα απαραίτητα αμινοξέα που υστερούν έναντι της πρότυπης πρωτεΐνης (αυγού) είναι η κυστεΐνη και μεθειονίνη π.χ. -35.1, άρα ο χημικός βαθμός της καζεΐνης = 100-35.1 = 64.9

(2) Για την γλουτένη, τα απαραίτητα αμινοξέα που υστερούν έναντι της πρότυπης πρωτεΐνης είναι η λυσίνη π.χ -58.3, άρα ο χημικός βαθμός της γλουτένης = 100-58.3 = 41.7

*απαραίτητα καλούνται τα αμινοξέα που πρέπει να εισαχθούν έτοιμα στον οργανισμό, επειδή δεν μπορεί ο ίδιος να τα συνθέσει.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

12.9 Εφαρμογές

Χαρακτηριστικά παραδείγματα προσδιορισμού της περιεκτικότητας διαφόρων τροφίμων σε πρωτεΐνες με διάφορες μεθόδους, περιλαμβάνουν:

Την μέθοδο Kjeldahl, κλασσική και αυτοματοποιημένη, σε τρόφιμα όπως: μαργαρίνη[13], κρέας και προϊόντα κρέατος[14], μπύρα[15], αναψυκτικά ποτά[16], ζωοτροφές[17] και γάλα[18].

Την χρωματογραφία σε τρόφιμα όπως γάλα και καφέ[19] (ιονανταλλαγή), καθώς και σε διάφορα βιολογικά υγρά (TLC[20], ιονανταλλαγή[21], αέρια χρωματογραφία[22]).

Την φασματοφωτομετρία σε τρόφιμα όπως γάλα[23,24] (UV και ορατό), σιτάρι/αλεύρι[25] (ορατό).

Την μέθοδο της φορμόλης στο γάλα[26,27] και στα παγωτά.[28]

Την αντίδραση Folin σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης[29] · την αντίδραση Biuret στο γάλα[30], στο σιτάρι[31] και σε προϊόντα σόγιας[32] · την αντίδραση σχηματισμού συμπλόκου πρωτεΐνης/χρωστικής στο γάλα[8,33] στο αλεύρι[34], στο κρέας[35] και άλλα τρόφιμα[36] καθώς και στον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστικότητας της ελαστάσης[37].

Τέλος την ηλεκτροφόρηση ζώνης στα αυγά και στα ψάρια [38].

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Βουδούρη Ε** και **Κοντομηνά ΜΓ** Εισαγωγή στην Χημεία των Τροφίμων, Αθήνα, (1985)
2. **Wood DE** AEC Accession No 7007 Rept. KN-65-186 (1965)
3. **Osborne D.R., Voogt P** "The Analysis of Nutrients in Foods", Academic Press, London (1978)
4. **Χατζηϊωάννου Θ.Π.** «Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας», Αθήνα (1980)
5. **Cecil R** and **McPhee I.R.** Adv. in Prot. Chem. 14, 255 (1959)
6. **Lowry O.H. Rosebrough N.J. Furr AL and Randall R.J.** J. Biol. Chem 193, 265 (1951)
7. **Rosenberg RM** and **Klotz IM.** Analytical Methods in Protein Chemistry, P. Alexander and R.J. Block (eds). Vol II Pergamon Press, Oxford (1960)
8. **Ashworth U.S. Seals R** and **Erb RE** J. Dairy Sci 43, 614 (1960)
9. **Zweig G** and **Whitaker JR** "Paper Chromatography and Electrophoresis. Vol I. Academic Press, New York (1967)
10. **Bailey J.L.** Techniques in Protein Chemistry. 2nd edit Elsevier, Amsterdam (1967)
11. **Levy M** Methods Enzymol 3,454 (1957)
12. **Mitchell HH** and **Block RJ** J. Biol. Chem. 163, 599 (1946)
13. **Tecator AB**, Application note, 18-08-1975 RM
14. **Ibid**, Experimental Result, 5-11-1975 RA
15. **Ibid** Experimental Result 5-11-1975 RA
16. **Ibid** Experimental Result 17-9-1975 RA
17. **Ibid** Experimental Result 26-6-1978 RA
18. **Γαλανού ΔΕ, Βουδούρη ΕΚ.** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων, Αθήνα, (1975)
19. **Underwood GF** and **Deatherage FE** Science 115, 95 (1952)
20. **Brenner M** and **Niederwieser A** Methods Enzymol 11, 39 (1967)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

21. **Jacobs S** Methods Biochem Anal 14, 177 (1966)
22. **Weinstein B** Methods Biochem Anal 14, 203 (1966)
23. **Nakai S, Wilson HK** and **Herreid EO** J. Dairy Sci 47, 356 (1964)
24. **Iwada M, Kawaguchi Y** and **Isugo T** J. Dairy Sci 50, 1322 (1967)
25. **Zeleny L, Neustadt MH** and **Dixon HB** Cereal Chem 19,1 (1942)
26. **Brunner JR** J. Dairy Sci 41, 444 (1958)
27. **Drux A** and **Bauer HJ** Nahrung 8, 99 (1964)
28. **Hill RL** and **Stone WK** J. Dairy Sci 47, 1014 (1964)
29. **Solecka M, Ross JA,** and **Millikan DF** Phytochem. 7,1293 (1968)
30. **Schober R, Niclaus W** and **Christ W** Milchwissenschaft 19,75 (1964)
31. **Pinckney AJ.** Cereal Chem 38, 501 (1961)
32. **Pomeranz Y** J Food Sci 30, 307 (1965)
33. **Udy DC** Nature 178, 314 (1956)
34. **Udy DC.** Cereal Chem. 31, 389 (1954)
35. **Torten J** and **Whitaker JR** J Food Sci 29, 168 (1964)
36. **Udy DC** J. Amer. Oil Chem Soc. 48(1), 29A (1971)
37. **Bailey JL** "Techniques in Protein Chemistry 2nd edit. Elsevier, Amsterdam (1967)
38. **Thompson R** J. Assoc. Agr. Chem. 45, 275 (1962)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΥΛΩΝ Ή ΛΙΠΙΔΙΩΝ

13.1 Εισαγωγή

Οι λιπαρές ύλες ή Λιπίδια είναι τα συστατικά των τροφίμων τα αδιάλυτα στο νερό και διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Οι συνηθέστεροι οργανικοί διαλύτες ή μίγματα διαλυτών περιλαμβάνουν τον αιθέρα, τον πετρελαϊκό αιθέρα, την ακετόνη, το χλωροφόρμιο, το βενζόλιο, τις αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη, βουτανόλη), το κυκλοεξάνιο κ.α. Ο ορισμός αυτός για τα λιπίδια έχει το μειονέκτημα ότι ενώσεις όπως οι στερόλες, τα καροτινοειδή, ορισμένες βιταμίνες, το σκουαλένιο κ.α. που είναι λιποδιαλυτά, δεν περιέχουν λιπαρά οξέα τα οποία αποτελούν τη βάση των λιπιδίων. Ακόμη ενώσεις όπως οι γαγγλιοζίτες που διαλύονται στο νερό και σε μίγματα νερού/αλκοόλης και είναι αδιάλυτα στους οργανικούς διαλύτες, υπάγονται στα λιπίδια. Τα λιπίδια (λίπη και έλαια) έχουν πολλαπλή λειτουργικότητα στα τρόφιμα. Είναι φορείς της γεύσης και οσμής και συνεπώς συμβάλλουν στο αφομοιώσιμο της τροφής, συμβάλλουν στην επιθυμητή υφή των τροφίμων (γαλακτωματοποιητές, σταθεροποιητές) π.χ. στο παγωτό και αποτελούν συμπυκνωμένη πηγή ενέργειας, αφού ανά γραμμάριο δίνουν διπλάσιο ποσό θερμίδων από τα σάκχαρα (9 kcal/gr έναντι 4 kcal/gr).

Στον Πίνακα 13.1 δίνεται ή σε λίπος περιεκτικότητα των κυριοτέρων τροφίμων.

Η κατάταξη των λιπιδίων είναι δύσκολη λόγω της ανομοιογένειας στη δομή τους. Για τους διάφορους τρόπους κατάταξης αυτών βλ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ[1].

Τα λιπίδια που ενδιαφέρουν τη Χημεία Τροφίμων είναι τα τριγλυκερίδια, τα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια.

13.2 Παραλαβή του λίπους

Η ανομοιογένεια στη δομή και την πολικότητα των διαφόρων λιπιδίων καθιστά αδύνατη την επιλογή ενός μόνου διαλύτη για την διαλυτοποίηση όλων των λιπιδίων. Γενικά για την αποτελεσματική παραλαβή των λιπιδίων από το τρόφιμο απαιτείται σπάσιμο των δεσμών που σχηματίζουν αυτά με τα λοιπά

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 13.1

Η περιεκτικότητα σε λίπος ορισμένων τροφίμων

Τρόφιμο	% λίπος (ως έχει)	Τρόφιμο	% λίπος (ως έχει)
Δημητριακά		Κηπευτικά,νωπά	
ψωμί	0.8-3.3	αγγινάρες	0.4
μπισκότα	10.6	καρρότα	0.3
αλεύρι	1.0-2.2	λάχανο	0.2
μακαρόνια	1.4-3.4	πατάτες	0.1
		ντομάτα	0.3
Γαλακτοκομικά		σπανάκι	0.3
γάλα-πλήρες	3.9		
γάλα-αποβουτυρ.	0.3	κρέατα	
γάλα-συμπυκνωμ.	8.4	μοσχάρι, νωπό	11-28
τυρί	0.5-40.0	μπέικον, νωπό	65
βούτυρο	81.0	αρνί, νωπό	17.5-32.4
		χοιρινό, νωπό	25-32.7
ψάρια		ζαμπόν	35
μπακαλιάρος	0.4	κοτόπουλο, νωπό	7-25
ρέγγα	2.6-12.5	αυγά, ολοκλ.	11.5
σολομός	16.5	λευκό	0.0
σαρδέλλες, κονσερ.	13.5-27.0		
τόνος, κονσερβ.	20.9	Ξηροί καρποί	
		αμύγδαλα	54.1
φρούτα, νωπά		φυστίκια	44.2
μήλα	0.4	καρύδια	64.4
μπανάνες	0.2		
σταφύλια	0.4-1.4		
πορτοκάλι	0.2		
ελιές	13.5-21.0		

συστατικά. Η παραλαβή των λιπιδίων γίνεται με διαλύτη της αυτής περίπου πολικότητας. Δηλαδή μη πολικά τριγλυκερίδια διαλύονται σε μη πολικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο και ο πετρελαϊκός αιθέρας, ενώ σχετικά πολικά λιπίδια όπως γλυκολιπίδια διαλύονται σε πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη κ.α.

Η παραλαβή του λίπους από δείγμα τροφίμου μπορεί να γίνει με έναν από τους τρείς ακόλουθους τρόπους:

α) με ανατάραξη σε κλειστό δοχείο απ' ευθείας ή κατόπιν κατεργασίας με αλκάλεα ή οξέα (π.χ. προσδιορισμός λίπους κατά Schmit-Bondzynski, βλ. κεφ. 13.9)

β) με συνεχή εκχύλιση (π.χ. εκχύλιση κατά Soxhlet, βλ. κεφ. 9.2)

γ) με φυγοκέντριση (π.χ. προσδιορισμός λίπους κατά Gerber, βλ. κεφ. 13.8 Β1)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Για τη σωστή παραλαβή του λίπους θα πρέπει:
(1) ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης να είναι χημικά καθαρός και σε σωστή αναλογία ως προς το εκχυλιζόμενο δείγμα. (2) η παραλαβή να γίνεται σε αδρανή ατμόσφαιρα π.χ. ατμόσφαιρα N_2, έτσι ώστε να παρεμποδίζεται τυχόν αλλοίωση του λίπους, (3) να αποφεύγεται κατά το δυνατόν η θέρμανση κατά την παραλαβή, (4) το απομονωθέν λίπος πρέπει να φυλάσσεται κατά προτίμηση υπό ψύξη ή κατάψυξη για να αποφευχθεί κάθε αλλοίωση στη σύστασή του.
Το περιεχόμενο στο τρόφιμο, νερό παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Συνήθως προ της παραλαβής του λίπους το τρόφιμο ξηραίνεται, διότι ο διαλύτης αφ' ενός μεν δεν δύναται να δυεισδύσει στους ιστούς παρουσία νερού, αφ' ετέρου δε κορένυται με νερό και δεν παραλαμβάνει ποσοτικά το λίπος. Αποφεύγεται, εν τούτοις, η ξήρανση σε υψηλές θερμοκρασίες, διότι το λίπος δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες και στη συνέχεια δεν εκχυλίζεται.
Η εκχύλιση ξηρών υλικών εξαρτάται από το μέγεθος των κόκκων του υλικού. Συνήθως αλέθεται το στερεό υλικό ή τρίβεται σε τρύφτη, αν είναι μαλακό. Γρήγορη παραλαβή του λίπους επιτυγχάνεται σε μπλέντερ (βλ. κεφ. 1.2), όπου ο διαλύτης εκχυλίζει εύκολα το περιεχόμενο στο δείγμα λίπος, από τα τεμαχίδια του τροφίμου που παράγονται. Σε περίπτωση που μέρος των λιπιδίων είναι δεσμευμένα από πρωτεΐνες (λιποπρωτεΐνες), συνίσταται υδρόλυση σε όξινο περιβάλλον και ξήρανση πριν από την εκχύλιση.

13.3 Διαλύτες εκχύλισης

Ο αιθέρας (σ.ζ. 34.6 °C) και ο πετρελαϊκός αιθέρας (σ.ζ.35-45 °C) είναι οι δύο πιο συνηθισμένοι διαλύτες του λίπους. Ο αιθέρας είναι πιο αποτελεσματικός σαν διαλύτης. Δηλαδή, διαλύει ταυτόχρονα και τα προϊόντα οξείδωσης των λιπών (υδροϋπεροξείδια, καρβονυλικές ενώσεις), είναι όμως πιο ακριβός και πιο επικίνδυνος, όσον αφορά την πρόκληση πυρκαγιάς, από τον πετρελαϊκό αιθέρα. Ακόμη προσλαμβάνει υγρασία από το δείγμα κατά την εκχύλιση και διαλύει συστατικά όπως τα σάκχαρα κ.α. Εκτός των παραπάνω, αποτελεσματικός διαλύτης του λίπους θεωρείται η βουτανόλη κορεσμένη με νερό. Ακόμη χρησιμοποιείται μίγμα $CHCl_3/CH_3OH$ (2:1 V/V) που χαρακτηρίζεται σαν ήπιο μέσον εκχύλισης και συνιστάται για την διαλυτοποίηση των λιποπρωτεϊνών, χωρίς να προκαλείται αλλοίωση στο πρωτεϊνικό τμήμα αυτών.

13.4 Καθαρισμός εκχυλισμάτων

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Κατά την εκχύλιση, εκτός των λιπιδίων απομακρύνονται από το δείγμα υδατοδιαλυτές ουσίες, όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες, άλατα κ.α. Τα συστατικά αυτά απομακρύνονται από το δείγμα με την προσθήκη νερού ή υδατικών διαλυμάτων αλάτων, πριν από τον προσδιορισμό του λίπους.
Απομάκρυνση τυχόν παρεμποδιζουσών ουσιών επιτυγχάνεται με ηλεκτροφορητικές ή χρωματογραφικές μεθόδους (TLC, στήλης).
Μετά την παραλαβή του λίπους με έναν από τους τρόπους που ήδη εκτέθηκαν, εξατμίζεται ο διαλύτης και ζυγίζεται το λιπαρό υπόλειμμα.

13.5 Κλασμάτωση των λιπιδίων

Το συνολικό εκχύλισμα του τροφίμου αποτελείται από διάφορες ετερογενείς ουσίες διαφέρουσες κατά πολύ μεταξύ τους ως προς την πολικότητα και τη δομή, πράγμα που καθιστά την κλασμάτωση εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία. Η τεχνική της κλασματικής κρυστάλλωσης που διαχωρίζει τα λιπίδια κατά τάξεις βάσει της διαλυτότητάς τους δεν είναι ιδιαίτερα αποδοτική. Ειδικά, για τα φωσφολιπίδια η εφαρμοζόμενη καταβύθιση τους με ακετόνη από το διάλυμα του μίγματος των λιπιδίων δεν είναι ικανοποιητική διότι ορισμένα πολικά λιπίδια (γλυκολιπίδια) συγκαταβυθίζονται με τα φωσφολιπίδια καθώς επίσης διότι ορισμένα φωσφολιπίδια διαλύονται στην ακετόνη.
Οι δύο πλέον επιτυχείς μέθοδοι κλασμάτωσης των λιπιδίων είναι (Α) η χρωματογραφία πυριτικού οξέος και (Β) η κατανομή κατ' αντιρροή (βλ. κεφ. 9).

Α. Χρωματογραφία πυριτικού οξέος

1. Χρωματογραφία στήλης (υλικό πλήρωσης στήλης: πυριτικό οξύ ή πυριτικό μαγνήσιο-Florisil).

Τα λιπίδια κλασματώνονται σε στήλη κατόπιν έκλουσης με σύστημα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Τα ουδέτερα λιπίδια (υδρογονάνθρακες, γλυκερίδια, στερόλες, εστέρες στερολών), διαχωρίζονται με προσθήκη $CHCl_3$. Τα εναπομείναντα πολικά λιπίδια διαχωρίζονται αντίστοιχα με CH_3OH. Μέλη κάθε μιας από τις παραπάνω κατηγορίες με διαφορετικές το καθένα ιδιότητες διαχωρίζονται με την αρχή της βαθμωτής έκλουσης (βλ. κεφ. 2.9). Για πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα οι ιδιότητες του πυριτικού οξέος (υγρασία, μέγεθος κόκκων, συνθήκες προετοιμασίας της στήλης) πρέπει να είναι απόλυτα ελεγχόμενες. Δεδομένου ότι κανένα μοναδικό υπόστρωμα δεν είναι κατάλληλο για πλήρη διαχωρισμό χρησιμοποιούνται συνήθως συστήματα υποστρωμάτων, όπως πυριτικό οξύ/νερό, ή τροποποιημένη κυτταρίνη/πυριτι-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κό οξύ.

2. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η μέθοδος συνδυάζει την απλότητα, την ταχύτητα, την ευαισθησία και την δυνατότητα πολλαπλότητας χρήσης. Τα λιπίδια διαχωρίζονται κατά τάξεις (αλκοόλες, οξέα κ.τ.λ.). Τα μέλη κάθε μιας τάξης διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μήκος της αλυσίδας ατόμων άνθρακα και το βαθμό ακορεστότητας. Τα μέλη κάθε τάξης μπορούν στη συνέχεια να διαχωριστούν με αέρια χρωματογραφία κατόπιν εστεροποίησης ή με TLC της οποίας το υπόστρωμα είναι εμποτισμένο με ειδικά αντιδραστήρια όπως π.χ. $AgNO_3$. Τα αντιδραστήρια αυτά συμπλέκονται ή αντιδρούν εκλεκτικά με χαρακτηριστικές ομάδες των λιποειδών, πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα το διαχωρισμό των μελών κάθε τάξης, σύμφωνα με το βαθμό ακορεστότητάς τους.

Τα φωσφολιπίδια διαχωρίζονται από το ολικό λιπαρό κλάσμα με προσρόφηση πάνω σε ενεργοποιημένο πυριτικό οξύ (TLC). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποχωρίζονται με προσρόφηση πάνω σε ιονανταλλακτική ρητίνη. Το ελεύθερο φωσφολιπιδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων διάλυμα υφίσταται σαπωνοποίηση με αλκοολικό διάλυμα KOH. Κατόπιν οξίνισης το μίγμα εκχυλίζεται με εξάνιο και παραλαμβάνονται γλυκερίδια, λιπαρά οξέα και η χοληστερόλη. Τα λιπαρά οξέα προσροφώνται σε ιονανταλλακτική ρητίνη, ενώ η χοληστερόλη παραμένει στο διάλυμα. Τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες απ' ευθείας στη ρητίνη. Τα φωσφολιπίδια που προσροφώνται σε πυριτικό οξύ μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων. Οι μεθυλεστέρες αναλύονται με αέρια χρωματογραφία.

Β. Κατανομή κατ' αντιρροή

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορά διαλυτότητας των διαχωριζόμενων λιπιδίων σε δύο μη αναμειγνυόμενους διαλύτες. Στην ουσία πρόκειται για εκχύλιση υγρού/υγρού πολλαπλών σταδίων. Μπορεί να γίνει σε διαχωριστική χοάνη, αλλά χρησιμοποιείται συνήθως ειδική συσκευή Craig με την οποία επιτυγχάνονται μέχρι και 10,000 διαχωρισμοί/ώρα. Η μέθοδος πλεονεκτεί πολλών άλλων γιατί γίνεται κάτω από ήπιες συνθήκες και είναι ποσοτική. Μέτρο της διαφοράς διαλυτότητας των συστατικών του λιπαρού μίγματος στους δύο διαλύτες είναι ο συντελεστής κατανομής kp, ο οποίος είναι συνάρτηση του μήκους της αλυσίδας και του βαθμού ακορεστότητας κάθε συστατικού.

Η μέθοδος έχει μερικά αντικατασταθεί σήμερα από τη χρωματογραφία αλλά χρησιμοποιείται ακόμη για παρασκευαστικούς σκοπούς. Λιπαρές ύλες που αναλύονται με τη μέθοδο αυτή περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα, γλυκερίδια, φωσφολιπίδια, χρωστικές, προϊόντα οξείδωσης λιπών κ.α.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

13.6 Φυσικές και χημικές μέθοδοι ανάλυσης λιπιδίων.

Α. Φυσικές μέθοδοι

1) Σημείο τήξεως

Τα λίπη και λάδια αποτελούν σύνθετα μίγματα ενώσεων και συνεπώς δεν έχουν συγκεκριμένο σημείο τήξεως. Για τη μέτρηση του σημείου τήξεως, το δείγμα τοποθετείται σε τριχοειδή σωλήνα διαστάσεων 1mm×6-8cm. Κατόπιν παραμονής του δείγματος στους 4-10°C επί 16 ώρες, χρόνος απαιτούμενος για την λήψη της σταθερής κρυσταλλικής μορφής (βλ. φαινόμενο πολυμορφισμού)[1], ο σωλήνας τοποθετείται στο λουτρό της συσκευής σημείου τήξεως η οποία θερμοστατείται 10°C χαμηλότερα από το αναμενόμενο σημείο τήξεως της λιπαρής ουσίας. Το λουτρό αρχίζει να θερμαίνεται με ρυθμό 0.5°C/min. Σαν σημείο τήξεως του λίπους λαμβάνεται η θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται πλήρης διαύγαση (πλήρης τήξη) του δείγματος.

2) Θερμοκρασία Titer

Με τη μέτρηση της θερμοκρασίας Titer προσδιορίζεται το σημείο στερεοποίησης μιας λιπαρής ύλης. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται ειδικός σωλήνας (σωλήνας Titer). Η λιπαρή ύλη υφίσταται κατ' αρχήν σαπωνοποίηση για την λήψη των λιπαρών οξέων. Το τεθηγμένο μίγμα αφήνεται να ψυχθεί ενώ παρακολουθείται η θερμοκρασία. Σε κάποιο σημείο αρχίζει η στερεοποίηση του δείγματος ενώ στιγμιαία ανέρχεται ελαφρά η θερμοκρασία, λόγω της απελευθερούμενης λανθάνουσας θερμότητας πήξεως. Η θερμοκρασία αυτή καλείται θερμοκρασία Titer.

3) Πυκνότητα

Τα λίπη και λάδια διαστέλλονται με την τήξη, ενώ συστέλλονται κατά την κρυστάλλωση (διαδικασία πολυμορφισμού). Η διαστολομετρία (dilatometry)[1] μετράει τη διαφορά στον ειδικό όγκο της λιπαρής ύλης, η οποία παρατηρείται με τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Από τη σταθερά αυτή υπολογίζεται ο **δείκτης στερεού λίπους (SFI)** του λίπους που είναι το πηλίκον στερεού/υγρό περιεχόμενο των εμπορικών λιπών. Η παράμετρος αυτή αποτελεί ένδειξη για το βαθμό υδρογόνωσης της λιπαρής ύλης. Η συσκευή που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση (dilatometer) αποτελείται από σφαιρική φιάλη που συνδέεται με βαθμολογημένο τριχοειδή σωλήνα στη μια της άκρη. Στη φιάλη τοποθετείται το λίπος μαζί με ένα έγχρωμο υγρό π.χ. νερό+χρωστική. Καθώς το λίπος διαστέλλεται με θέρμανση, το υπερκείμενο υγρό εισχωρεί και ανέρχεται στον τριχοειδή σωλήνα. Γραφική παράσταση του ειδικού όγκου, συναρτήσει της θερμοκρασίας δίνει καμπύλη από την οποία υπολογίζεται γραφικά το στερεό και το υγρό κλάσμα του λίπους.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

4) NMR

Έχει δειχθεί πως το σχήμα της γραμμής απορρόφησης στο φάσμα NMR επηρεάζεται από τη φυσική και χημική κατάσταση του δείγματος. Συγκεκριμένα το πλάτος της γραμμής απορρόφησης σχετίζεται με την κινητικότητα των ατόμων υδρογόνου του δείγματος και το βαθμό ομοιογένειας του μαγνητικού πεδίου.

Σε στερεό δείγμα όπου οι πυρήνες των ατόμων υδρογόνου είναι πακτωμένοι, ο κάθε πυρήνας βρίσκεται σε μαγνητικό πεδίο ισχυρότερο του εφαρμοζόμενου, γιαυτό και το εύρος της γραμμής προσρόφησης είναι σχετικά μεγάλο. Στα υγρά όπου τα άτομα βρίσκονται σε κατάσταση μεγαλύτερης ευκινησίας, το πεδίο, που είναι αποτέλεσμα συνεισφοράς των πυρήνων, εμφανίζεται ελαττωμένο και η γραμμή απορρόφησης έχει μικρό εύρος. Η διαφορά αυτή στο εύρος των γραμμών απορρόφησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του υγρού κλάσματος του λίπους σε διάφορα τρόφιμα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι το NMR μικρής διακριτικής ικανότητας. Περισσότερα για το NMR βλ. στο κεφ. 3.7.

5) Δείκτης διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης είναι, μέσα σε ορισμένα όρια συγκέντρωσης χαρακτηριστική σταθερά της λιπαρής ύλης ορισμένης προέλευσης. Για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση λιπών και λαδιών (βλ. κεφ. 6). Ακόμη μια και ο δείκτης διάθλασης σχετίζεται με το βαθμό ακορεστότητας της λιπαρής ύλης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του αριθμού ιωδίου αυτής.

6) Υπέρυθρη φασματοσκοπία (βλ. κεφ. 3:3)

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται το ποσοστό των trans-ισομερών των λιπαρών οξέων, το οποίο αυξάνει κατά τη βιομηχανική κατεργασία (υδρογόνωση) των λαδιών. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στο λ=103 nm και οφείλεται στην παραμόρφωση του δεσμού C-H γειτονικού του trans-διπλού δεσμού.

7) Υπεριώδης φασματοσκοπία (βλ. κεφ. 3.2)

Τα συνηθισμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα ακατέργαστα λάδια δεν απορροφούν στο UV. Αν όμως οι διπλοί δεσμοί ανακατανεμηθούν έτσι ώστε να προκύψει συζυγές σύστημα, τότε παρατηρείται απορρόφηση στην περιοχή αυτή του φάσματος.

Αυτό επιτυγχάνεται με θέρμανση παρουσία αλκάλεως. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η μέθοδος προβλέπει τη θέρμανση μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα 10 ml αιθυλενογλυκόλης που περιέχει 6.5% KOH, σε ελαιόλουτρο. Μόλις η θερμοκρασία φθάσει τους 180°C προστίθενται 100 mg λίπους και το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται. Η θέρμανση διαρκεί 25 min οπότε ακολουθεί ταχεία ψύξη. Κατόπιν αραίωσης με αιθανόλη σε ικανό όγκο μετρείται η απορρόφηση στα μήκη κύματος 234nm (απορρόφηση οφειλόμενη στα λινελαϊκό και λινολενικό οξύ) και 268 nm (απορρόφηση οφειλόμενη μόνο στο λινολενικό οξύ). Παράλληλα εκτελείται τυφλός προσδιορισμός.
Εξέταση των λαδιών γίνεται και στα μήκη κύματος 232 και 270 nm (βλ. κεφ. 3.2.)

8) Αέρια χρωματογραφία

Τα λιπαρά οξέα αναλύονται κατόπιν μετατροπής τους σε πτητικούς μεθυλεστέρες[2]. Με τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων επιτυγχάνεται ανίχνευση της νοθείας στα φυτικής κυρίως προέλευσης λάδια μια και το καθένα απ' αυτά έχει τη δική του αναλογία λιπαρών οξέων. Η μέθοδος λόγω ευαισθησίας τείνει να αντικαταστήσει όλες τι άλλες (βλ. κεφ. 2.8)

9) Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Η μέθοδος άρχισε να εφαρμόζεται συστηματικά από την αρχή της δεκαετίας του '70. Με κατάλληλες στήλες και συστήματα διαλυτών μπορούν να επιτευχθούν παντός είδους διαχωρισμοί και προσδιορισμοί των λιπαρών υλών (οξέων, εστέρων, αλκοολών κ.ο.κ. βλ. κεφ.2.9)

Β. Χημικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται στο συνολικό αιθερικό εκχύλισμα ή στο κλάσμα των αδιάλυτων στο νερό λιπαρών οξέων που έχουν απομονωθεί από το εκχύλισμα. Περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό των χημικών σταθερών που στηρίζονται κυρίως: (1) στα λιπαρά οξέα και (2) στην ακορεστότητα της λιπαρής ύλης.

1. Χημικές σταθερές λιπαρών υλών που στηρίζονται στα περιεχόμενα λιπαρά οξέα.

α) βαθμός οξύτητας κατά Köttstorfer.

Αποτελεί μέτρο των περιεχόμενων στη λιπαρή ύλη ελεύθερων λιπαρών οξέων. Οι λιπαρές ύλες κατά την παλαίωση υφίστανται τάγγιση, απο' έλεσμα της οποίας είναι η αύξηση της οξύτητάς τους.
Η τάγγιση στις λιπαρές ύλες οφείλεται σε υδρολυτικές ή οξειδωτικές μεταβολές στο δείγμα.
Η υδρολυτική τάγγιση περιλαμβάνει τη χημική ή ενζυμική υδρόλυση των λιπών σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερίνη. Η οξειδωτική τάγγιση περιλαμβάνει

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

την προσθήκη ατμοσφαιρικού οξυγόνου παρουσία ενζύμων ή χημικών αντιδραστηρίων.

Ο βαθμός οξύτητας παρέχει τον αριθμό των ml διαλύματος N/1 NaOH ή KOH, τα οποία απαιτούνται δια την εξουδετέρωση των εις 100 g λιπαρής ύλης περιεχόμενων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Ο προσδιορισμός της οξύτητας εκτελείται ως εξής:

Ποσότητα 5-10 g λίπους διαλύεται σε προεξουδετερωμένο μίγμα ίσων μερών αιθέρα/αλκοόλης, προστίθενται λίγες σταγόνες δείκτου (1% αλκοολικό διάλυμα φαινολοφθαλεΐνης) και το διάλυμα ογκομετρείται με διάλυμα N/1 ή N/10 NaOH ή KOH. Γίνεται τέλος η σχετική αναγωγή στα 100g λίπους.

Η αλκοόλη αποτελεί τον κοινό διαλύτη του αιθέρα και του υδατικού διαλύματος NaOH ή KOH για την αποφυγή σχηματισμού διφασικού συστήματος κατά την ογκομέτρηση.

Πολλές φορές το αποτέλεσμα του προσδιορισμού της οξύτητας στα φυτικά λάδια εκφράζεται σε % ελαϊκό οξύ. Η οξύτητα σε ελαϊκό οξύ υπολογίζεται κατόπιν πολλαπλασιασμού του βαθμού οξύτητας κατά Köttstorfer επί τον συντελεστή 0.2823. (Μ.Β. ελαϊκού οξέος=282.3)

β) Αριθμός σαπωνοποίησης

Παρέχει τα mg KOH τα οποία απαιτούνται για την πλήρη σαπωνοποίηση 1g λίπους ή λαδιού:

$$C_3H_5(R)_3 + 3KOH \rightarrow C_3H_5(OH)_3 + 3RCOOK \qquad (13.1)$$

Ο προσδιορισμός του αριθμού σαπωνοποίησης εκτελείται ως εξής: Ζυγίζεται ποσότητα 1-2 g λιπαρής ύλης σε κωνική φιάλη 250 ml, προστίθενται μέσω προχοΐδας 25 ml αλκοολικού διαλύματος N/2 KOH και θερμαίνεται η φιάλη σε ζέον υδρόλουτρο επί 30 min με κάθετο ψυκτήρα. Αναταράσσεται το περιεχόμενο της φιάλης με προσοχή ούτως ώστε να αποφευχθεί εκτίναξη σταγονιδίων του υγρού. Μετά την πλήρη διαύγαση παρατείνεται η θέρμανση του μίγματος επί 15 min, διότι λαβαίνει χώρα μετεστεροποίηση, σχηματιζομένων ευδιαλύτων στην αλκοόλη αιθυλικών εστέρων, οι οποίοι κατά την παράταση της θέρμανσης σαπωνοποιούνται πλήρως. Τέλος στο θερμό διάλυμα προστίθενται λίγες σταγόνες 1% αλκοολικού διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης και εξουδετερώνεται η περίσσεια του KOH με διάλυμα N/2 HCl. Για κάθε προσδιορισμό εκτελείται λευκός προσδιορισμός άνευ λίπους για τον καθορισμό της ισχύος του αλκοολικού διαλύματος KOH έναντι του διαλύματος N/2 HCl.

Ο αριθμός σαπωνοποίησης (ΑΣ) υπολογίζεται από την σχέση (13.2).

$$AΣ = \frac{(α-β)28}{γ} \qquad (13.2)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

όπου: α= ml N/2 HCl στον λευκό προσδιορισμό
β= ml N/2 HCl στον πραγματικό προσδιορισμό
γ= g λιπαρής ύλης.

Ο αριθμός σαπωνοποίησης των λιπαρών υλών που περιέχουν μικρή μόνο ποσότητα ασαπωνοποίητων υλών είναι αντιστρόφως ανάλογος του μοριακού βάρους των περιεχομένων στην λιπαρή ύλη λιπαρών οξέων.

γ) αριθμοί Reichert-Meissl, Polenske και Kirschner

Ο αριθμός Reichert-Meissl (RM) παρέχει τα ml διαλύματος N/10 NaOH ή KOH, τα οποία απαιτούνται για την εξουδετέρωσση των αποσταζόντων, υπό ορισμένες συνθήκες, πτητικών υδατοδιαλυτών λιπαρών οξέων που περιέχονται σε 5g ύλης.

Αντίστοιχα ο αριθμός Polenske (P) παρέχει τα ml διαλύματος N/10 NaOH ή KOH τα οποία απαιτούνται για την εξουδετέρωση των αποσταζόντων, υπό ορισμένες συνθήκες, πτητικών αδιάλυτων στο νερό λιπαρών οξέων, που περιέχονται σε 5g λιπαρής ύλης.

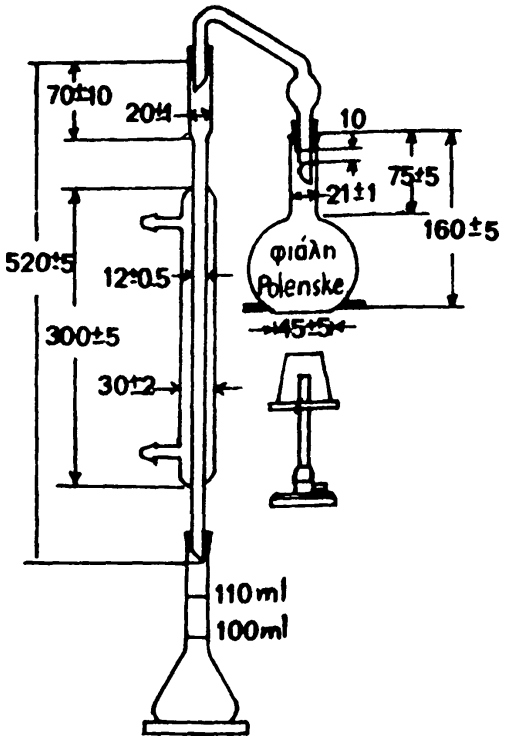
Ο αριθμός R.M. προσδιορίζεται ως εξής:

Ζυγίζονται 5.0 g λιπαρής ύλης σε σφαιρική φιάλη 250 ml, προστίθενται 20 ml γλυκερίνης και 2ml υδατικού διαλύματος KOH(1:1)και το μίγμα θερμαίνεται σε χαμηλή, γυμνή φλόγα, μέχρι βρασμού υπό συνεχή ανάδευση. Ο βρασμός σχεδόν πάντοτε συνοδεύεται από ισχυρό αφρισμό και γιαυτό η θέρμανση πρέπει να γίνεται προσεκτικά. Μετά την πάροδο ορισμένου χρόνου (6–9 min) οπότε έχει απομακρυνθεί το περιεχόμενο νερό, το μίγμα καθίσταται διαυγές, ενδεικτικό της αποπεράτωσης της σαπωνοποίησης της λιπαρής ύλης. Στη συνέχεια ο διαλυτοποιημένος σάπωνας αφήνεται να ψυχθεί στους 80-90 °C και στη φιάλη προστίθενται 90–100 ml πρόσφατα βρασμένου αποσταγμένου νερού της ίδιας θερμοκρασίας, οπότε συνήθως προκύπτει διαυγές διάλυμα σάπωνος.

Στο θερμό διάλυμα προστίθενται 50 ml αραιού H_2SO_4 (25 $^0/_{00}$) μικρή ποσότητα πορσελάνης και συναρμολογείται αμέσως η συσκευή απόσταξης (Σχ. 13-1). Η φλόγα του λύχνου για την απόσταξη ρυθμίζεται έτσι ώστε να ληφθεί απόσταγμα 110 ml σε 20-25 min. Μετά τη συλλογή του παραπάνω όγκου αποστάγματος, απομακρύνεται η φλόγα και αντικαθίσταται ο υποδοχέας του αποστάγματος με ποτήρι ζέσης. Ακολουθεί διήθηση του αποστάγματος, σε ηθμό διαμέτρου 8cm.

Σαν υποδοχέας για τη διήθηση χρησιμοποιείται ογκομετρική φιάλη 100 ml. Μετά τη συλλογή 100ml διηθήματος αντικαθίσταται ο υποδοχέας με κωνική φιάλη. Τα 100ml του διηθήματος μεταφέρονται σε κωνική φιάλη 250 ml προστίθενται λίγες σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης και ογκομετρούνται με διάλυμα N/10 NaOH. Τα καταναλισκόμενα ml NaOH αυξάνονται κατά 10%

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 13-1. Προσδιορισμός αριθμού Reichert-Meissl λιπαρών υλών.

(ελήφθηκαν προς ογκομέτρηση 100 εκ των 110 ml αποστάγματος). Παράλληλα εκτελείται λευκός προσδιορισμός του οποίου το αποτέλεσμα αφαιρείται από τον πραγματικό προσδιορισμό. Η μέθοδος είναι συμβατική και γιαυτό πρέπει να τηρούνται απαραίτητα όλες οι παραπάνω συνθήκες.

Ο αριθμός Ρ. προσδιορίζεται ως εξής:

Μετά τον προσδιορισμό RM εκπλύνονται τρεις φορές (15 ml περίπου για κάθε έκπλυση), το ένα μετά το άλλο, ο ψυκτήρας της αποστακτικής συσκευής, το ποτήρι που χρησίμευσε σαν δεύτερος υποδοχέας και η φιάλη των 110 ml. Το νερό έκπλυσης μαζί με τα σ΄αυτό περιεχόμενα λιπαρά οξέα αποχύνεται στον ηθμό για τη συγκράτηση των αδιάλυτων στο νερό λιπαρών οξέων. Το διήθημα απορρίπτεται. Η έκπλυση των παραπάνω οργάνων επαναλαμβάνεται ακόμη τρεις φορές (15 ml για κάθε έκπλυση) με προεξουδετερωμένη αλκοόλη και τα υγρά έκπλυσης διηθούνται μέσω του ίδιου ηθμού, προς διάλυση των αδιάλυτων στο νερό λιπαρών οξέων που συγκεντρώθηκαν πάνω σ΄ αυτόν κατά τις προηγούμενες διηθήσεις. Τα αλκοολικά διηθήματα συγκεντρώνονται σε κωνική φιάλη, προστίθενται λίγες σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης και ογκομετρούνται με διάλυμα N/10 NaOH ή KOH. Τα καταναλισκόμενα ml περιέχουν απ΄ ευθείας τον αριθμό Polenske.

Με τον αριθμό RM προσδιορίζονται κυρίως τα ευδιάλυτα στο νερό βουτυρικό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

και καπρονικό οξύ, ενώ με τον αριθμό P., κυρίως τα αδιάλυτα στο νερό οξέα: καπρυλικό (C_8), καπρυνικό (C_{10}), μυριστικό (C_{12}) και λαυρικό (C_{14}) που απαντούν στο βούτυρο.

Το κυριότερο πτητικό υδατοδιαλυτό λιπαρό οξύ στο βούτυρο είναι το βουτυρικό οξύ. Αυτό προσδιορίζεται με τον **αριθμό Kirschner** ο οποίος αποτελεί μέτρο των υδατοδιαλυτών αλάτων του Ag στο απόσταγμα RM δηλαδή του βουτυρικού αργύρου.

Ο αριθμός Kirschner προσδιορίζεται ως εξής:

Το εξουδετερωμένο απόσταγμα που προέκυψε από τον προσδιορισμό του αριθμού RM κατεργάζεται με Ag_2SO_4 (0.5g) και διηθείται κατόπιν παραμονής επί 1hr σε σκοτεινό χώρο. Στο διήθημα (100 ml) προστίθεται κρύο αποσταγμένο νερό (35ml), αραιό H_2SO_4 (10 ml, 2.5% V/V), τεμάχια πορσελάνης και αποστάζεται. Συλλέγονται 110 ml αποστάγματος τα οποία διηθούνται. 100 ml του διηθήματος ογκομετρούνται με διάλυμα NaOH 0.1 N. Ο αριθμός Kirschner (K) δίνεται από τη σχέση (13.3)

$$K = \frac{121(100+V_1)\,(V_2-V_3)}{10^4} \qquad (13.\ )$$

όπου: V_1=ml δ.NaOH 0.1N που καταναλώθηκαν στον προσδιορισμό του αριθμού RM

V_2, V_3 = ml δ.NaOH 0.1 N που καταναλώθηκαν κατά τον πραγματικό και λευκό προσδιορισμό του αριθμού (K) αντίστοιχα.

Για το βούτυρο ο αριθμός RM κυμαίνεται μεταξύ 24-34, ο αριθμός P μεταξύ 3-4 και ο αριθμός K μεταξύ 19-26.

Οι αντίστοιχοι αριθμοί για τις άλλες λιπαρές ύλες είναι μικρότεροι της μονάδας (με εξαίρεση το καρυδέλαιο) και γιαυτό οι αριθμοί αυτοί χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση της νόθευσης του βουτύρου.

2) Χημικές σταθερές των λιπαρών υλών που στηρίζονται στην ακορεστότητα των λιπαρών οξέων.

Ο προσδιορισμός της ακορεστότητας μιας λιπαρής ύλης έχει σημασία στον έλεγχο των διαφόρων βιομηχανικών κατεργασιών του ραφιναρίσματός τους. Για τον προσδιορισμό των διπλών δεσμών των λιπαρών οξέων χρησιμοποιείται συνήθως η μέθοδος της προσθήκης αλογόνων. Οι σχετικές χημικές σταθερές είναι (α) ο αριθμός ιωδίου και (β) ο αριθμός ροδανίου.

(α) Αριθμός ιωδίου

Παρέχει τα g I_2 που προστίθενται σε 100g λιπαρής ύλης προς κορεσμό των περιεχόμενων ακόρεστων λιπαρών οξέων. Ανάλογα με τον αριθμό των υπαρχόντων, στα ακόρεστα οξέα, διπλών δεσμών προσλαμβάνονται δύο,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τέσσερα, έξη, ή και περισσότερα άτομα αλογόνου, π.χ. το ελαϊκό οξύ προσλαμβάνει δύο άτομα αλογόνου (έχει ένα διπλό δεσμό) και δίνει αριθμό ιωδίου 89.96, ενώ το λινελαϊκό οξύ προσλαμβάνει τέσσερα άτομα αλογόνου και δίνει αριθμό ιωδίου 181.22

Η ταχύτητα προσθήκης του αλογόνου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως την σύνταξη των ακόρεστων λιπαρών οξέων κ.α. Για τον προσδιορισμό του αριθμού ιωδίου εφαρμόζονται οι μέθοδοι (i) Hanus και (ii) Wijs.

(i) Αριθμός Ιωδίου κατά Hanus

Η μέθοδος χρησιμοποιεί διάλυμα αριθμού ιωδίου που παρασκευάζεται ως εξής:

13.0 g τριμμένου ιωδίου τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 1lt, προστίθεται λίγο άνυδρο CH_3COOH, 8 g Br_2 και συμπληρώνεται μέχρι της χαραγής με άνυδρο CH_3COOH. Το περιεχόμενο αναταράσσεται καλά μέχρις πλήρους διάλυσης του ιωδίου.

Ο προσδιορισμός γίνεται ως εξής:

Σε φιάλη ιωδίου ζυγίζονται 0.20-0.25 g λιπαρής ύλης και προστίθενται 10 ml $CHCl_3$. Στο διάλυμα προστίθενται με προχοΐδα 25 ml διαλύματος αριθμού ιωδίου, κλείνεται η φιάλη και αφήνεται σε σκοτεινό χώρο επί 30 min, ενώ αναταράσσεται περιοδικά. Μετά την πάροδο του παραπάνω χρόνου προστίθενται στην φιάλη 15ml διαλύματος K I 10% και ογκομετρείται η περίσσεια του ιωδίου με διάλυμα N /10 $Na_2S_2O_3$ παρουσία αμύλου (2ml) σαν δείκτη,το οποίο προστίθεται προς το τέλος της ογκομέτρησης. Παράλληλα εκτελείται και λευκός προσδιορισμός.

Ο αριθμός ιωδίου (AI) υπολογίζεται από τη σχέση (13.4):

$$AI = \frac{1.269\,(\alpha-\beta)}{\gamma} \qquad (13.4)$$

όπου: α= ml $Na_2S_2O_3$ καταναλωθέντα για τον λευκό προσδιορισμό

β= ml $Na_2S_2O_3$ καταναλωθέντα για τον πραγματικό προσδιορισμό

γ= βάρος τους δείγματος σε g

Παρεμφερής είναι και ο προσδιορισμός του αριθμού ιωδίου με τη μέθοδο Wijs[2]

β) Αριθμός ροδανίου

Παρέχει την % ποσότητα ροδανίου (SCN), υπολογιζόμενη σε ισοδύναμο ποσότητα ιωδίου, η οποία απαιτείται για τον κορεσμό μιας λιπαρής ύλης. Επειδή το ροδάνιο έχει μικρότερη δραστικότητα από τα αλογόνα δεν προστίθεται σε όλους τους διπλούς δεσμούς των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αλλά εκλεκτικά σε ορισμένους από αυτούς π.χ. από τους δύο διπλούς δεσμούς του λινελαϊκού οξέος, με ροδάνιο κορέννυται μόνον ο ένας, από τους τρεις διπλούς δεσμούς του λινολενικού οξέος, με ροδάνιό κορέννυνται μόνον οι δύο κ.ο.κ.

Για τον προσδιορισμό του αριθμού ροδανίου προστίθεται στο λιπαρό δείγμα περίσσεια διαλύματος ροδανίου σε άνυδρο CH_3COOH και εν συνεχεία κατόπιν προσθήκης διαλύματος KI ελευθερώνεται I_2 από το μη προστεθέν στους διπλούς δεσμού ροδάνιο. Το τελευταίο ογκομετρείται, παρουσία αμύλου με $Na_2S_2O_3$.

Γ. Προσδιορισμός βαθμού οξείδωσης/σταθερότητας λιπαρών υλών

Πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης των λιπαρών υλών είναι τα υπεροξείδια που προκύπτουν από την προσθήκη ατμοσφαιρικού O_2 στο μόριο των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων δίνει **καρβονυλικές ενώσεις** (δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης που προσδίνουν τη χαρακτηριστική δυσοσμία στη λιπαρή ύλη).

1) Αριθμός υπεροξείδιων

Αποτελεί μέτρο του βαθμού πρωτογενούς οξείδωσης μιας λιπαρής ύλης. Ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων (ΑΥ) γίνεται ως εξής:

Σε κωνική φιάλη με εσμυρισμένο πώμα 250 ml ζυγίζεται με ακρίβεια ± 0.001g ορισμένη ποσότητα λιπαρής ύλης ανάλογα με την αναμενόμενη τιμή του ΑΥ (Πίνακας 13.2), προστίθενται 10 ml $CHCl_3$, 15 ml CH_3COOH και 1ml κορεσμένου διαλύματος KI. Η φιάλη κλείνεται αμέσως, αναταράσσεται ζωηρά επί 1min και αφήνεται σε χώρο σκοτεινό επί 5min. Στη συνέχεια στο μίγμα προστίθενται 75 ml νερού και το απελευθερωθέν ιώδιο ογκομετρείται με διάλυμα 0.002 N $Na_2S_2O_3$ (για τιμές ΑΥ<100) ή με διάλυμα 0.01 N $Na_2S_2O_3$ (για τιμές ΑΥ>100). Συγχρόνως εκτελείται και λευκός προσιορισμός.

Ο αριθμός υπεροξειδίων υπολογίζεται από τη σχέση (13.5):

$$\text{ΑΥ (meq υπεροξειδίου/kg λιπαρής ύλης)} = \frac{1000\ \alpha \cdot N}{\beta} \qquad (13.5)$$

όπου: α= καταναλωθέντα ml διαλύματος $Na_2S_2O_3$

N= κανονικότητα διαλύματος $Na_2S_2O_3$

β= βάρος του δείγματος σε g.

Οι αντιδράσεις που λαβαίνουν χώρα κατά τον προσδιορισμό είναι οι εξής:

$$2KI + 2RCOOH \xrightarrow{H^+} 2HI + 2RCOOK \qquad (13.6)$$

$$ROOH + 2HI \rightarrow ROH + I_2 + H_2O \qquad (13.7)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$$2Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow Na_2S_4O_6 + 2\ NaI \qquad (13.8)$$

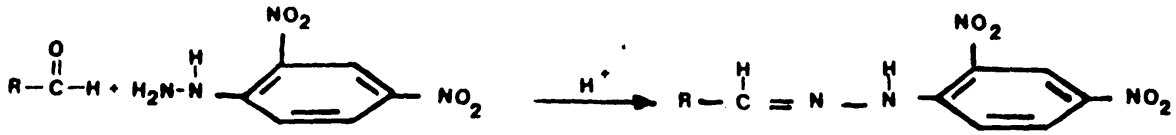
ΠΙΝΑΚΑΣ 13.2

Ποσότητα χρησιμοποιούμενου δείγματος λιπαρής ύλης για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων (Α.Υ)

Αναμενόμενη τιμή Α.Υ.	Ποσότητα χρησιμ. δείγματος (g)
0–150	2–1.2
150–250	1.2–0.8
250–400	0.8–0.5
400–700	0.5–0.3

2) Μέτρηση του καρβονυλικού περιεχόμενου λιπαρής ύλης.

Το καρβονυλικό περιεχόμενο μιας λιπαρής ύλης προσδιορίζεται με την αντίδραση Lappin-Clark: Η οξειδωμένη λιπαρή ύλη κατεργάζεται με 2.4 δινιτροφαινύλ-υδραζίνη σε όξινο περιβάλλον. Η παραγόμενη υδραζόνη σε αλκαλικό περιβάλλον δίνει προϊόν ερυθρού χρώματος που προσδιορίζεται φωτομετρικά στο λ=480 nm. Η αντίδραση Lappin Clark έχει ως εξής:



2,4 δινιτροφαινυλ-υδραζίνη υδραζόνη

3) Μέθοδος του ενεργού οξυγόνου (Active Oxygen Method, AOM)

Συνίσταται στη διοχέτευση αέρα, με σταθερή παροχή, μέσω δοκιμαστικού σωλήνα που περιέχει 20 ml λιπαρής ύλης στους 100°C. Σαν τιμή λαμβάνεται ο χρόνος σε ώρες που απαιτείται για τη λήψη 100meq υπεροξειδίων/Kg λιπαρής ύλης.

4) Μέθοδος θέρμανσης σε φούρνο κατά Schaal

Το δείγμα της λιπαρής ύλης τοποθετείται σε γυάλινο υποδοχέα, καλύπτεται με γυαλί ρολογιού και τοποθετείται στο φούρνο στους 65°C. Το δείγμα μυρίζεται περιοδικά και προσδιορίζεται ο χρόνος μετά τον οποίο επέρχεται τάγγιση της λιπαρής ύλης.

5) Μέθοδος αέριας χρωματογραφίας

Με χρήση αεροστεγούς σύριγγας λαμβάνεται αέριο δείγμα από τον υπερκείμενο χώρο της λιπαρής ύλης και εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο, ο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οποίος, μέσω του καταγραφέα, δίνει σειρά κορυφών που με την βοήθεια γνωστών προτύπων ουσιών ταυτοποιούνται. Η μέθοδος, στηρίζεται στο γεγονός ότι οι ενώσεις που συνθέτουν τη γεύση και το άρωμα της λιπαρής ύλης είναι πτητικές και συνεπώς διαχωρίζονται με την αέρια χρωματογραφία. Για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού, η αέρια χρωματογραφία μπορεί να συνδυαστεί και με την φασματοφωτομετρία μαζών. (βλ. κεφ. 2.8 και 20.6)

6) Μέθοδος TBA (2-θειοβαρβιτουρικού οξέος (βλ. κεφ. 13.7 ΣΤ.)

7. Υπεριώδης φασματοσκοπία

Οξειδωμένα λιπαρά οξέα περιέχοντα συζυγείς διπλούς δεσμούς απορροφούν ισχυρά μεταξύ των λ=230-375 nm, συζυγή διένια στο λ=234 nm ενώ συζυγή τριένια στο λ=268 nm (βλ. κεφ. 3.2)

8) Μέθοδος οργανοληπτικής εξέτασης λιπαρών υλών

Η σταθερότητα μιας λιπαρής ύλης αναφέρεται στην ικανότητα που έχει το συγκεκριμένο λιπαρό δείγμα να διατηρεί την επιθυμητή γεύση και οσμή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της χρήσης του. Συνδέεται δε άμεσα με τα λιπαρά οξέα τα οποία περιέχει.

Για την οργανοληπτική εξέταση των λιπαρών υλών ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Καταρχήν προσδιορίζεται η γεύση της λιπαρής ύλης ως έχει και κατόπιν θέρμανσής της στους 60°C σε ειδικούς υποδοχείς αλουμίνιου. Έμπειρο προσωπικό δοκιμάζει τα λιπαρά δείγματα (συνήθως 3) και τα βαθμολογεί. Σύμφωνα με άλλη μέθοδο τα δείγματα εκτίθενται στο φως και επαναλαμβάνεται η δοκιμή σε διαστήματα 0, 7, 14 και 21 ημερών. Αντίστοιχο πείραμα επαναλαμβάνεται σε σκοτεινό χώρο σε θερμοκρασία 60°C οπότε λαμβάνεται η βαθμολογία μετά 0, 1, 3, 5 και 7 ημέρες.

Χαρακτηριστικά αποτελέσματα της εξέτασης αυτής συνοψίζονται στον Πίνακα 13.3

ΠΙΝΑΚΑΣ 13.3

Αποτελέσματα οργανοληπτικής εξέτασης λιπαρής ύλης

	βαθμολογία (0-10)		
χρόνος δειγματοληψ.	δείγμα 1	δείγμα 2	δείγμα 3
0	8	8	6
7	8	6	6
14	7.5	4	4
21	7	2	2

το δείγμα 1 αντιστοιχεί σε λιπαρή ύλη με καλή γεύση και μεγάλη σταθερότητα
το δείγμα 2 αντιστοιχεί σε λιπαρή ύλη με καλή γεύση και μικρή σταθερότητα
το δείγμα 3 αντιστοιχεί σε λιπαρή με μέτρια γεύση και μικρή σταθερότητα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

13.7 Χρωστικές αντιδράσεις λιπαρών υλών

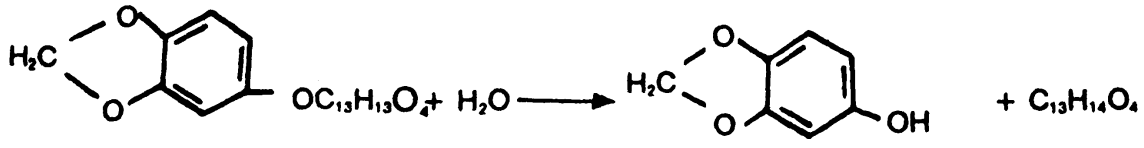
Κατά την ανάλυση των λιπαρών υλών πλην του προσδιορισμού των φυσικών και χημικών σταθερών αυτών, επιτελούνται διάφορες χρωστικές αντιδράσεις από τις οποίες συνάγονται συμπεράσματα για την ταυτότητα ή την πιθανότητα νοθείας ή αλλοίωσης της εξεταζόμενης λιπαρής ύλης.

Εντούτοις οι χρωστικές αυτές αντιδράσεις είναι στο μεγαλύτερο ποσοστό εμπειρικές και η αξιοπιστία τους περιορισμένη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σαν συμπληρωματικές εξετάσεις λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με τις οποίες εκτελούνται.

Οι σπουδαιότερες από τις χρωστικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν:

Α. Αντίδραση Baudouin

Στηρίζεται στον σχηματισμό υδατοδιαλυτών προϊόντων κόκκινου χρώματος όταν αναταραχθεί το σησαμέλαιο με υδροχλωρικό οξύ παρουσία φουρφουράλης[8]. Το χρώμα οφείλεται στην παρουσία στο σησαμέλαιο της σησαμολίνης και της παραγόμενης σησαμόλης κατά την αντίδραση:



σησαμολίνη σησαμόλη

Η αντίδραση χρησιμοποιείται για την πιστοποίηση της ταυτότητας του σησαμέλαιου ή της παρουσίας σησαμέλαιου σε μίγμα λιπαρών υλών (π.χ. μαργαρίνης).

Β. Αντίδραση Halphen

Στηρίζεται στο σχηματισμό διαφόρων χρωμάτων κατά τη θέρμανση λιπαρής ύλης με διάλυμα θείου σε μίγμα CS_2 και αμυλικής αλκοόλης. Παρουσία βαμβακελαίου το μίγμα χρωματίζεται κόκκινο[2]. Η αντίδραση θεωρείται ειδική για το βαμβακέλαιο, χρησιμοποιείται δε για την πιστοποίηση της ταυτότητας αυτού ή τον έλεγχο νοθείας του ελαιολάδου ή και του βουτύρου με βαμβακέλαιο. Το χρώμα οφείλεται στην παρουσία των κυκλικών λιπαρών οξέων στερκουλικό και μαλβαλικό.

Τα παραπάνω οξέα δύνανται εύκολα να καταστραφούν με απλή υδρογόνωση ή θέρμανση σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία, γιαυτό και η σημασία της αντίδρασης Halphen είναι περιορισμένη.

Γ. Αντίδραση Bellier

Στηρίζεται στο σχηματισμό διαφόρων χρωμάτων κατά την ανατάραξη τηγμέ-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

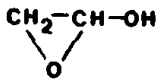
νου λίπους ή λαδιού με το αντιδραστήριο Bellier (κορεσμένο διάλυμα ρεζορκίνης σε βενζόλιο) παρουσία άχρωμου νιτρικού οξέος[2].
Το καθαρό βούτυρο και το ζωικό λίπος δεν δίνουν καμμία χρώση, ενώ τα φυτικά έλαια δίνουν διάφορες χρώσεις όπως κόκκινη, ιώδη, γαλάζια, πράσινη κ.τ.λ.
Η αντίδραση Bellier χρησιμοποιείται για τη διαπίστωση της νοθείας του βουτύρου ή ζωικού λίπους με φυτικά λάδια καθώς επίσης και για την ανίχνευση της παρουσίας σπορελαίων στο ελαιόλαδο. Σε περίπτωση καθαρού ελαιολάδου το μίγμα μετά την ανατάραξη παίρνει ακάθαρτο πράσινο χρώμα οπότε η αντίδραση χαρακτηρίζεται σαν αρνητική. Λήψη οποιουδήποτε άλλου χρώματος σημαίνει ότι το υπό εξέταση δείγμα δεν είναι καθαρό ελαιόλαδο. Μειονεκτήματα της αντίδρασης είναι ότι κατά τη διάρκεια διαφόρων βιομηχανικών κατεργασιών των λιπαρών ύλών που παρέχουν θετική την αντίδραση Bellier λαμβάνονται και προϊόντα που παρέχουν την ίδια αντίδραση αρνητική.

Δ. Αντίδραση νιτρικού οξέος (αντίδραση Κώνστα-Συνοδινού)

Στηρίζεται στον σχηματισμό διαφόρων χρωμάτων κατά την ανατάραξη δείγματος λαδιού με πυκνό νιτρικό οξύ[2]. Το παραγόμενο χρώμα είναι αχυροκίτρινο προκειμένου περί παρθένου ελαιόλαδου, αχυροκίτρινο έως γκριζοκίτρινο προκειμένου περί ραφινέ ελαιολάδου, καστανό δε έως ιώδες προκειμένου περί διαφόρων σπορελαίων και μιγμάτων αυτών.

Ε. Αντίδραση Kreis.

Η αντίδραση χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση της αλλοίωσης των λιπαρών υλών και συνίσταται στην ανατάραξη δείγματος της λιπαρής ύλης με ίση ποσότητα πυκνού HCl, προσθήκη στο μίγμα αιθερικού διαλύματος φλωρογλυκίνης και παρατήρηση του παραγόμενου χρώματος[2]. Αναλόγως της κατάστασης οξείδωσης του εξεταζόμενου λαδιού εμφανίζονται ζωηρές κόκκινες έως ιώδεις χρώσεις. Η θετική αντίδραση Kreis οφείλεται στην παρουσία της επιϋδρινοαλδεΰδης στην αλλοιωθείσα λιπαρή ύλη.



Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι εκτός της επιϋδρινοαλδεΰδης, παρόμοιες χρώσεις δίνουν και άλλες ενώσεις, όπως η αλλυλική αλκοόλη κ.α.
Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της επιϋδρινοαλδεΰδης δεν είναι η μόνη οδός αλλοίωσης μιας λιπαρής ύλης, αρνητική έκβαση της αντίδρασης Kreis δεν αποδεικνύει το αναλλοίωτο της εξεταζόμενης λιπαρής ύλης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΤ. Δοκιμή θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA test)

Στηρίζεται στον σχηματισμό χαρακτηριστικού ροζ χρώματος, προϊόντος συμπύκνωσης, προερχομένου από δύο μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέος και ενός μορίου μηλονικής αλδεΰδης $CH_2(CHO)_2$ (προϊόντος οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων κυρίως του λινολενικού οξέος).

Το λιπαρό δείγμα διαλύεται σε βενζόλιο ή χλωροφόρμιο, προστίθεται θειοβαρβιτουρικό οξύ διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και το μίγμα ανακινείται. Μετά τον διαχωρισμό των φάσεων απομακρύνεται η υδατική στοιβάδα η οποία θερμαίνεται σε βράζον υδρόλουτρο επί 30 min για να αναπτυχθεί το χαρακτηριστικό ροζ χρώμα (A=532 nm). Η ένταση του χρώματος αποτελεί μέτρο του βαθμού οξείδωσης της λιπαρής ύλης.

13.8 Μέθοδοι προσδιορισμού λίπους

Α. Γενικαί μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται για όλα σχεδόν τα τρόφιμα.

1. Μέθοδος εκχύλισης κατά Soxhlet.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί συσκευή συνεχούς εκχύλισης Soxhlet(βλ. κεφ. 9). Κατ' αρχήν ξηραίνεται το δείγμα σε πυριατήριο ή υπό κενό και το ξηρό δείγμα μεταφέρεται σε ειδικό φυσίγγι εκχύλισης. Στο φυσίγγι μεταφέρονται επίσης τα υπολείμματα του υποδοχέα ξήρανσης με τη βοήθεια βαμβακιού, διαποτισμένου σε πετρελαϊκό αιθέρα.

Το φυσίγγι τοποθετείται στον εκχυλιστήρα ενώ στη συσκευή προσαρμόζεται προζυγισμένη φιάλη περιέχουσα 100 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Συναρμολογείται η συσκευή και το δείγμα εκχυλίζεται επί 2-3 hrs*. Στη συνέχεια εξατμίζεται ο πετρελαϊκός αιθέρας και εισάγονται στη φιάλη 2-3 ml ακετόνης. Κατόπιν εμφύσησης αέρα στο εσωτερικό της φιάλης απομακρύνονται τα τελευταία ίχνη του διαλύτη. Η φιάλη τοποθετείται σε πυριατήριο στους 105°C για 5-10 min, ψύχεται σε ξηραντήρα και ζυγίζεται. Το % λίπος υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ λίπος} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100 \qquad (13.6)$$

όπου: W_1= βάρος δείγματος (g) πριν την ξήρανση

W_2= βάρος φιάλης κενής (g)

W_3 =βάρος φιάλης + δείγμα (g)

---

* Συνήθως ο χρόνος 2-3 hrs είναι αρκετός για την ποσοτική παραλαβή του λίπους. Για έλεγχο της πλήρους παραλαβής του λίπους, αντικαθίσταται η φιάλη από άλλη και συνεχίζεται η εκχύλιση για λίγο χρόνο (1hr). Κατόπιν εξάτμισης του διαλύτη και ξήρανσης ζυγίζεται η νέα φιάλη. Αν η αρχική εκχύλιση ήταν πλήρης, η φιάλη δεν πρέπει να περιέχει καθόλου λίπος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

2. Μέθοδος εκχύλισης με μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης[3]

Το λίπος εκχυλίζεται από το δείγμα κατόπιν ισχυρής ανάδευσης με μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Προστίθεται προϋπολογισμένη ποσότητα νερού που διαχωρίζει το εκχύλισμα σε δύο φάσεις. Η κατώτερη στοιβάδα είναι του χλωροφόρμιου περιέχουσα το λίπος. Η στοιβάδα αυτή απομακρύνεται, εκπλύνεται με αραιό διάλυμα NaCl για την απομάκρυνση της τυχόν εκχυλισμένης πρωτεΐνης και ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4. Το αιθερικό εκχύλισμα, στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζύγισης και το υπόλειμμα του λίπους ζυγίζεται.

3. Μέθοδος εκχύλισης κατά Weibul[3]

Η μέθοδος εφαρμόζεται στα περισσότερα τρόφιμα, εκτός ορισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων.

Στηρίζεται στο βρασμό του δείγματος με αραιό HCl ώστε να απελευθερωθούν τα δεσμευμένα λιπίδια και στη συνέχεια εκχύλισή τους με n-εξάνιο ή πετρελαϊκό αιθέρα.

Β. Ειδικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται για ειδικές κατηγορίες τροφίμων π.χ. γαλακτοκομικά κ.α.

1. Προσδιορισμός λίπους κατά Gerber.

Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για το γάλα και τα προϊόντα γάλακτος. Ορισμένη ποσότητα γάλακτος (11ml) και ισοαμυλικής αλκοόλης (1ml) προστίθενται στο βουτυρόμετρο Gerber που περιέχει H_2SO_4 ειδικού βάρους 1.82 (10ml). Το βουτυρόμετρο πωματίζεται, αναταράσσεται για να ομογενοποιηθεί το περιεχόμενο, φυγοκεντρείται επί 4min και βυθίζεται σε υδρόλουτρο 65°C για 5 min. Στην ειδικά βαθμολογημένη κλίμακα του βουτυρομέτρου διαβάζεται απ' ευθείας η % περιεκτικότητα του δείγματος σε λίπος. Η ισοαμυλική αλκοόλη διευκολύνει τον διαχωρισμό του λίπους και ελαττώνει την δράση του σχετικά πυκνού H_2SO_4.

Ειδικά για τα τυριά χρησιμοποιούνται η μέθοδος Gerber-Van Gulik η οποία χρησιμοποιεί ειδικό τυροβουτυρόμετρο του Gulik.

Σ' αυτήν λειοτριβηθέν δείγμα τυριού (3g) ζυγίζεται μέσα στο σωληνίσκο του τυροβουτυρόμετρου, ο οποίος στη συνέχεια εισάγεται στη βάση του τυροβουτυρόμετρου. Από το πάνω στόμιο του οργάνου εισάγεται με τη βοήθεια σιφωνιού H_2SO_4 ε.β.=1.5 (10 ml). Το τυροβουτυρόμετρο τοποθετείται σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 70°C και αναταράσσεται ισχυρά για την πλήρη διάλυση του τυριού. Στη συνέχεια προστίθεται ισοαμυλική αλκοόλη (1ml) και επαναλαμβάνεται η ανατάραξη. Τέλος προστίθεται H_2SO_4 τόσο ώστε η στοιβάδα του λίπους να βρίσκεται εξ ολοκλήρου μέσα στην κλίμακα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ανάγνωσης του τυροβουτυρόμετρου και φυγοκεντρείται επί 10 min. Στη συνέχεια φέρεται το τυροβουτυρόμετρο πάλι στο υδρόλουτρο και διαβάζεται στην κλίμακα η τιμή του λίπους στους 65°C. Η ανάγνωση επαναλαμβάνεται και κατόπιν νέας φυγοκέντρισης και τοποθέτησης στο υδρόλουτρο. Η τελευταία ανάγνωση παρέχει την ποσότητα του λίπους σε g/100 g τυριού εφ' όσον έχουν ζυγιστεί αρχικά 3 gr δείγματος.

2. Προσδιορισμός λίπους κατά Schmidt-Bondzynski

Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως στο γάλα και τα προϊόντα του και χρησιμοποιεί τον ειδικό σωλήνα Schmidt-Bondzynski.

Στον σωλήνα φέρεται το γάλα (10ml) και π. HCl (10 ml). Το μίγμα βράζεται με ήπια θέρμανση μέχρις πλήρους διάλυσης των πρωτεϊνικών υλών. Αφήνεται στη συνέχεια να ψυχθεί μέχρις θερμοκρασίας 35°C προστίθεται αιθέρας (30-35 ml) και αφήνεται σε ηρεμία επί 15 min σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 35°C. Αφού διαχωριστεί η αιθερική στοιβάδα από την κατώτερη φάση –πράγμα που υποβοηθείται με περιστροφή του σωλήνα μεταξύ των παλαμών– διαβάζεται ο όγκος αυτής πάνω στην κλίμακα, και λαμβάνεται με σιφώνι ορισμένο μέρος αυτής (20ml), το οποίο φέρεται σε προζυγισμένο φιαλίδιο. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης το φιαλίδιο ξηραίνεται και ζυγίζεται. Κατόπιν υπολογισμού, λαμβανομένου υπ' όψιν του ε.β. του γάλακτος, ευρίσκεται το % ποσόν του λίπους. Η μέθοδος δεν εφαρμόζεται στο σακχαρούχο γάλα διότι παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό τα προϊόντα της επίδρασης του HCl πάνω στην σακχαρόζη. Αντ' αυτής χρησιμοποιείται η μέθοδος Gottlied-Röse[2]

13.9 Διάφοροι προσδιορισμοί

Α. Προσδιορισμός μη σαπωνοποιούμενου κλάσματος λίπους

Σαν ασαπωνοποίητα συστατικά μιας λιπαρής ύλης χαρακτηρίζονται τα συστατικά εκείνα που είναι αδιάλυτα στο νερό μη πτητικά στους 100°C και δεν δύνανται να σαπωνοποιηθούν με προσθήκη διαλύματος KOH ή NaOH.

Το ασωπονοποίητο κλάσμα αποτελεί μόλις το 0.2-2% κ.β. της λιπαρής ύλης και αποτελείται από στερόλες (φυτοστερόλες και χοληστερόλες για τα φυτικά και ζωικά προϊόντα αντίστοιχα), υδρογονάνθρακες, χρωστικές, ανώτερες αλκοόλες κ.τ.λ.

Αν το ασαπωνοποίητο κλάσμα υπερβαίνει το 2% του βάρους της λιπαρής ύλης αυτό αποτελεί ένδειξη νοθείας της τελευταίας με παραφινέλαιο, κηρούς ή ρητινέλαιο, προϊόντα που περιέχουν σημαντικές ποσότητες ασαπωνοποίητων συστατικών.

Ο προσδιορισμός του ασαπωνοποίητου κλάσματος γίνεται ως εξής:

Ζυγίζεται ορισμένη ποσότητα λιπαρής ύλης (10g) σε κωνική φιάλη 250 ml, προστίθεται 60 ml C_2H_5OH 95% και υδατικό διάλυμα KOH 50% (10ml).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Συνδέεται η φιάλη με κατακόρυφο ψυκτήρα και θερμαίνεται το μίγμα σε ελαφρύ βρασμό επί 1hr.
Στη συνέχεια φέρεται το διάλυμα σε διαχωριστική χοάνη, εκπλύνεται η φιάλη με αποσταγμένο νερό (περίπου 70 ml) και τα εκπλύματα προστίθενται στη χοάνη. Προστίθενται στη χοάνη 75ml αιθέρα και αναταράσσεται το περιεχόμενό της επί 1min. Μετά την αποκατάσταση ισορροπίας και διαύγαση των δύο στοιβάδων μεταφέρεται η κάτω στοιβάδα του διαλύματος του σάπωνος σε νέα διαχωριστική χοάνη. Σ' αυτήν προστίθεται αιθέρας (50ml) και ακολουθεί νέα ανατάραξη επί 1 min. Η εργασία αυτή επαναλαμβάνεται και για τρίτη φορά. Τα αιθερικά εκχυλίσματα συλλέγονται και εκπλύνονται χωρίς να αναταραχθούν με αποσταγμένο νερό. Επίσης με αποσταγμένο νερό εκπλύνονται τα τοιχώματα της διαχωριστικής χοάνης. Τέλος η αιθερική στιβάδα μεταφέρεται σε προζυγισμένη φιάλη, εκδιώκεται ο διαλύτης, ξηραίνεται στους 105°C, αφήνεται να ψυχθεί και ζυγίζεται. Το ευρεθέν βάρος του ασαπωνοποίητου κλάσματος ανάγεται στα 100 g λιπαρής ύλης.
Κατά την εκτέλεση του προσδιορισμού των ασαπωνοποίητων υλών, παρουσιάζονται ορισμένες δυσκολίες, όπως π.χ. ο σχηματισμός συχνά, γαλακτωμάτων που δύσκολα διαχωρίζονται ή ακόμη το γεγονός ότι το αλκοολικό διάλυμα του σάπωνος πιθανόν να διαλύει ορισμένα από τα συστατικά του ασαπωνοποίητου κλάσματος, όπως τις στερόλες, ούτως ώστε να δυσχεραίνεται η ποσοτική παραλαβή αυτού.

Β. Διάκριση ζωικών/φυτικών λιπών και ελαίων

Όλα τα λίπη και έλαια περιέχουν 0.1–2.0% κ.β. στερόλες. Οι ζωϊκές ύλες περιέχουν μόνο χοληστερόλες, ενώ οι φυτικές μόνο φυτοστερόλες. Η ανάμειξη συνεπώς ζωϊκών με φυτικές λιπαρές ύλες ή αντίστροφα μπορεί να διαπιστωθεί κατόπιν ανίχνευσης των φυτοστερολών ή χοληστερολών αντίστοιχα.
Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος Windaus[2] στηρίζεται στην καταβύθιση των στερολών με διάλυμα 1% διγιτονίνης σε αλκοόλη και το σχηματισμό, στη συνέχεια οξικής χοληστερόλης και οξικής φυτοστερόλης. Η πρώτη έχει σ.τ.=114°C, ενώ η δεύτερη έχει σ.τ≈125-137°C. Η φυτοστερόλη είναι μίγμα τριών ισομερών στερολών που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις φυσικές ιδιότητες. Μίγματα οξικής χοληστερόλης και οξικής φυτοστερόλης θα έχουν σ.τ. ενδιάμεσο μεταξύ των παραπάνω σ.τ.

Γ. Προσδιορισμός κατηγοριών λιπαρών υλών.

1. Τριγλυκερίδια (μέθοδος Lofland)[4]

Κατ' αρχήν απομακρύνονται τα φωσφολιπίδια σε στήλη ιονανταλλακτικής

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ρητίνης και το προϊόν της στήλης σαπωνοποιείται με KOH. Κατόπιν εξάτμισης και προσθήκης H_2SO_4 η παραγόμενη γλυκερίνη οξειδώνεται προς HCHO με HIO_4. Η περίσσεια του υπεριωδικού οξέος καταστρέφεται με Na_3AsO_3. Η φορμαλδεΰδη αντιδρά με χρωμοτροπικό οξύ στους 95°C για να δώσει έγχρωμο προϊόν η απορρόφηση του οποίου μετρείται στο λ=570 nm. Έτσι προσδιορίζεται έμμεσα το ποσόν των τριγλυκεριδίων στη λιπαρή ύλη.

2. Φωσφολιπίδια (μέθοδος Zilversmit and Davis)[5]

Κατ' αρχήν καταβυθίζονται τα φωσφολιπίδια σαν σύμπλοκο με πρωτεΐνη με 10% τριχλωροξικό οξύ. Το ίζημα υποβάλλεται σε κατεργασία με $HClO_4$ και στο προϊόν προσδιορίζεται ο φωσφόρος με τη μέθοδο του μολυβδαινικού αμμωνίου χρωματομετρικά.

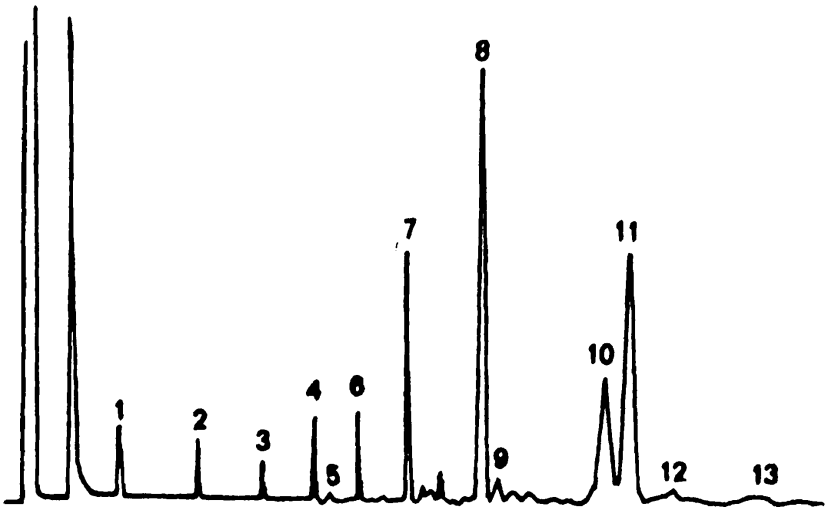
3. Χοληστερόλη (μέθοδος Levine και Zak)[6]

Το δείγμα θερμαίνεται στους 95°C με διάλυμα $FeCl_3$, H_2SO_4 και CH_3COOH και μετρείται η απορρόφηση του σχηματιζόμενου χρώματος στο λ=520 nm.

Δ. Προσδιορισμός συστατικών λιπαρών οξέων σε λιπαρό δείγμα (μέθοδος αέριας χρωματογραφίας)[3]

Η μέθοδος στηρίζεται στη μετεστεροποίηση του λιπαρού δείγματος με CH_3OH/τολουόλιο/H_2SO_4 και τον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό των σχηματιζόμενων μεθυλεστέρων. (βλ. Εφαρμογές κεφ. 2.8)

Στο σχήμα 13.2 δίνεται η σύσταση του λιπαρού κλάσματος του γάλακτος.



Σχ. 13-2. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση μεθυλεστέρων του λίπους του γάλακτος. 1-4:0, 2-6:0, 3-8:0, 4-10:0, 5-10:1, 6-12:0, 7-14:0, 8-16:0, 9-16:1, 10-18:0, 11-18:1, 12-18:2, 13-18:3

13.10 Εφαρμογές

Η δειγματοληψία και οι μέθοδοι ανάλυσης των λιπών και ελαίων συνοψίζονται

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στη βιβλιογραφία[7,8]. Ειδικώτερα από τις φυσικοχημικές μεθόδους ανάλυσης πρωτεύουσα θέση κατέχουν η αέρια χρωματογραφία (βλ. κεφ. 2.8 Η), η TLC (βλ. κεφ. 2.7), η HPLC (βλ. κεφ. 2.9 Ζ), η φασματοσκοπία IR (βλ. κεφ. 3.3 Γ), η φασματοφωτομετρία μαζών (βλ. κεφ. 3.6) και η φασματοφωτομετρία UV βλ. κεφ. 3.2 Γ).

Μία κλασσική εφαρμογή της τελευταίας, πέραν των όσων αναφέρθηκαν στο αντίστοιχο κεφάλαιο αποτελεί η εξέταση των φυτικών λαδιών σε λάμπα UV[2]. Το προς εξέταση δείγμα (50ml) τοποθετείται σε ποτήρι ζέσης (διαμέτρου 5 περίπου cm) και εξετάζεται στο UV.

Αποτελέσματα:

α) τα παρθένα ελαιόλαδα εμφανίζουν φθορισμό χρώματος κίτρινου έως πορτοκαλί

β) τα εξευγενισμένα λάδια, εκτός του πυρηνελαίου, εμφανίζουν σε όλη τους τη μάζα φθορισμό γκριζογάλαζο έως πρασινογάλαζο.

γ) τα εξευγενισμένα πυρηνέλαια εμφανίζουν στην επιφάνειά τους λαμπρό γαλάζιο δακτύλιο

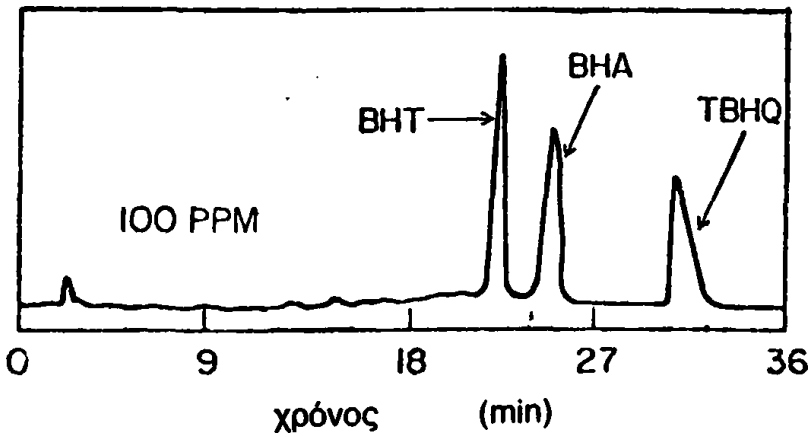
δ) τα ελαιόλαδα που περιέχουν πυρηνέλαιο εμφανίζουν στην επιφάνειά τους, λαμπρό γαλάζιο, δακτύλιο.

Ακόμη η διαθλασιμετρία (βλ. κεφ. 6.3), η θερμική ανάλυση (βλ. κεφ. 5.3) και η οργανοληπτική εξέταση[9-13] χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανάλυση των λιπαρών υλών.

Συνήθης εξέταση της σταθερότητας των λιπαρών υλών περιλαμβάνει τη μέτρηση της οξύτητας[2], του αριθμού υπεροξειδίων[11,14] τη δοκιμή του θειοβαρβιτουρικού οξέος[11,15], την αντίδραση Kreis[16] κ.α.

Ακόμη ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάλυση των αντιοξειδωτικών ουσιών[1,17,18] που προστίθενται στα λιπαρά τρόφιμα για την προστασία τους από την οξείδωση.

Στο σχήμα 13-3 φαίνεται ο διαχωρισμός των αντιοξειδωτικών BHT, BHA και TBHQ σε σογιέλαιο.



Σχ. 13-3. Αεριοχρωματογραφικός προσδιορισμός αντιοξειδωτικών σε σογιέλαιο
Από Min and Schweizer, (1983)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τέλος διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί για την ποσοτική παραλαβή του λίπους από διάφορα τρόφιμα[3,19,24]

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Βουδούρη ΕΚ** και **Κοντομηνά ΜΓ** Εισαγωγή στην Χημεία των Τροφίμων, Αθήνα (1985)
2. **Γαλανού ΔΣ** και **Βουδούρη ΕΚ.** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων, Αθήνα (1975)
3. **Osborne DR** and **Voogt P.** The Analysis of Nutrients in Foods, Academic Press, London (1978)
4. **Lofland HB** Anal. Biochem 9, 393 (1964)
5. **Zilversmit DB** and **Davis AK** J. Lab Clin. Med. 35, 155 (1960)
6. **Levine JB** and **Zak B** Clin. Chim. Acta 10, 381 (1964)
7. **IUPAC:** Std methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives 6th edit. Pergamon Press, Oxford (1979)
8. **AOCS:** Official and Tentative Methods of the Amer. Oil Chem. Soc. 3th edit. Campaign, Ill. (1978)
9. **Dupuy HP, Rayner EI** and **Wadsworth JI** J. Amer. Oil Chem. Soc. 53, 628 (1976)
10. **Huang AS, Hsieh OAL, Huang CL** and **Chang SS** J. Amer. Oil Chem. Soc. 58, 997 (1981)
11. **Jackson HW** J. Amer. Oil Chem. Soc. 58, 227 (1981)
12. **Waitking AE** and **Zmachinski H** J. Amer. Oil Chem Soc. Oct., 454 (1977)
13. **Williams L** and **Applewhite TH** J Amer. Oil Chem Soc Oct., 461 (1977)
14. **Barthel G** and **Grosch W** J. Amer. Oil Chem Soc. 51, 540 (1974)
15. **Braddock RJ** and **Dugan LR** J Amer. Oil Chem Soc. 50, 343 (1973)
16. **Dahle LK, Hill EG** and **Holman RT** Arch. Biochem Biophys 98, 253 (1962)
17. **Austin RE** and **Wyatt DM** J. Amer. Oil Chem. Soc. Dec., 422 (1980)
18. **Min DB** and **Schweizer D** J. Food Sci 48, 73 (1983)
19. **Randau EL AOAC** 57(5), 1165 (1974)
20. **Carter JR** Symp. Proc. No 28 Characterization of Fats and Oils, Leatherhead, BFMIRA
21. **Pettinati JD** and **Switt CE** J.Amer. Oil Chem. Soc. 60, 853 (1977)
22. **Hanson SW** and **Olley J.** Biochem J. 89, 101 (1963)
23. **Southgate DAT** J. Sci Food Agric. 22, 590 (1971)
24. **Hubbard WD, Sheppard Aj, Newkirk DR, Prosser AR** and **Osgood T** J. Amer. Oil Chem. Soc. 54, 81 (1977)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

14.1 Εισαγωγή

Με τον όρο υδατάνθρακες νοείται ένα πολύ ευρύ φάσμα ουσιών από τα απλά σάκχαρα μέχρι τους σύνθετους πολυσακχαρίτες. Οι ουσίες αυτές χρησιμεύουν στον οργανισμό σαν πηγή ενέργειας, με εξαίρεση ορισμένες ουσίες, όπως η κυτταρίνη, το αγαρ-αγαρ κ.τ.λ. οι οποίες δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συνεπώς να χρησιμοποιηθούν από τον οργανισμό για τον παραπάνω σκοπό.

Οι πιο σημαντικοί για την ανάλυση των τροφίμων υδατάνθρακες είναι οι εξής:

Α) Μονοσακχαρίτες: ουσίες που δεν δύνανται να υδρολυθούν σε απλούστερες ενώσεις. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της τάξης αποτελούν από τις πεντόζες: η αραβινόζη, η ριβόζη, η ξυλόζη και η ραμνόζη, και από τις εξόζες: η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη και η μανόζη.

Β) Ολιγοσακχαρίτες: ουσίες που κατόπιν υδρόλυσης δίνουν δύο έως έξι μόρια απλών σακχάρων. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της τάξης αποτελούν από τους δισακχαρίτες: η σακχαρόζη, μαλτόζη και λακτόζη και από τους τρισακχαρίτες η ραφινόζη.

Γ) Πολυσακχαρίτες: ουσίες που κατόπιν υδρόλυσης δίνουν μεγάλο αριθμό απλών σακχάρων. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της τάξης αποτελούν: το άμυλο, οι δεξτρίνες, το γλυκογόνο, η κυτταρίνη, οι πηκτινικές ουσίες και η ινουλίνη.

14.2 Μονο-και ολιγο-σάκχαρα

Είναι ενώσεις συνήθως γλυκειάς γεύσης, διαλυτές στο νερό που κρυσταλλώνονται εύκολα και υφίστανται ζύμωση από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι δραστικές ομάδες στο μόριό τους είναι το αλκοολικό –OH και το –CHO. Η κυριότερη ιδιότητά τους, από αναλυτικής πλευράς, είναι η οξείδωσή τους σε αλκαλικό περιβάλλον. Στον Πίνακα 14.1 δίνεται η περιεκτικότητα σε σάκχαρα διαφόρων τροφίμων.

Α. Εκχύλιση των σακχάρων από τα τρόφιμα

Η πλήρης εκχύλιση των σακχάρων από δείγματα τροφίμων, χωρίς την

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σύγχρονη διαλυτοποίηση των πολυσακχαριτών και των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με αιθανόλη 80% εν θερμώ[1].
Με την αλκοόλη αδρανοποιούνται τα ένζυμα ενώ διαλυτοποιούνται τα σάκχαρα, τα αμινοξέα, οι διαλυτές χρωστικές, τα άλατα, τα οργανικά οξέα

ΠΙΝΑΚΑΣ 14.1

Περιεκτικότητα σε ολιγασακχαρίτες διαφόρων τροφίμων
(g/100g βρώσιμου υλικού)

	Δισακχαρίτης		
τρόφιμο	Σακχαρόζη	Λακτόζη	Μαλτόζη
μήλα	3.1	–	–
βερύκοκα	5.5	–	–
σταφύλια	0.2	–	–
λεμόνια	0.2	–	–
πεπόνι	7.4	–	–
πορτοκάλι	4.6	–	–
ροδάκινο	6.6	–	–
καρπούζι	4.0	–	–
φασόλια	1.4	–	–
τεύτλα	12.9	–	–
λάχανο	0.3	–	–
αγγούρι	0.1	–	–
αρακάς	5.5	–	–
κρέμα γάλακτος	–	5.0	–
καζεΐνη	–	4.9	–
παγωτό	16.6	3.6	–
γάλα αγελάδος			
πλήρες	–	4.9	–
αποβουτ.	–	5.0	–
σακ. συμπυκνωμ.	43.5	14.1	–
ορός	–	4.9	–
γιαουρτι	–	3.8	–
αμυλοσιρόπι	–	–	26.4
σοκολάτα (σάκχ.)	–	–	56.4
μέλι	1.9	–	–
ιμβερτοσάκχαρο	6.0	–	–
μελάσσα	36	–	–

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

καθώς και άλλα μικρά μόρια. Τα σάκχαρα δύνανται να απομονωθούν από τα λοιπά συστατικά που παρεμποδίζουν τους προσδιορισμούς με διέλευση μέσω ιονανταλλακτικής ρητίνης ή κατόπιν καταβύθισης με άλατα του μολύβδου[1].

Β. Ανίχνευση σακχάρων

Για την ανίχνευση συγκεκριμένων σακχάρων έχουν διαμορφωθεί διάφορες δοκιμές που στηρίζονται είτε στη δραστικότητα της καρβονυλικής ομάδας, είτε στη διάσπαση μέσω οξείδωσης γειτονικών υδροξυλίων (γλυκολών), είτε σε χρωστικές αντιδράσεις των προϊόντων αποικοδόμησης των σακχάρων με οργανικά μέσα.

Για αναλυτικούς σκοπούς τα σάκχαρα διακρίνονται σε ανάγοντα και μη ανάγοντα.

Για την ανίχνευση των αναγόντων σακχάρων χρησιμοποιείται η αναγωγή:

(α) αλκαλικών διαλυμάτων πολλών μεταλλικών αλάτων π.χ. Cu, Ag, Hg κ.τ.λ.

(β) αρωματικών νιτροπαραγώγων

(γ) όξινων διαλυμάτων μολυβδαινικών αλάτων και

(δ) ορισμένων οργανικών ενώσεων, όπως είναι το πικρικό οξύ και το κυανούν του μεθυλενίου.

Ακόμη για τα ανάγοντα και τα μη ανάγοντα σάκχαρα χρησιμοποιείται η οξείδωση με HIO_4 καθώς και διάφορες χρωστικές αντιδράσεις προϊόντων αποικοδόμησης των σακχάρων, όπως η φουρφουράλη κ.α.

Πιο συγκεκριμένα για την ανίχνευση των σακχάρων χρησιμοποιούνται:

1) η αντίδραση της ανθρόνης που δίνουν όλοι οι υδατάνθρακες

2) η αντίδραση του Fehling, που δίνουν τα ανάγονα σάκχαρα

3) η αντίδραση Benedict

4) η αντίδραση οζαζόνης

5) η αντίδραση Barfoed

6) η αντίδραση Molisch, που δίνουν οι δισακχαρίτες και πολυσακχαρίτες

7) οι ειδικές αντιδράσεις ανίχνευσης των πεντοζών, εξοζών και κετοεξοζών, καθώς επίσης και οι τεχνικές της χρωματογραφίας χαρτιού, TLC, HPLC και αέρια χρωματογραφία.

1. Αντίδραση Ανθρόνης

Χρησιμοποιείται τόσο για ποιοτική, όσο και ποσοτική ανάλυση των σακχάρων. Η αντίδραση έχει ως εξής:

Σε διάλυμα εξεταζόμενης ουσίας 1mg/ml, προστίθενται 2ml διαλύματος ανθρόνης 0.2% σε πυκνό θειϊκό οξύ. Η θερμότητα διάλυσης ολοκληρώνει την αντίδραση και στην περίπτωση παρουσίας υδατανθράκων λαμβάνεται πράσινος ή μπλε-πράσινος χρωματισμός.

2. Αντίδραση Fehling για ανάγοντα σάκχαρα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στηρίζεται στην αναγωγή αλκαλικών διαλυμάτων αλάτων του χαλκού με σύγχρονη οξείδωση του ανάγοντος σακχάρου σύμφωνα με την αντίδραση:

$$2Cu^{2+} + \text{ανάγον σάκχαρο} \rightarrow Cu_2O\downarrow + \text{οξειδωμένο σάκχαρο}$$

Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται τα διαλύματα Fehling A και B.

Το διάλυμα A περιέχει 69.2 g κρυσταλλικού $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ σε 1lt απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα B περιέχει 346 g τρυγικού καλιονατρίου και 100g NaOH σε 1lt απεσταγμένου νερού.

Η δοκιμή έχει ως εξής:

Σε κωνική φιάλη 50 ml αναμειγνύονται 2.5 ml διαλύματος Fehling A, 2.5 ml διαλύματος Fehling B και 10-15 mg ανάγοντος σακχάρου. Το μίγμα υφίσταται βρασμό επί 5-10 min. Η αντίδραση θεωρείται θετική με τον σχηματισμό κόκκινου, πορτοκαλί ή πράσινου ιζήματος, ανάλογα με το είδος και την ποσότητα του ανάγοντος σακχάρου.

3) Αντίδραση Benedict

Στηρίζεται επίσης στην αναγωγή αλάτων του χαλκού σε αλκαλικό διάλυμα.

Η αντίδραση χρησιμοποιεί το αντιδραστήριο Benedict, το οποίο παρασκευάζεται με διάλυση 173 g κιτρικού νατρίου και 100g ανθρακικού νατρίου σε 800 ml νερού. Χωριστά διαλύονται 17.3g θειϊκού χαλκού σε 100 ml νερού. Τα δύο διαλύματα προστίθενται διαδοχικά σε φιάλη 1lt, το περιεχόμενο της οποίας συμπληρώνεται με νερό.

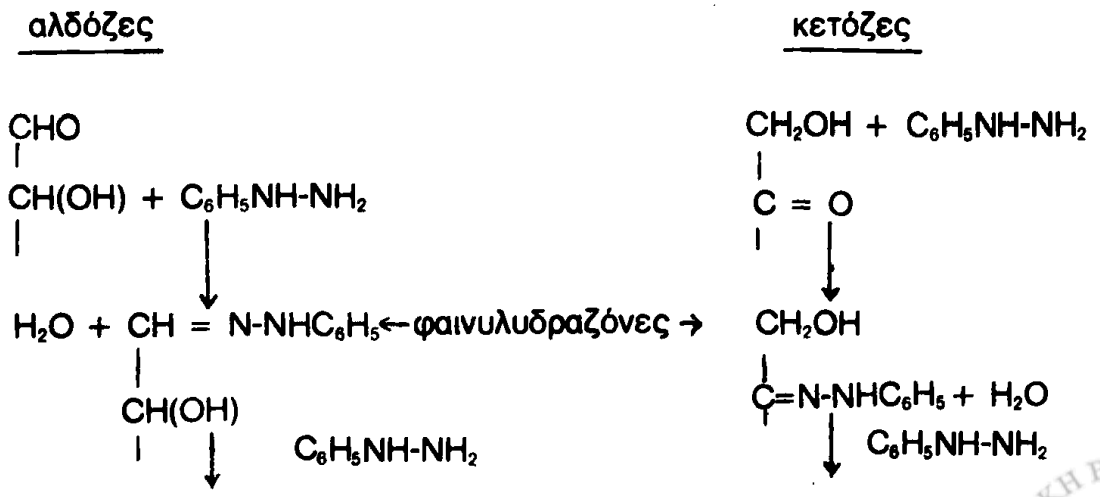
Το διάλυμα Benedict είναι σταθερό συναρτήσει του χρόνου.

Η αντίδραση Benedict έχει ως εξής:

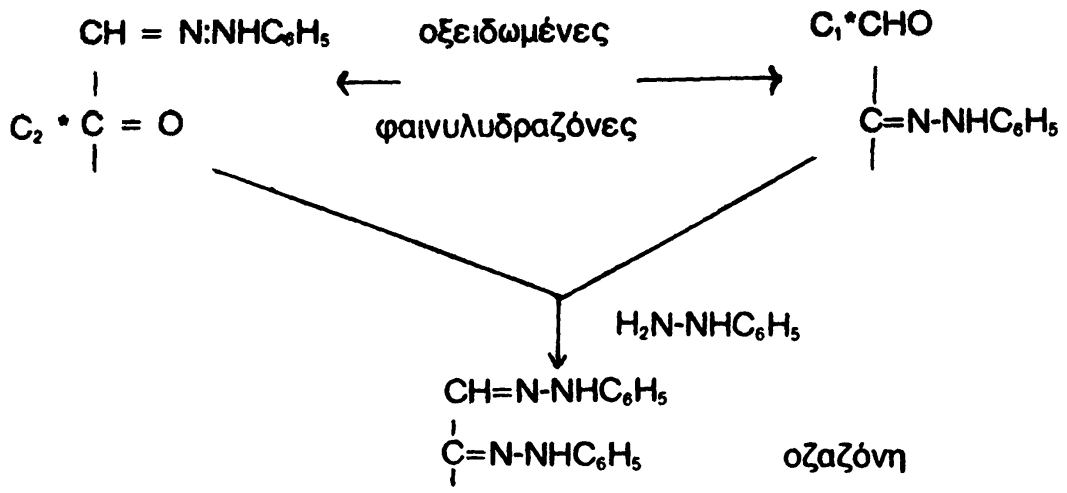
Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1ml διαλύματος ουσίας και 5ml διαλύματος Benedict. Το περιεχόμενο αναμιγνύεται και βράζεται σε υδρόλουτρο επί 2min. Κεραμέρυθρο ίζημα (Cu_2O) δείχνει την παρουσία ανάγοντος σακχάρου.

4. Αντίδραση οζαζόνης

Τα ανάγοντα σάκχαρα αντιδρούν με φαινυλυδραζίνη κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και παρέχουν οζαζόνες, σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



οι οζαζόνες που προέρχονται από τους μονοσακχαρίτες διαφέρουν ως προς την διαλυτότητα από τις αντίστοιχες που προέρχονται από τους δισακχαρίτες.

5) Αντίδραση Barfoed

Στηρίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Barfoed από τους μονοσακχαρίτες, όχι όμως και τους δισακχαρίτες (λακτόζη, μαλτόζη). Έτσι η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μονοσακχαριτών παρουσία δισακχαριτών.

Το αντιδραστήριο Barfoed παρασκευάζεται με διάλυση 13.3g κρυσταλλικού οξικού χαλκού σε 200 ml νερού. Στο διάλυμα προστίθενται 1.8 ml ανύδρου οξικού οξέος.

Η αντίδραση Barfoed έχει ως εξής:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται 5ml αντιδραστηρίου Barfoed με 1ml διαλύματος του υπό εξέταση δείγματος. Ο δοκιμαστικός σωλήνας φέρεται σε βρασμό επί 3-4 min σε υδρόλουτρο. Παρουσία μονοσακχαριτών σχηματίζεται ερυθρό ίζημα Cu_2O.

(Αναγωγή του αντιδραστηρίου μπορεί να επιφέρουν και οι δισακχαρίτες αν η ποσότητα του δείγματος του σακχάρου είναι πολύ μεγάλη ή αν η θέρμανση παραταθεί κατά πολύ.)

6) Αντίδραση Molisch

Στηρίζεται στην υδρολυτική και αφυδατική δράση του H_2SO_4 στους υδατάνθρακες. Υδρολύονται τυχόν υπάρχοντες γλυκοζιτικοί δεσμοί και αφυδατώνεται το παραγόμενο μονοσάκχαρο προς το αντίστοιχο παράγωγο φουρφουράλης. Το τελευταίο συμπυκνώνεται με α-ναφθόλη για να δώσει έγχρωμο προϊόν.

Η αντίδραση Molisch έχει ως εξής:

Σε διάλυμα υδατανθράκων προστίθενται σταγόνες αντιδραστηρίου Molisch (10g α-ναφθολης σε 100ml αλκοόλης 95%). Κατόπιν ανάμιξης προστίθεται προσεκτικά πυκνό H_2SO_4, ούτως ώστε να σχηματίζει ξεχωριστή στοιβάδα κάτω από το διάλυμα. Σχηματισμός κόκκινου-βιολετί δακτύλιου στην επιφά-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νεια μεταξύ των δύο στοιβάδων δείχνει την παρουσία δι-ή/και πολυσακχαριτών.

7) Ειδικές ανιχνεύσεις σακχάρων

α) Πεντόζες

i) αντίδραση φλωρογλυκίνης

Με μετρίως πυκνό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος και φλωρογλυκίνη, κατόπιν θέρμανσης σχηματίζεται κόκκινη έως ιώδης χροιά.

ii) αντίδραση Bial

Με υδροχλωρικό διάλυμα ορκίνης, παρουσία ιχνών $FeCl_3$, σχηματίζεται αμέσως ή κατόπιν θέρμανσης (5min) πράσινη χροιά.

iii) αντίδραση Rosenthaler για τις μεθυλοπεντόζες

Κατόπιν θέρμανσης του σακχαρούχου διαλύματος σε υδρόλουτρο με 10ml HCl 38% και 1-2 ml ακετόνης, παρουσία μεθυλοπεντοζών σχηματίζεται αμέσως βαθύ κόκκινο χρώμα.

β) εξόζες

i) Δοκιμή για την παρουσία ελεύθερης D-γλυκόζης

Στηρίζεται στην ενζυματική οξείδωση της D-γλυκόζης προς H_2O_2, την ενζυματική διάσπαση του τελευταίου προς $H_2O + O_2$ και την οξείδωση ενός λευκοχρωμογόνου προς έγχρωμο προϊόν. Οι παραπάνω αντιδράσεις έχουν ως εξής:

$$\text{D-γλυκόζη} \xrightarrow{\text{γλυκοζοξειδάση}} \text{λακτόνη του D-γλυκονικού οξέος} + H_2O_2 \qquad (14.1)$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{καταλάση}} H_2O + O_2 \qquad (14.2)$$

O_2 + ανηγμένο λευκοχρωμογόνο ⟶ οξειδωμένο χρωμογόνο (μπλε)(14.3)

Τα παραπάνω αντιδραστήρια και ένζυμα δοκιμής είναι προσροφημένα πάνω σε λωρίδες χαρτιού, γνωστές με το εμπορικό όνομα Clinistix (Ames Co. Elkhart Ind. U.S.A).

Για την ανίχνευση ελεύθερης D-γλυκόζης εμβαπτίζεται η παραπάνω λωρίδα χαρτιού σε ουδέτερο διάλυμα σακχάρου συγκέντρωσης μεγαλύτερης του 0.1%. Μετά 5min, παρουσία D-γλυκόζης λαμβάνεται μπλε χρωματισμός[2].

ii) Δοκιμή για την παρουσία D-γαλακτόζης

Στηρίζεται στην ίδια παραπάνω αρχή μόνο που εδώ χρησιμοποιείται το ένζυμο γαλακτοξειδάση. Οι αντιδράσεις έχουν ως εξής:

$$\text{D-γαλακτόζη} + O_2 \xrightarrow{\text{γαλακτοξειδάση}} \text{D-γαλακτο-εξο-διαλδόζη} + H_2O_2 \qquad (14.4)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}} O_2 + H_2O \qquad (14.5)$$

O_2 + λευκοχρωμογόνο (άχρωμο) → οξειδωμένο χρωμογόνο

Το αντιδραστήριο Galactostat (περιέχει γαλακτοξειδάση, υπεροξειδάση και χρωμογόνο) κυκλοφορεί έτοιμο στο εμπόριο (Worthington Biochem Co. Freehold, N.J. U.S.A)

Για την ανίχνευση της D-γαλακτόζης προστίθεται 1ml σακχαρούχου διαλύματος σε 2ml αντιδραστηρίου Galactostat. Κατόπιν ανάμιξης και θέρμανσης επί 5 min στους 37°C σχηματίζεται κοκκινωπή χροιά που πιστοποιεί την παρουσία D-γαλακτόζης[3].

iii) Αντίδραση Seliwanoff για τις κετόζες

Διαμορφώθηκε για τη διάκριση μεταξύ κετοζών και αλδοζών (φρουκτόζη/γλυκόζη ή γαλακτόζη). Χρησιμοποιείται και για ποσοτικούς σκοπούς.

Η αντίδραση έχει ως εξής:

Προστίθενται 5 ml ρεζορκίνης σε 5ml διαλύματος σακχάρου. Ακολουθεί καλή ανάδευση και βρασμός σε υδρόλουτρο επί 20 min. Κατόπιν ψύξης (2min) σχηματίζεται κόκκινο χρώμα ή κόκκινο ίζημα παρουσία κετοζών.

iiii) οξείδωση εξοζών προς λαιβουλικό οξύ

Οι εξόζες κατόπιν θέρμανσης με ισχυρά οξέα (π.χ. HCl) δίνουν λαιβουλικό οξύ (CH_3COCH_2COOH), σε αντίθεση προς τις πεντόζες που δίνουν φουρφουράλη. Το λαιβουλικό οξύ δύναται να ανιχνευθεί με διάφορα αντιδραστήρια.

γ) δισακχαρίτες (σακχαρόζη)

Ειδικά η σακχαρόζη δίνει χαρακτηριστική χρωστική αντίδραση με τη διαζουρακίλη.

Σε αλκαλικό διάλυμα σακχάρων, που έχει προψυχθεί στους 10°C προστίθεται στερεή διαζουρακίλη. Το μίγμα αναταράσσεται καλά, οπότε παρουσία σακχαρόζης εμφανίζεται μπλε-πράσινη χροιά. Η ραφινόζη και σταχιόζη δίνουν επίσης θετική αντίδραση.

8) Ανίχνευση σακχάρων με χαρτοχρωματογραφία[4]

Τα αιθανολικά εκχυλίσματα των τροφίμων απαλάσσονται των πρωτεϊνών κατόπιν προσθήκης τριχλωροξικού οξέος και διήθησης. Το διάλυμα των σακχάρων συγκέντρωσης περίπου 0.5%, τοποθετείται υπό μορφή κηλίδων πάνω στο χαρτί χρωματογραφίας. Παράλληλα με το άγνωστο δείγμα τοποθετούνται οι κηλίδες των πρότυπων διαλυμάτων των γνωστών σακχάρων. Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος γίνεται με μίγμα n-προπυλικής αλκοόλης/

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οξικού αιθυλεστέρα/νερού (70:20:10) (ανερχόμενη τεχνική) ενώ η εμφάνιση γίνεται με: α) υδατικό διάλυμα οξικής ανιλίνης 1% και β) αλκοολικό διάλυμα αναφθόλης 1% σε 100ml του οποίου προστίθενται 100 ml φωσφορικού οξέος (85%).

Η αναγνώριση κάθε σακχάρου γίνεται από την τιμή της R_f με τη βοήθεια του αντίστοιχου γνωστού σακχάρου που συγχρωματογραφείται.

9) Ανίχνευση σακχάρων με TLC[5].

Το προκατεργασμένο, σύμφωνα με τα παραπάνω εκχύλισμα των σακχάρων φέρεται σε πλάκα TLC από Kieselgel G διαποτισμένο με βορικό οξύ. Παράλληλα με το άγνωστο δείγμα τοποθετούνται οι κηλίδες των γνωστών σακχάρων. Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος μπορεί να γίνει με μίγμα (α) ακετόνης/n-βουτανόλης/νερού (5:4:1), (β) οξικού αιθυλεστέρα/ισοπροπανόλης/νερού (6:2:1), (γ) n-προπανόλης/νερού/οξικού αιθυλεστέρα/αμμωνίας (24:12:4:1) ή (δ) n-προπανόλης/ακετόνης/0.1 M γαλακτικού οξέος (9g/l) (50:40:10). Η ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε 40 min. περίπου.

Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος γίνεται συνήθως με μίγμα διαλύματος διφαινυλαμίνης (40% V/V σε αιθανόλη)/διαλ. ανιλίνης (40% V/V σε αιθανόλη)/ορθοφωσφορικού οξέος (10:10:2). Μετά τον ψεκασμό ακολουθεί θέρμανση στους 100°C επί 5 min, επαναψεκασμός και αναθέρμανση επί 10 min.

Η ανίχνευση των σακχάρων γίνεται, όπως φαίνεται στον Πίνακα 14.2 με βάση το R_f αυτών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14.2

Τιμές Rf ορισμένων σακχάρων (TLC)

σάκχαρο	Τιμή Rf διαλύτη A σε Kieselgel G διαποτισμένου με βορικό οξύ	Τιμή Rf με διαλύτη D σε πλάκες Silica Gel F 1500	χρώμα κατόπιν ψεκασμού
φρουκτόζη	0.19	0.41	κόκκινο
λακτόζη	0.34	0.18	μπλέ-πράσινο
γλυκόζη	0.47	0.38	σκούρο καφέ
μαλτόζη	0.53	0.25	μπλε
σακχαρόζη	0.56	0.31	ανοιχτό καφέ
ολιγοσάκχαρα σε σιρόπι γλυκόζης		< 0.18	μπλέ

10) Ανίχνευση σακχάρων με αέρια και υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται εκτός της ανίχνευσης και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων (βλ. ποσοτικό προσδιορισμό).

Γ. Ποσοτικός προσδιορισμός μονο-και ολιγοσακχάρων

Παλαιότερα ο ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων γινόταν εκ διαφοράς.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Αφαιρείτο δηλαδή το άθροισμα των πρωτεϊνών, λίπους, νερού και τέφρας από το 100%. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονταν κατόπιν καταβύθισης με τριχλωροξικό ή φωσφοβολφραμικό οξύ και το λίπος κατόπιν εκχύλισης με πετρελαϊκό αιθέρα, στον οποίον οι υδατάνθρακες είναι πρακτικά αδιάλυτοι.

Σήμερα τα σάκχαρα προσδιορίζονται με διάφορες μεθόδους, οι κυριότερες από τις οποίες είναι:

1. Οι Αναγωγικές
2. Οι Διαθλασιμετρικές
3. Οι Πολωσιμετρικές
4. Οι Πυκνομετρικές
5. Οι Χρωματογραφικές
6. Οι Ηλεκτροφορητικές
7. Οι Χρωματομετρικές
8. Οι Βιοχημικές

Οι περισσότερες, αν όχι όλες, από τις παραπάνω μεθόδους περιλαμβάνουν προκαταρκτικό διαχωρισμό των υδατανθράκων από το δείγμα τροφίμων με χρωματογραφικές κυρίως μεθόδους (χρωματογραφία χαρτιού, ιονανταλλαγής). Στη συνέχεια ακολουθεί ο κυρίως προσδιορισμός.

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού του συνόλου των σακχάρων, καθώς επίσης και από το βαθμό διαχωρισμού του κάθε σακχάρου από το σακχαρούχο μίγμα.

1. Αναγωγικές μέθοδοι

Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στην οξείδωση των σακχάρων, με σύγχρονη αναγωγή άλλων ενώσεων, όπως διαλυμάτων αλάτων του Cu, σιδηροκυανιούχων αλάτων, ιωδίου κ.α.

α) Μέθοδοι αναγωγής Cu^{2+}

Οι μέθοδοι αυτές είναι οι πλέον χρησιμοποιούμενες για τον προσδιορισμό των σακχάρων. Δεν είναι στοιχειομετρικές. Ποσοτικά αποτελέσματα λαμβάνονται με τη βοήθεια πινάκων. Ο προσδιορισμός των σακχάρων στηρίζεται στην οξείδωση των σακχάρων από αλκαλικό διάλυμα Cu^{2+} παρουσία τρυγικού καλιονατρίου. Το τελευταίο αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για να παραμείνει διαλυμένος ο χαλκός στο αλκαλικό διάλυμα που απαιτείται για την οξείδωση των σακχάρων.

Στην Ευρώπη καθιερώθηκε η μέθοδος Lane Eynon (επίσημη μέθοδος). Στην Αμερική η μέθοδος αυτή βρήκε περιορισμένη χρήση, κυρίως στον προσδιορισμό της τιμής DE (dextrose equivalent) σε αμυλοσιρόπια. Σαν DE ορίζεται η ποσότητα αναγόντων σακχάρων, εκφρασμένη σαν δεξτρόζη, στο στερεό κλάσμα των αμυλοσιροπιών.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στη μέθοδο αυτή το σακχαρούχο διάλυμα προστίθεται μέσω προχοΐδας σε μίγμα διαλυμάτων Fehling A και B (1:1) που βράζουν. Κατά τη θέρμανση αρχικά αποσπάται οξυγόνο από το $Cu(OH)_2$ και σχηματίζεται Cu(OH), κατά την αντίδραση:

$$2Cu(OH)_2 \rightarrow 2Cu(OH)\downarrow + H_2O + O \qquad (14.7)$$

Το τελευταίο με αποβολή νερού μεταπίπτει αμέσως στο κεραμοκόκκινο υποξείδιο του χαλκού Cu_2O, σύμφωνα με την αντίδραση:

$$2Cu(OH) \rightarrow Cu_2O + H_2O \qquad (14.8)$$

Κοντά στο τελικό σημείο, το σακχαρούχο διάλυμα προστίθεται σταγόνα-σταγόνα, παρουσία 1 ml διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 2%, το οποίο αποχρωματίζεται με την πρώτη περίσσεια ανάγοντος σακχάρου[6], αφήνοντας να φανεί το κεραμοκόκκινο χρώμα του σχηματισθένος Cu_2O.

Η συνολική αντίδραση οξειδοαναγωγής έχει ως εξής:

$$RCHO + Cu(OH)_2 + NaOH \rightarrow RCOONa + Cu_2O + 3H_2O \qquad (14.9)$$

Η οξείδωση των σακχάρων, όπως ελέχθει και προηγουμένως, δεν ακολουθεί απλή στοιχειομετρική εξίσωση, αλλά βαίνει κατά πολύπλοκο τρόπο κατά τον οποίο επέρχεται διάσπαση του μορίου των σακχάρων. Οι εξόζες διασπώνται σε δύο τριόζες (διοξυ-ακετόνη και μεθυλογλυοξάλη) μεγαλύτερης αναγωγικής δύναμης.

Λόγω του πολυπλόκου της πορείας οξείδωσης των σακχάρων οι αναγωγικές μέθοδοι προσδιορισμού των είναι συμβατικές και τα λαμβανόμενα αποτελέσματα αναπαραγώγιμα μόνον όταν τηρούνται επακριβώς οι συνθήκες εργασίας.

Η σε ορισμένη ποσότητα χαλκού ή υποξειδίου του χαλκού αντιστοιχούσα ποσότητα σακχάρου ευρίσκεται από πίνακες που έχουν συνταχθεί κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Παραλλαγή της μεθόδους Lane Eynon αποτελεί η μέθοδος Schoorl-Regenbogen. Σ' αυτήν σε ορισμένη ποσότητα σακχαρούχου διαλύματος προστίθεται γνωστή περίσσεια φελιγγείου υγρού (A+B). Το μίγμα βράζεται κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και το ποσό του περιεχόμενου σακχάρου βρίσκεται είτε άμεσα από το ποσόν του σχηματιζόμενου υποξειδίου του χαλκού, είτε έμμεσα κατόπιν ιωδομετρικού προσδιορισμού της παραμένουσας περίσσειας του δισθενούς χαλκού και κατόπιν αφαίρεσης εκ του συνολικού ποσού του δισθενούς Cu, του προσδιοριζόμενου κατά τον λευκό προσδιορισμό[6].

Η συνολική πορεία των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα έχει ως εξής:

πραγματικός προσδ.:

$$RCHO + \text{περ. } Cu^{2+} \xrightarrow{OH^-} RCOONa + Cu^+ + H_2O \qquad (14.10)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$$2Cu^{2+} + 4I^- \rightleftharpoons 2CuI\downarrow + I_2 \quad (14.11)$$

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons 2I^- + S_4O_6^{2-} \quad (14.12)$$

α ml

λευκός προσδ: περ. $2Cu^{2+} + 4I^- \rightleftharpoons 2CuI + I_2$ (14.13)

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightleftharpoons 2I^- + S_4O_6^{2-} \quad (14.14)$$

β ml

Ποσό αναγόντων σακχάρων → (β-α) ml $Na_2S_2O_3$ ⟹ πίνακες

Τέλος στη μέθοδο Munson-Walker το ποσό του προκύπτοντος Cu_2O αντιδρά με $Fe_2(SO_4)_3$ προς $FeSO_4$ και το ποσό του $FeSO_4$ προσδιορίζεται ογκομετρικά με πρότυπο διάλυμα $KMnO_4$. Οι αντιδράσεις έχουν ως εξής:

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow 2FeSO_4 + CuSO_4 \,.\, CuO \quad (14.15)$$

$$10FeSO_4 + 2KMnO_4 + 8H_2SO_4 \rightarrow 5Fe_2(SO_4)_3 + K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 8H_2O \quad (14.16)$$

β. Μέθοδος αναγωγής αλκαλικού διαλύματος σιδηροκυανιούχων

Στηρίζεται στην αναγωγή αλκαλικού διαλύματος σιδηροκυανιούχου καλίου (Fe^{3+})προς σιδηροκυανιούχο (Fe^{2+}),παρουσία ανάγοντος σακχάρου. Παρουσία KI η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

$$2K_3[Fe(CN)_6] + 2KI \rightarrow 2K_4[Fe(CN)_6] + I_2$$

Το παραγόμενο I_2 ογκομετρείται σύμφωνα με τα προηγούμενα με πρότυπο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου.

Η μέθοδος παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι η οξειδωτική δράση των σιδηροκυανιούχων δεν είναι τόσο εξειδικευμένη, όσο εκείνη των αλάτων χαλκού, μια και το διάλυμα σιδηροκυανιούχων ανάγεται ευκολώτερα από ουσίες μη σακχαρούχες.

γ. Ιωδομετρική μέθοδος προσδιορισμού αλδοξών (Kolthoff)

Η μέθοδος ισχύει μόνο για τον προσδιορισμό των αλδοζών. Οι κετόνες δεν οξειδώνονται σε σημαντικό βαθμό.

Στη μέθοδο[6] το σακχαρούχο διάλυμα κατεργάζεται με περίσσεια αραιού διαλύματος ιωδίου σε αλκαλικό περιβάλλον (άλλως το I_2 μπορεί να οξειδωθεί προς IO_3^- και να μην αντιδράσει με τα σάκχαρα). Μετά μερικά λεπτά το διάλυμα οξινίζεται με HCl ή H_2SO_4 και η περίσσεια του διαλύματος I_2 ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου.

Η οξείδωση των αλδοζών βαίνει κατά τη στοιχειομετρική αντίδραση:

$$RCHO + I_2 + 3NaOH \rightarrow RCOONa + 2NaI + 2H_2O \quad (14.17)$$

Οι αλδόζες οξειδώνονται προς τα αντίστοιχα αλδονικά οξέα, ενώ οι κετόζες παραμένουν σχεδόν αναλλοίωτες. Έτσι γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός των αλδοζών παρουσία κετοζών.

δ. Προσδιορισμός μη αναγόντων σακχάρων

Τα μη ανάγοντα σάκχαρα π.χ. καλαμοσάκχαρο, ραφινόζη κτλ. προσδιορίζονται

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

εκ της διαφοράς στην αναγωγική ικανότητα που παρουσιάζει σακχαρούχο διάλυμα, πριν και μετά την υδρόλυση των σακχάρων σε όξινο περιβάλλον. Η υδρόλυση (ιμβερτοποίηση) των μη αναγόντων σακχάρων επιτυγχάνεται με προσθήκη υδροχλωρικού οξέος και βρασμό σε υδρόλουτρο επί 30min. Ακολουθεί ψύξη και εξουδετέρωση του οξέος με NaOH, παρουσία δείκτη φαινολοφθαλεΐνης και προσδιορισμός των συνολικών σακχάρων (αρχικών + υδρολυθέντων).

Η ποσότητα των μη αναγόντων σακχάρων προκύπτει κατόπιν αφαίρεσης των απ' ευθείας αναγόντων από τα συνολικά σάκχαρα. Η ποσότητα του καλαμοσάκχαρου βρίσκεται κατόπιν πολλαπλασιασμού της διαφοράς αυτής επί τον συντελεστή 0.95. (Με υδρόλυση 95 μερών σακχαρόζης ΜΒ.=342 προκύπτουν 100 μέρη ιμβερτοσακχάρου ΜΒ=360 και 342/360=0.95).

ε) Προσδιορισμός γλυκόζης, φρουκτόζης και καλαμοσακχάρου σε μίγμα

Κατ' αρχήν προσδιορίζονται η γλυκόζη και η φρουκτόζη σαν απ' ευθείας ανάγοντα σάκχαρα με αλκαλικό διάλυμα χαλκού με τη μέθοδο Lane-Eynon ή Schoorl και Regenbogen. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η γλυκόζη με τη μέθοδο Kolthoff, οπότε με αφαίρεση προκύπτει η φρουκτόζη. Ακολούθως το σακχαρούχο διάλυμα υφίσταται ιμβερτοποίηση και στο υδρολυμένο διάλυμα προσδιορίζονται τα συνολικά σάκχαρα. Το καλαμοσάκχαρο προσδιορίζεται όπως αναπτύχθηκε προηγουμένως (Γ1 δ).

2. Διαθλασιμετρικός προσδιορισμός σακχάρων

Ο δείκτης διάθλασης ενός σακχαρούχου διαλύματος είναι συνάρτηση της ποσότητας του περιεχομένου σακχάρου. Επομένως ο προσδιορισμός του δείκτη διάθλασης δύναται να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση διαλυμάτων σακχάρων. Ο προσδιορισμός μπορεί να γίνει με το διαθλασίμετρο Abbé ή και το εμβαπτιζόμενο διαθλασίμετρο (κεφ. 6).

Η περιεκτικότητα σε σάκχαρο διαλύματος βρίσκεται από τον δείκτη διάθλασης με τη χρήση πινάκων.

3. Πολωσιμετρικός προσδιορισμός σακχάρων

Τα σάκχαρα είναι οπτικά ενεργοί ενώσεις και συνεπώς μπορούν να προσδιοριστούν και πολωσιμετρικά. Στο πολωσίμετρο (κεφ. 7) μετρείται η γωνία στροφής του πολωμένου φωτός που προκαλεί το σακχαρούχο διάλυμα. Η μέθοδος δεν είναι καταστρεπτική για το δείγμα. Ανάλογη είναι και η λειτουργία του σακχαρομέτρου (κεφ. 7).

Για τη σακχαρόζη, γωνία στροφής 1° αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0.7519 g/ml. Αντίστοιχα για τη γλυκόζη 0.9470 g/ml, για τη φρουκτόζη 0.5405 g/ml,για τη γαλακτόζη 0.9524 g/ml και για τη μαλτόζη 0.9524 g/ml.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

4. Πυκνομετρικός προσδιορισμός σακχάρων.

Η πυκνότητα ή το ειδικό βάρος ενός διαλύματος σακχάρου, σε καθαρή κατάσταση είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του στο διάλυμα σε ορισμένη θερμοκρασία. Αν και διάφορες προσμίξεις επηρεάζουν την πυκνότητα του διαλύματος, η μέθοδος πολλές φορές προτιμάται των λοιπών λόγω της απλότητας και της ταχύτητάς της. Ο προσδιορισμός του ειδικού βάρου του σακχαρούχου διαλύματος γίνεται με τη χρήση αραιόμετρου (Brix, Baumé) ή ληκύθου (κεφ. 8).

Η ακρίβεια της μεθόδου είναι σχετικά περιορισμένη, έναντι των λοιπών χημικών ή και των πολωσιμετρικών μεθόδων.

Η σε σάκχαρο περιεκτικότητα ενός διαλύματος με βάση το ειδικό βάρος βρίσκεται με τη βοήθεια πινάκων.

5. Χρωματογραφικές μέθοδοι προσδιορισμός σακχάρων

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την κλασμάτωση, απομόνωση, ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των υδατανθράκων σε πολύπλοκα μίγματα βιολογικών δειγμάτων.

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι περιλαμβάνουν την χρωματογραφία χαρτιού, λεπτής στοιβάδας, ιονανταλλαγής (στήλης και HPLC) και την αέρια χρωματογραφία (βλ. κεφ. 2.6, 2.7, 2.8 και 2.9). Απ' αυτές οι δύο πρώτες ήδη καλύφτηκαν στην ανίχνευση των σακχάρων (κεφ. 14.2 Β 8,9).

Στον ιονανταλλακτικό προσδιορισμό των σακχάρων χρησιμοποιείται ποικιλία ιονανταλλακτών, π.χ. ισχυρά ανιονική ρητίνη βενζολίου/διβινυλοβενζολίου. Τα σάκχαρα εκλούονται με βορικό ρυθμιστικό διάλυμα αυξανόμενου pH και συγκέντρωσης χλωρίου. Στο προϊόν της στήλης τα σάκχαρα προσδιορίζονται με τη μέθοδο της φαινόλης/H_2SO_4 χρωματομετρικά (βλ. κεφ. 14.2 Γ7).

Στο σχήμα 14-1 φανεται η ανάλυση μίγματος μόνο-και ολιγοσακχαριτών σε στήλη κατιονανταλλακτικής ρητίνης Aminex A-6 υπό υψηλή πίεση.

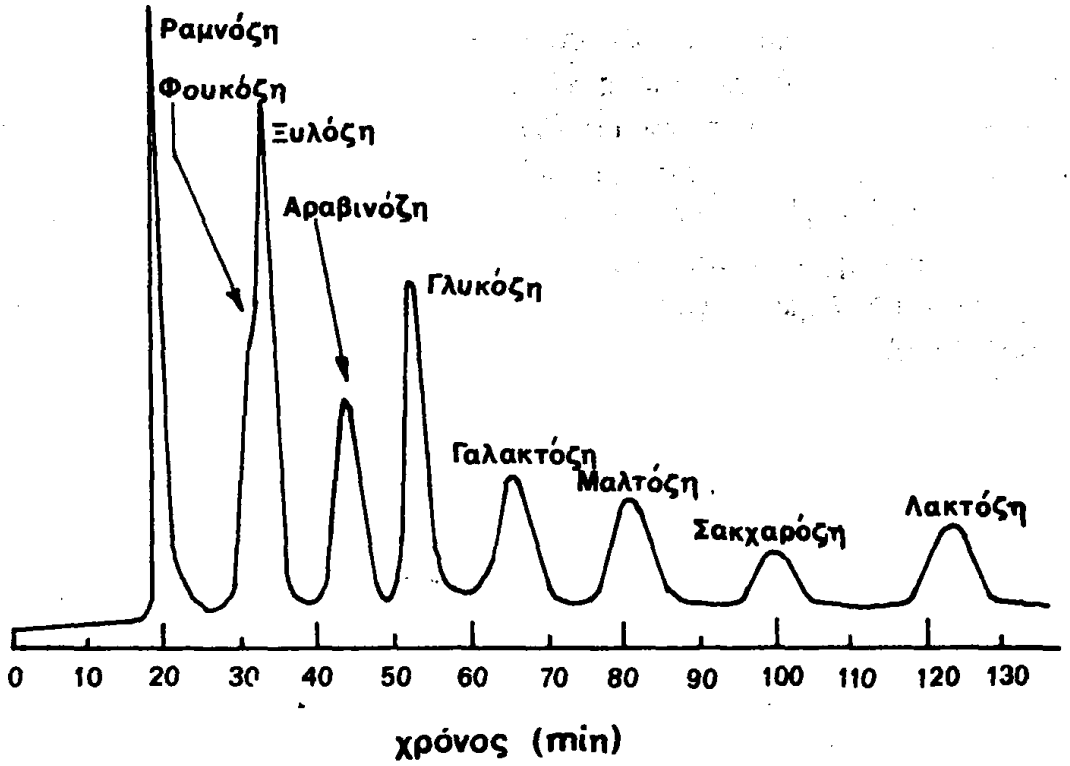
Για τον αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό τα σάκχαρα μετατρέπονται σε παράγωγα τριμεθυλ-σιλύλ-αιθέρων τα οποία είναι πτητικά προϊόντα[7]. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι πολύ μικρές ποσότητες σακχάρων (~ 10 mg) που δύνανται να μετατραπούν σε αιθεροπαράγωγα, καθώς επίσης και οι αντίστοιχα μικρές ποσότητες του δείγματος που εισάγονται στο όργανο (~ 10 μg).

Το σχήμα 14-2 δείχνει τα συστατικά-σάκχαρα υπό μορφή παραγώγων που προέκυψαν από μίγμα σακχάρων.

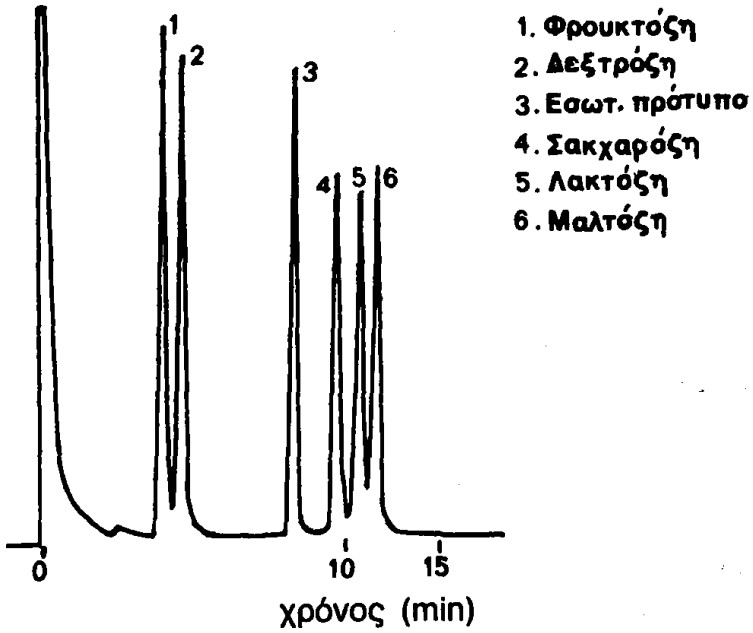
6. Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι προσδιορισμού σακχάρων

Χρησιμοποιείται η τεχνική του χαρτιού ή της πηκτής (ηλεκτροφόρηση ζώνης - κεφ. 4.3) με τροφοδοτικό 0-1000V. Ο διαχωρισμός των σακχάρων επιτυγχά-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 14-1. Διαχωρισμός μίγματος μονο-και δισακχαριτών σε κατιονανταλλακτική Στήλη Aminex A-6: Διαλ: αιθανόλη/νερό (85:15), T=75°C, p=1000 lb/in².



Σχ. 14-2. Αεριοχρωματογραφικός διαχωρισμός σακχάρων. Στήλη: OV-17, 2%.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νεται κατόπιν παρασκευής των βορικών παραγώγων τους[8].
Η μέθοδος πλεονεκτεί έναντι των αντιστοίχων χρωματογραφικών (χαρτιού, TLC) κατά το ότι μίγματα σακχάρων,όπως D-γαλακτόζη, D-μαννόζη και D-φρουκτόζη μπορούν αν διαχωριστούν στα συστατικά τους, πράγμα που θα ήταν αδύνατο για τις παραπάνω χρωματογραφικές μεθόδους.

7. Χρωματομετρικές μέθοδοι

Τα τελευταία χρόνια οι μέθοδοι αυτές απέκτησαν αρκετή δημοσιότητα. Απ' αυτές ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέθοδος της φαινόλης/H_2SO_4[1]. Σύμφωνα μ' αυτή το σακχαρούχο διάλυμα κατεργάζεται με υδατικό διάλυμα φαινόλης και θειϊκό οξύ. Η θερμότητα διάλυσης ολοκληρώνει την αντίδραση σε λίγα sec. Κατόπιν ψύξης του προκύπτοντος διαλύματος, κίτρινο-πορτοκαλί χρώματος, μετρείται η απορρόφησή του στο λ=490 nm.
Η μέθοδος εφαρμόζεται στο διαυγές σακχαρούχο διάλυμα που έχει προκύψει κατόπιν χρωματογραφικού διαχωρισμού.

8. Βιοχημικές μέθοδοι

Αυτές διακρίνονται σε μικροβιολογικές (βλ. κεφ. 19) και σε ενζυματικές μεθόδους (βλ. κεφ. 18) ανάλυσης.
Στις πρώτες επιλέγονται ειδικά –για την ζυμωτική τους ικανότητα– στελέχη ζυμών τα οποία διαφοροποιούν π.χ. τις πεντόζες από τις εξόζες. Ακόμη προϊόντα όπως η ζύμη αρτοποιΐας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαφοροποίηση μη ζυμούμενης λακτόζης και ζημούμενων σακχάρων, όπως η μαλτόζη και η σακχαρόζη.
Στις δεύτερες χρησιμοποιείται εκλεκτική ενζυματική οξείδωση των σακχάρων π.χ. προσδιορισμός της γλυκόζης με εξοκινάση/γλυκοζο-6-φωσφο-δεϋδρογενάση[9], της γαλακτόζης με β-γαλκτοζο-δεϋδρογενάση[9], της λακτόζης με β-γαλακτοξειδάση, της μαλτόζης με α-γαλακτοξειδάση/εξοκινάση/γλυκοζο-6-φωσφο-δεϋδρογενάση[9] κ.α. (βλ. κεφ. 18).

14.3 Πολυσακχαρίτες

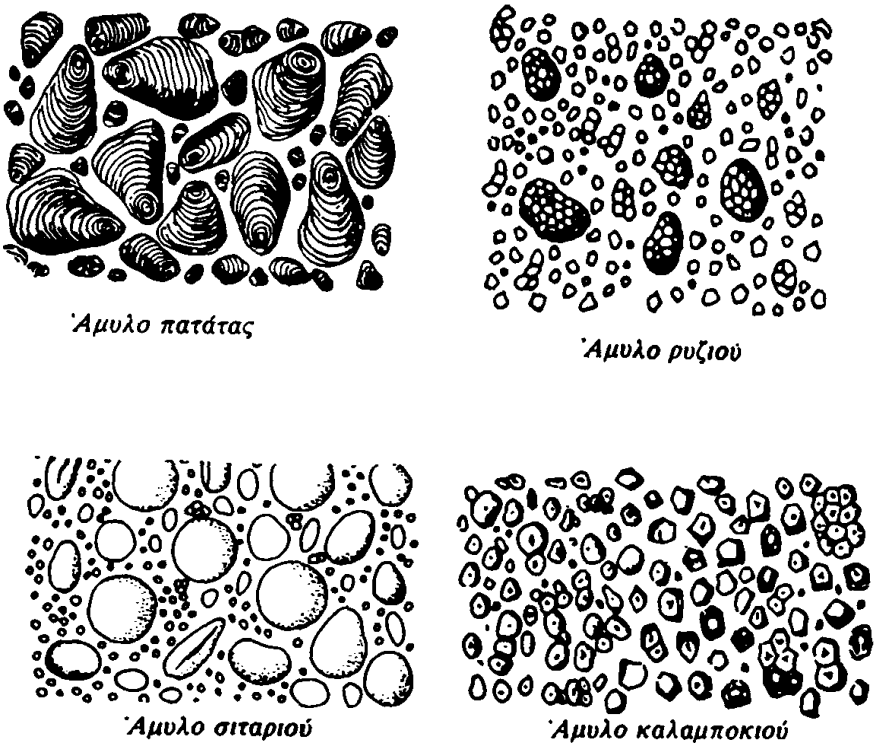
Όπως ελέχθει και στην αρχή του κεφαλαίου οι σπουδαιότεροι για την ανάλυση των τροφίμων πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο, το γλυκογόνο, οι δεξτρίνες, οι πηκτινικές ύλες, η κυτταρίνη και η ινουλίνη, όλες, ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους που χρησιμεύουν σαν αποταμιευτικές και στηρικτικές ύλες στον οργανισμό των φυτών και των ζωών.

Α. Άμυλο

Το άμυλο, είναι μετά την κυτταρίνη ο πιο διαδομένος υδατάνθρακας στο φυτικό βασίλειο. Απαντά υπό μορφή κόκκων, το μέγεθος και το σχήμα των

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οποίων είναι χαρακτηριστικό κάθε φυτικού οργανισμού. (σχ. 14-3)



Σχ. 14-3. Μικροσκοπικές εικόνες αμυλοκόκκων διαφόρων προελεύσεων.

Ολόκληροι, στη φυσική τους κατάσταση, οι κόκκοι του αμύλου είναι αδιάλυτοι σε ψυχρό ή ελαφρά θερμό νερό. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας και της υγρασίας προκαλείται διόγκωση του αμύλου (εγκλωβισμός μορίων νερού στην πολυμερική δομή του) και σχηματισμός πηκτών[10]. Παράγοντες, όπως ισχυρές βάσεις, ισχυρά οξέα και ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαλυτοποίηση του αμύλου.

Το άμυλο αποτελείται αποκλειστικά από D-γλυκόζη, τα μόρια της οποίας συννενούνται σε μορφή ευθείας αλυσίδας (κλάσμα της αμυλόζης Μ.Β. = 80,000, 22-26% κ.β. του άμυλου) και σε μορφή διακλαδωμένης αλυσίδας (κλάσμα αμυλοπηκτίνης Μ.Β.>1,000,000, 74-78% κ.β. του αμύλου). Τα δύο κλάσματα προκύπτουν από το άμυλο κατόπιν ζελατινοποίησης του τελευταίου σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Διαχωρίζονται μεταξύ τους με υπερφυγοκέντριση λόγω σημαντικής διαφοράς στο Μ.Β. τους.

Β. Δεξτρίνες

Είναι προϊόντα θερμικής αποικοδόμησης του αμύλου (μη αντιστρεπτή διεργασία). Είναι άμορφα σώματα, διαλυτά στο κρύο νερό που χρησιμοποιού-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

νται σαν συγκολλητικές ουσίες.
Μικρού Μ.Β. δεξτρίνες παράγονται και από την επίδραση των ενζύμων αμυλασών πάνω στο άμυλο. Η β-αμυλάση αποικοδομεί το άμυλο μέχρι μονοσακχάρων, συνηθέστερα όμως μέχρι τον δισακχαρίτη μαλτόζη.

1) Ποιοτικός προσδιορισμός αμύλου και δεξτρινών

Στηρίζεται στο μπλε χρωματισμό που δίνει το σύμπλοκο [αμύλου-I_2]. Στο σύμπλοκο συμμετέχει κυρίως η αμυλόζη. Αν η αντίδραση αποβεί αρνητική τότε επειδή μπορεί μεν να υπάρχει άμυλο αλλά αποικοδομημένο (δεξτρίνη), προστίθεται β-αμυλάση για υδρόλυση του προϊόντος και εξετάζονται χρωματογραφικά τα προϊόντα υδρόλυσης. Ταυτοποίηση της μαλτόζης στα προϊόντα υδρόλυσης επιβεβαιώνει την παρουσία αμύλου ή δεξτρινών.

2) Ποσοτικός προσδιορισμός αμύλου και δεξτρινών

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του αμύλου διακρίνονται σε υδρολυτικές και μη υδρολυτικές.

α) Υδρολυτικές μέθοδοι

Συνίστανται στην προσθήκη οξέος το οποίο υδρολύει πλήρως το άμυλο προς γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια προσδιορίζεται με χημικές ή φυσικοχημικές μεθόδους.
Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται στην περίπτωση τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο (πατάτα, αλεύρι κ.α.).
Η υδρόλυση με οξύ εισάγει σφάλματα στον προσδιορισμό λόγω ταυτόχρονης υδρόλυσης πολυσακχάρων, πλην του αμύλου, αφ' ενός και καταστροφής της προκύπτουσας δεξτρόζης από το οξύ, αφ' ετέρου.
Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με χρήση συνδυασμού οξέος και ενζύμων για την υδρόλυση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ένζυμα όπως α-αμυλάση και αμυλογλυκοξειδάση.

$α_1$) Η διαδικασία όξινης υδρόλυσης του αμύλου έχει ως εξής:[1]

Το δείγμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσης με κρύο νερό και αναδεύεται επί 1hr. Ακολουθεί διήθηση και το υπόλειμμα θερμαίνεται σε σφαιρική φιάλη με κάθετο ψυκτήρα επί 3hrs, παρουσία περίσσειας HCl (ε.β.=1.19), μέχρις ότου το άμυλο μετατραπεί πλήρως σε γλυκόζη. Κατόπιν ψύξης του διαλύματος εξουδετερώνεται το οξύ με NaOH, παρουσία φαινολοφθαλεΐνης. Ακολουθεί αραίωση και διήθηση του σακχαρούχου διαλύματος και προσδιορισμός σ' αυτό της γλυκόζης. Το ποσόν της ευρισκόμενης γλυκόζης επί τον παράγοντα 0.9 δίνει το ποσόν του αμύλου στο δείγμα.
Σύμφωνα με παρεμφερή μέθοδο[14] τα σάκχαρα εκχυλίζονται κατ' αρχήν από το δείγμα με αιθανόλη 80% εν θερμώ. Το άμυλο εκχυλίζεται στη συνέχεια από το υπόλειμμα με αιθανολικό διάλυμα KOH. Ακολουθεί υδρόλυση του αμύλου με HCl προς γλυκόζη και προσδιορισμός της τελευταίας ογκομετρικά με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$Na_2S_2O_3$ (ιωδομετρική μέθοδος).

$α_2$) Η ενζυματική υδρόλυση του αμύλου έχει ως εξής[14]:

Κατ' αρχήν απομακρύνονται από το δείγμα τα σάκχαρα κατόπιν εκχύλισης με 80% αιθανόλη. Για την απομόνωση του αμύλου, το δείγμα στη συνέχεια κατεργάζεται με αιθανολικό διάλυμα KOH και εκπλύνεται με 80% αιθανόλη. Το άμυλο στο υπόλειμμα θερμαίνεται προς ζελατινοποίηση σε βράζον υδρόλουτρο επί 15min και επωάζεται με το ένζυμο αμυλογλυκοξειδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=4.5. Το ένζυμο αποικοδομεί το άμυλο προς γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια προσδιορίζεται ιωδομετρικά ή ενζυματικά με τη μέθοδο της γλυκοξειδάσης[9].

β) Μή υδρολυτικές μέθοδοι

Συνίστανται στην χώνευση του αμύλου με 52% $HClO_4$ και διασπορά του σε κολλοειδές διάλυμα. Το άμυλο στο κολλοειδές διάλυμα μπορεί να προσδιοριστεί με καταβύθιση σαν σύμπλοκο [αμυλο-I_2] και σταθμική ή ογκομετρική ανάλυση του ιζήματος[1]. Στο κολλοειδές διάλυμα το άμυλο μπορεί ακόμη να προσδιοριστεί πολωσιμετρικά ή χρωματομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης του χρώματος του συμπλόκου [άμυλο-I_2].

Σε τρόφιμα πλούσια σε λίπος ή πρωτεΐνες (τυρί, λουκάνικο) το άμυλο αντιδρά με άλκαλι προς σχηματισμό αδιάλυτων στην αλκοόλη συμπλόκων που μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από τ' άλλα συστατικά. Η μέθοδος δεν ενδείκνυται για φυτικά τρόφιμα που περιέχουν μίγμα διαφόρων πολυσακχάρων.

Το άμυλο μπορεί επίσης να εκχυλιστεί με θερμό πυκνό διάλυμα $CaCl_2$. Στο εκχύλισμα προστίθεται διάλυμα I_2 οπότε καθιζάνει το σύμπλοκο [αμυλου-I_2]. Το άμυλο στη συνέχεια υπολογίζεται σταθμικά ή το ποσόν του απορροφηθέντος I_2 προσδιορίζεται ογκομετρικά ή χρωματομετρικά.

Η επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου για την ανάλυση του αμύλου εξαρτάται από τη φύση και προέλευση του δείγματος, καθώς και από την ακρίβεια που απαιτείται στον προσδιορισμό.

Γενικά σαν πρώτο στάδιο της ανάλυσης συνιστάται η απομάκρυνση των λιπιδίων, που επικαλύπτουν τους κόκκους του αμύλου, κατόπιν εκχύλισης με αιθέρα και των σακχάρων κατόπιν εκχύλισης με αλκοόλη 80%.

Για τις δεξτρίνες προτιμάται η υδρόλυση με οξέα διότι τα προϊόντα αυτά είναι ήδη τροποποιημένα δομικά και γιαυτό δεν παρουσιάζουν αρκετά υψηλή στροφική ικανότητα και δεν αντιδρούν με I_2, όπως το φυσικό άμυλο.

Γ. Γλυκογόνο

Χρησιμεύει σαν αποταμιευτική ύλη στα ζώα, όπως το άμυλο στα φυτά. Μοιάζει δομικά με την αμυλοπηκτίνη του αμύλου με Μ.Β. της τάξης των μερικών εκατομμυρίων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Για την απομόνωση του γλυκογόνου το τρόφιμο κατεργάζεται σε υψηλή θερμοκρασία με KOH, οπότε το γλυκογόνο καθιζάνει με την προσθήκη αλκοόλης. Το απομονωμένο γλυκογόνο προσδιορίζεται άμεσα με τη μέθοδο της ανθρόνης ή έμμεσα με υδρόλυση και προσδιορισμό της περιεχόμενης γλυκόζης.

Δ. Πηκτινικές ύλες

Αποτελούν ολόκληρη ομάδα παραγώγων των πολυσακχαριτών. Αποτελούν πολυμερή του γαλακτουρονικού οξέος και του μεθυλεστέρα του[10].

Διαφέρουν από τους άλλους πολυσακχαρίτες στις χημικές ιδιότητες, λόγω της παρουσίας μεγάλων ποσοτήτων –COOH. Υφίστανται οξειδωτική αποικοδόμηση με την επίδραση αντιδραστηρίων, όπως τα: H_2O_2, $K_2Cr_2O_7$, $KMnO_4$, HIO_4 κ.α.

1. Παραλαβή και ανίχνευση πηκτινικών υλών

Η παραλαβή των πηκτινικών υλών γίνεται συνήθως με βάση το βαθμό εστεροποίησής τους, που συνδέεται άμεσα με τη διαλυτότητά τους. Αυξανομένου του βαθμού εστεροποίησης, αυξάνει η διαλυτότητά τους. Πηκτινικές ύλες με βαθμό εστεροποίησης μέχρι 20% καταβυθίζονται με διάλυμα NaCl, με βαθμό εστεροποίησης μέχρι 50% με διάλυμα $CaCl_2$, ενώ με βαθμό εστεροποίησης μέχρι 70% με διάλυμα $AlCl_3$ ή $CuCl_2$. Οι πλήρως εστεροποιημένες πηκτινικές ύλες δεν καταβυθίζονται με την προσθήκη ηλεκτρολυτών.

Για την ανίχνευση των πηκτινικών υλών χρησιμοποιούνται οι παρακάτω αντιδράσεις:

α) Αντίδραση Ehrlich

Το υπό εξέταση δείγμα υφίσταται υδρόλυση με το ένζυμο πηκτινάση προς γαλακτουρονικό οξύ. Στο προϊόν υδρόλυσης προστίθεται αλκαλικό διάλυμα $(CH_3COO)_2Pb$, οπότε παρουσία του παραπάνω οξέος σχηματίζεται λευκό ίζημα που με θέρμανση μετατρέπεται σε κεραμέρυθρο. Η αντίδραση είναι ειδική για το γαλακτουρονικό οξύ, αν και οι ολιγοσακχαρίτες δίνουν διάφορα χρώματα από πορτοκαλί μέχρι κίτρινο.

β) Αντίδραση υδροξαμικού οξέος

Στο υπό εξέταση δείγμα προστίθεται αλκαλικό διάλυμα υδροξαμικού οξέος και διάλυμα τρισθενούς σιδήρου, οπότε παρουσία πηκτινικών υλών σχηματίζεται κόκκινο σύμπλοκο αδιάλυτο στο νερό.

2. Ποσοτικός προσδιορισμός πηκτινικών υλών

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πηκτινικών υλών χρησιμοποιούνται σταθμικές, χρωματομετρικές, πολωσιμετρικές, ογκομετρικές κ.α. μέθοδοι.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Στην σταθμική μέθοδο[11] το δείγμα εκχυλίζεται με αραιό HCl. Στο εκχύλισμα καταβυθίζονται οι πηκτινικές ύλες με αλκοόλη ή ακετόνη. Το ίζημα υφίσταται σαπωνοποίηση με ψυχρό άλκαλι, οξίνιση, βρασμό με οξύ, για τη μετατροπή σε ίζημα πηκτινικού οξέος, το οποίο ζυγίζεται.
Στην πολωσιμετρική μέθοδο[12] οι πηκτινικές ύλες προσδιορίζονται, υπό τον όρον ότι είναι γνωστή η ειδική στροφή τους στο υπό εξέταση δείγμα. Η διαδικασία για δείγμα φλούδας πορτοκαλιού (ειδικής στροφής πηκτινικών ουσιών=230+) έχει ως εξής:
Το πηκτινικό εκχύλισμα διηθείται. Στο διήθημα μετρείται η οπτική στροφή (Ο.Σ.) σε υποδοχέα 1cm. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα $CuSO_4$ διηθείται ο σχηματιζόμενος πηκτινικός χαλκός και μετρείται η οπτική στροφή σε υποδοχέα 2dm. Η διαφορά στην οπτική στροφή των δύο διαλυμάτων οφείλεται στις πηκτινικές ύλες, η ποσότητα των οποίων υπολογίζεται από τη σχέση (14.18).

$$\text{Πηκτινικές ύλες } \% = \frac{\text{διαφορά Ο.Σ.}}{230} \times 100 \qquad (14.18)$$

Ε. Κυτταρίνη

Ο προσδιορισμός της κυτταρίνης είναι δύσκολος επειδή περιέχει μη καθορισμένα, σε μέγεθος και σύσταση πολυμερή. Μέρος μόνο της κυτταρίνης διαλύεται σε άλκαλι. Το αδιάλυτο κλάσμα ονομάζεται α-κυτταρίνη. Το κλάσμα του αλκαλικού εκχυλίσματος το οποίο καταβυθίζεται με οξίνιση ονομάζεται β-κυτταρίνη, ενώ το κλάσμα που παραμένει στο διάλυμα ονομάζεται γ-κυτταρίνη και περιέχει κυρίως ημικυτταρίνες.
Η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες προσδιορίζονται[13] σε απολιπασμένο δείγμα (κατεργασία με μίγμα αιθέρα/αιθανόλης), αφού αφαιρεθούν οι υδατοδιαλυτοί υδατάνθρακες (εκχύλιση με αλκοόλη 80-85% και κατακόρυφο ψυκτήρα). Ακόμη αφαιρείται η πρωτεΐνη και η λιγνίνη. Τα ένζυμα επίσης έχουν αδρανοποιηθεί στην αρχή της ανάλυσης. Το υπόλειμμα χωνεύεται με άλκαλι. Η κυτταρίνη προσδιορίζεται στο αδιάλυτο σε αλκοόλη κλάσμα, κατόπιν, πλήρους υδρόλυσης με H_2SO_4 και προσδιορισμού των προκυπτόντων αναγόντων σακχάρων.

ΣΤ. Διαιτητική ΄Ινα (Crude or dietary fiber)

Περιέχεται στα κυτταρινούχα τρόφιμα και περιέχει υλικά που δεν μπορούν να αξιοποιηθούν από τον οργανισμό. Ορίζεται σαν το υλικό το αδιάλυτο σε αραιό οξύ και αραιό άλκαλι.
Η διαιτητική ίνα προσδιορίζεται[14] σε απολιπασμένο δείγμα το οποίο κατεργάζεται κατ΄ αρχήν με βράζον H_2SO_4, ακολούθως δε με βράζον NaOH. Το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

υπόλειμμα μεταφέρεται σε χωνευτήριο και ζυγίζεται. Στη συνέχεια αποτεφρώνεται σε φούρνο στους 550°C και ξαναζυγίζεται. Η ποσότητα της διαιτητικής ίνας δίνεται από τη σχέση 14.19.

$$\text{Διαιτητική ινα\%} = \frac{w_2 - w_3}{w_1} \times 100 \qquad (14.19)$$

όπου: w_1= βάρος δείγματος
w_2= βάρος αδιάλυτου κλάσματος
w_3= βάρος τέφρας

14.4 Εφαρμογές

Α. Μέλι

Από τις κύριες εφαρμογές του προσδιορισμού των υδατανθράκων αποτελεί η ανάλυση του μελιού. Το προϊόν αυτό περιέχει μίγμα γλυκόζης/φρουκτόζης σε ποσοστό 70–80% και καλαμοσάκχαρο ≤4%. Όσο πιο ώριμο είναι το μέλι τόσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητά του σε ιμβερτοσάκχαρο (γλυκόζη και φρουκτόζη) και μικρότερη σε καλαμοσάκχαρο.

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων παρασκευάζεται διάλυμα μελιού 1% περίπου. Κατ' αρχήν προσδιορίζονται τα απ' ευθείας ανάγοντα σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη) με μια από τις γνωστές μεθόδους Lane Eynon ή Schoorl και Regenbogen και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ιμβερτοσάκχαρο. Σε άλλη ποσότητα του δείγματος προσδιορίζεται η γλυκόζη κατά Kolthoff, οπότε με αφαίρεση από το ποσό των απ' ευθείας αναγόντων σακχάρων προκύπτει η ποσότητα της περιεχόμενης φρουκτόζης. Στη συνέχεια το δείγμα υποβάλλεται σε ιμβερτοποίηση (υδρόλυση), οπότε προσδιορίζονται τα συνολικά σάκχαρα (απ' ευθείας ανάγοντα + αυτά που προέκυψαν από την υδρόλυση), με μια από τις δύο παραπάνω μεθόδους των αναγόντων σακχάρων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ιμβερτοσάκχαρο.

Τέλος κατόπιν αφαίρεσης των απ' ευθείας αναγόντων σακχάρων από τα συνολικά σάκχαρα και πολλαπλασιασμού της διαφοράς επί τον συντελεστή 0.95 προκύπτει η ποσότητα του περιεχόμενου καλαμοσάκχαρου.

Εκτός του φυσικού προϊόντος υπάρχει και το τεχνητό μέλι το οποίο παρασκευάζεται κατόπιν πλήρους υδρόλυσης, παρουσία μικρής ποσότητας αραιού διαλύματος οξέος, πυκνού διαλύματος καλαμοσάκχαρου (περίπου 80%). Κατά την υδρόλυση αυτή σχηματίζεται σε μικρή ποσότητα 5-υδροξυμεθυλο-φουρφουράλη (HMF) σαν προϊόν διάσπασης της φρουκτόζης.

Για την ανίχνευση τεχνητού ιμβερτοσακχάρου, στο μέλι επιτελείται η αντίδραση Fiehe που στηρίζεται στην αντίδραση της HMF με ρεσορκίνη.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η αντίδραση Fiehe έχει ως εξής:
Υδατικό διάλυμα μελιού υφίσταται εκχύλιση με αιθέρα. Από το αιθερικο εκχύλισμα απομακρύνεται ο αιθέρας και το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε αιθέρα. Σε μικρή ποσότητα του διαλύματος αυτού προστίθεται διάλυμα 1% ρεσορκίνης σε πυκνό HCl. Η εμφάνιση έντονης και σταθερής επί 1 τουλάχιστον hr, κερασέρυθρης χροιάς πιστοποιεί την παρουσία τεχνητού ιμβερτοσακχάρου. Αντίθετα εμφάνιση ασθενούς ροδέρυθρης μέχρι πορτοκαλλί χροιάς που καταστρέφεται αμέσως, αποτελεί ένδειξη ανόθευτου μελιού.

Β. Αμυλοσιρόπι

Είναι το προϊόν υδρόλυσης του αμύλου, πυκνόρευστης υφής. Κύρια συστατικά του αμυλοσιροπιού είναι η γλυκόζη (≥37%), οι δεξτρίνες (≤47%) και η μαλτόζη. Η ανάλυση των υδατανθράκων στο αμυλοσιρόπι ουνίσταται στον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζη και μαλτόζη) κατά τα γνωστά (βλ. κεφ. 14.4 Α). Τα αποτελέσματα αυτά εκφράζονται σε γλυκόζη. Στη συνέχεια ακολουθεί υδρόλυση των δεξτρινών με HCl, ψύξη και εξουδετέρωση του οξέος με NaOH παρουσία ηλιανθίνης. Επαναπροσδιορίζονται τα συνολικά σάκχαρα και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε γλυκόζη. Η διαφορά μεταξύ συνολικών και απ' ευθείας αναγόντων σακχάρων πολλαπλασιαζόμενη επί τον συντελεστή 0.9 δίνει το ποσό των περιεχόμενων δεξτρινών (Για προσδιορισμό των δεξτρινών βλ. κεφ. 14.3 Β2).

Γ. Προσδιορισμός σακχάρων σε μίγμα με HPLC[14]

(βλ. κεφ. 14.2Γ5).

Το αιθανολικό εκχύλισμα του τροφίμου διαβιβάζεται μέσω ιονανταλλακτικής στήλης με μίγμα αιθανόλη/νερό σαν κινούμενη φάση. Για την ανάλυση των δισακχαριτών χρησιμοποιείται στήλη Li^+, των μονοσακχάρων στήλη τριμεθυλαμμωνίου και των μιγμάτων γλυκόζης/φρουκτόζης/καλαμοσάκχαρου στήλη SO_4^{2-}

Δ. Ενζυματική ανάλυση υδατανθράκων (λακτόζης)[14]

Υδατικό αιώρημα πολτού του δείγματος υφίσταται αποπρωτεΐνωση και διήθηση. Στο διήθημα η λακτόζη μετατρέπεται σε γλυκόζη και γαλακτόζη παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοξειδάσης (β-Gal). Η γαλακτόζη στη συνέχεια οξειδώνεται παρουσία της γαλακτοζο-δεϋδρογενάσης (Gal-DH) προς γαλακτονο-λακτόνη και NADH. Το τελευταίο προσδιορίζεται φωτομετρικά στα λ=340 ή 366 nm.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τον προσδιορισμό της λακτόζης έχουν ως εξής:

$$\text{λακτόζη} + H_2O \xrightleftharpoons{\beta\text{-Gal}} \text{γλυκόζη} + \text{γαλακτόζη} \qquad (14.20)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

γαλακτόζη + NAD^+ $\xrightarrow{Gal\cdot DH}$ γαλακτονο-λακτόνη + NADH + H^+ (14.21)

Ε. Διάφορα

1. Τα Μονο-και ολιγοσάκχαρα έχουν προσδιοριστεί:
αεριοχρωματογραφικά η D-γλυκόζη[15], η φρουκτόζη, η λακτόζη, η μαλτόζη, η σακχαρόζη[7] και τα παράγωγά τους[16]· χαρτοχρωματογραφικά[17,18] με χρωματογραφία ιονανταλλαγής[19], με TLC[20], ηλεκτροφορητικά[8], διαθλασιμετρικά[21] με HPLC[22] η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η λακτόζη και η σακχαρόζη· τέλος ενζυματικά[23], πολωσιμετρικά και με αναγωγικές μεθόδους[24-26].

2. Οι Πολυσακχαρίτες έχουν προσδιοριστεί:
Ενζυματικά το άμυλο σε κλάσματα αλευριών[27]· πολωσιμετρικά το άμυλο σε δημητριακά, φρούτα και κηπευτικά[28,29,30] και υγροχημικά με την αντίδραση της ανθρόνης σε κρέας και προϊόντα του[31]. Με TLC οι δεξτρίνες[32]. Ενζυματικά το γλυκογόνο[33,34]. Υγροχημικά η διαιτητική ίνα (κυτταρίνη και λιγνίνη) σε κακάο και προϊόντα του[35]. Τέλος οι πηκτινικές ουσίες χρωματομετρικά[36], χαρτοχρωματογραφικά[37], πολωσιμετρικά[38] σε εσπεριδοειδή και με χρωματογραφία πηκτής/ηλεκτροφόρησης ελεύθερου μετώπου[39] σε ζαχαρότευτλα, μήλα και εσπεριδοειδή.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Joslyn M.A** Methods in Food Analysis 2nd edit. Academic Press, New York (1970)
2. **Bentley R** and **Neuberget A** Biochem J. 45, 584 (1949)
3. **Avigad C., Amaral D. Asensio C** and **Horecker B.L.** J. Biol. Chem 237, 2736 (1962)
4. **Egan H, Kirk RS** and **Sawyer R**, Pearson's Chemical Analysis of Foods, 8th edit, Churchill Livingston Publ. London (1980)
5. **Ghebregzabher M, Rufini S, Monaldi B** and **Lato M**, J. Chromatogr. 127, 133 (1976)
6. **Γαλανού ΔΣ** και **Βουδούρη ΕΚ** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων, Αθήνα (1975)
7. **Woods AE** and **Aurand LW** Lab. Manual in Food Chemistry, AVI Publ. Co., Westport, Conn. (1977)
8. **Wiegel H** Adv. in Carbohydrate Chem. 18, 61 (1963)
9. **Bergmeyer HU** (edit) Methoden der Enzymatischen Analyse, 2nd edit. Verlag Chemie, Weinheim (1970)
10. **Βουδούρη ΕΚ** και **Κοντομηνά ΜΓ** Εισαγωγή στην Χημεία των Τροφίμων, Ιωάννινα (1985)
11. **Wichmann HI** J. Assoc. Off Agr. Chem. 7, 107 (1923)
12. **McCready RM, Shepderd AD, Swenson HA, Ehrlaudsen RF** and **Maclay WD**, Anal. Chem. 23, 975 (1951)
13. **Paech K** and **Tracey MV** (eds), Modern Methods of Plant Analysis Springer-Verlag, Berlin (1955)
14. **Osborne DR** and **Voogt P** Analysis of Nutrients in Foods, Academic Press, London (1978)
15. **Alexander RJ** and **Garbutt JT** Anal. Chem. 37, 303 (1965)
16. **Bishop CT** Adv. Carbohydrate Chem. 19, 95 (1964)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

17. **McCready RM** and **Goodwin JC** J. Amer. Soc. Sugar Beet Tech. 14, 197 (1966 b)
18. **Partridge SM** Biochem. J 42, 238 (1948)
19. **Samuelsen O** and **Stromberg H** Acta Chem. Scand. 22, 1252 (1968)
20. **Huber CM, Scobell H** and **Tal H,** Cereal Chem 43, 342 (1966)
21. **Charles DF** and **Meads DF** Methods Carbohydrate Chem. 1, 520 (1962)
22. **Hunt DC, Jackson PA, Mortlock** and **Kirk RS,** Analyst 102, 917 (1977)
23. **King RD,** (edit) Devel. in Food Analysis Techniques, Applied Sci Publ. London (1978)
24. **Pearson D.** The Chemical Analysis of Foods, Churchil Livingstone Publ. Edinburgh (1976)
25. **Lothrop RE** and **Holmes RL,** Ind. Eng. Chem. Anal, Edit 3, 334 (1931)
26. **Hinton L** and **Macara T** Analyst 52, 668 (1927)
27. **Donelson JR** and **Yamazaki WT.** Cereal Chem. 45, 177 (1968)
28. **Winkler S** and **Lukov G** Die Starke 19, 110 (1967)
29. **Dimler RJ** Methods Carbohydrate Chem. 4, 133 (1964)
30. **McCready RM, Guggolr J, Silviera V** and **Owens HW,** Anal. Chem. 22, 1156 (1950)
31. **Stevens FJ** and **Chapman RA** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 38, 202 (1955)
32. **Diemair W** and **Kolbel R,** Z. Lebensmit: Unters Forsch. 124, 1,157 (1963)
33. **Passonneau JR, Gatfield PD, Schultz DW** and **Lowry OH** Anal. Biochem 19, 315 (1967)
34. **Lee EYC** and **Whelan WJ** Arch Biochem Biophys. 116, 162 (1966)
35 **Fincke H** and **Thaler H** Z. Unters. Lebensmit. 84, 97 (1942)
36. **McComb EA** and **McCready RM** Anal. Chem. 24, 1630 (1952)
37. **McCready RM** and **Gee M.** J. Agr. Food Chem. 5, 167 (1960)
38. **McCready RM,** Anal. Chem. 23, 975 (1951)
39. **Zitco V** and **Bishop CT,** Can. J. Chem. 43, 3206 (1965)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

15.1. Εισαγωγή

Οι Βιταμίνες αποτελούν μεγάλη ομάδα οργανικών ενώσεων που διαφέρουν ως προς τις ιδιότητες μεταξύ τους, με μόνο, ίσως, κοινό χαρακτηριστικό ότι σε μικρές ποσότητες είναι απαραίτητες για την κανονική ανάπτυξη των οργανισμών.

Διακρίνονται σε λιποδιαλυτές (A,D,E,K) και υδατοδιαλυτές (B,C). Οι ανάγκες κάθε οργανισμού σε βιταμίνες ποικίλλουν ανάλογα με την ηλικία, τυχόν κατάσταση εγκυμοσύνης κ.α.

Η περιεκτικότητα των τροφίμων σε βιταμίνες εκφράζεται σε mg, μg ή διεθνείς μονάδες (I.U.).

Οι βιταμίνες είναι γενικά ασταθείς ενώσεις, αλλοιώνονται εύκολα κατά τη διάρκεια των περισσοτέρων κατεργασιών των τροφίμων και γιαυτό απαιτείται ειδική μεταχείριση για τη διατήρησή τους στο κατεργασμένο τελικό προϊόν.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των βιταμινών διακρίνονται σε:

Α. Χημικές

Β. Φυσικοχημικές

Γ. Μικροβιολογικές

Δ. Βιολογικές

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι στηρίζονται στο γεγονός ότι ορισμένοι μικροοργανισμοί απαιτούν συγκεκριμένες βιταμίνες για την ανάπτυξή τους. Αν στο θρεπτικό υλικό που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά, εκτός από την εξεταζόμενη βιταμίνη, καλλιεργηθεί συγκεκριμένος μικροοργανισμός τότε μπορεί να συγκριθεί ποσοτικά ο ρυθμός ανάπτυξης αυτού στο παραπάνω θρεπτικό υλικό με τον αντίστοιχο σε πρότυπο θρεπτικό υλικό (περιέχει και γνωστή ποσότητα βιταμίνης).

Στις βιολογικές μέθοδους διεξάγονται πειράματα διατροφής σε πειραματόζωα με και χωρίς τις συγκεκριμένες βιταμίνες. Οι μέθοδοι αυτές παρόλο ότι παρουσιάζουν πολλά μειονεκτήματα, όπως το ότι είναι χρονοβόρες, δαπανηρές (συντήρηση πειραματόζωων), εντούτοις αποτελούν το τελικό πρότυπο προς το οποίο συγκρίνονται τα αποτελέσματα των άλλων μεθόδων. Στη συνέχεια εξετάζεται ο προσδιορισμός των υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών χωριστά.

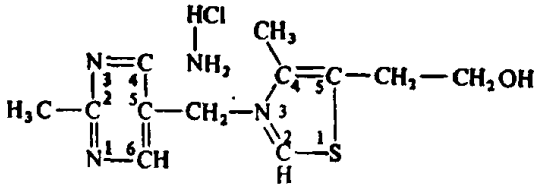
15.2 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Α. Θειαμίνη ή Βιταμίνη B_1

1. Ιδιότητες

Η θειαμίνη (υδροχλωρική) είναι λευκό κρυσταλλικό σώμα, υγροσκοπικό σ.τ. 246-250°C. Μ.Β. = 337.3 του τύπου:



θειαμίνη

Είναι διαλυτή στο νερό και την αλκοόλη, αδιάλυτη στον αιθέρα, το βενζόλιο και τ' άλλα οργανικά διαλυτικά. Είναι σχετικά σταθερή έναντι της θερμοκρασίας, αλλά καταστρέφεται στη θερμοκρασία του αυτόκλειστου. Σε διάλυμα η θειαμίνη είναι ευαίσθητη στην οξείδωση και την αναγωγή. Σε όξινο περιβάλλον διατηρεί την ενεργότητά της, ακόμα και σε θ= 120 °C, αλλά καταστρέφεται εύκολα σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον.

Απαντά στα τρόφιμα ελεύθερη ή συζευγμένη σαν σύμπλοκο με πρωτεΐνη.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού

Από τις φυσικοχημικές και χημικές μεθόδους η θειαμίνη προσδιορίζεται: φθορισμομετρικά, χρωματομετρικά, σταθμικά, ογκομετρικά και χρωματογραφικά (HPLC). Επίσης προσδιορίζεται μικροβιολογικά και βιολογικά.

α) Μέθοδος θειοχρώματος[1] (φθορισμομετρική)

Στηρίζεται στην εκχύλιση της θειαμίνης με θερμό αραιό HCl και κατεργασία του εκχυλίσματος με διάλυμα φωσφατάσης σε pH = 4.5 (ενζυματική υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων της θειαμίνης προς απελευθέρωση της τελευταίας). Το προϊόν της υδρόλυσης χρωμογραφείται σε στήλη ιονανταλλακτικής ρητίνης και η εκλουόμενη θειαμίνη οξειδώνεται με αλκαλικό διάλυμα σιδηροκυανιούχου καλίου προς θειόχρωμα το οποίο μετρείται φθορισμομετρικά στα $\lambda_{διεργ}$ = 360nm, $\lambda_{εκπ.}$ = 435 nm

β) Χρωματογραφικός προσδιορισμός (HPLC)[1]

Η θειαμίνη εκχυλίζεται από το τρόφιμο με όξινη υδρόλυση (αραιό H_2SO_4). Το προϊόν της υδρόλυσης κατεργάζεται με διάλυμα διαστάσης (απελευθερώνει τη θειαμίνη που βρίσκεται υπό μορφή φωσφορικού εστέρα) και διάλυμα παπαΐνης και τριχλωροξικού οξέος (αίρουν την παρεμπόδιση λόγω παρουσίας πρωτεϊνών). Ακολουθεί φυγοκέντριση του προκύπτοντος διαλύματος και έγχυση στο χρωματογράφο HPLC, σε στήλη Silica gel. Η εκλουόμενη θειαμίνη οξειδώνεται με διάλυμα σιδηροκυανούχου καλίου προς κυτόχρωμα που προσιορίζεται με ανιχνευτή φθορισμού στα $\lambda_{διεγ.}$ = 366 nm και $\lambda_{εκπ.}$ = 464

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

nm. Ο προσδιορισμός γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

γ) Χρωματομετρικός προσδιορισμός[2]

Στηρίζεται στην αντίδραση της θειαμίνης με διάλυμα άλατος Reinecke που δίνει ίζημα. Το ίζημα διαλύεται σε ακετόνη και μετρείται χρωματομετρικά στο λ = 435 nm. Το αντιδραστήριο Reinecke είναι του τύπου: $NH_4[Cr(NH_3)_2](SCN)_4 \cdot H_2O$.

δ) Σταθμικός προσδιορισμός[3]

Στηρίζεται στην καταβύθιση της θειαμίνης κατόπιν αντίδρασης με πυριτοβολφραμικό και υδροχλωρικό οξύ. Το μίγμα θερμαίνεται και διηθείται. Το ίζημα εκπλύνεται εκ νέου με αραιό μίγμα των παραπάνω οξέων. Απομακρύνεται το περιεχόμενο νερό με ακετόνη και το υπόλειμμα ξηραίνεται και ζυγίζεται. 1g ιζήματος = 0.193 g υδροχλωρικής θειαμίνης ($C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$).

ε) Ογκομετρικός προσδιορισμός[4]

Κατόπιν της παραπάνω καταβύθισης με πυριτοβολφραμικό οξύ, στο ίζημα προστίθεται δείκτης (Metanil κίτρινο) και ογκομετρείται με πρότυπο πυριτοβολφραμικό οξύ. Σαν τελικό σημείο λαμβάνεται το σημείο μετατροπής του χρώματος του ιζήματος, από κίτρινο σε κόκκινο-μωβ. Ενδιάμεσα λαμβάνεται κιτρινοκόκκινος χρωματισμός. 1ml διαλύματος πυριτοβολφραμικού οξέος 0.05N = 8.43 mg υδροχλωρικής θειαμίνης.

στ) Μικροβιολογικός προσδιορισμός[5]

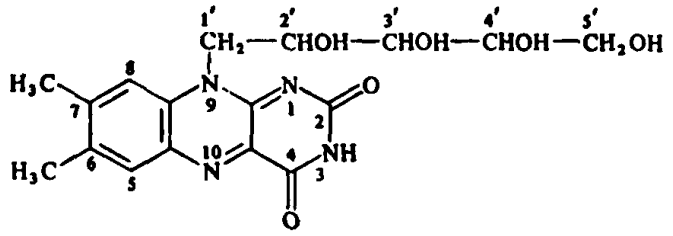
Στηρίζεται στην κατανάλωση της θειαμίνης για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού Ochromonas danica. Η μέθοδος είναι ειδική για τη θειαμίνη.
Το εκχύλισμα του δείγματος προστίθεται στο θρεπτικό υγρό, κατόπιν προστίθεται ο μικροοργανισμός και το σύνολο επωάζεται στους 27°C κάτω από φθορίζον φως επί 5-7 μέρες. Μετρείται, η ένταση του θολώματος που σχηματίζεται, στο λ=436 nm. Παράλληλα παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα θειαμίνης που εμβολιάζονται στο θρεπτικό υλικό κατά τον ίδιο τρόπο. Έτσι κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη $C_{\theta\varepsilon\iota\alpha\mu.}=f$ (ένταση νεφελώματος). Από την πρότυπη καμπύλη προσδιορίζεται η ποσότητα της θειαμίνης στο άγνωστο δείγμα γραφικά.

Β. Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B_2)

1. Ιδιότητες

Είναι κρυσταλλικό στερεό σ.τ. = 274-282°C, Μ.Β. = 376 του τύπου:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



ριβοφλαβίνη

Είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό, διαλυτή στα αλκάλεα, ολίγον διαλυτή στην αιθανόλη. Έχει πικρή γεύση και εμφανίζει κιτρινοπράσινο φθορισμό. Απορροφά στα λ (223, 266, 373) UV και 444 nm. Είναι σταθερή έναντι της θερμοκρασίας, των ισχυρών οξέων και της οξείδωσης. Είναι ασταθής σε αλκαλικό περιβάλλον και στο φως, συνθήκες κάτω από τις οποίες δίνει λουμιφλαβίνη. Ανάγεται αντιστρεπτά με ενεργό Η και NaHS. Απαντά ελεύθερη (γάλα) και δεσμευμένη με πρωτεΐνες. Απ' αυτές λαμβάνεται με ενζυματική χώνευση.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού ριβοφλανίνης.

Προσδιορίζεται:

α) φασματοφωτομετρικά (ορατό, UV)

β) φθορισμομετρικά

γ) χωματογραφικά (HPLC)

δ) μικροβιολογικά

α) Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός[5]

Η ριβοφλαβίνη εκχυλίζεται από ξηρά δείγματα με θερμό, αραιό HCl σε ατμόλουτρο. Το εκχύλισμα διηθείται και αποχρωματίζεται κατόπιν οξείδωσης με $KMnO_4$ και H_2O_2. Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στο λ=267 nm.

β) Φθορισμομετρικός προσδιορισμός[5]

Ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία παραλαβής της ριβοφλαβίνης. Μετρείται ο φθορισμός του αποχρωματισθέντος διαλύματος πριν και μετά την αναγωγή της ριβοφλαβίνης με $Na_2S_2O_6$ (διθειωνώδες νάτριο). Η διαφορά αυτή στον φθορισμό είναι ανάλογη του ποσού της περιεχόμενης στο δείγμα βιταμίνης B_2. $\lambda_{\delta\iota\epsilon\gamma}$= 440 nm, $\lambda_{\epsilon\kappa\pi.}$= 525 nm.

γ) χρωματογραφικός προσδιορισμός (HPLC)[1]

Η ριβοφλαβίνη κατεργάζεται όπως και η θειαμίνη. Προσδιορίζεται απ' ευθείας σε στήλη Silica gel με ανιχνευτή φθορισμού στα $\lambda_{\delta\iota\epsilon\gamma}$ = 435 nm και $\lambda_{\epsilon\kappa\pi}$ =545 nm με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

δ) Μικροβιολογικός προσδιορισμός[5]

Προσδιορίζεται κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν της βιταμίνης B_1, με τη βοήθεια του μικροοργανισμού Lactobacillus casei. Το σύστημα επωάζεται στους 37°C επί 72 hrs. Ακολουθεί νεφελομετρική ανάλυση.

Οι βιταμίνες Νιασίνη (νικοτινικό οξύ), Πυριδοξίνη (B_6) και Κοβαλαμίνη (B_{12}) προσδιορίζονται συνήθως μικροβιολογικά με τους μικροοργανισμούς Lactobacillus plantarum, Saccharomyces carlsbergensis και Lactobacillus leichmanii αντίστοιχα[1].

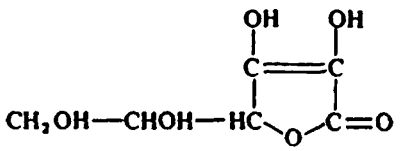
Η νιασίνη προσδιορίζεται ακόμη χρωματογραφικά (HPLC)[1]:

Η νιασίνη παραλαμβάνεται κατόπιν όξινης υδρόλυσης, προσθήκης παπαΐνης και διαστάσης κατά τα γνωστά. Το διαυγές διήθημα της κατεργασίας αυτής εισάγεται σε στήλη Silica gel όπου διαχωρίζονται το νικοτινικό οξύ από το νικοτιναμίδιο. Στην έξοδο της στήλης οι παραπάνω μορφές της νιασίνης αντιδρούν με BrCN και p-αμινοακετοφαινόνη και προσδιορίζονται φθορισμομετρικά στα $\lambda_{διεγ}$=435 nm και $\lambda_{εκπ}$=500 nm.

Γ. Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)

1. Ιδιότητες

Είναι άχρωμο κρυσταλλικό σώμα σ.τ. 192°C, ΜΒ = 176 του τύπου:



ασκορβικό οξύ

Λόγω της χαρακτηριστικής ομάδας της διενόλης έχει αναγωγικές ιδιότητες και όξινο χαρακτήρα. Είναι διαλυτό στο νερό, τη μεθανόλη και αιθανόλη, αδιάλυτο στο βενζόλιο, αιθέρα, χλωροφόρμιο και πετρελαϊκό αιθέρα.

Είναι αρκετά ευαίσθητο στα αλκάλια και την οξείδωση, ιδιαίτερα παρουσία καταλύτη. Οξειδώνεται προς δεϋδροασκορβικό οξύ που είναι σχετικά σταθερό σε pH < 4.0. Το δεϋδροασκορβικό οξύ διατηρεί το 75-80% της ενεργότητας του L-ασκορβικού οξέος.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού

Προσδιορίζεται με χημικές, φθορισμομετρικές, χρωματογραφικές και φωτομετρικές μεθόδους.

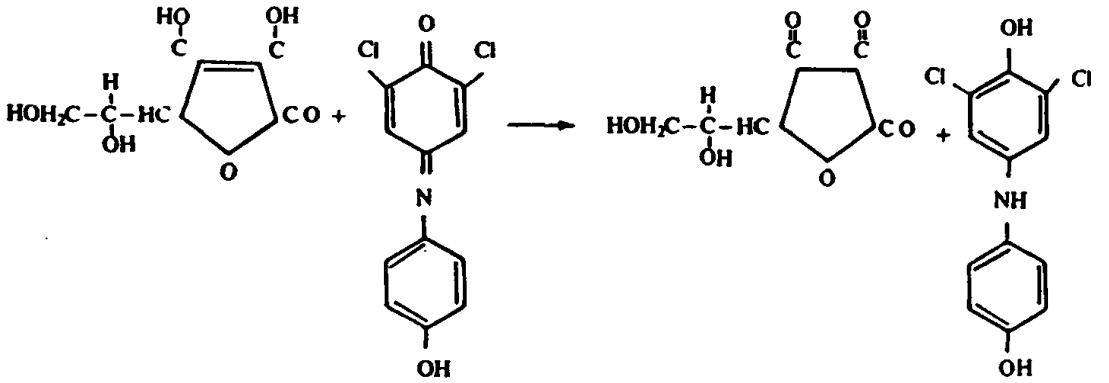
α) χημικός/ογκομετρικός προσδιορισμός[1,6]

Στηρίζεται στις αναγωγικές ιδιότητες του ασκορβικού οξέος. Ανάγει ποσοτικά τον δείκτη 2,6-διχλωροφαινολ-ινδοφαινόλη (αντίδραση 15.1).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το δείγμα τεμαχίζεται και εκχυλίζεται σε μπλέντερ με μίγμα μεταφωσφορικού/οξικού οξέος. Ακολουθεί φυγοκέντριση και παραλαβή του διαλύματος. Το διάλυμα οξυνίζεται (H_2SO_4), προστίθεται HCHO (προς συμπύκνωση των παρεμποδιζουσών S^{2-}, SO_3^{2-} και θειολών. Ακολουθεί ογκομέτρηση με τη χρωστική που προηγουμένως έχει τιτλοδοτηθεί με πρότυπο ασκορβικό οξύ. Σαν τελικό σημείο της ογκομέτρησης λαμβάνεται το σημείο σχηματισμού ελαφράς ρόδινης χροιάς η οποία παραμένει επί 5-10 sec.
Η βασική αντίδραση της οξειδοαναγωγής έχει ως εξής:

(15.1)



ασκορβικό οξύ — 2,6 διχλωροφαινόλ-ινδοφαινόλη — δεϋδροασκορβικό οξύ — λευκοένωση 2,6 διχλωροφαινόλ-ινδοφαινόλης

β) φθορισμομετρικός προσδιορισμός[1]

Στηρίζεται στη μετατροπή του ασκορβικού οξέος σε δεϋδροασκορβικό οξύ και εν συνεχεία στην αντίδραση της α-δικέτο ομάδας με ο-φαινυλενοδιαμίνη. Η προκύπτουσα κινοξαλίνη μετρείται φθορισμομετρικά στα $\lambda_{\delta\iota\varepsilon\gamma}$=350 nm και $\lambda_{\varepsilon\kappa\pi}$=430 nm.

γ) χρωματογραφικός/ογκομετρικός προσδιορισμός[5]

Το δείγμα εκχυλίζεται με διάλυμα οξαλικού οξέος. Σε περίπτωση που πρόκειται να προσδιοριστεί το άθροισμα (ασκορβικό + δεϋδροασκορβικό), το εκχύλισμα κατεργάζεται με H_2S σε pH=3.5, για την αναγωγή του δεϋδροασκορβικού σε ασκορβικό οξύ. Το προκύπτον διάλυμα χρωματογραφείται (χαρτί ή TLC) με διάλυμα οξικού βουτυλεστέρα κορεσμένου με νερό/αιθανόλη. Η κηλίδα του ασκορβικού αποξύνεται και προσδιορίζεται ογκομετρικά σύμφωνα με τα προηγούμενα.

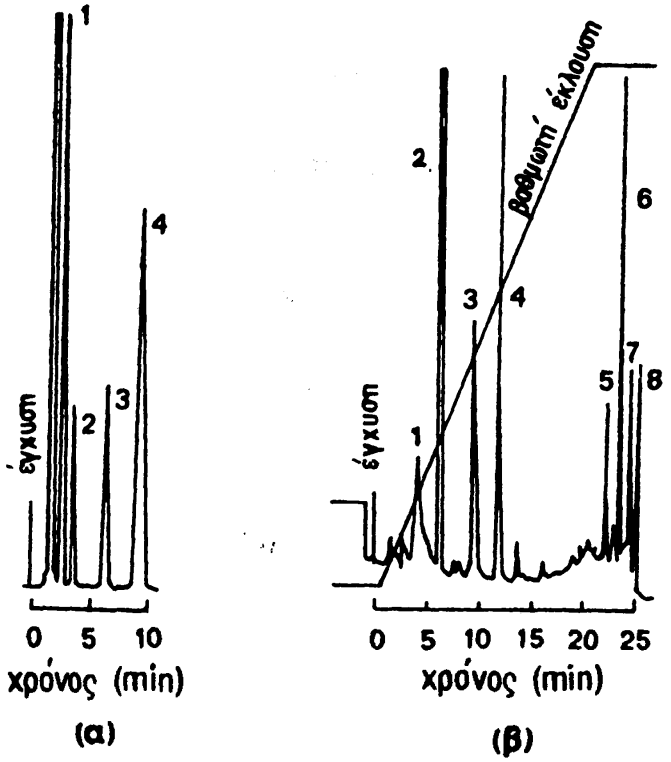
δ) Φωτομετρικός προσδιορισμός[5]

Κατ' αρχήν οξειδώνεται το ασκορβικό προς δεϋδροασκορβικό οξύ με άνθρακα Norit ή 2,6 διχλωροφαινολ-ινδοφαινόλη. Το δεϋδρο-ασκορβικό οξύ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αντιδρά με 2,4 –δινιτροφαινυλυδραζίνη για να δώσει 2,4 –δινιτροφαινολυδραζόνη ή οποία κατόπιν διάλυσης σε H_2SO_4 85% δίνει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα που απορροφά στο λ=520-525 nm.

Στο σχήμα 15-1α δίνεται ο διαχωρισμός των υδατοδιαλυτών βιταμινών: νικοτιναμίδιο (1), πυριδοξίνη (2), θειαμίνη (3) και ριβοφλαβίνη (4) με HPLC[10].



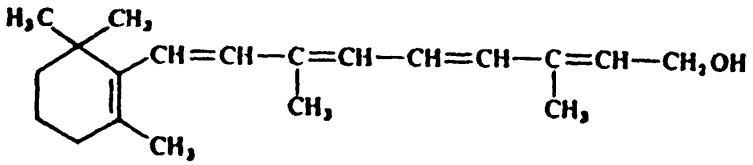
Σχ. 15-1. Ανάλυση βιταμινών με HPLC.
(α) υδατοδιαλυτές: 1) αμίδιο της νιασίνης 2) πυριδοξίνη 3) θειαμίνη 4) ριβοφλαβίνη στήλη: μBondapaK C_{18} διαλ: CH_3OH/H_2O με 0.005M C_6H_{14}/CH_3COOH ανιχν: UV: 280 nm.
(β) υδατο- και λιποδιαλυτές: 1) βιταμίνη B_6 2) βιτ. B_3, 3) βιτB_1 4) βιτB_2 5) βιτA 6) οξικός εστέρας βιτA 7) ΒιτD_3, 8) οξικός εστέρας βιτE στήλη: μBondapak C_{18} διαλ: A) $(NH_4)_2CO_3$ B) CH_3OH προγρ. 20 min. ανιχν: UV: 254 nm.

15.3 Λιποδιαλυτές βιταμίνες

Α. Βιταμίνη Α (ρετινόλη)/β-καροτένιο

1. Ιδιότητες

Είναι ακόρεστη αλκοόλη, σώμα κίτρινο κρυσταλλικό σ.τ.=63-64°C Μ.Β.=286.5 του τύπου:



Βιταμίνη Α

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Φθορίζει πράσινα στο UV. Είναι διαλυτή στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, αδιάλυτη στο νερό. Οξειδώνεται στον αέρα, ενώ είναι ανθεκτική έναντι της θερμοκρασίας. Σχηματίζεται στον οργανισμό, όπου απαντά σαν εστέρας λιπαρών οξέων, από τις προβιταμίνες α και β και το β-καροτένιο. Το τελευταίο με υδρόλυση δίνει, θεωρητικά, δύο μόρια βιταμίνης Α. Απαντά στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του λίπους.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού

Η βιταμίνη Α προσδιορίζεται φασματοφωμετρικά (UV), χρωματογραφικά (HPLC) και χρωματομετρικά.

α) φασματοφωμετρικός προσδιορισμός (UV.)[7]

Το δείγμα σαπωνοποιείται σε σφαιρική φιάλη με κατακόρυφο ψυκτήρα παρουσία αλκοολικού διαλύματος καυστικού καλίου. Το προϊόν της σαπωνοποίησης διαχωρίζεται σε δύο φάσεις σε διαχωριστική χοάνη παρουσία αιθέρα. Ο αιθέρας από το ασωπονοποίητο κλάσμα εξατμίζεται, ενώ το υπόλειμμα διαλύεται σε 2-προπανόλη και μετρείται στο λ=325 nm. Η τιμή της απορρόφησης μετατρέπεται, τέλος, σε σταθμικές μονάδες με τη βοήθεια κατάλληλου συντελεστή.

β) χρωματογραφικός προσδιορισμός (HPLC)[1]

Το δείγμα σαπωνοποιείται, όπως και παραπάνω και το ασαπωνοποίητο κλάσμα εκχυλίζεται με n-εξάνιο. Μέρος του διαλύματος εξανίου χρωματογραφείται σε στήλη αλουμίνας με διαλύτη έκλουσης 2% αιθανόλη σε βενζόλιο. Η εκλουόμενη βιταμίνη Α προσδιορίζεται με ανιχνευτή φθορισμού στα $\lambda_{\delta\iota\epsilon\gamma}$=330 nm και $\lambda_{\epsilon\kappa\pi}$= 514 nm.

Για τον προσδιορισμό του β-καροτενίου, ένα δεύτερο μέρος του διαλύματος εξανίου χρωματογραφείται στην ίδια στήλη, με διαλύτη έκλουσης 0.4% διοξάνιο σε εξάνιο. Το εκλουόμενο β-καροτένιο προσδιορίζεται φωτομετρικά στο λ=460 nm.

γ) χρωματομετρικός προσδιορισμός[5] **(μέθοδος Carr-Price)**

Το δείγμα σαπωνοποιείται, σύμφωνα με τα προηγούμενα και το υπόλειμμα μετά την εξάτμιση του αιθέρα, διαλύεται σε χλωροφόρμιο. Η προσθήκη του χλωροφόρμιου πρέπει να είναι άμεση για να αποφευχθεί τυχόν οξείδωση της βιταμίνης Α. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κυβέτα όπου προστίθεται τριχλωριούχο αντιμόνιο. Μετρείται η απορρόφηση στο λ=620 nm. Η βιταμίνη Α προσδιορίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

Β. Βιταμίνη D

1. Ιδιότητες

Απαντά υπό διάφορες μορφές κυριώτερες των οποίων είναι η D_2 και D_3.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Αυτές σχηματίζονται κατά την ακτινοβόληση της εργοστερόλης και 7-δεϋδροχοληστερόλης αντίστοιχα. Και οι δύο βιταμίνες έχουν την ίδια βιολογική δράση. Έλλειψη της (αδυναμία μετατροπής των προβιταμινών σε βιταμίνες λόγω ανεπαρκούς έκθεσης στην ακτινοβολία UV του ηλίου) προκαλεί ραχίτιδα. Η βιταμίνη D είναι σταθερώτερη της A. Απαντά στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του λίπους.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού

α. μέθοδος αέριας χρωματογραφίας[1].

Το δείγμα κατόπιν προσθήκης εσωτερικού προτύπου, σαπωνοποείται και το ασωπονοποίητο κλάσμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Οι στερόλες από το κλάσμα αυτό απομακρύνονται με καταβύθιση σαν παράγωγα της διγιτονίνης, πρώτα με 10% υδατικό διάλυμα μεθανόλης και στη συνέχεια με διάλυμα 4% διγιτονίνης σε 10% υδατικό διάλυμα μεθανόλης. Η βιταμίνη D ισομερίζεται προς ισοταχυστερόλη με διάλυμα τριχλωριούχου αντιμονίου και το ισόμερές διαχωρίζεται από τις βιταμίνες A και E με χρωματογραφία στήλης (αλουμίνα). Με επίδραση επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη σχηματίζεται το αλογονοπαράγωγο της ισοταχυστερόλης το οποίο εκχυλίζεαι με πετρελαϊκό αιθέρα και προσδιορίζεται με αέρια χρωματογραφία. Στήλη: 3% OV-17. Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

β. μέθοδος HPLC[8]

Η μέθοδος προβλέπει εκχύλιση και καθαρισμό του δείγματοςμε καταβύθιση των στερολών με διγιτονίνη, χρωματογραφία στήλης (αλουμίνα, παρασκευαστική HPLC κ.α.). Ακολουθεί χρωματογράφηση του δείγματος σε στήλες ποικίλης φύσης π.χ. Nucleosil 5 C_{18} με σύστημα έκλουσης CH_3OH/H_2O (95:5) και ανιχνευτή UV στο λ=254 nm.

Γ. Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες α,β,γ)

1. Ιδιότητες

Αποτελεί ομάδα βιολογικά δραστικών ουσιών, των τοκοφερολών. Απ' αυτές η πιο δραστική είναι η α-τοκοφερόλη, κίτρινο παχύρευστο λάδι, αδιάλυτο στο νερό, διαλυτό στην αλκοόλη και τον αιθέρα. Δρα σαν φυσικό αντιοξειδωτικό προστατεύοντας τα ακόρεστα λιπαρά οξέα από την οξείδωση. Απαντά στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του λίπους.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού

α. Μέθοδοι TLC[1]

Το δείγμα σαπωνοποιείται και το ασωπονοποίητο κλάσμα εκχυλίζεται με αιθέρα. Οι τοκοφερόλες α- και β- διαχωρίζοναι από τις λοιπές τοκοφερόλες με χρωματογραφία TLC, με σύστημα ανάπτυξης 15% αιθέρα σε πετρελαϊκό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αιθέρα. Οι κηλίδες διαλύονται σε αιθανόλη. Προστίθεται διάλυμα α-α'-διπυριδίνης, τριχλωριούχος σίδηρος και μετρείται η απορρόφηση στο λ=520 nm.
Η βιταμίνη Ε προσδιορίζεται ακόμα με χρωματογραφία HPLC[9].
Στο σχήμα 15-1β φαίνεται ο διαχωρισμός μίγματος υδατο-και λιποδιαλυτών βιταμινών με HPLC[10].

15.4 Εφαρμογές

Απ' όλες τις μεθόδους ανάλυσης των βιταμινών οι πιο συχνά εφαρμοζόμενη είναι εκείνη της HPLC[11]. Για παράδειγμα ο προσδιορισμός της βιταμίνης Α,[12] κατόπιν αλκαλικής υδρόλυσης του δείγματος, εκχύλισης του ασαπωνοποίητου κλάσματος με αιθέρα, εξάτμισης του αιθέρα, διάλυσης του υπολείμματος σε μεθανόλη και ανάλυσης σε στήλη 5-μm C_8, C_{18} ή C_{22}. Διαλύτης: μεθανόλη/νερό (90:10). Ανιχνευτής UV λ=313 nm· ο προσδιορισμός των καροτενίων[13] σε στήλη 5μm C_{18} με διαλύτη ακετόνη/νερό (95:5) και ανιχνευτή UV λ=440nm· ο προσδιορισμός των βιταμινών D_2 και D_3[12] σε στήλη 5μm C_{18} με την τεχνική της ανεστραμμένης φάσης με διαλύτη μεθανόλη/νερό και ανιχνευτή UV λ=280 nm· ο προσδιορισμός των τοκοφερολών σε φυτικά λάδια και ζωοτροφές[14-16]· ο προσδιορισμός της βιταμίνης D σε μαργαρίνη[17].
Παραδείγματα άλλων μεθόδων ανάλυσης περιλαμβάνουν: τον χαρτοχρωματογραφικό,[18] πολαρογραφικό[19] και ποτενσιομετρικό[20] προσδιορισμό της βιταμίνης C κ.τ.λ.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Osborne DR** and **Voogt P.** Analysis of Nutrients in Foods. Academic Press, London (1978)
2. **Bendelin F.J** and **Tuschhoff J.V** Anal. Chem. 25, 1198 (1953)
3. **Bessot L.** J. Pharm Chim. 9, 281 (1940)
4. **Graf E** and **Fiedler E** Arzneimittel-Forsch 3, 489 (1953)
5. **Joslyn M.A.** Methods in Food Analysis, Academic Press, London (1970)
6. **Γαλανού ΔΣ** και **Βουδούρη ΕΚ** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων. Αθήνα (1975)
7. **Freed M** (edit) Methods of Vitamin Assay, 3th edit, Wiley-Interscience, New York (1966)
8. **Borsje B, Craenen H.A.H., Esser RJE, Mulder FJ** and **de Vries EJ.** J. Assoc. Off Anal. Chem 61, 122(1978)
9. **Van Niekerk PJ.** Analyt Biochem. 52, 533 (1973)
10. **Waters Associates Inc.** Milford, Mass, Analysis of Pharmaceutical Products, Pamphlet N 68 Aug: (1976)
11. **Barnett SA, Frich LW.** and **Baine HM,** Analyt Chem. 52, 610 (1980)
12. **Wiggins RA, Zai ES** and **Lumley I:** Applications of Liquid Chromatography V. Marcel Dekker, London (1980)
13. **Zakaria M, Simpson K. Brown PR** and **Krstulovic A.,** J Chromatogr. 176, 117 (1979)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

14. **Abe K, Yuguchr Y** and **Katsui G,** J Nutr. Sci and Vitaminol. 21, 183 (1975)
15. **Cohen H** and **Lapointe M** J Agr. Food Chem. 26, 1210 (1978)
16. **Soderhjelm P** and **Anderson B.** J. Sci. Food. Agr. 29, 697 (1978)
17. **Van Niekerk PJ** and **Smit SU** J. Amer. Oil Chem. Soc. 417, Deci (1980)
18. **Strohecker R, Heimann W** and **Matt F** Z. Anal. Chem. 145, 401 (1955)
19. **Krauze S** and **Bozyk A** Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 50, 228 (1959)
20. **Spaeth E, Baptist V** and **Roberts M,** Anal. Chem. 34, 1342 (1962)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ

16.1. Οξυμετρία

Τα οργανικά οξέα διαδραματίζουν σύνθετο ρόλο στα τρόφιμα. Επηρεάζουν τη γεύση, το χρώμα, τη σταθερότητα και την ποιότητα των τελευταίων. Η ογκομετρούμενη οξύτητα κυμαίνεται στα τρόφιμα από 0.2% (μήλα) μέχρι 6% (λεμόνι). Η περιεκτικότητα σε οξέα σε σχέση προς το περιεχόμεννο σε σάκχαρα αποτελεί εξ άλλου κριτήριο ωριμότητας πολλών φυτικών προϊόντων. Όσον αφορά τη συνεισφορά των οξέων στη γεύση βρέθηκε πως η ολική οξύτητα (μη διϊστάμενα οξέα) συνεισφέρει περισσότερο στη πικρή γεύση των τροφίμων απ' ότι το pH (διϊστάμενα οξέα). Η παραπάνω διαπίστωση ισχύει για τρόφιμα που περιέχουν κιτρικό, γαλακτικό, μηλικό και τρυγικό οξύ.

Τα οξέα ακόμη επηρεάζουν έμμεσα τη θρεπτική αξία των τροφίμων παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας οξέων/βάσεων στον οργανισμό.

Σε προϊόντα ζύμωσης όπως το κρασί, η μπύρα κ.α. το περιεχόμενο σε πτητικά οξέα αποτελεί κριτήριο ποιότητας και καταλληλότητας. Η παρουσία ποσότητας έστω 0.1% οξικού οξέος αποτελεί ένδειξη αλλοίωσης των προϊόντων αυτών. Αντίστοιχα σε γαλακτοκομικά προϊόντα υψηλή περιεκτικότητα γαλακτικού οξέος αποτελεί ένδειξη αλλοίωσης από τα βακτήρια της γαλακτικής ζύμωσης. Η πτητική οξύτητα αποτελεί επίσης κριτήριο αλλοίωσης σε κονσερβοποιμένα ψάρια όπως τόνο, σολωμό, σαρδέλλες κ.α. Η συσσώρευση μυρμηκικού οξέος σε πολλά προϊόντα ζύμωσης, υποδηλώνει, αλλοίωση, λόγω παρουσίας βακτηρίων μια και οι ζύμες παράγουν μόνο ίχνη μυρμηκικού οξέος κατά τη ζύμωση.

Η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων σε μια λιπαρή ύλη αποτελεί ένδειξη υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων από τα ένζυμα λιπάσες μικροβιακής προέλευσης.

Τα οργανικά οξέα δυνατόν να απαντούν σαν φυσικά συστατικά των τροφίμων, δυνατόν να σχηματίζονται κατά τις διάφορες κατεργασίες π.χ. ζυμώσεις ή ακόμη να προστίθενται στα τρόφιμα οπότε θεωρούνται πρόσθετα συστατικά (βλ. κεφ. 17). Το φωσφορικό οξύ είναι το μόνο ανόργανο οξύ που προστίθεται στα τρόφιμα. Αντίθετα ποικιλία οργανικών οξέων, όπως το γαλακτικό, το

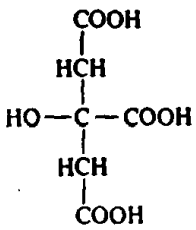
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

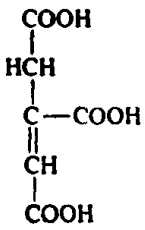
κιτρικό κ.α. προστίθενται ευρέως στα τρόφιμα σαν μέσα συντήρησης.
Τα οξέα που απαντούν στα τρόφιμα μπορούν να καταταγούν πολύ γενικά σε τρεις κατηγορίες:

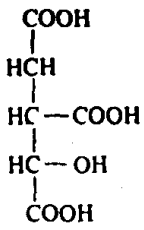
Α. Οξέα που απαντούν φυσικά στα φυτικά τρόφιμα (Πίνακας 16.1)
Β. Οξέα που παράγονται κατά την διάρκεια ζυμώσεων (Πίνακας 16.2)
Γ. Λιπαρά οξέα (Πίνακας 16.3)

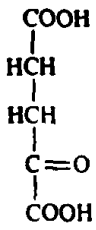
ΠΙΝΑΚΑΣ 16.1

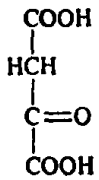
Άκυκλα και κυκλικά οξέα που απαντούν στα φυτικά τρόφιμα

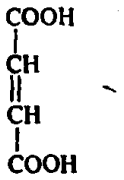

κιτρικό

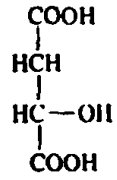

cis-ακονιτικό

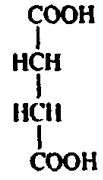

ισοκιτρικό

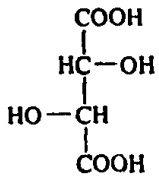

α-κετογλουταρικό


οξαλοξικό

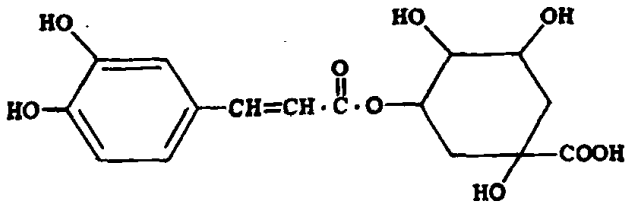

φουμαρικό

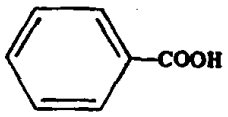

μηλικό


ηλεκτρικό


L-τρυγικό

οξαλικό


χλωρογενικό οξύ


βενζοϊκό οξύ

Από τα οξέα της πρώτης κατηγορίας πιο συχνά απαντούν από τα άκυκλα τα: κιτρικό, μηλικό και τρυγικό. Απ' αυτά το κιτρικό είναι συστατικό όλων των

ΠΙΝΑΚΑΣ 16.2

Οξέα που παράγονται κατά τη διάρκεια ζυμώσεων

$H \cdot COOH$	μυρμηκικό οξύ
$CH_3 \cdot COOH$	οξικό οξύ
$CH_3 \cdot CH_2 \cdot COOH$	προπιονικό οξύ
$CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH$	γαλακτικό οξύ
$CH_2 \cdot COOH \cdot CH_2 \cdot COOH$	ηλεκτρικό οξύ
$COOH \cdot CH{=}CH \cdot COOH$	φουμαρικό οξύ

ΠΙΝΑΚΑΣ 16.3

Λιπαρά οξέα που απαντούν στα τρόφιμα

βουτυρικό	$CH_3(CH_2)_2COOH$
σορβικό	$CH_3(CH{=}CH)_2COOH$
λαυρικό	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
μυριστικό	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
παλμιτικό	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
στεατικό	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
αραχιδικό	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
βεχενικό	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
λιγνοκερικό	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
παλμιτελαϊκό	$CH_3(CH_2)_5CH{=}(CH_2)_7COOH$
ελαϊκό	$CH_3(CH_2)_7CH{=}(CH_2)_7COOH$
λινελαϊκό	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
λινολενικό	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
ελαιοστεατικό	$CH_3(CH_2)_3CH{=}CHCH{=}CHCH{=}CH(CH_2)_7COOH$
αραχιδονικό	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$

φυτικών ιστών. Το μηλικό απαντά σε μεγάλες σχετικά ποσότητες στο λάχανο και το σπανάκι. Το τρυγικό απαντά σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα σταφύλια. Από τα κυκλικά το πιο διαδομένο είναι το βενζοϊκό που απαντά σε υψηλές συγκεντρώσεις στα μούρα, τα δαμάσκηνα κ.α.

Από τα οξέα της δεύτερης κατηγορίας πιο διαδομένα είναι το οξικό (προϊόν οξικής ζύμωσης), το γαλακτικό (προϊόν γαλακτικής ζύμωσης) και το βουτυρικό (προϊόν βουτυρικής ζύμωσης). Το τελευταίο ανήκει και στα λιπαρά οξέα. Τα οξέα της τρίτης κατηγορίας απαντούν υπό μορφή εστέρων στα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιποειδή και σε μικρότερη συχνότητα ελεύθερα. Από τα κορεσμένα τα πιο διαδομένα είναι το λαυρικό (C_{14}), το παλμιτικό (C_{16}) και το στεατικό (C_{18}). Από τα ακόρεστα οξέα τα πιο διαδομένα είναι τα ελαϊκό, λινελαϊκό και

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

λινολενικό (C_{18}) (περισσότερα για τα λιπαρά οξέα βλ. κεφ. 12).

16.2 Προσδιορισμός των οξέων

Η ανάλυση των οξέων μέχρι της εισαγωγής των χρωματογραφικών μεθόδων γινόταν κατόπιν εκχύλισής τους με νερό ή οργανικό διαλύτη ή με απόσταξη με υδρατμούς ή με καταβύθιση σαν άλατα του μολύβδου. Η ταυτοποίηση γινόταν με χημικά μέσα, κυρίως με σχηματισμό παραγώγων, με εξέταση χαρακτηριστικών σταθερών όπως το σ.ζ., κρυσταλλογραφία, οπτικές ιδιότητες κ.α.

Τα τελευταία χρόνια οι παραπάνω μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί σε σημαντικό βαθμό από τη χρωματογραφία: αέρια χρωματογραφία, TLC, χαρτιού, στήλης και ιονανταλλαγής.

Α. Ογκομετρούμενη οξύτητα

Για τον προσδιορισμό της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, ορισμένος όγκος διαλύματος που περιέχει το οξύ ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα βάσης μέχρις εξουδετέρωσης του οξέος στο ισοδύναμο σημείο. Το τελικό σημείο ανιχνεύεται χρωματομετρικά με χρήση κατάλληλου δείκτη, ηλεκτρομετρικά με συσκευή που μετρά τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων ή ποτενσιομετρικά με μέτρηση της μεταβολής του ηλεκτρικού δυναμικού στο τελικό σημείο.

Η ογκομέτρηση αποτελεί ακόμη και σήμερα την πιό συνηθισμένη μέθοδο προσδιορισμού της οξύτητας. Η ακρίβεια κατά την ογκομέτρηση εξαρτάται από τη συγκέντρωση του οξέος που θα προσδιοριστεί, τη συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος βάσης, καθώς και από το ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης των υδρογονοκατιόντων πλησίον του τελικού σημείου.

Για τον προσδιορισμό της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, αν τα προς ογκομέτρηση οξέα είναι υδατοδιαλυτά, παρασκευάζεται υδατικό εκχύλισμα του τροφίμου από το οποίο απομακρύνεται το περιεχόμενο CO_2 (που εισάγει θετικό σφάλμα στον προσδιορισμό, $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$), είτε με διαδοχικές μεταγγίσεις από υποδοχέα σε υποδοχέα, είτε με ισχυρή θέρμανση σε ανοιχτό δοχείο, είτε με συνεχή ανάδευση υπό κενό επί 1-2 min. Προσοχή πρέπει να δίνεται κατά τη θέρμανση, που αν παραταθεί συνεπάγεται την απώλεια των πτητικών οξέων. Για το σκοπό αυτό προστίθεται καλύτερα 200-300 ml προεξουδετερωμένου, πρόσφατα βρασμένου νερού ανά 10 ml εκχυλίσματος πριν από την ογκομέτρηση.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Αν το προς ογκομέτρηση εκχύλισμα είναι έγχρωμο λόγω παρουσίας χρωστικών, το τελικό σημείο γίνεται ασαφές. Στην περίπτωση αυτή το δείγμα αραιώνεται και κατεργάζεται με ενεργό αποχρωστικό άνθρακα πριν από την ογκομέτρηση.
Η έκφραση της οξύτητας γίνεται με βάση το σε μεγαλύτερη συγκέντρωση περιεχόμενο οξύ, π.χ. τρυγικό στο σταφύλι, κιτρικό στα εσπεριδοειδή, μηλικό στο μήλο κ.ο.κ.

Β. Πτητική οξύτητα

Το σύνολο των πτητικών οξέων σε φυτικής προέλευσης προϊόντα προσδιορίζεται με διαχωρισμό των οξέων αυτών με απ΄ ευθείας απόσταξη ή απόσταξη με υδρατμούς και ογκομέτρηση του αποστάγματος με πρότυπο διάλυμα βάσης παρουσία φαινολοφθαλεΐνης σαν δείκτη.
Η δυσκολία της μεθόδου έγκειται στο γεγονός της ταυτόχρονης απομάκρυνσης των λιγώτερο πτητικών οξέων, όπως το γαλακτικό καθώς και των SO_2, CO_2 κ.α.
Η πτητική οξύτητα εκφράζεται συνήθως σε οξικό οξύ.

Γ. Διαχωρισμός οξέων

Κατά την εξέταση ορισμένων τροφίμων, εκτός της ολικής ογκομετρούμενης και πτητικής οξύτητας επιζητείται ο διαχωρισμός και στη συνέχεια ο προσδιορισμός ενός εκάστου των οξέων π.χ. του οξικού, του μυρμηκικού κ.α. Στις περιπτώσεις αυτές εφαρμόζεται κλασματική απόσταξη, κλασματική καθίζηση των αλάτων των οξέων (Ag, Pb) κ.ο.κ.
Τα τελευταία χρόνια για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιείται η χρωματογραφία. Τεχνικές όπως η χρωματογραφία κατανομής σε Silica gel, η χρωματογραφία ιονανταλλαγής, η αέρια χρωματογραφία και η χρωματογραφία χαρτιού αντικαθιστούν ολοένα και περισσότερο τις παραπάνω κλασσικές μεθόδους, π.χ. ο διαχωρισμός του κιτρικού από το μηλικό οξύ επιτυγχάνεται με χρωματογραφία κατανομής σε Silica gel[1], ενώ ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των οξέων ηλεκτρικό, μηλικό, τρυγικό και κιτρικό, επιτυγχάνεται με αέρια χρωματογράφηση των τριμεθυλοπυριτικών παραγώγων τους[2].

Δ. Προσδιορισμός συγκεκριμένων οξέων.

1. Μυρμηκικό οξύ

α. Οξείδωση με άλας του Hg[3]

Το HCOOH οξειδώνεται παρουσία συνήθως οξικού υδραργύρου σύμφωνα με την αντίδραση 16.1

$$2Hg(CH_3COO)_2 + HCOOH \rightarrow CO_2\uparrow + 2Hg(CH_3COO) + 2CH_3COOH \quad (16.1)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το μυρμηκικό οξύ προσδιορίζεται (i) από το ποσόν του παραγόμενου CO_2 το οποίο παγιδεύεται σε διάλυμα 0.1N NaOH. Το τελευταίο ογκομετρείται με διάλυμα 0.1N HCl, παρουσία φαινολοφθαλεΐνης. (ii) από την ποσότητα της ανηγμένης ένωσης του Hg που παρήχθη.

β. αναγωγή του $HgCl_2$[4]

Το HCOOH ανάγει τον $HgCl_2$ σχηματιζόμενου αδιάλυτου Hg_2Cl_2 που αποχωρίζεται με διήθηση, έκπλυση και ζύγιση. Ο $HgCl_2$ προστίθεται σε περίσσεια. Η αντίδραση που λαβαίνει χώρα είναι η εξής:

$$2HgCl_2 + HCOOH \rightarrow Hg_2Cl_2 + CO_2 + 2HCl \qquad (16.2)$$

Το μυρμηκικό οξύ απομονώνεται κατ' αρχήν από το προϊόν με απόσταξη με υδρατμούς ή με συνεχή εκχύλιση με αιθέρα ή με απλή εκχύλιση με αιθέρα σε διαχωριστική χοάνη. Το οξύ απομακρύνεται από την αιθερική στοιβάδα κατόπιν έκπλυσης με αραιό άλκαλι. Το αλκαλικό εκχύλισμα εξατμίζεται και αντιδρά με $HgCl_2$ σε υδατόλουτρο.

2. Γαλακτικό οξύ

α. χρωματομετρικά

(i) το γαλακτικό οξύ με $FeCl_3$ δίνει κίτρινο χρώμα σε όξινο διάλυμα η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς του στο τρόφιμο.[5]

(ii) κατόπιν βρασμού με πυκνό H_2SO_4, το γαλακτικό οξύ μετατρέπεται σε CH_3CHO που προσδιορίζεται χρωματομετρικά από το ζωηρό μπλε χρώμα που παράγεται από την αντίδραση της ακεταλδεΰδης με ρ-υδροξυδιφαινύλιο.[6]

β. κατόπιν οξείδωσης με MnO_2 προς ακεταλδεΰδη[7]

Το γαλακτικό οξύ οξειδώνεται προς ακεταλδεΰδη παρουσία περίσσειας MnO_2. Η τελευταία οδηγείται σε περίσσεια $NaHSO_3$, σχηματιζόμενου αλδεϋδοσουλφονικού άλατος.

Το τελευταίο σε pH=8 ελευθερώνει τα δεσμευμένα SO_3^{2-}, τα οποία προσδιορίζονται ιωδιομετρικά, με πρότυπο διάλυμα I_2. Οι αντιδράσεις που λαβαίνουν χώρα έχουν ως εξής:

$$2CH_3{\cdot}CH_2OH{\cdot}COOH + MnO_2 + 2H^+ \longrightarrow Mn^{2+} + 2CH_3CHO + 2CO_2 + 2H_2O \qquad (16.3)$$

$$CH_3CHO + NaHSO_3 \longrightarrow CH_3C(H)(OH)-SO_3Na \qquad (16.4)$$

$$CH_3C(H)(OH)-SO_3Na + OH^- \xrightarrow{PH=8} CH_3CHO + SO_3^{2-} + Na^+ \qquad (16.5)$$

$$SO_3^{2-} + I_3^- + H_2O \longrightarrow 3I^- + SO_4^{2-} + 2H^+ \qquad (16.6)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το γαλακτικό οξύ παραλαμβάνεται από το τρόφιμο με αιθερική εκχύλιση. Από το εκχύλισμα αυτό απομακρύνονται κατόπιν καταβύθισης με $CaSO_4$ και $Ca(OH)_2$ τα οξέα: τρυγικό, μηλικό, ηλεκτρικό, κιτρικό κ.α. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φωσφοβολφραμικό οξύ, ενώ μικρές ποσότητες των σακχάρων απομακρύνονται κατόπιν καταβύθισης με το αντιδραστήριο $CuSO_4$ Van Slyke) + Ca $[OH]_2$ κατόπιν οξείδωσης προς οξαλικό οξύ παρουσία $KMnO_4$[8].

3. Τρυγικό οξύ

α) Κατόπιν καθίζησης σαν όξινο τρυγικό κάλιο, παρουσία περίσσειας KCl σε ορισμένο pH.

Το τρυγικό οξύ μετατρέπεται ποσοτικά σε όξινο τρυγικό κάλιο το οποίο στη συνέχεια καταβυθίζεται παρουσία περίσσειας KCl. (αντίδραση 16.7)

$$K^+ + HC_4H_4O_6^- \rightarrow KHC_4H_4O_6 \qquad (16.7)$$

Με ρύθμιση του pH η αντίδραση 16.7 είναι ποσοτική. Στα ώριμα σταφύλια, η οξύτητα είναι αρκετά χαμηλή και το τρυγικό οξύ απαντά σαν $HC_4H_4O_6^-$. Στα ανώριμα όμως σταφύλια η οξύτητα είναι υψηλότερη με αποτέλεσμα μέρος του τρυγικού οξέος να βρίσκεται σαν ελεύθερο, οπότε εισάγεται αρνητικό σφάλμα στον προσδιορισμό. Το όξινο τρυγικό κάλιο αφού απομονωθεί σε ιονανταλλακτική ρητίνη, προσδιορίζεται χρωματομετρικά ή ογκομετρικά, με NaOH.

β) κατόπιν καταβύθισής, του σαν τρυγικό μόλυβδο και προσδιορισμό του τελευταίου.

16.3 Αλκοολομετρία

Από τις αλκοόλες, εκείνες που απαντούν ελεύθερες στα τρόφιμα είναι συνήθως οι μεγάλου μοριακού βάρους αλκοόλες, όπως η μανιτόλη, σορβιτόλη, ινοσιτόλη κ.α. Από τις κατώτερες αλκοόλες απαντούν η αιθανόλη και η μεθανόλη, κυρίως σαν προϊόντα ζύμωσης ή προϊόντα αλλοίωσης, κατόπιν δράσης των μικροοργανισμών σε διάφορα τρόφιμα.

Η D-μανιτόλη απαντά σε πολλά φυτικά τρόφιμα όπως η βρώμη, οι ελιές, το σακχαροκάλαμο, τα καρότα, ο ανανάς κ.α. Η σορβιτόλη απαντά ευρέως στα φρούτα: μήλα, κεράσια, αχλάδια κ.α. Η ινοσιτόλη απαντά στο μυϊκό ιστό των ζώων, σαν μέρος του φωσφολιποειδούς, κεφαλίνη.

Η γλυκερίνη απαντά ενωμένη με λιπαρά οξέα υπό μορφή γλυκεριδίων στα λίπη και τα λάδια. Η αιθανόλη απαντά αφ' ενός σαν εστέρας με οξέα στους κηρούς και στους πτητικούς εστέρες, αφ' ετέρου ελεύθερη σε ζυμωμένα προϊόντα, όπως κρασί, μπύρα κ.α. σε ποσοστό 5-15% και σε αποστάγματα,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

όπως ούζο, μπράντυ κ.α. σε ποσοστό 35-50%.
Η μεθανόλη απαντά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στα αποστάγματα και τα διάφορα προϊόντα ζύμωσης και θεωρείται ότι προκύπτει από τη διάσπαση της πηκτίνης κατά τη ζύμωση. Συνήθως απαντά σαν εστέρας ($-OCH_3$) με οργανικά οξέα στα αλκαλοειδή, αιθέρια έλαια, πηκτινικές ουσίες χρωστικές φυτών κ.α. Τέλος οι αλκοόλες προστίθεται στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της παρασκευής τους, π.χ. η σορβιτόλη δρα σαν σταθεροποιητής και γλυκαντική ουσία σε γλυκίσματα και διαιτητικά τρόφιμα, σε αναψυκτικά, η γλυκερίνη σαν πλαστικοποιητής σε γλυκίσματα και μαστίχα, η αιθανόλη σαν διαλύτης για την εκχύλιση της βανίλιας, στα λικέρ κ.ο.κ.
Η περιεκτικότητα σε αλκοόλες πολλών τροφίμων αποτελεί κριτήριο ταυτότητας και ποιότητας των τελευταίων, π.χ. ο προσδιορισμός CH_3OH σε μπράντυ αποτελεί ένδειξη νοθείας του προϊόντος αυτού, διότι τα μπράντυ που παρασκευάζονται από ζύμωση φρούτων περιέχουν CH_3OH, ενώ εκείνα που παρασκευάζονται με βάση την καθαρή αλκοόλη δεν περιέχουν CH_3OH. Η περιεκτικότητα των θαλασσινών σε αιθανόλη αποτελεί δείκτη του βαθμού αποικοδόμησης των προϊόντων αυτών, μια και η ένωση αυτή σχηματίζεται κατά την αλλοίωσή τους. Το γλυκερινικό εξ άλλου περιεχόμενο του ξυδιού αποτελεί κριτήριο του βαθμού προόδου της αλκοολικής ζύμωσης.

16.4 Προσδιορισμός αλκοολών

Α. Αιθανόλη

Έχει πυκνότητα 0.7893 g/ml στους 20°C, σ.ζ. = 78.4°C σε p=760 mmHg και δείκτη διάθλασης για το φως της ημέρας, στους 18°C n=1.3614. Αναμιγνύεται με το νερό σ' όλες τις αναλογίες.
Οι μέθοδοι προσδιορισμού της αιθανόλης διακρίνονται σε **φυσικές** και **χημικές**. Στις πρώτες μετρείται κάποια φυσική ιδιότητα της αιθανόλης, όπως η πυκνότητα, το σ.ζ., ο δείκτης διάθλασης που μεταβάλλεται ανάλογα με το περιεχόμενο σε αιθανόλη του συγκεκριμένου τροφίμου ή ευφραντικού. Οι δεύτερες στηρίζονται στην οξείδωση της αιθανόλης συνήθως προς οξικό οξύ.

1. Φυσικές μέθοδοι

Για τα αλκοολούχα αποστάγματα, το κρασί, τη μπύρα, το ξύδι κ.α., η αιθανόλη προσδιορίζεται πυκνομετρικά, στο απόσταγμα του αντίστοιχου προϊόντος με τη βοήθεια αραιόμετρου ή πυκνόμετρου (βλ. κεφ. 8). Κατά την απόσταξη προσοχή πρέπει να δίνεται στην πιθανή συναπόσταξη ανωτέρων αλκοολών, εστέρων, πτητικών οξέων μαζί με την αιθανόλη, που εισάγουν θετικό σφάλμα στον προσδιορισμό. Από ειδικούς πίνακες με βάση το ε.β. υπολογίζεται η

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Σύγχρονη μέθοδο προσδιορισμού της αιθανόλης αποτελεί η αέρια χρωματογραφία.

2. Χημικές μέθοδοι

Στηρίζονται στην οξείδωση της αιθανόλης προς οξικό οξύ με περίσσεια διχρωμικού οξέος και προσδιορισμό της ποσότητας του διχρωμικού που καταναλώθηκε, είτε με προσδιορισμό της περίσσειας αυτού ογκομετρικά ή κατόπιν μέτρησης της μεταβολής στην απορρόφηση του διαλύματος που περιέχει το υπόλοιπο του διχρωμικού οξέος ή τέλος από το ποσόν του οξικού οξέος που παρήχθη.[10]

Β. Μεθανόλη

Συνήθως απαντά μαζί με την αιθανόλη. Προσδιορίζεται με διάφορες φυσικές και χημικές μεθόδους. Από τις φυσικές μεθόδους πιο διαδομένες είναι η διαθλασιμετρία και η αέρια χρωματογραφία.

Ο διαθλασιμετρικός προσδιορισμός της μεθανόλης παρουσία αιθανόλης, στηρίζεται στο γεγονός ότι οι δείκτες διάθλασης των δύο διαφέρουν αισθητά (1.328 έναντι 1.361), ενώ έχουν παραπλήσια πυκνότητα (0.796 έναντι 0.794). Από τις τιμές της πυκνότητας του μίγματος μεθανόλη/αιθανόλη/νερό και του δείκτη διάθλασης του ιδίου μίγματος με διαθλασίμετρο εμβάπτισης υπολογίζεται η αναλογία/ποσότητα των δύο αλκοολών.[11]

Ο παραπάνω προσδιορισμός βασίζεται στην υπόθεση ότι η προσθήκη μεθανόλης σε αιθανόλη ελαττώνει τον δείκτη διάθλασης του μίγματος, ανάλογα προς την προστιθέμενη ποσότητα της πρώτης.

Αεριοχρωματογραφικά η μεθανόλη σε μίγμα με νερό και ακεταλδεΰδη προσδιορίζονται σε στήλη Porapak Q.[12]

Χημικά η μεθανόλη παρουσία αιθανόλης, προσδιορίζεται κατόπιν εκλεκτικής οξείδωσης προς φορμαλδεΰδη με $KMnO_4$ και ακόλουθο χρωματομετρικό προσδιορισμό της HCHO, κατόπιν προσθήκης σ' αυτήν χρωμοτροπικού οξέος, στο λ=575 nm.[13]

Γ. Γλυκερίνη

Προσδιορίζεται με φυσικές και χημικές μεθόδους. Από τις φυσικές μεταξύ χρωματομετρίας, αέριας χρωματογραφίας και φθορισμομετρίας, πιο διαδομένη είναι η τελευταία. Σ' αυτήν η γλυκερίνη οξειδώνεται προς φορμαλδεΰδη παρουσία HIO_4. Η τελευταία αντιδρά με 2,4 πεντανοδιόνη και NH_3 για το σχηματισμό του φθορίζοντος χρωμοφόρου 1,2 διακετυλ-1,4-διϋδρολουτιδίνη.[14].

Χημικά η γλυκερίνη προσδιορίζεται κατόπιν οξείδωσης με διχρωμικό κάλιο. Η περίσσεια του αντιδραστηρίου αυτού προσδιορίζεται ογκομετρικά με πρότυπο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

διάλυμα $FeSO_4$, παρουσία σιδηροκυανιούχου καλίου σαν δείκτη.[15] Η βασική αντίδραση που λαβαίνει χώρα έχει ως εξής:

$$3\ C_3H_8O_3 + 7Cr_2O_7^{2-} + 46\ H^+ \rightarrow 9CO_2 + 14\ Cr_3^+ + 40\ H_2O \qquad (16.8)$$

Για τον προσδιορισμό της γλυκερίνης απαιτείται προηγουμένως η απομάκρυνση των σακχάρων και των άλλων παρεμποδιζουσών ουσιών.

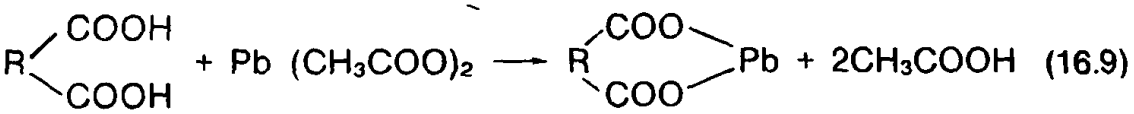
Δ. Ανώτερες αλκοόλες

Προσδιορίζονται αεριοχρωματογραφικά και χημικά/χρωματομετρικά. Στη δεύτερη περίπτωση οι ανώτερες αλκοόλες αντιδρούν, κατόπιν απόσταξης, με θειϊκό οξύ εν θερμώ, για να δώσουν έγχρωμα προϊόντα που προσδιορίζονται χρωματομετρικά.[16]

16.5 Εφαρμογές

Α. Οξυμετρία

Για τον προσδιορισμό της οξύτητας στο χυμό πορτοκαλιού και άλλων φρούτων[17] το προϊόν αντιδρά με οξικό μόλυβδο για το σχηματισμό αλάτων του μολύβδου, με σύγχρονη απελευθώρωση οξικού οξέος, σύμφωνα με την αντίδραση 16.9



(16.9)

Μετά την καταβύθιση των αλάτων του μολύβδου ακολουθεί διήθηση και ογκομέτρηση του διηθήματος. Το απελευθερούμενο οξικό οξύ δίνει με αρκετή ακρίβεια την οξύτητα του προϊόντος.

Η οξύτητα των σιτηρών[18] προσδιορίζεται κατόπιν εκχύλισης των οξέων με πετρελαϊκό αιθέρα, εξάτμισης του τελευταίου, διάλυσης του υπολείμματος σε μίγμα βενζολίου/αιθανόλης και ογκομέτρησης του διαλύματος με NaOH παρουσία φαινολοφθαλεΐνης.

Στο ξύδι τα πτητικά οξέα προσδιορίζονται εκ διαφοράς στην ολική οξύτητα πριν και μετά την εξάτμιση των πτητικών οξέων. Η εξάτμιση γίνεται σε κάψα πορσελάνης μέχρις ξηρού, οπότε προστίθεται μικρή ποσότητα νερού και η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνολικά πέντε φορές.

Στο κρασί[19] και τ' άλλα προϊόντα ζύμωσης η πτητική οξύτητα προσδιορίζεται κατόπιν απόσταξης με υδρατμούς. Στα αυγά[20] το γαλακτικό και ηλεκτρικό οξύ προσδιορίζονται κατόπιν εκχύλισης με απόλυτο αιθέρα και μετατροπής, μέσω εστεροποίησης, σε προπυλεστέρες. Σε διάφορα προϊόντα ζύμωσης[21] τα: μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ προσδιορίστηκαν αεριοχρωματογραφικά. Στον καφέ[22] το περιεχόμενο σε οξέα συσχετίστηκε με το βαθμό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

καβουρντίσματος του προϊόντος αυτού. Στα αχλάδια[23] προσδιορίστηκαν τα μη πτητικά οξέα σε σχέση με την αποικοδόμηση του φυτικού ιστού. Στους χυμούς φρούτων[24] ο προσδιορισμός των οξέων χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό συγκεκριμένων χυμών. Τέλος για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων σε λιπαρά τρόφιμα βλ. κεφ. 13.

Β. Αλκοολομετρία

Η αλκοόλη στο κρασί, στη μπύρα και σε αποστάγματα έχει προσδιοριστεί με αέρια χρωματογραφία[25,28] κατόπιν χημικής οξείδωσης[10], πυκνομετρικά[26,27] και διαθλασιμετρικά[29,30]. Η μεθανόλη έχει προσδιοριστεί σε αποστάγματα (μπράντυ, ουίσκυ, βότκα) φασματοφωτομετρικά[31], αεριοχρωματογραφικά[12] και χημικά, κατόπιν εκλεκτικής οξείδωσης προς HCHO με $KMnO_4$[13]. Η γλυκερίνη σε κρασί κατόπιν οξείδωσης με διχρωμικό οξύ[32] και φθορισμομετρικά[14]. Τέλος οι ανώτερες αλκοόλες σε αποστάγματα χρωματομετρικά[16,33] (βλ. κεφ. 16.4 Δ).

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Hulme AC** Advan. Appl. Microbiol. 3, 343 (1961)
2. **Brunelle RL, Schoeneman RL** and **Martin GE** J. Assoc. Off Anal. Chem. 50, 329 (1967)
3. **Reid JD** and **Weihe HD.** Ind. Eng. Chem Anal Ed. 10, 271 (1938)
4. **Hillig F** and **Clark EP** J Assoc Off. Agr. Chem. 21, 688 (1938)
5. **Hillig P** J. Assoc Off Agr. Chem. 20, 130 (1937)
6. **Barker SB** and **Summersan WH** J. Biol. Chem. 138, 535 (1941)
7. **Friedemann TE, Cotonio M** and **Shaffer PA** J. Biol. Chem 73, 335 (1927)
8. **Hartmann BG** and **Hillig F** J. Assoc. Off Agr. Chem. 16, 435 (1933)
9. **Stockwell PB** and **Sawyer R** Anal. Chem. 42, 1136 (1970)
10. **Caputi A, Keda M** and **Brown T** J. Assoc. Off Anal. Chem 52, 85 (1968)
11. **Williams JP** Ind Eng Chem. 19, 844 (1927)
12. **Dyer RH** J. Assoc Off. Anal Chem 55, 564 (1972)
13. **Mathers AP** J Assoc. Off Agr. Chem. 41, 121 (1958)
14. **Avellini P, Damiani P** and **Burini G** J. Assoc. Off Anal. Chem 60, 536 (1977)
15. **Schaefer WE** Ind. Eng. Chem Anal. Ed. 9,449 (1937)
16. **Singer DD** and **Stiles JW** Analyst 90, 290 (1965)
17. **Hartmann BG** and **Hillig F.** J. Assoc. Off Agr. Chem. 13, 103 (1930b)
18. **AOAC**, Assoc. Off Anal. Chem. Washinghton DI. (1975)
19. **Amerine MA Ough CS.** Wine and Must Analysis, Wiley-Intersience, New York (1974)
20. **Salwin M** and **Bond Jr** J. Assoc. Off. Anal. Chem 52, 41 (1969)
21. **Shelley RN, Salwin H** and **Horwitz W** J Assoc Off Agr. Chem 46, 48 (1963)
22. **Lentner C** and **Deatherage FE** Food Res. 24, 283 (1959)
23. **Williams MW** and **Patterson ME** J. Agr. Food Chem 12, 80 (1964)
24. **Jorysch D** J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 42, 331 (1959)
25. **Bouthilet RJ, Caputi A** and **Ueda M** J. Assoc. Offic Agr. Chem. 44, 410 (1961)
26. **Jaulmes P** and **Brun S** Ann. Fals. Expert. Chem 56, 129 (1963)
27. **Rankine B** Austr. Brew Wine J. 71, 20 (1953)
28. **Morrison RL** Amer. J. Enol. Viticult. 12, 101 (1961)
29. **Williams JF** Ind. Eng. Chem. 19, 844 (1927)
30. **Jaulmes P, Grun S** and **Laval JP** Ann. Fals, Expert Chem. 58, 304 (1965)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

31. **Beyer GF** J Assoc Off Agr. Chem. 34, 745 (1951)
32. **Amerine Ma** and **Dietrich WC** J. Assoc Off. Agr. Chem. 26, 400 (1943)
33. **Boruff Cs** J. Assoc. Off Agr. Chem. 42, 331 (1959)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΠΡΟΣΘΕΤΩΝ

17.1 Εισαγωγή

Με τον όρο **πρόσθετα** νοούνται οι ουσίες που προστίθενται στα τρόφιμα για τη βελτίωση της εμφάνισης, της υφής, της γεύσης, της οσμής, της θρεπτικής αξίας καθώς και της ικανότητας συντήρησης των τροφίμων. Τα πρόσθετα δυνατόν να προστεθούν στα τρόφιμα κατά τα στάδια της παραγωγής, κατεργασίας, συσκευασίας ή και αποθήκευσης των τελευταίων. Αντίστοιχα **κατάλοιπα** είναι ουσίες που καταλήγουν στα τρόφιμα χωρίς πρόθεση. Τέτοιες ουσίες είναι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων, οι τοξίνες, προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών, μέταλλα όπως Sn, Fe, οργανικοί διαλύτες, μονομερή πολυμερικών υλικών κ.α.

Η χρήση όλων των παραπάνω ουσιών ελέγχεται από κρατικούς οργανισμούς, όπως το Γενικό Χημείο του Κράτους, το Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο, κ.α. κατόπιν πειραμάτων που διεξάγονται σε πειραματόζωα για τον καθορισμό της ασφάλειας κάθε ουσίας που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Τα τελευταία χρόνια έχει καθιερωθεί διεθνώς η εξής διαδικασία: Ο παραγωγός που πρόκειται να κυκλοφορήσει στην αγορά προϊόν που περιέχει κάποιο καινούργιο πρόσθετο, να υποχρεούται μαζί με πλήρη ανάλυση της σύστασης του προϊόντος να προσκομίζει αποδεικτική βεβαίωση, στηριζόμενη σε πειραματικά δεδομένα όσον αφορά την ασφάλεια του εν λόγω προσθέτου σε σχέση με την υγεία του καταναλωτή.

Με βάση τα παραπάνω, διεθνείς οργανισμοί όπως οι FAO, WHO, EEC[1] κ.α, καταρτίζουν ειδικούς πίνακες με τις επιτρεπόμενες, για τρόφιμα, ουσίες τους οποίους οφείλουν να ακολουθούν οι παραγωγοί τροφίμων.

Οι σπουδαιότερες κατηγορίες προσθέτων είναι τα χημικά συντηρητικά, οι χρωστικές, τα αντιοξειδωτικά, οι σταθεροποιητές, οι γαλακτοματοποιητές, οι γλυκαντικές ύλες, καταλοίπων δε, οι οργανικοί διαλύτες, κ.α.

Στη συνέχεια θ' αναπτυχθούν οι σπουδαιότεροι εκπρόσωποι των κατηγοριών αυτών.

17.2 Χημικά συντηρητικά

Κυριώτερα απ' αυτά είναι το διοξείδιο του θείου, το βενζοικό οξύ/Νάτριο, το

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σορβικό οξύ/Κάλιο, τα νιτρώδη και νιτρικά άλατα κ.α.

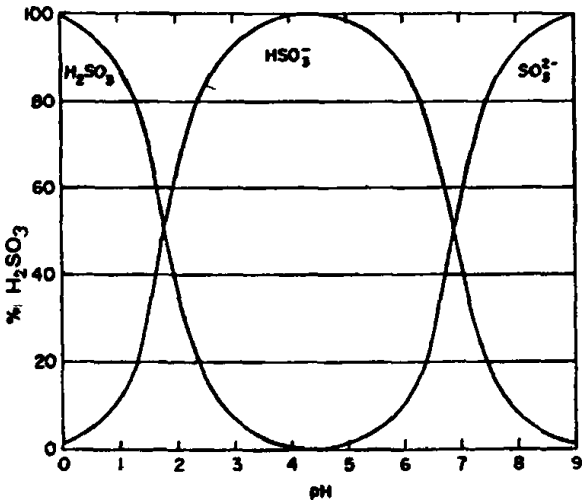
Α. Διοξείδιο του θείου

Χρησιμοποιείται υπό μορφή αερίου ή διαλύματος σαν θειώδες οξύ ή θειώδες νάτριο. Προσδιορίζεται πάντοτε σαν διοξείδιο του θείου. Οι πλέον δραστικές μορφές του SO_2 είναι το H_2SO_3 και κατά δεύτερο λόγο η $(HSO_3)^-$. Σε υδατική φάση επέρχεται ισορροπία μεταξύ όλων των παραπάνω μορφών. Η ισορροπία εξαρτάται από το pH του διαλύματος (Σχ. 17-1). Σε χαμηλό pH ενισχύεται η δράση του θειώδους οξέος. Σε αλκαλικό pH τα άλατα του θειώδους οξέος αντιδρούν με συστατικά των τροφίμων που περιέχουν ελεύθερες καρβονυλομάδες, ακόρεστους δεσμούς C-C ή αμινομάδες και δίνουν δεσμευμένες μορφές του SO_2 που δεν έχουν συντηρητική δράση.

1) Ποιοτικός προσδιορισμός

(α) Το τρόφιμο υπό μορφή αιωρήματος αναμιγνύεται με πράσινο του μαλαχίτη. Παρουσία SO_2, ο τελευταίος αποχρωματίζεται.

(β) Το SO_2 ανάγεται παρουσία Zn και 20% HCl. Το παραγόμενο H_2S ανιχνεύεται με χαρτί οξικού μολύβδου από τον σχηματισμό μαύρου ιζήματος του PbS.



Σχ. 17-1. Κατανομή διαφορετικών μορφών του H_2SO_3 σε διάφορα pH.

2) Ποσοτικός προσδιορισμός

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του διοξειδίου του θείου μπορεί να είναι άμεσες ή έμμεσες. Οι άμεσες συνήθως είναι ογκομετρικές, χρωματομετρικές, ηλεκτρομετρικές κ.α., ενώ οι έμμεσες περιλαμβάνουν την απομάκρυνση του SO_2 με απόσταξη και παγίδευσή του σε οξειδωτικό παράγοντα, όπως I_2 ή H_2O_2. Το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίζεται ογκομετρικά, σταθμικά, χρωματομετρικά ή ηλεκτρομετρικά. Το SO_2 υπολογίζεται από τη στοιχειομετρία των παραπάνω αντιδράσεων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(α) Ελεύθερο θειώδες (SO_2)

Προσδιορίζεται άμεσα κατόπιν ογκομέτρησης με πρότυπο διάλυμα I_2, παρουσία περίσσειας H_2SO_4 και αμύλου σαν δείκτη.[3] Έμμεσα προσδιορίζεται κατόπιν διέλευσης αδρανούς αζώτου μέσω του υγρού τροφίμου (pH=1), οξινισμένου με H_2SO_4 και παγίδευσης του SO_2 σε αλκαλικό διάλυμα γλυκερίνης, όπου και υπολογίζεται κατόπιν ογκομέτρησης με I_2.

(β) Ολικό Θειώδες

Μέρος του θειώδους οξέος βρίσκεται δεσμευμένο από τις καρβονυλικές ενώσεις από όπου πρέπει να απελευθερωθεί. Η απόσπαση γίνεται παρουσία αλκάλεως (pH=13), σύμφωνα με την αντίδραση:

$$\begin{matrix} HO \\ \diagdown \\ RCH \\ \diagup \\ SO_3H \end{matrix} + 2KOH \rightarrow RCHO + KHSO_3 + H_2O \qquad (17.1)$$

Το σχηματιζόμενο $KHSO_3$ κατόπιν οξίνισης δίνει H_2SO_3:

$$2KHSO_3 + H_2SO_4 \rightarrow 2H_2SO_3 + K_2SO_4 \qquad (17.2)$$

Τέλος το παραγόμενο H_2SO_3 ογκομετρείται[4] με διάλυμα I_2:

$$H_2SO_3 + I_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4 + 2HI \qquad (17.3)$$

Έμμεσα το SO_2 προσδιορίζεται κατόπιν απόσταξης από το δείγμα και διοχέτευσης σε πρότυπο διάλυμα I_2 του οποίου η περίσσεια ογκομετρείται με διάλυμα $Na_2S_2O_3$ (Μέθοδος Monier-Williams)[5]. Παραλλαγή της μεθόδου αυτής αποτελεί η μέθοδος Shipton στην οποία το αποστάζον SO_2 συλλέγεται σε οξειδωτικό διάλυμα (H_2O_2) μέσα σε υποδοχείς σχήματος U, όπου μετατρέπεται σε H_2SO_4. Το τελευταίο ογκομετρείται με πρότυπη βάση[6]. Παρόμοια είναι και η μέθοδος Tanner που έχει υιοθετηθεί από την ΕΟΚ[7]. Τέλος σύμφωνα με τη χρωματομετρική μέθοδο των Nauman et al.[8], το SO_2 απελευθερώνεται από το τρόφιμο με προσθήκη ισχυρού οξέος παρουσία τετραχλωροϋδραργυρικού νατρίου, που δρα σαν δεσμευτικό μέσον και στη συνέχεια με προσθήκη p-ροζανιλίνης και φορμαλδεΰδης σχηματίζεται σουλφονικό οξύ μώβ χρώματος, η απορρόφηση του οποίου μετρείται στο λ=550 nm.

Β. Νιτρώδη και Νιτρικά άλατα (NO_2^-, NO_3^-)

Τόσο τα νιτρώδη όσο και τα νιτρικά άλατα του Na ή K χρησιμοποιούνται επί σειρά ετών σαν συντηρητικά σε κρεατοσκευάσματα και λιγώτερο σε τυριά. Στα πρώτα, η ανώτατη επιτρεπόμενη τιμή είναι 500 mg/kg για το $NaNO_3$ και 200 mg/kg για το $NaNO_2$, ενώ για τα δεύτερα οι αντίστοιχες τιμές είναι 100 mg/kg και 10 mg/kg. Τα άλατα αυτά προκαλούν αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου Clostridium Botulinum το οποίο παράγει τη θανατηφόρο τοξίνη της

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αλλαντίασης. Επιπλέον συνεισφέρουν στο χρώμα και τη γεύση των παραγομένων κρεατοσκευασμάτων, λόγω σχηματισμού της, ροζ χρώματος, νιτρωδομυογλοβίνης σε προϊόντα όπως το ζαμπόν, το μπέικον κ.α.

Για τον προσδιορισμό τόσο των νιτρωδών, όσο και των νιτρικών αλάτων απαιτείται κατ' αρχήν εκχύλισή τους από το τρόφιμο. Το τελευταίο κατεργάζεται με ζεστό νερό σε pH >5 για την ελαχιστοποίηση των απωλειών των νιτρωδών. Ακολουθεί απομάκρυνση της υδατοδιαλυτής πρωτεΐνης, κατόπιν καταβύθισης της τελευταίας στο ισοηλεκτρικό σημείο pH=5.5-6.5. Τέλος το εκχύλισμα διαυγάζεται, είτε με $HgCl_2$, είτε με το αντιδραστήριο Carrez (οξικός ψευδάργυρος και σιδηροκυανιούχο κάλιο) και διηθείται.

1) Προσδιορισμός νιτρωδών

Τόσο η ανίχνευση όσο και ο προσδιορισμός των νιτρωδών στηρίζεται στη διαζώτωση (μέθοδος Griess-Illosvay)[9].

Στην αντίδραση δηλαδή των NO_2^- με αρωματικές αμίνες παρουσία περίσσειας ανοργάνου οξέος, οπότε σχηματίζεται διαζωνιακό άλας, σύμφωνα με την αντίδραση:

$$C_6H_5NH_2.HCl + NaNO_2 + HCl \rightarrow C_5H_5\overset{+}{N_2}Cl^- + NaCl + 2H_2O \qquad (17.4)$$

Σύζευξη, στη συνέχεια του διαζωνιακού άλατος με αρωματικές αμίνες ή φαινόλη, δίνει αζώχρωμα, η απορρόφηση του οποίου μετρείται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

$$C_6H_5N_2Cl + ArN(CH_3)_2 \rightarrow HCl + C_6H_5N{=}N\ C_6H_5N(CH_3)_2 \qquad (17.5)$$

2) Προσδιορισμός νιτρικών

Γίνεται συνήθως χρωματομετρικά και στηρίζεται (α) στη νίτρωση αρωματικών ενώσεων παρουσία H_2SO_4, (β) στην οξείδωση αρωματικών αμινών παρουσία H_2SO_4 και (γ) σε αντιδράσεις αναγωγής προς παραγωγή NH_3 ή NO_2^-. Οι τελευταίες μεθόδοι είναι και οι πιό ακριβείς. Σαν αναγωγικά μέσα χρησιμοποιούνται τα μέταλλα Zn, Cd, Ag κ.α. Το εκχύλισμα (βλ. παραπάνω) του τροφίμου διαβιβάζεται μέσω στήλης που περιέχει το αναγωγικό μέταλλο (π.χ. Cd)[9]. Στο προϊόν έκλουσης της στήλης προσδιορίζονται τα νιτρώδη, σύμφωνα με όσα ελέχθηκαν παραπάνω.

Η ανίχνευση των νιτρικών στηρίζεται στην οξείδωση του Fe^{2+} προς Fe^{3+} από τα NO_3^- σε ισχυρά όξινο (με πυκνό H_2SO_4) περιβάλλον, σύμφωνα με την αντίδραση:

$$Fe^{2+} + H^+ + HNO_3 \longrightarrow NO_2 + H_2O + Fe^{3+} \qquad (17.6)$$

Παρουσία περίσσειας Fe^{2+} σχηματίζεται το καστανού χρώματος $[Fe(NO_2)]^{2+}$ που δείχνει την ύπαρξη νιτρικών στο δείγμα.

$$Fe^{2+} + NO_2 \longrightarrow [Fe(NO_2)]^{2+} \qquad (17.7)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Γ. Βενζοϊκό οξύ

Το βενζοϊκό οξύ $C_6H_5.COOH$ και το μετά Na άλας του χρησιμοποιούνται ευρέως σαν αντιμικροβιακοί παράγοντες στην αναστολή ανάπτυξης των μυκήτων και ζυμομυκήτων σε προϊόντα όπως χυμοί φρούτων, μαρμελάδες μαργαρίνη. Το βενζοϊκό Νάτριο είναι πιο διαδομένο σαν συντηρητικό γιατί είναι πιο ευδιάλυτο απ' ότι το αντίστοιχο οξύ. Η δραστικότητα του συντηρητικού αυξάνει σε χαμηλά pH ($2.5<pH<4$). Ακόμη χρησιμοποιούνται τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος: ρ-υδροξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας και ρ-υδροξυβενζοϊκός προπυλεστέρας που επίσης παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση.

Το βενζοϊκό οξύ προσδιορίζεται ογκομετρικά ή φασματοφωτομετρικά κατόπιν απ'ευθείας εκχύλισης και ογκομέτρησης με άλκαλι (άμεση μέθοδος) ή κατόπιν απόσταξης με υδρατμούς και ογκομέτρησης με άλκαλι (έμμεση μέθοδος).

Στην άμεση μέθοδο[9] που εφαρμόζεται στα αναψυκτικά, τα κρασιά κ.α. το βενζοϊκό οξύ εκχυλίζεται απ' ευθείας από το δείγμα με μίγμα αιθέρα/πετρελαϊκού αιθέρα ή αιθέρα/εξανίου (3:1) κατόπιν οξίνισης με αραιό H_2SO_4 και κορεσμού με άλας. Στο εκχύλισμα προστίθεται $KMnO_4$ που καταστρέφει τα παρεμποδίζοντα οξέα. Η περίσσεια του $KMnO_4$ ανάγεται με SO_2. Το βενζοϊκό οξύ παραλαμβάνεται με νέα εκχύλιση με αιθέρα, ο διαλύτης εξατμίζεται, το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε ακετόνη και ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα NaOH.

Στην έμμεση μέθοδο που εφαρμοζεται σε ιξώδη τρόφιμα, τα πηκτικά οξέα απομακρύνονται κατόπιν απόσταξης με υδρατμούς. Το απόσταγμα κατεργάζεται με $KMnO_4$, όπως παραπάνω. Το βενζοϊκό οξύ παραλαμβάνεται με νέα εκχύλιση με αιθέρα, ο διαλύτης εξατμίζεται, το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε μίγμα χλωροφορμίου/αιθανόλης και στο διάλυμα προσδιορίζεται το βενζοϊκό οξύ ογκομετρικά,[9] χρωματομετρικά,[10] αεριοχρωματογραφικά[10] ή με HPLC[10].

Δ. Σορβικό οξύ

Χρησιμοποιείται συνήθως υπό τη μορφή άλατος και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για την αναστολή ανάπτυξης των μυκήτων καί ζυμομυκήτων. Χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στα τυριά, όπου δεν παρεμποδίζει την επιθυμητή δράση των γαλακτοβακίλλων.

Το σορβικό οξύ προσδιορίζεται κατόπιν απόσταξης με υδρατμούς σε όξινο περιβάλλον όπως και το βενζοϊκό οξύ[9,11] με τη διαφορά ότι το απόσταγμα δεν κατεργάζεται με $KMnO_4$. Στο απόσταγμα το σορβικό οξύ προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στο UV. σε pH=2-4 ή κατόπιν οξείδωσης με διχρωμικό οξύ προς μαλοναλδεΰδη, η οποία κατόπιν αντίδρασης με θειοβαρβιτουρικό

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

οξύ δίνει κόκκινο χρώμα που απορροφά στο λ=532 nm.
Η ανίχνευση του σορβικού οξέος γίνεται με χαρτοχρωματογραφία. Το συμπυκνωμένο όξινο (με αραιό HCl) χλωροφορμικό εκχύλισμα του δείγματος συγχρωματογραφείται με πρότυπο σορβικό οξύ σαν μάρτυρα. Σαν κινητή φάση χρησιμοποιείται η πάνω στοιβάδα μίγματος βουτανόλης/αμμωνίας/νερού (5:2:3) και σαν αντιδραστήριο εμφάνισης (1) μίγμα $K_2Cr_2O_7$ και H_2SO_4 (1:1) και (2) όξινο διάλυμα 2-θειοβαρβιτουρικού Νατρίου.

17.3 Χρωστικές

Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα είναι φυσικές ή συνθετικές (βλ. κεφ. 20). Κρατικοί οργανισμοί όπως το F.D.A. (Υπηρεσία ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων, ΗΠΑ), Γενικό Χημείο του Κράτους κ.α. κατά καιρούς αναπροσαρμόζουν τον κατάλογο των επιτρεπόμενων, για προσθήκη στα τρόφιμα, χρωστικών με σκοπό την διασφάλιση της υγείας του καταναλωτικού κοινού.

(Α) Συνθετικές χρωστικές

Η γενική διαδικασία προσδιορισμού των χρωστικών περιλαμβάνει:
(1) Προκατεργασία του δείγματος του τροφίμου
(2) Εκχύλιση της χρωστικής και καθαρισμό
(3) απομόνωση της υπό μελέτη χρωστικής από άλλες χρωστικές που τυχόν συνυπάρχουν στο δείγμα
(4) ταυτοποίηση και προσδιορισμό
(α) για τα διαλυτά στο νερό: Η προκατεργασία των τροφίμων προβλέπει: διαλυτοποίηση ή αραίωση του δείγματος σε ζεστό νερό και έκλουση μέσω στήλης πολυαμιδίου για την προσρόφηση των χρωστικών.[9,12] Ακολουθεί εκρόφηση των χρωστικών με μεθανολικό διάλυμα NaOH, εξουδετέρωση του pH με CH_3COOH, εξάτμιση μέχρι ξηρού και ταυτοποίηση ή προσδιορισμός με την επιλεγείσα μέθοδο
(β) για στερεά, αμυλούχα τρόφιμα: κατεργασία με μίγμα μεθανόλης/αμμωνίας για την καταβύθιση του αμύλου, διήθηση, ρύθμιση του pH (5-6) στο διήθημα, αραίωση και έκλουση μέσω στήλης πολυαμιδίου όπως παραπάνω.
(γ) Για δείγματα περιέχοντα λίπος ή και μυϊκό ιστό: άλεση του δείγματος με άμμο και ακετόνη σε γουδί, εκχύλιση του λίπους με ακετόνη, άλεση του υπολείμματος, προσθήκη μίγματος μεθανόλης/αμμωνίας για την απελευθέρωση των χρωστικών από τις πρωτεΐνες, ρύθμιση του pH(5-6) και έκλουση μέσω στήλης πολυαμιδίου όπως παραπάνω.
Η παλαιότερα χρησιμοποιούμενη τεχνική της βαφής απολιπασμένου μαλλιού[13] για την παραλαβή των χρωστικών έχει αντικατασταθεί από την παραπάνω

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τεχνική προσρόφησης-εκρόφησης των χρωστικών σε στήλη πολυαμιδίου καθώς επίσης και από τη χρήση ενζύμων για την απελευθέρωση των χρωστικών από τρόφιμα πλούσια σε άμυλο και πρωτεΐνες.[14]
Ο διαχωρισμός των χρωστικών μεταξύ τους και η ταυτοποίηση κάθε μιας γίνεται κυρίως με TLC[15,16] και HPLC.[17,18] Παλαιότερα για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιείτο η χρωματογραφία. Στατικές φάσεις στην TLC ποικίλλουν από Silica gel, κυτταρίνη κ.α., ενώ από τα συστήματα διαλυτών γενικής χρήσης φαίνεται να είναι το μίγμα προπανόλης/αμμωνίας (4:1). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των χρωστικών χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά η HPLC[14,19] με τη μέθοδο του εσωτερικού πρότυπου ή της πρότυπης καμπύλης.

(Β) Φυσικές χρωστικές

Από τις φυσικές χρωστικές, τα καροτινοειδή προσδιορίζονται υπό μορφή Βιταμίνης Α (βλ. κεφ. 15). Οι ανθοκυανίνες εκχυλίζονται με μεθανόλη σε όξινο περιβάλλον και διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης πολυαμιδίου,[20] HPLC[21] κτλ. Οι χλωροφύλλες εκχυλίζονται με ακετόνη από το φυτικό τρόφιμο και διαχωρίζονται με TLC.[22]

17.4 Αντιοξειδωτικά

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες προστίθενται στα λιπαρά τρόφιμα για την προστασία τους από την οξειδωτική τάγγιση, που αποτελεί την κύρια αιτία αλλοίωσής τους. Τα χρησιμοποιούμενα στα τρόφιμα αντιοξειδωτικά είναι **φυσικά** και **συνθετικά**. Μεταξύ των φυσικών αντιοξειδωτικών που συνήθως απαντούν σαν κανονικά συστατικά των τροφίμων, περιλαμβάνονται το ασκορβικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, το δεντρολίβανο κ.α. Στα συνθετικά, επιτρεπόμενα για τρόφιμα, αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται η βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA), το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT), η βουτυλιωμένη υδροξικινόνη (TBHQ) και ο προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος (PG).
Ακόμη χηλικές ενώσεις, όπως το EDTA εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες μέσω δέσμευσης των μετάλλων που μπορούν να δράσουν σαν καταλύτες της οξείδωσης. Έχει δειχτεί ότι τα αντιοξειδωτικά έχουν συνεργιστική δράση και γιαυτό χρησιμοποιούνται συχνά σε συνδυασμό.
Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών έχουν προταθεί μέθοδοι χρωματομετρικές, φασματοφωτομετρικές και χρωματογραφικές (TLC, GLC και HPLC).[23,24] Το πρώτο στάδιο της ανάλυσης των αντιοξειδωτικών περιλαμβάνει την εκχύλισή τους από το λιπαρό τρόφιμο. Σε τρόφιμα πλούσια σε λίπος τα αντιοξειδωτικά εκχυλίζονται μαζί με το λίπος κατά Soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα ή μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης (1:1), και

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

στη συνέχεια εκχυλίζονται τα αντιοξειδωτικά από το λίπος. Σε τρόφιμα φτωχά σε λίπος συνηθίζεται η απ' ευθείας εκχύλιση των αντιοξειδωτικών από το τρόφιμο με τους παραπάνω διαλύτες. Ειδικά το BHA και το BHT απομονώνονται από όξινο διάλυμα του τροφίμου, κατόπιν απόσταξης με υδρατμούς παρουσία επτανίου.[25]

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών από το λίπος γίνεται συνήθως με αλκοόλη και ακετονιτρίλιο. Ακόμη χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα αιθανόλης ή μεθανόλης. Τέλος για αποτελεσματικώτερο διαχωρισμό μπορεί να γίνει διαδοχική χρήση των παραπάνω διαλυτών.

Από τις παραπάνω μεθόδους προσδιορισμού των αντιοξειδωτικών επικρατέστερες είναι οι χρωματογραφικές.

A) TLC[9]

Τα αντιοξειδωτικά παραλαμβάνονται από το λίπος με ακετονιτρίλιο κορεσμένο με πετρελαϊκό αιθέρα. Απομακρύνεται ο διαλύτης και το υπόλειμμα διαλύεται σε μεθανόλη. Το δείγμα τοποθετείται σε πλάκες TLC από Silica Gel G και χρωματογραφείται με διαλύτη πετρ. αιθέρα/βενζόλιο/οξικό οξύ (2:2:1), παρουσία γνωστών αντιοξειδωτικών. Μετά το διαχωρισμό οι πλάκες ψεκάζονται με το αντιδραστήριο Gibb (2,6 διχλωρο-ρ-βενζοκινονο-4χλωριμίνη σε απόλυτη αιθανόλη). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δίνονται στον πίνακα 17.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17.1

Χαρακτηριστικά ανάλυσης TLC ορισμένων αντιοξειδωτικών

αντιοξειδωτικό	Rf	αντιδραστ. Gibb	τελικό χρώμα κατόπιν αντίδρασης με αντιδρ. Gibb+NH_3
PG	0.12	καφέ	γκρίζο-πράσινο
οκτυλ-γαλλικός εστέρας	0.22	καφέ	γκρίζο-πράσινο
δωδεκυλ-γαλλικός εστέρας	0.27	καφέ	γκρίζο-πράσινο
BHA	0.62	καφέ-κόκκινο	γκρίζο
BHT	0.89	καφέ-μωβ	γκρίζο

B) HPLC[26,27]

Τα αντιοξειδωτικά παραλαμβάνονται από το λίπος κατόπιν εκχύλισης με μεθανόλη, κατεργασίας σε βαθειά κατάψυξη για την απομάκρυνση του αδιάλυτου λίπους, διήθησης και έγχυσης σε στήλη ανεστραμμένης φάσης με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

διαλύτη (βαθμωτή έκλουση) 55-85% μεθανόλη σε νερό. Ο διαχωρισμός των αντιοξειδωτικών επιτυγχάνεται και με διαλύτη νερό/ακετονιτρίλιο.
Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιείται ανιχνευτής UV το λ=280 nm.

Γ) GLC.[28]

Η εκχύλιση των αντιοξειδωτικών PG και TBHQ γίνεται με 70% αιθανόλη, απομακρύνεται ο διαλύτης, το υπόλειμμα μετατρέπεται σε τριμεθυλοπυριτικά παράγωγα των αντιοξειδωτικών που στη συνέχεια αναλύονται σε στήλη 3%, OV-225. Τα BHT, BHA, TBHQ και Ionox-100 εκχυλίζονται με οξικό αιθυλεστέρα και αναλύονται απ' ευθείας σε στήλη 3%, OV-17.

17.5 Διάφορα πρόσθετα

Α. γαλακτοματοποιητές και σταθεροποιητές

Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται αφ' ενός μεν για τη δημιουργία, αφ' ετέρου δε για τη σταθεροποίηση γαλακτωμάτων, αιωρημάτων και αφριστικών διαλυμάτων. Οι κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής των προσθέτων είναι από τις φυσικές ουσίες: τα φυσικά κόμμεα (gums), η λεκιθίνη, το άγαρ, οι πηκτίνες και η καραγενάνη (Carrageenan). Από τις συνθετικές ουσίες είναι: ο τριγικός διστεατικός εστέρας, οι τριεστέρες της γλυκερίνης, οι μονο-και διστεατικός εστέρας της γλυκερίνης, οι εστέρες λιπαρών οξέων με σορβιτόλη, οι εστέρες της προπυλενογλυκόλης κ.α.
Από τις παραπάνω ουσίες τα φυσικά κόμμεα απομονώνονται από τα τρόφιμα κατόπιν εκχύλισης των τελευταίων με ζεστό νερό. Μετά από απολίπανση και διαύγαση τα κόμμεα καταβυθίζονται με αλκοόλη. Η ταυτοποίηση των κόμμεων γίνεται με χρωστικές αντιδράσεις.[9]
Η λεκιθίνη είναι μίγμα φωσφατιδίων προερχομένων από σογιέλαιο και άλλα φυτικής προέλευσης λάδια. Εκχυλίζεται από τα στερεά τρόφιμα με μίγμα χλωροφορμίου/αιθανόλης. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη το περιεχόμενο P_2O_5 υπολογίζεται με υγρή οξείδωση και χρωματομετρία.[9]
Η καραγενάνη (Carageenan) προσδιορίζεται κατόπιν δέσμευσης με τη χρωστική πορτοκαλί της ακριδίνης και μέτρησης της ελάττωσης του φθορισμού σε σχέση με τη μονομερή χρωστική σε διάλυμα.[29]
Ο τριγικός διστεατικός εστέρας, που χρησιμοποιείται στην αρτοποιία για το «δέσιμο» της αρτομάζας προσδιορίζεται έμμεσα κατόπιν εκχύλισης και σαπωνοποίησης προς στεαρυλοαλκοόλη η οποία προσδιορίζεται σε πλάκα TLC.[30]
Οι τριεστέρες της γλυκερίνης εκχυλίζονται από το τρόφιμο με αιθέρα μετά από χώνευση του δείγματος με οξύ και διαχωρίζονται σε στήλη Silica gel. Ο

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

προσδιορισμός τους γίνεται σε πλάκα TLC.[31]
Οι μονο-και διστεατικός εστέρες της γλυκερίνης προσδιορίζονται με χρωματογραφία στήλης.[32]
Οι εστέρες της προπυλενογλυκόλης προσδιορίζονται με αέρια χρωματογραφία κατόπιν προηγουμένου διαχωρισμού σε στήλη πυριτικού οξέος.[33]
Τέλος οι εστέρες των λιπαρών οξέων με σορβιτόλη προσδιορίζονται κατόπιν εκχύλισης με χλωροφόρμιο, σαπωνοποίησης και ανάλυσης σε πλάκα TLC.[34]

Β. Αρωματικές ύλες

Οι αρωματικές ύλες που προστίθενται στα κατεργασμένα κυρίως τρόφιμα είναι πολλές και ποικίλες. Η κοινή τους, εν τούτοις, ιδιότητα της πτητικότητας έχει συμβάλλει στη διαμόρφωση γενικών τεχνικών για την εκχύλισή τους, τον διαχωρισμό τους και τον προσδιορισμό τους σε διάφορα τρόφιμα.[35] Μεταξύ των μεθόδων προσδιορισμού των αρωματικών υλών πρωτεύουσα θέση κατέχει ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας (τριχοειδούς στήλης)/φασματοφωτομετρίας μαζών. (βλ. κεφ. 20)

Γ. Βελτιωτικά-Λευκαντικά

Κατά την αποθήκευση των αλευριών έχει δειχτεί ότι βελτιώνονται οι αρτοποιητικές τους ιδιότητες. Το ίδιο αποτέλεσμα επιτυγχάνεται σε λίγες μόνον ώρες με την προσθήκη στα αλεύρια των λεγομένων βελτιωτικών ουσιών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται όξινα και ουδέτερα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου και νατρίου, ασκορβικό οξύ, κιτρικό και τρυγικό οξύ, όξινα ανθρακικά άλατα του νατρίου και αμμωνίου και τα οξειδωτικά υπερθειϊκό, βρωμικό και υπεριωδικό κάλιο. Τα τρία τελευταία είναι απαγορευμένα στη χώρα μας.
Αντίστοιχα για τη λεύκανση των μαύρων αλευριών, που θεωρούνται κατώτερης ποιότητας χρησιμοποιούνται ουσίες όπως οξείδια του αζώτου, χλώριο, τριχλωριούχο άζωτο, βενζοϋπεροξείδιο και το O_3. Απ' αυτά, στη χώρα μας επιτρέπεται η χρήση μόνον του O_3. Τα λευκαντικά δρουν μέσω οξείδωσης και αποχρωματισμού των κίτρινων χρωστικών, των καροτινοϊδών που απαντούν φυσικώς στο αλεύρι.
Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των παραπάνω ουσιών έχει ως εξής:

1. ασκορβικό οξύ

Με την προσθήκη 0.1% υδατικού διαλύματος 2,6 διχλωροφαινολινδοφαινόλης σε δείγμα αλευριού, παρουσία ασκορβικού οξέος προκαλείται ο αποχρωματισμός της χρωστικής.

2. βρωμικό κάλιο

Μικρή ποσότητα δείγματος κατεργάζεται με διάλυμα KI 10% και HCl 10%

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(V/V) οπότε παρουσία βρωμικού καλίου σχηματίζονται σκούρες κηλίδες (αντίδραση 17.8)

$$KBrO_3 + 6HCl + 6KI \rightarrow KBr + 6KCl + 3H_2O + 3I_2 \qquad (17.8)$$

3.Μονόξινο φωσφορικό ασβέστιο

Το δείγμα αλευριού αναταράσσεται με τετραχλωράνθρακα και στο σχηματιζόμενο ίζημα ανιχνεύεται το ασβέστιο είτε κατόπιν καταβύθισης σαν οξαλικό ασβέστιο είτε κατόπιν ογκομέτρησης με EDTA.[37]

4. Υπερθειϊκό αμμώνιο ή κάλιο

Σε υγρανθέν δείγμα αλευριού προστίθεται αλκοολικό διάλυμα βενζιδίνης 1%. Παρουσία υπερθειϊκών ιόντων σχηματίζονται σκοτεινές μπλε κηλίδες.[38]

5. Βενζοϋπεροξείδιο

Το βενζοϋπεροξείδιο μετατρέπεται με NaOH, παρουσία ακετόνης σε βενζοϊκό οξύ. Το τελευταίο προσδιορίζεται σύμφωνα με τα γνωστά (βλ. κεφ. 17.2) ή μετατρέπεται σε σαλικυλικό οξύ που προσδιορίζεται χρωματομετρικά.[39]

6. Οξείδια του αζώτου

Βλ. ανίχνευση νιτρωδών και νιτρικών ιόντων.

Δ. Γλυκαντικές ύλες

Οι γλυκαντικές ύλες διακρίνονται σ΄εκείνες που έχουν θρεπτική αξία (τα σάκχαρα: γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη, μαλτόζη, το μέλι, τὸ αμυλοσιρόπι, οι πολυαλκόολες: σορβιτόλη, μαννιτόλη και η συνθετικά παρασκευαζόμενη ξυλιτόλη, η ασπαρτάμη-μεθυλεστέρας των αμινοξέων φαινυλαλανίνη και ασπαραγινικού οξέος-κ.α.) και σ΄ εκείνες που δεν έχουν θρεπτική αξία, σπουδαιότερος εκπρόσωπος των οποίων είναι η σακχαρίνη. Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των γλυκαντικών υλών γίνεται ανάλογα με την χημική δομή τους.

1. Τα σάκχαρα ανιχνεύονται και προσδιορίζονται σύμφωνα με τις μεθόδους που αναπτύχθηκαν στο κεφ. 14.

2. Οι πολυαλκοόλες σορβιτόλη, μαννιτόλη και ξυλιτόλη ανιχνεύονται και προσδιορίζονται αεριοχρωματογραφικά σαν παράγωγα τριμεθυλοπυριτικών αιθέρων[40] ή ακετυλεστέρων με τριχοειδή στήλη.[41] Ειδικά η σορβιτόλη προσδιορίζεται ενζυματικά κατόπιν οξείδωσης με NAD^+ παρουσία του ενζύμου δεϋδρογενάσης της σορβιτόλης προς φρουκτόζη (αντίδραση 17.9). Η συγκέντρωση του παραγόμενου NADH προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά (UV) στο λ=340nm[42]

$$\text{σορβιτόλη} + NAD^+ \xrightleftharpoons{SDH} \text{φρουκτόζη} + NADH + H^+ \qquad (17.9)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

SDH = δεϋδρογενάση της σορβιτόλης

3. Η σακχαρίνη ανιχνεύεται με την αντίδραση της ρεσορκινόλης.[9] Το δείγμα θερμαίνεται με ρεσορκινόλη παρουσία πυκνού θειϊκού οξέος μέχρις λήψης σκοτεινού πράσινου χρώματος. Το μίγμα ψύχεται και προστίθεται μικρή ποσότητα νερού και περίσσεια NaOH. Παρουσία σακχαρίνης λαμβάνεται πράσινο φθορίζον χρώμα. Ο προσδιορισμός της γίνεται κατόπιν εκχύλισης με αιθέρα από υδατικό διάλυμα οξινισμένο με HCl και κατεργασίας με φαινόλη και θειϊκό οξύ. Η απορρόφηση του σχηματιζόμενου χρώματος μετρείται στο λ=588 nm.[43]

17.6 Προσδιορισμός καταλοίπων

Κατάλοιπα διαλυτών

Σαν αποτέλεσμα τόσο της προσθήκης ορισμένων συστατικών στα τρόφιμα όπως αντιοξειδωτικά, βιταμίνες κ.ο.κ. όσο και της αλληλεπίδρασης του υλικού συσκευασίας με το περιεχόμενο τρόφιμο κατά την αποθήκευση, το τελευταίο συγκρατεί κάποια ποσότητα κατάλοιπων διαλυτών οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την οσμή/γεύση καθώς και την ασφάλεια, από άποψη υγιεινής, του τροφίμου.

Μεταξύ των επιτρεπόμενων για χρήση στα τρόφιμα διαλυτών περιλαμβάνονται οι: αιθανόλη, μεθανόλη, προπανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόλη, αλκοόλη, διαιθυλαιθέρας, ακετόνη κ.α., ενώ μεταξύ των μη επιτρεπόμενων περιλαμβάνονται η μεθυλοαιθυλοκετόνη, το τολουόλιο, το ξυλόλιο κ.α.

Οι περισσότεροι από τους διαλύτες, λόγω πτητικότητος μπορούν να προσδιοριστούν, όπως και οι αρωματικές ύλες, με αέρια χρωαμτογραφία/φασματοφωμετρία μαζών.[36]

17.7 Εφαρμογές

Το SO_2 προσδιορίστηκε σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων,[44] όπως αφυδατωμένα φρούτα (1200 ppm), σαλάτες (400-950 ppm), κρασί (150 ppm), γαρίδες 10-40 ppm), τουρσιά (30 ppm), μπισκότα (5 ppm) κ.α.

Τα βενζοϊκό κάλιο και νάτριο προσδιορίστηκαν σε προϊόντα, όπως αναψυκτικά (0.03-0.08%), σαλάτες (0.01%) και μαργαρίνη (0.1%).[45]

Τα σορβικό οξύ και και σορβικό νάτριο προσδιορίστηκαν σε προϊόντα, όπως αναψυκτικά (0.025-0.1%),[10] αφυδατωμένα φρούτα (0.02-0.05%), κρεατοσκευάσματα (0.1%), καπνιστά ψάρια (0.1%), κρασί (0.02-0.1%) και τυροκομικά προϊόντα (0.05-0.1%).[46]

Τα νιτρώδη και σορβικά άλατα προαδιορίστηκαν σε διάφορα κρεατοσκευάσμα-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

τα[47,48].

Διάφορες χρωστικές προσδιορίστηκαν σε τρόφιμα, όπως κρεατοσκευάσματα[14,19] και ποτά.[13]

Τα αντιοξειδωτικά: TBHQ,[49] BHA και BHT,[50]τοκοφερόλες και ασκορβικό οξύ[51] προσδιορίστηκαν σε ποικιλία λιπαρών τροφίμων, κυρίως τηγανισμένα πατατάκια (chips και άλλα snacks).

Γαλακτοματοποιητές και σταθεροποιητές προσδιορίστηκαν σε τρόφιμα όπως μαργαρίνη, μαγιονέζα, σε ορισμένους τύπους τυριών,[31,52]σε προϊόντα σοκολάτας[53] και κέικς[54].

Αρωματικές ύλες προσδιορίστηκαν σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, όπως φρούτα,[55] κρέας[56] κ.α. (βλ. εφαρμ. κεφ. 3 και 20).

Βελτιωτικά και οξειδωτικά προσδιορίστηκαν σε αλεύρια[38] και ψωμί.[57]

Γλυκαντικές ύλες προσδιορίστηκαν σε ποικιλία τροφίμων, όπως αναψυκτικά, μέλι, αμυλοσιρόπι, σοκολάτα, φρούτα,[58,59] καραμέλες, μαστίχα,[60] είδη αρτοποιΐας, γιαούρτι κ.α.

Τέλος κατάλοιπα διαλυτών προσδιορίστηκαν σε ποικιλία τροφίμων [36] και υλικών συσκευασίας.[61]

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Joint FAO/WHO** Expert Com. on Food Additives. FAO. Rome (1974)
2. **Rahn C** and **Conn J.** Ind. and Eng. Chem 36, 185 (1944)
3. **Ingram M** J. Soc of Chem Ind. 66, 50, 105 (1947)
5. **Schuller PPL** and **Veen E** J. Assoc. Off. Anal Chem 50, 1127 (1967)
6. **Monier-Williams GW** Analyst 52:153, 229, 343, 415 (1927 a, b,c)
7. **Shipton J.**, Food Preserv. Quarterly 14, 54 (1954)
8. **Tanner H** Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, Bern 54(2):158 (1963)
   Nauman RV, West PW, Tron F and **Gaeke GC** Anal. Chem. 32, 1307 (1960)
9. **Egan H, Kirk RS** and **Sawyer R** Pearson's Chemical Analysis of Foods. 8th edit, Churchill Livingstone, Edinburgh (1981)
10. **Neale ME** and **Ridlington J** J. Assoc. Publ. Analysts 16, 135 (1978)
11. **Carr W** and **Smith GA** J. Assoc. of Publ. Analysts 2, 37 (1964)
12. **Lehman G, Collet P, Hahn HG** and **Ashworth MRF** J. Assoc. Off Anal. Chem. 53, 1182 (1970)
13. **Γαλανού Δ.Σ.** και **Βουδούρη Ε.Κ.** Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων, Αθήνα (1975)
14. **Boley NP, Bunton NG, Crosby NT, Johnson AE, Roper P** and **Somers L** Analyst 105, 589 (1980)
15. **Hoodless RA, Pitman HG, Stewart TE, Thomson J** and **Arnold JE** J Chromatogr. 54, 393 (1971)
16. **Pearson D**, J. Assoc Public Analysts 11, 135 (1973 b)
17. **Chudy J, Grosby NT** and **Patel I** J Chromatogr 154, 306 (1978)
18. **Noda H** and **Nishika S** J. Food Hyg. Soc, Japan 18, 321 (1977)
19. **Boley NP Crosby NT** and **Roper P** Analyst 104, 472 (1979)
20. **Strack D** and **Mansell R** J. Chromatogr. 109, 325 (1975)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

21. **Wilkinson M, Sweeny J.G.** and **Iacobucci GA** J. Chromatogr. 132, 349 (1977)
22. **Yoshiura M, Iriyama K** and **Shiraki M** Chem Letters 3, 281 (1978)
23. **Cantafora A,** Riv. della Soc Ital. di Sci dell'Aliment. 5, 87 (1976)
24. **Endean ME** Scientific and Technical Survey No 91, Leatherhead Food RA,
25. **Dilli S** and **Robards K** Analyst 102, 201 (1977)
26. **Page BD** J. Assoc Anal. Chem 62, 1239 (1979)
27. **Hammond KJ** J. Assoc. of Public Analysts 16, 17 (1978)
28. **Kline DA, Joe FL** and **Fazio T** J Assoc. Off Anal. Chem. 61, 513 (1978)
29. **Cundall RB, Phillips GO** and **Rowland DR** Analyst 98, 857 (1973)
30. **Williams EI** Analyst 89, 289 (1964)
31. **Dieffenbacher A** and **Bracco U.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 55, 642 (1978)
22. **IUPAC,** Std. Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 6th edit (1979)
23. **Sahasrabudhe MR** and **Legari JI** J. Amer. Oil Chem. Soc. 45, 148 (1968)
34. Schrepfer R and **Egle H,** Zeitschrift fur Lebensmittel unter Suchung und Forsc. 107, 510 (1958)
35. **Land DG** and **Nursten EH** Progress in Flavor Research, Applied Sci Publ, London (1979)
36. **Dickes GJ** and **Nicholas PW** G.C. in Food Analysis, Sevenoaks, Butterworth (1976)
37. **Moss P** J. Sci Food Agr. 12, 30 (1961)
38. **Kent-Jones DW** and **Amos AJ** Modern Cereal Chemistry, 6th edit. Food Trade Press London (1967)
39. **Knight RA** and **Kent-Jones DW** Analyst 78, 467 (1953)
40. **Moseley FA, Salinsky JS** and **Woods RW** J. Assoc. Offic. Anal. Chem 61, 164 (1978)
41. **Makinen KK** and **Soderling E** J. Food Sci 45, 367 (1980)
42. **Bergmeyer HU** (edit) Methods in Enrymatic Analysis, Vol 3, Verlag Chemie Weinheim/ Academic Press, New York (1974)
43. **Fernandez-Flores E, Johnson AR Leber B, Larry D) and Lerner S** J Assoc Off Anal. Chem 56, 1411 (1973)
44. **Taylor SL** and **Bush RK,** Food Tech. June, 47 (1986)
45. **Miles Labs Inc** Product Information, Biotech Products Div. Elkhart Ind. U.S.A. (1985a)
46. **Dziezak JD** Food Tech Sept. 111 (1986)
47. **Sofos JN. Busta FF** and **Allen CE,** J. Food Prot. 42(9), 739 (1979)
48. **Lechowich RV, Brown WL, Deihcl RH** and **Somers II,** Food Tech. 32(5), 45 (1978)
49. **Buck DF.** Cereal Foods 29(5), 301, (1984)
50. **Sherwin ER,** J.Amer. Oil Chem. Soc. 55(11):809 (1978)
51. **Cort WM,** J Amer. Oil Chem. Soc. 51(7), 321 (1974).
52. **Baur F.J.** J. Amer. Oil Chem. Soc. 50, 85 (1973)
53. **Dick R** and **M. Serez A** Mitt aus dem Geb. der Lebensm. und Hyg., Bern 67, 472 (1976)
54. **Wetterau FP, Olsanski VL** and **Smullin CP** J. Amer. Oil Chem. Soc. 41, 791 (1964)
55. **Nursten HE** and **Williams AA** Chem and Ind. 12, 486 (1967)
56. **Wasserman AE.** J. Food Sci. 44, 6 (1979)
57. **Dangouman A** and **Ducos R** Chim. Analyt. 44, 292 (1962)
58. **Sipple HL** and **Mc Nutt KW** (eds), Sugars in Nutrition, Chpt 5, Academic Press, New York (1974)
59. **Emodi A,** Food Tech. 32(1), 28 (1978)
60. **Newsome RL,** Food Tech Aug., 195 (1986)
61. **Kontominas MG** and **Voudouris EK** Chim. Chron., New Series 11, 215 (1982).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18

ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

18.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία 20 χρόνια το ενδιαφέρον γύρω από τη μελέτη των ενζύμων σε σχέση με τα τρόφιμα έχει αυξηθεί σημαντικά.

Η δραστηριότητα των ενζύμων χρησιμοποιείται σήμερα: 1) σαν κριτήριο ποιότητας των τροφίμων (π.χ. δείκτης: αρτοποιητικής ικανότητας αλευριού, ικανότητας συντήρησης αυγών κ.α.), 2) σαν δείκτης ελέγχου αποτελεσματικότητας διαφόρων θερμικών κατεργασιών (π.χ. ελέγχου παστερίωσης γάλακτος κ.α.) και 3) για τον γρήγορο προσδιορισμό της χημικής σύστασης διαφόρων ζωικών και φυτικών τροφίμων (π.χ. το ένζυμο ιμβερτάση χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό της σακχαρόζης).

Από άποψη σύστασης, τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που οφείλουν την ειδική δράση τους στην παρουσία και την ιδιαίτερη αλληλουχία διαφόρων αμινοξέων στο μόριο τους, στην παρουσία ισχυρά δεσμευμένων μεταλλικών κατιόντων, όπως Cu, Mg ή Zn, στην παρουσία μεταλλο-οργανικών ενώσεων, όπως π.χ. η αίμη της υπεροξειδάσης ή καταλάσης ή τέλος στην παρουσία συνενζύμων, όπως π.χ. η συνκαρβοξυλάση, η τρανσαμινάση ή τα νουκλεοτίδια της πυριδίνης.

Το πλήρες σύστημα του ενζύμου γνωστό σαν ολοένζυμο θεωρείται ότι αποτελείται από το πρωτεϊνικό τμήμα του ενζύμου (αποένζυμο) και το μή πρωτεϊνικό τμήμα (συνένζυμο).

Τα ένζυμα απαντούν στους διαφόρους ιστούς των τροφίμων, είτε χαλαρά συνδεμένα απ΄ όπου απομακρύνονται με απλή εκχύλιση ή ισχυρά συνδεμένα σε πολυενζυματικά συστήματα. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των ενζύμων, τα τελευταία μπορεί να προστεθούν σε δοσμένο υπόστρωμα για την επίτευξη συγεκριμένης ενζυματικής δράσης.

Τα ένζυμα αυτά γνωστά σαν «δεσμευμένα» ή «ακινητοποιημένα» (immobilized enzymes) δεσμεύονται σε συγκεκριμένη επιφάνεια με μεθόδους φυσικές και χημικές.

Οι φυσικές μέθοδοι δέσμευσης περιλαμβάνουν την προσρόφηση σε αδιάλυτα πλέγματα ουσιών, παγίδευση σε πήγματα ή και σε ημιπερατές μεμβράνες. Χημικές μέθοδοι δέσμευσης περιλαμβάνουν το σχηματισμό ομοιοπολικού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

δεσμού μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος.
(Για την κατάταξη των ενζύμων βλ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ)[1]. Τα σπουδαιότερα είδη ενζύμων που απαντούν στα τρόφιμα περιλαμβάνουν:

Α. Τις υδρολάσες, που μπορούν να δράσουν πάνω σε εστεροδεσμούς (εστεράσες), σε πεπτιδοδεσμούς (πρωτεάσες), σε γλυκοζιτικούς δεσμούς (αμυλάσες) και σε μη πεπτιδικούς δεσμούς (C–N).

1. Τις εστεράσες όπου υπάγονται οι λιπάσες, π.χ. η παγκρεατική λιπάση, για τη διαφοροποίηση των θέσεων 1 και 3 στα τριγλυκερίδια[1], οι φωσφολιπάσες που υδρολύουν φωσφολιπίδια κ.α., οι πηκτινοεστεράσες που υδρολύουν μεθόξυ-ομάδες στις πηκτινικές ουσίες κ.α.

2. Τις αμυλάσες που καταλύουν την αποικοδόμηση του αμύλου και διακρίνονται σ' εκείνες που διασπούν δεσμούς 1,6 των διακλαδώσεων και σ' εκείνες που διασπούν δεσμούς 1,4 μεταξύ μονάδων γλυκόζης στην ευθεία αλυσίδα του αμύλου.

3. Τις πρωτεάσες που διασπούν τις πρωτείνες και τα πεπτίδια σε αμινοξέα. Σ' αυτές υπάγονται οι οξυπρωτεάσες (ρενίνη, πεψίνη κ.α.), οι πρωτεάσες της σερίνης (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση, θρομβίνη κ.α.). Οι σουλφιδριλοπρωτεάσες (παπαΐνη) καί οι μεταλλοπρωτεάσες (καρβοξυπεπτιδάση Α και Β, αμινοπεπτιδάσες κ.α.).

Β. Τις οξειδορεδουκτάσες που καταλύουν την οξείδωση φαινολικών ενώσεων προς ο-κινόνες. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται η πολυφαινολοξειδάση ή πολυφαινολάση ή φαινολάση, η δράση της οποίας έχει σαν αποτέλεσμα της αμαύρωση του φυτικού ιστού, η γλυκοζοξειδάση που καταλύει την οξείδωση της D-γλυκόζης προς δ-D-γλυκονολακτόνη, η υπεροξειδάση που καταλύει την αντίδραση του τύπου:

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}} 2H_2O + A \qquad (18.1)$$

η λιποξειγενάση (λιποξειδάση) που καταλύει την οξείδωση ακόρεστων λιπών κ.α.

18.2 Ενζυματική ανάλυση

Με τον όρο ενζυματική ανάλυση εννοείται αφ' ενός, η ανάλυση συστατικού που επιτυγχάνεται με την βοήθεια των ενζύμων, αφ' ετέρου οι προσδιορισμοί της ενεργότητας κάποιου συγκεκριμένου ενζύμου, που δρα πάνω σε δοσμένο σύστημα.
Στην πρώτη περίπτωση υπάγονται οι προσδιορισμοί υποστρώματος: π.χ. οι

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

προσδιορισμοί μονο-ολιγο-και πολυσακχαριτών, αλκοολών, οξέων κ.α.
Στη δεύτερη περίπτωση υπάγονται προσδιορισμοί όπως π.χ. της ενεργότητας της πολυφαινολοξειδάσης σε φυτικά τρόφιμα, της ενεργότητας της πρωτεάσης παπαΐνης στο κρέας βοειδών κ.α.

Α. Προσδιορισμός υποστρώματος

Από την βασική ενζυματική αντίδραση:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_2} E + P \qquad (18.2)$$

όπου: E =ένζυμο
S = υπόστρωμα
ES= σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος
P = προϊόντα

με κατάλληλους μετασχηματισμούς[1], για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου, προκύπτει η σχέση 18.3.

$$U_o = \frac{U_{max}\,[S]_o}{K_m + [S]_o} \qquad (18.3)$$

όπου: $K_M = \frac{K_2+K_{-1}}{K_1}$ = σταθερά Michaelis Menten
U_o = αρχική ταχύτητα αντίδρασης
U_{max} = μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης
$[S]_o$= αρχική συγκέντρωση υποστρώματος

Στη σχέση 18.3 φαίνεται ότι η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του υποστρώματος μέχρι κάποιας τιμής της τελευταίας πάνω από την οποία δεν αυξάνει άλλο η ταχύτητα της αντίδρασης.
Η συγκέντρωση του υποστρώματος που μεταβάλλεται κατά την πορεία μιας ενζυματικής αντίδρασης μπορεί να προσδιοριστεί με τους εξής τρόπους:

i) Κατόπιν προσδιορισμού του προϊόντος της ενζυματικής αντίδρασης το οποίο βρίσκεται σε στοιχειομετρική σχέση με το υπόστρωμα. Στην περίπτωση αυτή επιλέγεται αντίδραση στην οποία καταναλίσκεται ολόκληρο το ποσόν του υποστρώματος.

ii) Κατόπιν μέτρησης κάποιας χαρακτηριστικής ιδιότητας του υποστρώματος που μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ενζυματικής αντίδρασης π.χ. αν το υπόστρωμα παρουσιάζει φάσμα απορρόφησης όπως το ουρικό οξύ, τότε μπορεί να μετρηθεί η απορρόφησή του (λ=293 nm) για τον προσδιορισμό του με ουρικάση ως εξής:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

$$\text{Ουρικό οξύ} \xrightarrow{\text{ουρικάση}} \text{αλλαντοΐνη} + CO_2 \qquad (18.4)$$

Το ίδιο ισχύει για τον προσδιορισμό της αλκοόλης με αλκοολική δεϋδρογενάση κ.ο.κ.

iii) Κατόπιν μέτρησης της ταχύτητας της ενζυματικής αντίδρασης. Εδώ μετά την αυστηρή ρύθμιση των συνθηκών της αντίδρασης και τον περιορισμό της ποσότητας του υποστρώματος, η αρχική ταχύτητα (Uo) της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του υποστρώματος (εξισ. 18.3).

1. Προσδιορισμός μονο-ολιγο-και πολυσακχαριτών

α) Γλυκόζη/φρουκτόζη

Το δείγμα συνήθως τεμαχίζεται (προκειμένου περί στερεών), διαλύεται, διηθείται, αποχρωματίζεται και αραιώνεται. Στο διάλυμα η γλυκόζη και φρουκτόζη φωσφορυλιώνονται προς 6-P-γλυκόζη και 6-P-φρουκτόζη παρουσία ATP και του ενζύμου εξοκινάση (HK), σύμφωνα με τις αντιδράσεις (18.5) και (18.6):

$$\text{γλυκόζη} + ATP \xrightarrow{HK} \text{6-P-γλυκόζη} + ADP \qquad (18.5)$$

$$\text{φρουκτόζη} + ATP \xrightarrow{HK} \text{6-P-φρουκτόζη} + ADP \qquad (18.6)$$

Παρουσία του ενζύμου 6-P-γλυκοζοδεϋδρογενάση (G6P-DH) ή G-6-P οξειδώνεται από το $NADP^+$ προς 6-P-γλυκονικό οξύ με σύγχρονο σχηματισμό του ανηγμένου NADPH, σύμφωνα με την αντίδραση (18.7):

$$\text{6-P-γλυκόζη} + NADP^+ \xrightarrow{GGP\text{-}DH} \text{6-P-γλυκονικό οξύ} + NADPH + H^+ \qquad (18.7)$$

Από το παραγόμενο NADPH, η απορρόφηση του οποίου μετρείται στο λ=340 nm προκύπτει το ποσόν της γλυκόζης στο δείγμα. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης (18.7) η 6-P-φρουκτόζη μετατρέπεται σε 6-P-γλυκόζη, παρουσία του ενζύμου φωσφογλυκοζοϊσομεράση (PGI) σύμφωνα με την αντίδραση (18.8).

$$\text{6-P-φρουκτόζη} \xrightarrow{PGI} \text{6-P-γλυκόζη} \qquad (18.8)$$

Στη συνέχεια η 6-P-γλυκόζη αντιδρά με $NADP^+$, προς σχηματισμό 6-P-γλυκονικού οξέος και NADPH. Η φρουκτόζη υπολογίζεται στοιχειομετρικά από το ποσόν του παραγόμενου NADPH, το οποίον προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

β) Προσδιορισμός σακχαρόζης/γλυκόζης

Κατ' αρχήν προσδιορίζεται η γλυκόζη σύμφωνα με τα προηγούμενα. Στη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

συνέχεια υδρολύεται η σακχαρόζη σε pH=4.6 παρουσία του ενζύμου β-φρουκτοξειδάση (ιμβερτάση) προς γλυκόζη και φρουκτόζη, σύμφωνα με την αντίδραση (18.9).

$$\text{σακχαρόζη} + H_2O \xrightarrow{\text{ιμβερτάση}} \text{γλυκόζη} + \text{φρουκτόζη} \qquad (18.9)$$

Ακολουθεί προσδιορισμός της συνολικής γλυκόζης κατά τα γνωστά. Η σακχαρόζη υπολογίζεται από τη διαφορά στην ποσότητα της γλυκόζης πριν και μετά την υδρόλυση.

γ) Προσδιορισμός λακτόζης/γαλακτόζης

Η λακτόζη υδρολύεται προς γλυκόζη και β-γαλακτόζη σε υδατικό περιβάλλον, παρουσία του ενζύμου β-γαλακτοξειδάση. Στη συνέχεια η β-γαλακτόζη οξειδώνεται προς γαλακτουρονικό οξύ από το ένζυμο β-γαλακτοζοδεϋδρογενάση (Gal-DH) από το NAD^+, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (18.10) και (18.11)

$$\text{λακτόζη} + H_2O \xrightarrow{\text{β-γαλακτοξειδάση}} \text{γλυκόζη} + \text{β-γαλακτόζη} \qquad (18.10)$$

$$\text{β-γαλακτόζη} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Gal-DH}} \text{γαλακτουρονικό οξύ} + NADH + H^+ \qquad (18.11)$$

Η απορρόφηση του παραγόμενου NADH μετρείται στο λ=340 nm, απ' όπου υπολογίζεται και η συγκέντρωση της λακτόζης μέσω των στοιχειομετρικών αντιδράσεων.

δ) Προσδιορισμός μαλτόζης

Η μαλτόζη υδρολύεται σε pH=6.6 προς δύο μόρια γλυκόζης παρουσία του ενζύμου α-γλυκοζοξειδάση, σύμφωνα με την αντίδραση (18.12).

$$\text{μαλτόζη} + H_2O \xrightarrow{\text{α-γλυκοξειδάση}} 2\ \text{γλυκόζη} \qquad (18.12)$$

Η παραγόμενη γλυκόζη φωσφορυλιώνεται προς 6-P-γλυκόζη σε pH=7.6, παρουσία του ενζύμου εξοκινάση κατά τα γνωστά (βλ. κεφ. 18.2 A1α). Η μαλτόζη προσδιορίζεται μέσω των στοιχειομετρικών αντιδράσεων με βάση την απορρόφηση του παραγόμενου NADPH.

ε) Προσδιορισμός ραφινόζης

Η ραφινόζη υδρολύεται προς γαλακτόζη κα σακχαρόζη σε pH=4.6, παρουσία του ενζύμου α-γαλακτοξειδάση, σύμφωνα με την αντίδραση (18.13)

$$\text{ραφινόζη} + H_2O \xrightarrow{\text{α-γαλακτοξειδάση}} \text{γαλακτόζη} + \text{σακχαρόζη} \qquad (18.13)$$

Στη συνέχεια η γαλακτόζη οξειδώνεται από το NAD^+ προς γαλακτονολακτόνη παρουσία του ενζύμου γαλακτοζοδεϋδρογενάση (Gal-DH), σύμφωνα με την αντίδραση (18.14).

$$\text{γαλακτόζη} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Gal-DH}} \text{γαλακτονολακτόνη} + NADH + H^+ \qquad (18.14)$$

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το NADH προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σύμφωνα με τα γνωστά.

στ) Προσδιορισμός αμύλου

Το άμυλο υδρολύεται προς γλυκόζη σε pH=4.6, παρουσία του ενζύμου αμυλογλυκοξειδάση (AGS), σύμφωνα με την αντίδραση (18.15)

$$\text{άμυλο} + (n-1)\ H_2O \xrightarrow{AGS} n\ [\text{γλυκόζη}] \qquad (18.15)$$

Η γλυκόζη προσδιορίζεται στη συνέχεια κατά τα γνωστά.

Για την παραλαβή του αμύλου από το τρόφιμο, το τελευταίο ομογενοποιείται, κοσκινίζεται, ζυγίζεται ορισμένη ποσότητα σε κωνική φιάλη (περίπου 500 mg) προστίθεται διμεθυλσουλφοξείδιο (20ml), HCl (20ml, 8 mol/l) και επωάζεται επί 30 min στους 60°C. Ακολουθεί ψύξη, προσθήκη αποσταγμένου νερού (50ml) ρύθμιση του pH=4-5 με NaOH, μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml, πλήρωση της φιάλης με νερό και διήθηση. Στο διήθημα γίνεται ο προσδιορισμός του αμύλου.

2. Προσδιορισμός αλκοολών και οξέων

α) Προσδιορισμός γλυκερίνης

Η γλυκερίνη φωσφορυλιώνεται προς 3-P-γλυκερίνη παρουσία του ενζύμου γλυκεροκινάση (GK), σύμφωνα με την αντίδραση (18.16)

$$\text{γλυκερίνη} + ATP \xrightarrow{GK} \text{3-P-γλυκερίνη} + ADP \qquad (18.16)$$

Το παραγόμενο ADP μετατρέπεται εκ νέου προς ATP παρουσία του ενζύμου πυροσταφυλική κινάση (PK), σύμφωνα με την αντίδραση (18.17):

$$ADP + \text{P-ενολ-πυροσταφυλικό οξύ} \xrightarrow{PK} ATP + \text{πυροσταφυλικό οξύ} \qquad (18.17)$$

Το πυροσταφυλικό οξύ, ανάγεται προς γαλακτικό οξύ παρουσία του ενζύμου γαλακτο-δεϋδρογενάση (LDH), σύμωνα με την αντίδραση (18.18):

$$\text{πυροσταφυλικό οξύ} + NADH + H^+ \xrightarrow{LDH} \text{γαλακτικό} + NAD^+ \qquad (18.18)$$

Το ποσόν του καταναλισκόμενου NADH προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm. Στοιχειομετρικά υπολογίζεται η ποσότητα της γλυκερίνης.

β) Προσδιορισμός αιθανόλης

Η αιθανόλη οξειδώνεται προς ακεταλδεΰδη παρουσία του ενζύμου αλκοολο-δεϋδρογενάση (ADH) από το NAD^+ σύμφωνα με την αντίδραση (18.19)

$$\text{αιθανόλη} + NAD^+ \xrightarrow{ADH} \text{ακεταλδεΰδη} + NADH + H^+ \qquad (18.19)$$

Η αντίδραση (18.19) μετατοπίζεται προς τα δεξιά σε αλκαλικό περιβάλλον. Η παραγόμενη ακεταλδεΰδη οξειδώνται ποσοτικά προς οξικό οξύ παρουσία του ενζύμου αλδεΰδο-δεϋδρογενάση (Al-DH), σύμφωνα με την αντίδραση

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(18.20):

$$\text{ακεταλδεΰδη} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{Al \cdot DH} \text{οξικό οξύ} + NADH + H^+ \quad (18.20)$$

Το NADH προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm. Η αιθανόλη προσδιορίζεται απ' αυτό μέσω των στοιχειομετρικών αντιδράσεων.

γ) Προσδιορισμός χοληστερόλης

Η χοληστερόλη οξειδώνεται προς χοληστενόνη παρουσία του ενζύμου χοληστερολ-οξειδάση, σύμφωνα με την αντίδραση (18.21).

$$\text{χοληστερόλη} + O_2 \xrightarrow[\text{οξειδάση}]{\text{χοληστερολ-}} \Delta^4\text{-χοληστενόνη} + H_2O_2 \quad (18.21)$$

Το παραγόμενο H_2O_2 οξειδώνει τη μεθανόλη προς φορμαλδεΰδη παρουσία του ενζύμου καταλάση, σύμφωνα με την αντίδραση (18.22).

$$\text{μεθανόλη} + H_2O \xrightarrow{\text{καταλάση}} \text{φορμαλδεΰδη} + 2H_2O \quad (18.22)$$

Η φορμαλδεΰδη αντιδρά με ακετυλ-ακετόνη, παρουσία NH_4^+ προς σχηματισμό της κίτρινης χρωστικής λουτιδίνης, σύμφωνα με την αντίδραση 18.23.

$$\text{φορμαλδεΰδη} + NH_4^+ + 2\text{ακετυλ-ακετόνη} \rightarrow \text{λουτιδίνη} + 3H_2O \quad (18.23)$$

Κατόπιν μέτρησης της απορρόφησης της λουτιδίνης στο λ=405 nm, προσδιορίζεται στοιχειομετρικά η ποσότητα της χοληστερόλης.

δ) Προσδιορισμός γαλακτικού οξέος

Το L-γαλακτικό οξύ παρουσία του ενζύμου L-γαλακτο-δεΰδρογενάση (L-LDH) οξειδώνεται προς πυροσταφυλικό οξύ, σύμφωνα με την αντίδραση (18.24):

$$\text{L-γαλακτικό οξύ} + NAD^+ \underset{}{\overset{\text{L-LDH}}{\rightleftharpoons}} \text{πυροσταφυλικό οξύ} + NADH + H^+ \quad (18.24)$$

Η ισορροπία στην αντίδραση (18.24) μετατοπίζεται ποσοτικά προς τα δεξιά κατόπιν παγίδευσης του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος, προς αντίδρασή του με L-γλουταμινικό οξύ παρουσία του ενζύμου γλουταμινο-πυροσταφυλική τρανσαμινάση (GPT), σύμφωνα με την αντίδραση (18.25):

$$\text{πυροσταφυλικό οξύ} + \text{L γλουταμινικό οξύ} \overset{\text{GPT}}{\rightleftharpoons} \text{L-αλανίνη} + \text{α-κετογλουταρικό οξύ} \quad (18.25)$$

Το γαλακτικό οξύ προσδιορίζεται στοιχειομετρικά από την απορρόφηση του NaDH (αντίδραση 18.24) στο λ=340 nm.

ε) Πυροσταφυλικο οξύ

Το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται προς L-γαλακτικό οξύ παρουσία του ενζύμου L-γαλακτο-δεΰδρογενάση (L-LDH), σύμφωνα με την αντίδραση (18.26)

$$\text{πυροσταφυλικό οξύ} + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{L-LDH}} \text{L-γαλακτικό οξύ} + NAD^+ \quad (18.26)$$

Το παραγόμενο NADH προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

3. *Διάφοροι προσδιορισμοί*

Προσδιορισμός λεκιθίνης[4]

Η περιεκτικότητα σε λεκιθίνη αποτελεί μέτρο της ποσότητας των αυγών σε διάφορα τρόφιμα. Η λεκιθίνη υδρολύεται παρουσία του ενζύμου λεκιθινάση D προς φωσφατιδυλικό οξύ και χολίνη. Η λεκιθίνη και το φωσφατιδυλικό οξύ είναι διαλυτά στον αιθέρα, ενώ η χολίνη στο νερό.

Μετά το τέλος της ενζυματικής αντίδρασης, το φωσφατιδυλικό οξύ διαχωρίζεται από τη χολίνη κατόπιν εκχύλισης με αιθέρα, ενώ η χολίνη μπορεί να καταβυθιστεί από υδατικό διάλυμα με το αντιδραστήριο Reinecke. Το προϊόν της αντίδρασης αυτής έχει χρώμα κόκκινο-μωβ και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στο λ= 680nm.

Β. Προσδιορισμός ενεργότητας των ενζύμων

Από τους ποικίλους προσδιορισμούς ενζύμων στα τρόφιμα πρωταρχικής σημασίας είναι οι εξής:

1) Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα

Η φωσφατάση υπάρχει στο νωπό γάλα και είναι αρκετά ευαίσθητη έναντι της θερμοκρασίας. Καταστρέφεται κατά την παστερίωση του γάλακτος (Θ=61-65°C), γιαυτό και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της σωστής θερμικής κατεργασίας του τελευταίου. (Για μεθόδους προσδιορισμού της φωσφατάσης βλ. εφαρμογές).

2) Ο Προσδιορισμός πολυφαινολοξειδάσης στον φυτικό ιστό

Η πολυφαινολοξειδάση μετέχει στην αντίδραση οξειδωτικής αμαύρωσης των φρούτων, στη ζύμωση των φύλλων του τσαγιού κ.τλ. (Για μεθόδους προσδιορισμού της πολυφαινολοξειδάσης βλ. εφαρμογές).

3) Ο Προσδιορισμός της πρωτελυτικής δράσης των πρωτεασών

Οι πρωτεάσες χρησιμοποιούνται στη θρόμβωση της καζεΐνης για την παρασκευή του τυριού, στην τρυφεροποίηση του κρέατος κ.α.

Η πρωτεολυτική δράση των πρωτεασών προσδιορίζεται από την ικανότητα του ενζύμου να προκαλέσει την διάσπαση ή θρόμβωση των πρωτεϊνών του συγκεκριμένου υποστρώματος πάνω στο οποίο δρα. (Για μεθόδους προσδιορισμού των πρωτεασών βλ. εφαρμογές).

4) Ο Προσδιορισμός λιπασών στο γάλα

Η λιπάση είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του λίπους του γάλακτος προς ελεύθερα λιπαρά οξέα. Το φαινόμενο μεταξύ άλλων προκαλεί αλλοίωση στη γεύση του προϊόντος. (Για μεθόδους προσδιορισμού της ενεργότητας της λιπάσης βλ. εφαρμογές).

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

18.3 Εφαρμογές

Ενζυματικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των εξής υποστρωμάτων:

Του οξικού οξέος, φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm σε χυμούς φρούτων, στο κρασί, στο ξύδι, στη μπύρα, σε τυριά, γιαούρτι και μαγιονέζα[3,9,10].

Του κιτρικού οξέος, φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm σε μπύρα, κρασί και χυμούς φρούτων[3,12]. Του γαλακτικού οξέος, φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm στο κρασί, στη μπύρα, στο γάλα, στα τυριά και το γιαούρτι[3,9,10]. Του ηλεκτρικού οξέος φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm σε κρασί, χυμούς φρούτων και τυρί τύπου Swiss[3]. Του πυροσταφυλικού οξέος, φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm στο γάλα και το τυρί[2,3]. Του μηλικού οξέος, φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm στο κρασί[2,3]. Του γλουταμινικού οξέος, χρωματομετρικά στο λ=492 nm σε σούπες, εκχυλίσματα κρέατος, λουκάνικα, τοματοπολτό[11] κ.α.

Της γλυκόζης/φρουκτόζης φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm σε χυμούς φρούτων, στο κρασί, στη μπύρα, σε μαρμελάδες, στο μέλι[2,3] κ.α. Της λακτόζης/γαλακτόζης φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm στο νωπό και συμπυκνωμένο γάλα στη σοκολάτα, στα σκληρά τυριά, στο παγωτό και τις παιδικές τροφές[2,3,13,14].

Της μαλτόζης, φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm σε διάφορα σακχαρούχα τρόφιμα[3,15]. Της ραφινόζης φασματοφωτομετρικά στο λ=340 nm σε σιρόπια, στη μέλασσα και άλλα ζαχαρώδη προϊόντα[2,3]. Της σακχαρόλης φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm στο κρασί, στη μπύρα, στη σοκολάτα, στις κομπόστες και στο μέλι[2,3]. Του αμύλου φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm σε αμυλούχα τρόφιμα, όπως δημητριακά, οπωροκηπευτικά κ.α.[2,3]

Της χοληστερόλης χρωματομετρικά στο λ=405 nm σε χυλοπίτες, αυγά, λουκάνικα, ζωικό λίπος και μαγιονέζα[3]. Της αιθανόλης, φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm σε χυμούς φρούτων, σοκολάτα και σοκολατούχα τρόφιμα[2,3] και της γλυκερίνης φασματοφωτομετρικά στο λ=340nm σε χυμούς φρούτων, κρασί, μπύρα κ.α.[3,11].

Ακόμη οι ενζυματικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση της θέσης 1 από της θέσης 3 στα τριγλυκερίδια των λιπαρών υλών[16].

Όσον αφορά τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων σε διάφορα υποστρώματα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εξής εφαρμογές:

Προσδιορισμός της υπεροξειδάσης: (α) χρωματομετρικά με βάση το ποσόν της χρωστικής που σχηματίζεται κατόπιν οξείδωσης φαινολικών[17] (γουαϊκόλη) ή αρωματικών αμινοενώσεων (p-αμινοβενζοϊκό οξύ), (β) ογκομετρικά κατόπιν οξείδωσης του ασκορβικού οξέος υπό του H_2O_2 παρουσία της 2,6-διχλωρο-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

φαινολινδοφαινόλης[18] σε φρέσκα και κατεψυγμένα κηπευτικά, όπως πατάτες, καρρότα, αρακά, μπάμιες[7] κ.α, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του blanching στα προϊόντα αυτά.

Προσδιορισμός της καταλάσης; που βασίζεται στον προσδιορισμό του εναπομείναντος ποσού H_2O_2[19], το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα δράσης του ενζύμου αυτού, σε κατεψεγμένο αρακά.

Προσδιορισμός της πολυφαινολοξειδάσης[6] (ή φαινολάσης ή κατεχολοξειδάσης): (α) μανομετρικά κατόπιν μέτρησης του ρυθμού απορρόφησης του οξυγόνου κατά τη διάρκεια αερόβιας οξείδωσης φαινολικών υποστρωμάτων[20] ή (β) χρωματομετρικά κατόπιν μέτρησης του ρυθμού οξείδωσης της κατεχόλης σε pH=5[7,21] σε μηλοχυμό, μπανάνες, αχλάδια κ.α. για τον έλεγχο της ενζυματικής/οξειδωτικής αμαύρωσης στα προϊόντα αυτά.

Προσδιορισμός της φωσφατάσης, χρωματομετρικά κατόπιν μέτρησης του χρώματος του προϊόντος διάσπασης της φωσφορικής φαινολαφθαλεΐνης στο λ=550nm που προκαλείται από το ένζυμο,[5,22] για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της παστερίωσης στο γάλα.

Προσδιορισμός της πρωτεάσης (θρυψίνης): (α) χρωματομετρικά[23] (μέθοδος τρινιτροβενζοσουλφονικού οξέος), (β) φθορισμομετρικά[23] και (γ) φασματοφωτομετρικά[23] στο λ=280nm για τον έλεγχο της αποπεράτωσης της πρωτεόλυσης στο γάλα, καθώς και της πρωτεάσης (παπαΐνης) ογκομετρικά[8] για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας τρυφεροποίησης του κρέατος κ.α.

Προσδιορισμός ενεργότητας της λιπάσης ογκομετρικά[24] με KOH, οπότε προσδιορίζονται τα προϊόντα της λιπόλυσης, δηλαδή τα ελεύθερα λιπαρά οξέα π.χ. στο γάλα.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Βουδούρη ΕΚ** και **Κοντομηνά ΜΓ**, Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων, Αθήνα (1985)
2. **Bergmeyer HU** (edit), Methods in Enzymatic Analysis Vol 3, Academic Press, New York (1974)
3. Methods in Enzymatic Foods Analysis, Boehringer Manheim G mbM, Biochem (1977-1978)
4. **Griffin FJ** and **Casson CB**: Analyst 86, 544 (1961)
5. **Babson AI** and **Greeley SJ** J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 50, 555 (1967)
6. **Mayer AM, Harel E** and **Ben-Shaw R** Phytochem 5,783 (1968)
7. **Joslyn MA,** Methods in Food Analysis, Academic Press, New York (1970)
8. **AOAC** Assoc. Off. Agr. Chem. 10th edit. Weshington, DC (1965)
9. **Bergermeyer HU** (edit) Methods in Enzymatic Analysis Vol. 1 Academic Press, New York (1974)
10. **Bergermeyer HU** (edit) Methods Enzymatic Vol 2, Academic Press, New York (1974)
11. **Bergmeyer H.U.** (edit) Methods in Enzymatic Vol 4 Academic Press, New York (1974)
12. **Möllering H** and **Gruber W,** Anal. Biochem. 17, 369 (1966)
13. **Bahl RK** Analyst 96, 88 (1971)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

14. **Bahl RK** Analyst 97, 559 (1972)
15. **Postel W, Drawert F** and **Hagen W** Deut. Lebensm.-Rundsch. 67, 107 (1971)
16. **Holman ET** (edit) Progress in Chemistry of Fats and Other Lipids. Vol 12, Pergamon Press, Oxford (1972)
17. **Fields ML.**, Laboratory Manual in Food Preservation, AVI. Publ. Co. Westport Conn. (1977)
18. **Joslyn MA** and **Zuegg E** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 39, 267 (1956)
19. **O'Neil, RE** J. Assoc. Off. Agr. Chem. 45, 749 (1962)
20. **Mayer AM, Harel E** and **Ben Shaw R**, Phytochem 5, 783 (1966)
21. **Ponting JD** and **Joslyn MA** Arch. Biochem. 19, 47 (1948)
22. **Babson AI** and **Greedey SJ** J. Assoc. Off Agr. Chem. 50, 555 (1967)
23. **Kwan KKH, Nakai S** and **Skura BJ** J.Food Sci. 48, 1418 (1983)
24. **Deeth HC** and **Gerald CH**, The Austr. J. of Dairy Tech. June, 53 (1976)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΕΤΑΣΙΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

19.1 Εισαγωγή

Κατ' αναλογία προς την ενζυματική ανάλυση, με τον όρο μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων νοείται αφ' ενός ο προσδιορισμός συστατικού ή συστατικών των τροφίμων που επιτυγχάνεται με την βοήθεια των μικροοργανισμών, αφ' ετέρου ο προσδιορισμός του αριθμού και του τύπου των μικροοργανισμών που απαντούν σε συγκεκριμένο τρόφιμο.

Στο παρόν κεφάλαιο θα γίνει μια συνοπτική αναφορά στο δεύτερο από τα παραπάνω αντικείμενα και θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στο πρώτο, το σχετικό με την ανάπτυξη της μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των συστατικών των τροφίμων.

19.2 Προσδιορισμός συστατικών των τροφίμων με την βοήθεια των μικροοργανισμών

Συστατικά που προσδιορίζονται με την βοήθεια των μικροοργανισμών περιλαμβάνουν τις βιταμίνες, τα αμινοξέα, τους υδατάνθρακες, τα παράγωγα των νουκλεϊνικών οξέων, τις πουρίνες κ.α.

Κάθε μικροβιολογική εξέταση στηρίζεται στην παρατήρηση ότι παρουσία αυστηρά καθορισμένων ποσοτήτων ορισμένων ουσιών-συστατικών, το ποσοστό της ανάπτυξης των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών είναι συνάρτηση της ποσότητας των ουσιών αυτών.

Σύμφωνα με την τυποποιημένη μεθοδολογία το υπό προσδιορισμό συστατικό προστίθεται σε υγρό ή ημίρευστο μέσον το οποίο στη συνέχεια ενοφθαλμίζεται με συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ακολούθως μετρείται συνήθως η ενίσχυση/αναστολή της ανάπτυξης του τελευταίου. Η μετρούμενη απόκριση εξαρτάται από την επίδραση της υπό μελέτη ουσίας στον μεταβολισμό του χρησιμοποιούμενου μικροοργανισμού.

Παράμετροι της μεταβολικής αυτής απόκρισης μπορεί να είναι: η παραγωγή οξέων ή CO_2, η πρόσληψη O_2, η αναγωγή των νιτρικών αλάτων κ.α.

Α. Οι μικοοργανισμοί

Η επιλογή του μικροοργανισμού για την συγκεκριμένη ανάλυση γίνεται με

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

βάση τα παρακάτω κριτήρια: (1) την ευαισθησία του στην υπό μελέτη ουσία (2) την ευκολία καλλιέργειάς του (3) την ύπαρξη ή μη εύκολα μετρούμενης μεταβολικής παραμέτρου και (4) την ανθεκτικότητά του κατά την διάρκεια του σχεδιαζόμενου προσδιορισμού. Ευνόητον είναι πως για τους παραπάνω προσδιορισμούς αποφεύγεται κατά το δυνατόν η χρήση παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι χρησιμοποιούμενοι μικροοργανισμοί κατά σειρά συχνότητας χρήσης περιλαμβάνουν τα βακτήρια, τους ζυμομήκυτες, τα πρωτόζωα και τους μύκητες.

Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών, αμινοξέων, βιταμινών, υδατανθράκων, απολυμαντικών ουσιών κ.α. Ειδικά τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactobacillus, Streptococcus και Leuconostoc), λόγω των ιδιαίτερα πολύπλοκων θρεπτικών αναγκών που παρουσιάζουν, κατέχουν πρωταρχική θέση, όσον αφορά τη συχνότητα χρήσης τους, μεταξύ των λοιπών βακτηρίων. Οι ζυμομύκητες χρησιμοποιούνται κυρίως στον προσδιορισμό βιταμινών, τα πρωτόζωα στον προσδιορισμό ορμονών, βιταμινών, παραγώγων των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και στον προσδιορισμό της βιολογικής αξίας των πρωτεϊνών, ενώ οι μύκητες βρίσκουν κάποια εφαρμογή στον προσδιορισμό ιχνομετάλλων και αντιβιοτικών.

Η συντήρηση της καλλιέργειας επιτυγχάνεται συνήθως σε δοκιμαστικό σωλήνα με την τεχνική «κεκλιμένου άγαρ» κατόπιν διαδοχικής αλλαγής σε μηνιαία διαστήματα.

Β. Το θρεπτικό μέσον

Το ιδανικό θρεπτικό μέσο πρέπει: (1) να περιέχει όλα τα απαραίτητα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού στοιχεία (πηγή ενέργειας, πηγή N_2, ανόργανα άλατα κ.α.), πλην εκείνου που μελετάται (περιοριστικό συστατικό) και το οποίο προστίθεται σε αυξανόμενες ποσότητες, (2) να μην περιέχει αναστολείς, υποκατάστατα ή ανταγωνιστές του υπό μελέτη συστατικού, και (3) να έχει τιμή pH που ευνοεί την δραστικότητα του μελετούμενου συστατικού και την ανάπτυξη του επιλεγέντος μικροοργανισμού.

Γ. Μέθοδοι αναλυτικής μικροβιολογίας

Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν: (1) τη νεφελομετρία, (2) τη σταθμική ανάλυση, (3) τη μέτρηση κάποιας μεταβολικής απόκρισης του μικροοργανισμού και (4) την επιφανειακή διάχυση.

(1) Νεφελομετρία

Σ' αυτή, προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις της υπό μελέτην ουσίας σε σειρά δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν το θρεπτικό μέσον. Το τελευταίο ενοφθαλμίζεται με τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό και επωάζε-

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ται επί ορισμένο χρόνο (8-24 hrs). Η μεταβολική απόκριση,(νεφέλωμα),του μικροοργανισμού μετρείται σε φωτόμετρο. Η ποσότητα της υπό μελέτην ουσίας υπολογίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης που έχει προκύψει μετρώντας τις αντίστοιχες αποκρίσεις γνωστών ποσοτήτων της ουσίας. Η μέθοδος εφαρμόζεται στον προσδιορισμό βιταμινών, αντιβιοτικών, αμινοξέων κ.α.

(2) Σταθμική ανάλυση

Σ' αυτήν η απόκριση του μικροοργανισμού, κατόπιν ενοφθαλμισμού –σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν αυξανόμενες ποσότητες της υπό προσδιορισμόν ουσίας– και επώασης, μετρείται από την αύξηση του βάρους των κυττάρων του μικροοργανισμού. Εννοείται πως το βάρος αυτό, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας. Η μέθοδος είναι απλή αλλά χρονοβόρα.

(3) Μέτρηση μεταβολικής απόκρισης του μικροοργανισμού

Η συνήθως χρησιμοποιούμενη παράμετρος της μεταβολικής απόκρισης του μικροοργανισμού είναι η παραγωγή οξέων. Το ποσόν του παραγόμενου οξέος (π.χ. γαλακτικό οξύ) είναι ανάλογο του αριθμού των κυττάρων του μικροοργανισμού που με την σειρά του είναι ανάλογος της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας.

(4) Επιφανειακή διάχυση

Σ' αυτή σχηματίζεται ζώνη ανάπτυξης ή αναστολής του συγκεκριμένου μικροοργανισμού γύρω από το σημείο τοποθέτησης του τελευταίου. Η υπό μελέτη ουσία διαχέεται ακτινωτά, μέσω του στερεού υποστρώματος μέσα στο τρυβλίο petri. Το μέγεθος της ζώνης ανάπτυξης ή αναστολής είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της υπό προσδιορισμό ουσίας. Ο προσδιορισμός της ουσίας προκύπτει κατόπιν μέτρησης της απόστασης κατά την οποία διαχέεται η υπό μελέτη ουσία και σύγκρισης προς την αντίστοιχη απόσταση «πρότυπης» ουσίας.

Δ. Πορεία ανάλυσης με την βοήθεια μικροοργανισμών

Η πορεία αυτή περιλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια:

(1) Παρασκευή του θρεπτικού υλικού, (2) παρασκευή της αρχικής καθαρής (stock) καλλιέργειας και συντήρηση αυτής (3) παρασκευή του θρεπτικού υλικού στο οποίο απουσιάζει η εξεταζόμενη ουσία (4) εκχύλιση της εξεταζόμενης ουσίας από το δείγμα τροφίμου (5) αποστείρωση των δοκιμαστικών σωλήνων και των θρεπτικών υλικών (6) ενοφθαλμισμό των μέσων με τον μικροοργανισμό (7) επώαση, (8) προσδιορισμό της απόκρισης στα δύο θρεπτικά υλικά και (9) υπολογισμό της συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

19.3 Προσδιορισμός αριθμού μικροοργανισμών

Ο όρος «ολικός αριθμός» αναφέρεται στα βακτήρια, ενώ οι μύκητες και οι ζυμομύκητες προσδιορίζονται σαν ξεχωριστή ομάδα. Οι σπουδαιότερες μέθοδοι προσδιορισμού του αριθμού των μικροοργανισμών σ' ένα δείγμα περιλαμβάνουν:

(Α) τη μέθοδο προτύπων αριθμήσεων σε τρυβλία (std. plate counts, SPC)

(Β) τη μέθοδο αναγωγής χρωστικών (dye reduction)

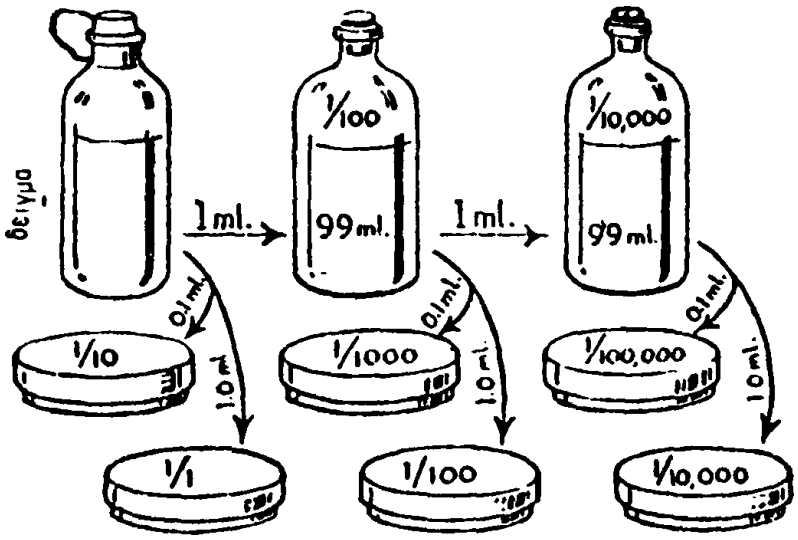
(Γ) τη μέθοδο πιο πιθανών αριθμών (most probable numbers, MPN)

(Δ) τη μέθοδο μετρήσεων με άμεση μικροσκόπηση (direct microscopic counts, DMC)

Α. Μέθοδος πρότυπων αριθμήσεων σε τρυβλία

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τον αριθμό των ζώντων αεροβίων και προαιρετικά αεροβίων μεσόφιλων βακτηρίων ανά μονάδα όγκου του εξεταζόμενου δείγματος. Απ' αυτήν με μικρές διαφοροποιήσεις στο χρησιμοποιούμενο θρεπτικό μέσο, στο χρόνο επώασης κτλ. προκύπτουν παρεμφερείς τεχνικές όπως: η αρίθμηση σε τρυβλία των θερμόφιλων (TPC), των ψυχρόφιλων (PPC), των κολοβακτηριοειδών (CPC), των ζυμομυκήτων, μυκήτων (YMPC) κ.α.

Σύμφωνα με τη μέθοδο τα δείγματα τροφίμων αραιώνονται με κατάλληλο αραιωτικό και τα υποπολλαπλάσια (κλάσματα) τοποθετούνται σε τρυβλία μαζί με το στερεό θρεπτικό υλικό σε ρευστή μορφή (Σχ. 19-1). Ακολουθεί ενσωμάτωση του δείγματος στο θρεπτικό υλικό με κυκλικές και οριζόντιες κινήσεις. Τα τυβλία επωάζονται ανεστραμμένα σε κατάλληλη θερμοκρασία για



Σχ. 19-1. Τρόπος προετοιμασίας διαφόρων αραιώσεων γάλακτος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ορισμένο χρόνο και στη συνέχεια μετρούνται όλες οι ορατές αποικίες σε μετρητή αποικιών.

Σε κάθε ομάδα δειγμάτων τοποθετούνται και τρυβλία μάρτυρες με τα οποία γίνεται ο έλεγχος της στειρότητας των υλικών (αραιωτικών, τρυβλίων, υποστρώματος).

Η έκφραση των αποτελεσμάτων στηρίζεται στη συμβατική παραδοχή ότι κάθε ζωντανό κύτταρο δίνει μια ορατή αποικία.

Ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιάζεται επί τον αντίστοιχο συντελεστή αραίωσης και το αποτέλεσμα εκφράζει τον ολικό αριθμό μεσόφιλων βακτηρίων ανά gr ή ml δείγματος.

Παράδειγμα μέτρησης της ολικής χλωρίδας (ΟΜΧ) σε δείγμα τροφίμου φαίνεται στον Πίνακα 19.1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19.1

Παραδείγματα αρίθμησης και εξαγωγής αποτελεσμάτων Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε δείγματα τροφίμων

Αριθμός δείγματος	Αριθμός αποικιών ανά τρυβλίο 10^{-2}	10^{-3}	Λόγος	ΟΜΧ/g ή ml
1	280	24	-	28,000
2	230	31	1:1.3	27,000
3	130	32	1:2.3	13,000
4	14	1	-	1,400
5	0	0	-	< 100
6	ΠΔΑ*	6870	-	>6,500,000
7	ΠΔΑ*	4120	-	4,100,000
8	250	42	1:1	33,000
	280	38		
9	220	43	1:2.1	19,000
	150	36		

ΠΔΑ*: Πολυάριθμες, δεν αριθμούνται.

Αντί τρυβλίων είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν δοκιμαστικοί σωλήνες (τεχνική όρθιου σωλήνα).

Β. Μέθοδος αναγωγής χρωστικών

Σ' αυτή κατάλληλα επεξεργασμένα δείγματα τροφίμων προστίθενται σε πρότυπα διαλύματα κυανού του μεθυλενίου ή ρεζαζουρίνης και παρατηρείται η αναγωγή των χρωστικών αυτών (το κυανούν του μεθυλενίου μεταπίπτει από κυανό σε λευκό και η ρεζαζουρίνη από τεφροκύανη σε ροζ ή λευκή). Η μεταβολή του χρώματος των χρωστικών οφείλεται στην αφαίρεση οξυγόνου και το σχηματισμό αναγωγικών ουσιών κατά τον μεταβολισμό των βακτηρίων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Βασική παραδοχή της μεθόδου είναι ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των βακτηρίων στο δείγμα τόσο ταχύτερα αλλάζουν χρώμα οι χρωστικές.
Η μέθοδος εφαρμόζεται στην εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου του γάλακτος και έχει ως εξής: Σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμειγνύονται το δείγμα με μικρή ποσότητα κυανού του μεθυλενίου και ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C, έτσι ώστε το νερό να καλύπτει πλήρως τον όγκο του δείγματος. Στη συνέχεια παρακολουθείται ανά 30min ο αποχρωματισμός του δείγματος.
Βάσει του χρόνου αποχρωματισμού προκύπτει η ποιότητα του γάλακτος με τη βοήθεια του Πίνακα 19.2

ΠΙΝΑΚΑΣ 19.2

Διάκριση του γάλακτος σε ποιότητες με βάση τον αποχρωματισμό του κυανού του μεθυλενίου

Χρόνος αποχρωματισμού	Αριθμός μικροοργανισμών	Ποιότητα	Μικροβιακή κατάσταση
Μεγαλύτερος των 4.5 ωρών	μέχρι 500,000	Α (καλή)	Κανονικό
Από 2 ώρες έως 4.5	500,000-4,000,000	Β (ικανοποιητική)	Ελαφρά μολυσμένο
Από 20 min έως 2 ώρες	4,000,000-20,000,000	Γ (κακή)	Αρκετά μολυσμένο
Μικρότερος των 20min	Πάνω από 20,000,000	Δ (πολύ καλή)	Ισχυρά μολυσμένο

Γ. Μέθοδος των πιο πιθανών αριθμών

Σ' αυτή ο χειρισμός των δειγμάτων των τροφίμων γίνεται όπως και στη μέθοδο των προτύπων αριθμήσεων σε τρυβλία. Το δείγμα ή οι αραιώσεις του ενοφθαλμίζονται σε σειρά σωλήνων με κατάλληλο υγρό θρεπτικό υλικό. Ο αριθμός των μικροοργανισμών στο δείγμα προσδιορίζεται με τη βοήθεια πινάκων του πιο πιθανού αριθμού. Η μέθοδος είναι στατιστική και δίνει αριθμούς γενικά υψηλότερους εκείνων των προτύπων αριθμήσεων σε τρυβλία.

Δ. Μέθοδος μετρήσεων με άμεση μικροσκόπηση

Σ' αυτή, παρασκευάζονται επαλείψεις δείγματος του τροφίμου π.χ. γάλα ή αραιώσεις του πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου οι οποίες ξηραίνονται σε πυριατήριο στους 40-45°C επί 5min. Ακολουθεί εμβάπτιση των πλακών σε ξυλόλιο για απομάκρυνση του λίπους, νέα ξήρανση, εμβάπτιση σε διάλυμα χρωστικής (συνήθως κυανούν του μεθυλενίου) επί 10-15 sec, έκπλυση με άφθονο νερό και στέγνωμα. Στη συνέχεια παρατηρείται το παρασκεύασμα με ελαιοκαταδυτικό φακό σε διάφορα οπτικά πεδία (15-30) επιφανείας 1cm^2 εκάστου. Από τον μέσο αριθμό κυττάρων ανά οπτικό πεδίο υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά gr ή ml δείγματος.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

19.4 Προσδιορισμός τύπου μικροοργανισμών

Εκτός του αριθμού εξ ίσου σημαντικός είναι και ο προσδιορισμός του τύπου των μικροοργανισμών ο οποίος αφορά κυρίως τον έλεγχο για παθογόνα, π.χ. Clostridium botulinum, Salmonella, Staphylococcus aureus, Aspergillus flavus κ.ο.κ.

Στους προσδιορισμούς αυτούς χρησιμοποιούνται επιλεγμένα θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών, για τους οποίους υπάρχει υποψία παρουσίας στο εξεταζόμενο τρόφιμο και οι τεχνικές των προτύπων αριθμήσεων σε τρυβλία είτε του πιο πιθανού αριθμού. Ακολούθως οι ύποπτες αποικίες εξετάζονται με βιομηχικές συνήθως δοκιμές καθώς και με άλλες μεθόδους.

Το όλο θέμα εν τούτοις εκφεύγει του σκοπού του παρόντος βιβλίου.

19.5 Εφαρμογές

Α. Προσδιορισμός συστατικών με τη βοήθεια μικροοργανισμών

1. Βιταμίνες

Βιταμίνες όπως η ριβοφλαβίνη[1], η νιασίνη[1] και η βιταμίνη B_6[1] εκχυλίζονται από το εξεταζόμενο τρόφιμο κατόπιν όξινης υδρόλυσης με HCl. Κατόπιν κατάλληλων αραιώσεων οι παραπάνω βιταμίνες προσδιορίζονται νεφελομετρικά, χρησιμοποιώντας αντίστοιχα τους μικροοργανισμούς Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum και Saccharomyces carlsbergensis για τους οποίους οι αντίστοιχες βιταμίνες αποτελούν περιοριστικούς απράγοντες ανάπτυξης.

2. Αμινοξέα και προσδιορισμός θρεπτικής αξίας πρωτεϊνών

Αν και η χρωματογραφία ιονανταλλαγής και στήλης παραμένουν οι πλέον ενδεδειγμένες μέθοδοι προσδιορισμού της αλληλουχίας των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης, με τις μεθόδους αυτές δεν μπορεί να προσδιοριστεί η θρεπτική αξία της πρωτεΐνης γιατί η παρουσία κάποιου ή κάποιων αμινοξέων δεν σημαίνει οπωσδήποτε δυνατότητα αξιοποίησης αυτών (βιοδιαθεσιμότητα) από τον οργανισμό. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού χρησιμοποιούνται μικροβιολογικές μέθοδοι (χρήση πρωτοζώων και βακτηρίων).

Από τα βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί τα: Streptococcus faecalis[2], S. zymogenes[3] και Leuconostoc mesenteroiedes[4]. Οι υπό μελέτη πρωτεΐνες υφίστανται αρχικά χώνευση με χημικά ή ενζυματικά μέσα, το δε προϊόν υδρόλυσής τους (αμινοξέα) χρησιμεύει σαν πηγή αζώτου για τους παραπάνω μικροοργανισμούς. Ο βαθμός ανάπτυξης των βακτηρίων προσδιορίζεται νεφελομετρικά ή κατόπιν μέτρησης του ποσού του παραγόμενου οξέος, σε

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

σχέση με «πρότυπη» πρωτεΐνη, όπως π.χ. η καζεΐνη. Έτσι συγκριτικά προκύπτει η θρεπτική αξία της πρωτεΐνης.
Ανάλογη είναι η χρήση των πρωτοζώων, όπως το Tetrahymena Pyriformis[5], το οποίο λόγω ύπαρξης στα κύτταρα του πρωτεολυτικών ενζύμων, μπορεί και χρησιμοποιεί ακέραιες τις υπό μελέτη πρωτεΐνες σαν πηγή αζώτου. Έτσι δεν χρειάζεται προκαταρκτική πρωτεόλυση με οξέα ή εξωτερικά ένζυμα. Σημαντική είναι επίσης η χρήση των μικροοργανισμών στον προσδιορισμό του περιοριστικού αμινοξέος για την ανάπτυξη τους.[6]

Β. Προσδιορισμός αριθμού μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Στο γάλα[7,8] επιτελούνται οι προσδιορισμοί προτύπων αριθμήσεων σε τρυβλία (SPC) και κολοβακτηροειδών (CPC). Οι τιμές SPC και CPC για το νωπό και παστεριωμένο γάλα δίνονται στον πίνακα 19.3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19.3

Όρια αριθμού βακτηρίων ωμού και παστεριωμένου γάλακτος Α ποιότητας

Προϊόν	όρια αριθμού βακτηρίων
ωμό γάλα	SPC/ml = 200,000 έως 400,000 CPC/ml = 50 έως 150
παστεριωμένο γάλα	SPC/ml ⩽ 20,000 CPC/ml = 5

Στα παγωτά[7,8] και τα κατεψυγμένα γλυκά επιτελούνται οι προσδιορισμοί: προτύπων αριθμήσεων σε τρυβλία (SPC), κολοβακτηροειδών (CPC) και ζυμομυκήτων/μυκήτων (YMPC).
Στα τυριά[7,8] όπου η χλωρίδα είναι ιδιαίτερα πλούσια, ο προσδιορισμός SPC δεν έχει πρακτική αξία. Έτσι εδώ προσδιορίζονται τα CPC και YMPC.
Στα κατεψυγμένα προϊόντα[7] προσδιορίζονται τα SPC, και CPC. Στα κρέατα νωπά και κατεργασμένα[7,9] προσδιορίζονται τα SPC, YMPC καθώς και το DMC (μέτρηση μικροοργανισμών με άμεση μικροσκόπηση). Στα ψάρια και τα οστρακοειδή[7,10] προσδιορίζονται τα SPC, CPC. Τέλος στα αφυδατωμένα προϊόντα όπως γάλα, αυγά[7] κ.α. προσδιορίζονται τα SPC, CPC, TPC, YMPC και DMC ενώ για τα αφυδατωμένα δημητριακά και τα προϊόντα τους[7] προσδιορίζονται τα SPC, TPC, YMPC, CPC καθώς και οι δοκιμές αναεροβίων[7], Salmonella[7] και Staphylococcus[7].

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Osborne DR and Voogt P.:** The Analysis of Nutrients in Foods, Academic Press, London

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

(1978).
2. **Halery S** and **Grossowicz N.** Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 82, 567 (1953)
3. **Ford JE** Brit. J. Nutr. 16, 409 (1962)
4. **Horn MJ, Blum AE** and **Womack MJ.** J. Nutr. 52, 375 (1954)
5. **Teunison DJ** Anal. Biochem 2, 405 (1961)
6. **Stott JA** and **Smith H** Brit. J. Nutr. 20, 663 (1966)
7. **Dilliello LR** Methods in Food and Dairy Microbiology, AVI Publ. Co. Westport Conn. (1982)
8. **Marth EM.**, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 14th edit. Amer. Publ. Helath Assoc. Wash DC (1974)
9. **Sharf JM.** Recommended Methods for Microbiological Examination of Foods 2nd edit. Amer. Publ. Helath Assoc. Wash DC (1974)
10. Amer. Publ. Health Assoc. Sub Comm: Recommended Procedures for Examination of Sea Water and Shellfish, 4th edt. Publ. Health. Assoc. Wash. D.C. (1970)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

20.1 Εισαγωγή

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ποιοτική εκτίμηση, την αποδοχή καθώς και την ικανότητα πέψης των τροφίμων από τον καταναλωτή παίζουν τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Στα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνονται (1) η εμφάνιση του προϊόντος (χρώμα, μέγεθος, σχήμα, πιθανός τραυματισμός, στιλπνότητα κ.τ.λ.), (2) η υφή του προϊόντος (ιξώδες, ρεολογικές ιδιότητες, σκληρότητα, χυμώδες κ.τ.λ. και (3) η οσμή και η γεύση του προϊόντος (αρωματικό, όξινο, μπαγιάτικο, δύσοσμο κ.τ.λ.).

Παραδείγματα εφαρμογής των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων σαν κριτήρια ποιότητας αυτών αποτελούν: ο βαθμός αμαύρωσης της πατάτας κατά το τηγάνισμα, η διαύγεια του κρασιού, η απόχρωση του κόκκινου χρώματος στο κρέας κατά τη συντήρηση, η συνεκτικότητα του ιστού στο ψάρι, η σκλήρυνση (επαναβάθμιση) του ψωμιού κατά την παλαίωση, η δυσοσμία στο κρέας και τα ψάρια λόγω σήψης, το άρωμα του καφέ, η οξίνιση του κρασιού κ.ο.κ.

Τα οργανοληπτικά εξ άλλου χαρακτηριστικά ενδιαφέρουν τον παρασκευαστή ο οποίος τα χρησιμοποιεί για τον καθορισμό της προτίμησης των καταναλωτών και τέλος ενδιαφέρουν τις αντίστοιχες υπηρεσίες ελέγχου των τροφίμων (π.χ. Γενικό Χημείο Κράτους, F.D.A κ.ο.κ.), οι οποίες τα χρησιμοποιούν σαν κριτήρια για την απομάκρυνση ή διατήρηση των τροφίμων στο εμπόριο.

Σύμφωνα με τα παραπάνω είναι ευνόητο ότι η εκτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών εξαρτάται από τον υποκειμενικό παράγοντα (κλίμα, ψυχολογία, κοινωνικά πρότυπα, ηλικία, θρησκεία κ.ο.κ.). Για την εξουδετέρωση των παραγόντων αυτών τα αποτελέσματα κάθε οργανοληπτικής εξέτασης επεξεργάζονται στατιστικά. Πολλές φορές, όπου αυτό είναι δυνατόν, τα παραπάνω αποτελέσματα συσχετίζονται με αντίστοιχα αποτελέσματα που προκύπτουν κατόπιν φυσικών και χημικών μετρήσεων (αντικειμενική εξέταση).

Οι τρείς παραπάνω κατηγορίες οργανοληπτικών χαρακτηριστικών θα εξετασθούν χωριστά σύμφωνα με τη χρονική σειρά που επηρεάζουν τον καταναλωτή.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

20.2 Εξέταση εμφάνισης

Πρωταρχική σημασία στην εμφάνιση ενός τροφίμου έχει το χρώμα του. Το χρώμα των τροφίμων είναι περισσότερο αποτέλεσμα της ανάκλασης του φωτός που πέφτει σ' αυτά, παρά της διάθλασής του. Το φως, όπως είναι γνωστό, είναι μια μορφή ακτινοβολούμενης ενέργειας μήκους κύματος 380-780 nm, ενώ το χρώμα ενός αντικειμένου είναι ο τρόπος με τον οποίο αντιδρά το αντικείμενο στο φως και ερεθίζει την κόρη του ματιού. Κατά συνέπεια, το χρώμα των τροφίμων πρέπει να μελετηθεί σε συνάρτηση με την λειτουργία των οφθαλμών οι οποίοι αποτελούν τα αισθητήρια όργανα που δέχονται τα φωτεινά ερεθίσματα και δημιουργούν την αίσθηση της όρασης.

Το αίσθημα του χρώματος που σχηματίζεται στον εγκέφαλο, όταν το μάτι δει κάποιο φωτισμένο αντικείμενο, σχετίζεται με τρεις παράγοντες: (α) Το τμήμα του φάσματος· το εκπέμπει η πηγή φωτός, που φωτίζει το αντικείμενο (β) τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του αντικειμένου και (γ) την ευαισθησία του οφθαλμού στο φως.

Για να μελετήσει κανείς τις ιδιότητες του αντικειμένου, θα πρέπει να κρατήσει σταθερούς τους άλλους δύο παράγοντες. Έτσι αντί οφθαλμού χρησιμοποιείται κάποιο ευαίσθητο φωτοκύτταρο και σαν πηγή φωτός ένας ηλεκτρικός λαμπτήρας με ορισμένες προδιαγραφές.

Α. Αντικειμενική μέτρηση του χρώματος.

Για την κατάταξη και την περιγραφή των χρωμάτων υπάρχουν τρία συστήματα: Το σύστημα CIE (Commission International de l'Eclairage), το σύστημα Hunter και το σύστημα Munsell.

1. Σύστημα CIE

Το σύστημα CIE χρησιμοποιεί τρεις πηγές φωτός: την A, B και C.

Η πηγή A είναι ηλεκτρικός λαμπτήρας που λειτουργεί σε θερμοκρασία 2854°K και οι πηγές B και C όμοιοι λαμπτήρες, εφοδιασμένοι με κατάλληλα φίλτρα, έτσι ώστε το φως της μεν πηγής B να αντιστοιχεί στο φως της ηλιόλουστης μέρας, το δε φως της C, στο φως της συννεφιασμένης μέρας.

Οι ακτινοβολίες διάφορων μηκών κύματος που αποτελούν το φως, όταν προσπέσουν πάνω σε κάποιο τρόφιμο, ανάλογα με την περίπτωση, ή θα ανακλαστούν ή θα απορροφηθούν ή θα το διαπεράσουν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό. Αν π.χ. λευκό φως προσπέσει σε κάποιο αδιαφανές αντικείμενο (ψωμί), όλα τα μήκη κύματος θα ανακλαστούν εξίσου και το αντικείμενο θα φανεί στον παρατηρητή λευκό. Αν ανακλαστεί λίγο ή καθόλου φως, τότε το αντικείμενο θα φανεί γκρίζο ή μαύρο, αντίστοιχα. Τα λαχανικά π.χ. φαίνονται πράσινα, επειδή απ' το λευκό φως τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στο κόκκινο και στο μπλε χρώμα απορροφούνται, ενώ τα μήκη

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κύματος που αντιστοιχούν στο πράσινο χρώμα ανακλώνται. Κάτω από πράσινο φως, τόσο το ψωμί όσο και τα λαχανικά θα φαίνονταν πράσινα. Στην περίπτωση που το λευκό φως θα προσπέσει σε διαφανές υλικό, π.χ. στο νερό, θα διαδοθεί δια μέσου του υλικού και το εξερχόμενο απ' το υλικό φως, θα διαφέρει από το αρχικό και ως προς την ένταση και ως προς τη σύσταση των μηκών κύματος που το αποτελούν.

Τα στοιχεία που χαρακτηρίζουν κάθε χρώμα σύμφωνα με το σύστημα CIE είναι τρία: (α) Το επικρατέστερο μήκος κύματος (dominant wavelength, x) (β) η καθαρότητα (purity, y) (γ) η φωτεινότητα (lightness, Y).

Το επικρατέστερο μήκος κύματος είναι το στοιχείο εκείνο με το οποίο ξεχωρίζει το πράσινο χρώμα, από το κόκκινο, το μπλε κ.τ.λ. Η καθαρότητα είναι το στοιχείο που δίνει το βαθμό της ισχύος στο επικρατέστερο μήκος κύματος ή την απόκλισή του από την ανάμιξη του χρώματος με το λευκό φως. Η φωτεινότητα είναι το στοιχείο που έχει σχέση με το βαθμό ανάκλασης ή διέλευσης του φωτός, από το υλικό (η φωτεινότητα δημιουργεί τη γνωστή αίσθηση του γυαλιστερού).

Το σύστημα CIE είναι τριχρωματικό, δηλαδή κάθε χρώμα μπορεί να προκύψει με κατάλληλη μίξη τριών βασικών χρωμάτων. Τα τρία βασικά χρώματα είναι το κόκκινο που συμβολίζεται (X), το πράσινο (Y) και το μπλε (Z).

Πειραματικά ο προσδιορισμός του χρώματος στο σύστημα CIE γίνεται ως εξής: Μετρείται σε φασματοφωτόμετρο το ποσόν της ανακλώμενης φωτεινής ενέργειας πάνω στο δείγμα, μεταξύ των μηκών κύματος 380-780 nm, κατά διαστήματα 10nm. Η τιμή αυτή πολλαπλασιάζεται με συντελεστές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία[1] για να δώσουν τις τιμές για το X, Y και Z. Τέλος τα στοιχεία x και y, που χαρακτηρίζουν κάθε χρώμα, υπολογίζονται από τις σχέσεις: (20.1) και (20.2)

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \qquad (20.1)$$

$$y = \frac{Y}{X+Y+Z} \qquad (20.2)$$

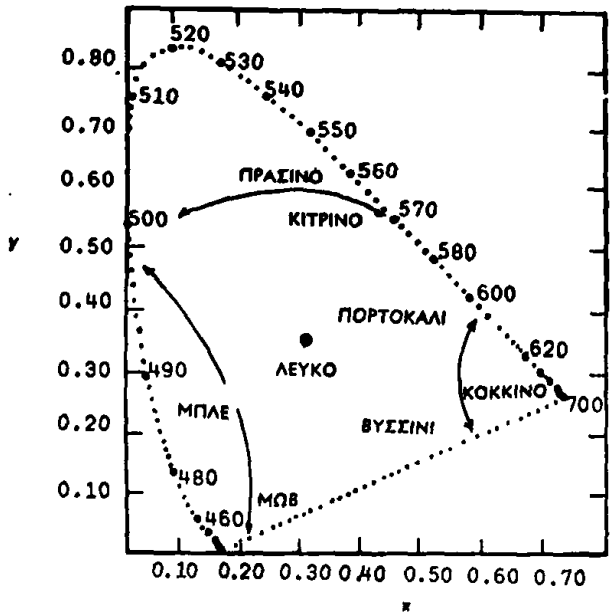
Όταν γίνει η γραφική παράσταση των χρωματικών συντεταγμένων x και y προκύπτει το λεγόμενο χρωματικό διάγραμμα (σχ. 20-1) στο οποίο κάθε χρώμα ορίζεται από ένα ζεύγος τιμών $x_n y_n$

Η μέθοδος αυτή μέτρησης του χρώματος είναι ακριβής αλλά χρονοβόρα, αν το χρησιμοποιούμενο φασματοφωτόμετρο δεν δίνει απ' ευθείας τις τιμές x και y. Τέτοια όργανα υπάρχουν, αλλά είναι πολύ ακριβά.

2. Σύστημα Munsell

Το σύστημα Munsell χρησιμοποιεί διαφορετικά στοιχεία και σύμβολα για να

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-1. Χρωματικό διάγραμμα
(Από Hunter Associates Lab. Inc., Η.Π.Α.)

περιγράψει τα χρώματα. Τα στοιχεία αυτά είναι:

- το hue που αντιστοιχεί στο επικρατέστερο μήκος κύματος (x) του συστήματος CIE
- το chroma που αντιστοιχεί στην καθαρότητα (y) του συστήματος CIE
- το value που αντιστοιχεί στη φωτεινότητα (Y) του συστήματος CIE

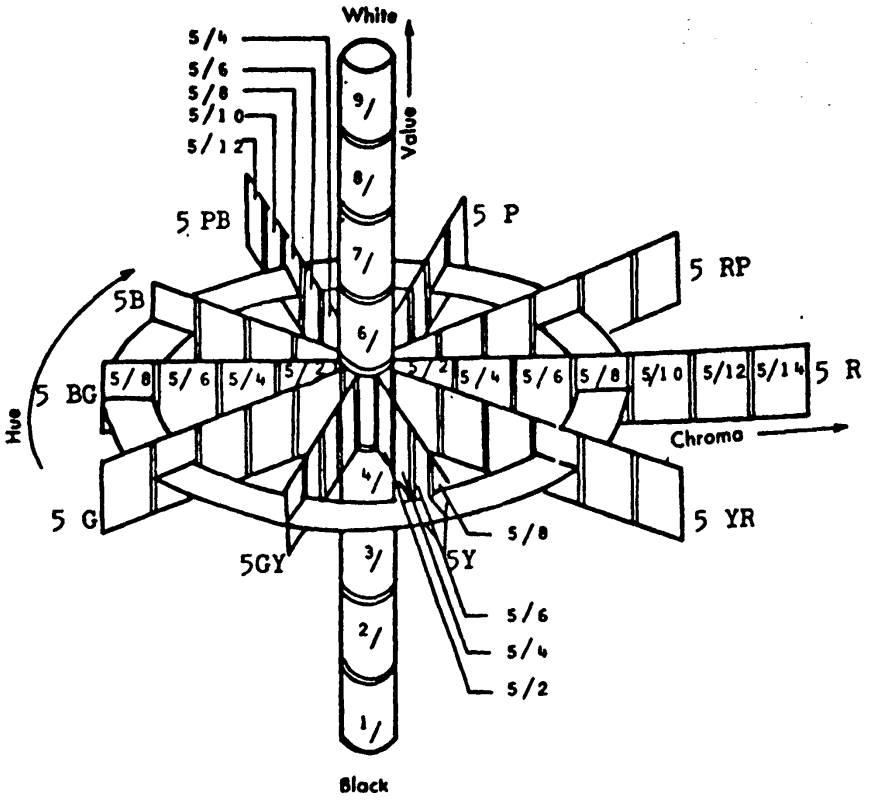
Τα τρία αυτά μεγέθη παρίστανται στο χώρο με ειδική κλίμακα όπως φαίνεται στο σχήμα 20-2.

Ένα πράσινο μήλο π.χ. στο σύστημα Munsell μπορεί να έχει την εξής χαρακτηριστική τιμή: 5GY8/4. Δηλαδή κιτρινοπράσινο (GY)-hue, φωτεινό (8/)-value και όχι πολύ βαθύ (/4)-chroma.

Η μέτρηση του χρώματος του δείγματος στο σύστημα Munsell γίνεται ως εξής:

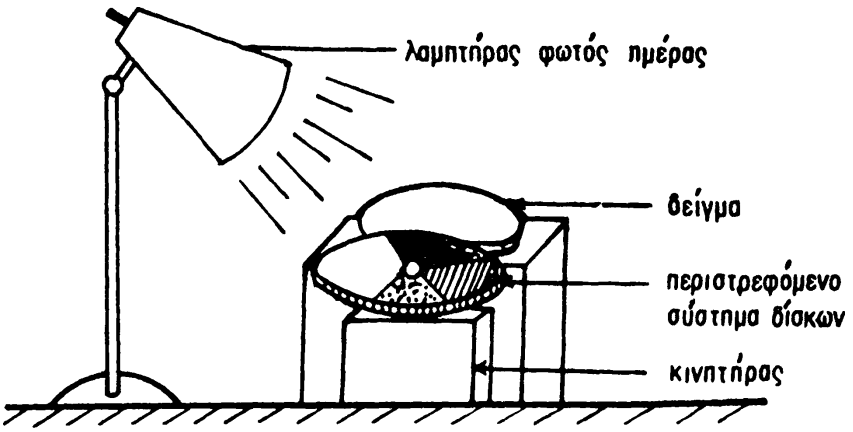
Χρησιμοποιείται η διάταξη του σχήματος 20-3. Λαμπτήρας που προσομοιάζει το φως της μέρας φωτίζει με σταθερή ένταση έναν δίσκο που έχει τη δυνατότητα περιστροφής, γύρω από κατακόρυφο άξονα, και το δείγμα τροφίμου, το χρώμα του οποίου πρόκειται να προσδιοριστεί. Στον δίσκο προστίθενται τρεις ή τέσσερις έγχρωμοι κυκλικοί τομείς ανάλογα με το χρώμα του εξεταζόμενου δείγματος. Ο δίσκος τίθεται σε περιστροφή με τέτοια ταχύτητα ώστε τα χρώματα του δίσκου να δίνουν ενιαίο χρώμα. Με αυξομείωση της συνεισφοράς του καθενός από τα τέσσερα χρώματα επιτυγχάνεται η ταύτιση του χρώματος των «προτύπων» με το υπό προσδιορισμό χρώμα.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-2. Ο χρωματικός χώρος κατά Munsell

(Από Munsell Color Co., Η.Π.Α.)



Σχ. 20-3. Αρχή χρωματομέτρου δίσκων κατά Munsell.

3. Σύστημα Hunter

Το σύστημα αυτό υιοθετεί τα σύμβολα L, a και b για τον καθορισμό του χρώματος.

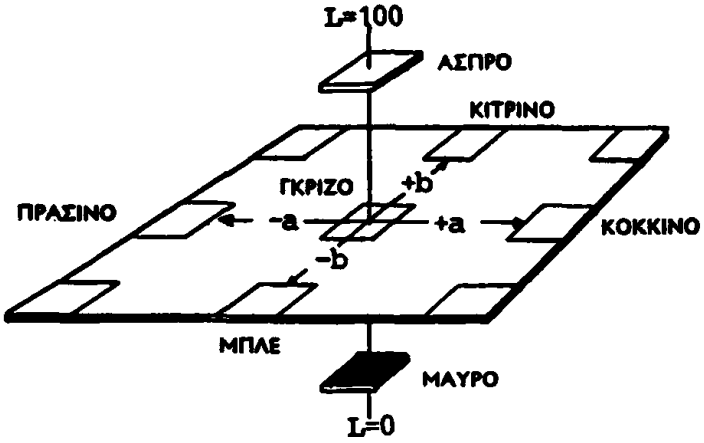
Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στο (+a)

Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στο (-a)

Το κίτρινο χρώμα αντιστοιχεί στο (+b)

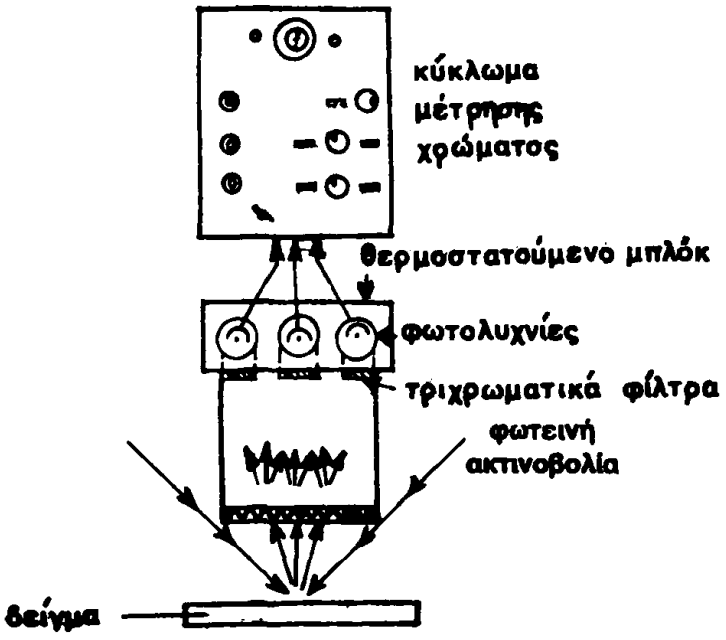
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στο (-b)
Το τρίτο σύμβολο (L) σχετίζεται με τη φωτεινότητα του χρώματος (αντίστοιχο του Y στο σύστημα CIE). Ο χρωματικός χώρος κατά Hunter με τις παραπάνω παραμέτρους φαίνεται στο σχήμα 20-4.



Σχ. 20-4. Ο χρωματικός χώρος κατά Hunter.
(Από Hunter Associates Lab. Inc., Η.Π.Α.)

Για τη μέτρηση του χρώματος στο σύστημα Hunter χρησιμοποιείται το χρωματόμετρο (να μην γίνεται σύγχυση με το φωτόμετρο) κατά Hunter (Hunter colorimeter).
Το όργανο αποτελείται από τρία διαφορετικά, ηλεκτρικά κυκλώματα, φίλτρα και φωτοκύτταρα (σχ. 20-5). Φως ορισμένης έντασης εστιάζεται στην



Σχ. 20-5. Χρωματόμετρο Hunter.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

επιφάνεια του δείγματος και συλλέγεται μέσω διαφράγματος σε κλειστό θάλαμο η κάθετα ανακλωμένη ακτινοβολία (μέτρο της παραμέτρου L). Στο πάνω άκρο του θαλάμου υπάρχουν τρία φίλτρα (κόκκινο, πράσινο, μπλε) συνδεμένα με φωτοκύτταρα που μετρούν τις τιμές των παραμέτρων α και β. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως έχουν, κατόπιν μαθηματικής μετατροπής σε παραμέτρους του συστήματος Munsell ή τέλος σαν διαφορές σε σχέση με «πρότυπο» χρώμα που μετρείται πριν από το δείγμα (μέθοδος διαφορικού χρωματόμετρου, Hunter color difference meter). Στις παραπάνω αρχές, με διάφορες όμως καινοτομίες, στηρίζονται διάφορα εμπορικά όργανα μέτρησης του χρώματος όπως το Καταγραφικό Φασματοφωτόμετρο General Electric, το χρωματόμετρο Lovibond (Lovibond Tintometer) που χρησιμοποιείται ευρέως στη μέτρηση του χρώματος των λιπών και λαδιών κ.τ.λ.

Β. Οργανοληπτική εξέταση του χρώματος

Στο είδος αυτό της εξέτασης, το χρώμα του τροφίμου αξιολογείται αποκλειστικά με την όραση. (Για λεπτομέρειες πάνω στην οργανοληπτική εξέταση του χρώματος βλ. κεφ. 20.6).

Γ. Χρωστικές τροφίμων

Το χρώμα των τροφίμων είναι αποτέλεσμα της παρουσίας σ' αυτά φυσικών ή και συνθετικών χρωστικών. Οι δεύτερες προστίθενται στα κατεργασμένα κυρίως τρόφιμα για να βελτιώσουν την εμφάνισή τους. Και οι δύο παραπάνω κατηγορίες χρωστικών είναι οργανικές ενώσεις. Στις φυσικές χρωστικές μπορούν να υπαχθούν και οι χρωστικές εκείνες που αναπτύσσονται κατά τις διάφορες κατεργασίες των τροφίμων π.χ. το χρώμα καραμέλλας κατά την καραμελοποίηση των σακχάρων κ.ο.κ.

Οι φυσικές χρωστικές κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες με βάση τη δομή τους:

(1) παράγωγα τετραπυρρολίου: χλωροφύλλες, μυογλοβίνες
(2) παράγωγα ισοπρενίου: καροτινοειδή
(3) παράγωγα βενζοπυρανίου: ανθοκυανίνες και φλαβονοειδή
(4) παράγωγα κατεργασίας τροφίμων: μελανοϊδίνες, καραμελόχρωμα κ.α.

Οι χλωροφύλλες και οι μυογλοβίνες δίνουν στα οπωροκηπευτικά και τα κρέατα το χαρακτηριστικό πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. Τα καροτινοειδή που απαντούν στα ψάρια, τα οστρακοειδή, τα αυγά, τα φρούτα, τα δημητριακά και γαλακτοκομικά προϊόντα είναι υπεύθυνα για τα κίτρινο ή και κόκκινο χρώμα αυτών. Οι ανθοκυανίνες και τα φλαβονοειδή που απαντούν στα οπωροκηπευτικά είναι υπεύθυνες για το κόκκινο χρώμα οι πρώτες και το κίτρινο χρώμα οι δεύτερες των προϊόντων αυτών. Τέλος οι μελανοϊδίνες και το καραμελόχρωμα, χρωστικές σκούρου χρώματος, απαντούν σε σιρόπια,

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κομπόστες, μαρμελάδες και δημητριακά προϊόντα και είναι αποτέλεσμα της θερμικής κατεργασίας των τελευταίων.
Για περισσότερα πάνω στις ιδιότητες των φυσικών χρωστικών βλ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ[80].
Όσον αφορά τις συνθετικές χρωστικές, η νομοθεσία κάθε χώρας επιτρέπει τη χρήση εκείνων μόνον που αποδεικνύονται ασφαλείς σε πειράματα διατροφής πειραματοζώων που περιλαμβάνουν τις χρωστικές αυτές. Σύμφωνα με παρόμοια πειράματα η Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα σύνταξε τον πίνακα των επιτρεπόμενων συνθετικών χρωστικών για χρήση σε τρόφιμα (Πίνακας 20.1).

ΠΙΝΑΚΑΣ 20.1

Κατάλογος επιτρεπομένων συνθετικών χρωστικών για τρόφιμα (Ε.Ε.C.)

Όνομα	δείκτης χρώματος No
κόκκινο No 2 (αμάρανθος)	16185
κόκκινο No 3 (ερυθροσίνη)	45430
κίτρινο No 6 (κίτρινο Sunset)	15985
κίτρινο No 5 (ταρτραζίνη)	19140
μπλε No 2 (ινδιγοτίνη)	73015
(αζορουβίνη)	14720
Ponceau 4R	16255
Scarlet GN	14815
Ponceau 6R	16290
πορτοκαλί GGN	15980
όξινο κίτρινο 6	13015
(κίτρινο ρεζορκίνης)	14270
κίτρινο κινολίνης	47005
μπλε πατέντας V	42051
μπλε ινδαθρενίου RS	69800
μαύρο λαμπερό BN	28440

Δ. Προσδιορισμός Χρωστικών

Η γενική μέθοδος προσδιορισμού των χρωστικών περιλαμβάνει την εκχύλιση της χρωστικής με τον κατάλληλο διαλύτη, σε μπλέντερ, αραίωση του εκχυλίσματος, διαύγαση με φυγόκεντριση και προσδιορισμό της διαπερατότητας του προκύπτοντος διαλύματος στο λmax. (βλ. κεφ. 3.2). Π.χ. για την εκχύλιση των καροτινίων από σιμιγδάλι χρησιμοποιείται βουτανόλη κορεσμένη με νερό ή αφθαλκοόλη. Η μέτρηση της διαπερατότητας γίνεται στο λ=440 nm.

Ε. Μέτρηση μεγέθους και σχήματος

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά ανήκουν στην γενική εμφάνιση του δείγματος και επίσης επηρεάζουν την επιλογή του καταναλωτή. Μετρούνται εύκολα με απλές συσκευές που φέρουν ανοίγματα ορισμένων διαστάσεων (π.χ. κόσκινα) μέσα από τα οποία διέρχονται τα προς μέτρηση δείγματα. Έτσι εξ άλλου επιτυγχάνεται στη βιομηχανία ο διαχωρισμός κατά μέγεθος προϊόντων όπως φρούτα, αυγά κ.ο.κ.

20.3 Εφαρμογές

Προσδιορισμός χρώματος έγινε:
στο χοιρινό κρέας σε σχέση με την αμαύρωση και την μεταβολή της υφής του[2], στα καρρότα σε σχέση με την ποσότητα του περιεχόμενου καροτινίου[3], στο κρέας σε σχέση με την συντήρηση με ακτινοβολία[4], στα οπωροκηπευτικά σε σχέση με την ποιοτική τους διαβάθμιση[5], στα κατεψυγμένα σπαράγγια σε σχέση με τη θερμοκρασία διατήρησής τους[6], σε κονσερβοποιημένα δαμάσκηνα σε σχέση με το βαθμό αποδοχής τους από τους καταναλωτές[7], στα ροδάκινα σε σχέση με την ποιότητά τους[8], στα φασόλια σαν κριτήριο της ποιότητάς τους[9], στις ντομάτες σαν κριτήριο του βαθμού ωριμότητάς τους[10], στον τοματοχυμό σε σχέση με την ποιότητά του[11], στον καφέ σαν δείκτη του βαθμού καβουρντίσματος αυτού[12], στις γλυκοπατάτες όπου μετρήθηκε το περιεχόμενο β-καροτίνιο[13], στα μακαρόνια το χρώμα των οποίων οφείλεται στα καροτινοειδή των αυγών κυρίως[14], σε χυμό από βατόμουρα το χρώμα του οποίου οφείλεται στις περιεχόμενες ανθοκυανίνες[15], στα καρρότα σε σχέση με την ποικιλία και τις συνθήκες καλλιέργειάς τους[16], στις γλυκοπατάτες σε σχέση με την ενζυματική μεταβολή του χρώματός των[17], στον κονσερβοποιημένο αρακά σε σχέση με τον αποχρωματισμό του κατά τη θερμική αποστείρωση[18], στην πορτοκαλάδα[19,20] και στα εσπεριδοειδή γενικά με διαμόρφωση ειδικού χρωματομέτρου[21], στα πατατάκια «chips» σε σχέση με τις συνθήκες αποθήκευσής τους[22], στο αλεύρι σε σχέση με την αρτοποιητική του ικανότητα[23] και το βαθμό άλεσής του[24], στο συσκευασμένο κρέας σε σχέση με τον αποχρωματισμό του λόγω υψηλής διαπερατότητας της πλαστικής συσκευασίας[25], στα ψάρια (τόννος) σε σχέση με τις χρωστικές που σχηματίζονται κατά την θερμική κατεργασία του[26], σε διαλύματα καλαμοσακχάρου[27], στην μπύρα[28], στα κόκκινα κρασιά σε σχέση με τον καθορισμό των προδιαγραφών τους[29], στον κρόκο αυγών[30] και στα φυτικά λάδια[31] σε σχέση με την τυποποίησή τους, στο βούτυρο και τη μαργαρίνη[32], στο κακάο και σοκολάτα[33], στο μέλι σαν κριτήριο διαβάθμισής του σύμφωνα με το χρώμα του[34] καθώς επίσης και σε λικέρ για την εξακρίβωση της φύσης της συνθετικής χρωστικής του (επιτρεπόμενη ή μη)[35].

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

20.4 Εξέταση υφής

Παρόλο ότι ο όρος υφή αποτελεί ένα από τους σπουδαιότερους παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για τον καθορισμό της ποιότητας των τροφίμων, δεν έχει δοθεί γι' αυτόν ικανοποιητικός ορισμός. Συνήθως με τον όρο υφή χαρακτηρίζονται εκείνες οι ιδιότητες των τροφίμων, οι οποίες γίνονται αντιληπτές με το μάσημα (χωρίς να λαμβάνονται υπόψη η γεύση και η θερμοκρασία) και με την πίεση με τα δάχτυλα.

Ένας πιο ικανοποιητικός τρόπος ορισμού της υφής των τροφίμων είναι ο εξής: υφή είναι ο τρόπος με τον οποίο τα διάφορα δομικά στοιχεία και τα άλλα συστατικά του τροφίμου είναι διαταγμένα και συνδυασμένα, ώστε ν' αποτελέσουν την μικρο- και μακρο- δομή του, καθώς και οι εξωτερικές μαρτυρίες των δομών αυτών που αποδίδονται με όρους ρευστότητας και παραμορφώσεων. Κατά τη διατύπωση του ορισμού αυτού της υφής λήφθηκαν υπόψη η φύση και η δομή των συστατικών των τροφίμων, η δε αναφορά στις εξωτερικές μαρτυρίες της δομής σχετίζεται με την συμπεριφορά των τροφίμων τόσο κατά την κατανάλωσή τους (οργανοληπτική εξέταση), όσο και κατά τις μηχανικές δοκιμασίες τους σε ειδικές συσκευές. Τα περισσότερα τρόφιμα αποτελούν πολύπλοκα φυσικοχημικά συστήματα, στα οποία υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ χημικής σύστασης, φυσικής δομής και φυσικών ιδιοτήτων κατά το σχήμα:

χημική σύσταση $\rightleftarrows$ φυσική δομή $\rightleftarrows$ φυσικές ιδιότητες

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μελέτη της υφής ενός τροφίμου ανάγεται στη μελέτη της μικρο- και μακροδομής του και στις ιδιότητες ροής και παραμόρφωσής του.

Η μελέτη της υφής των τροφίμων είναι σημαντική, επειδή με αυτή καθορίζονται:

1. Η αντίσταση των προϊόντων στις μηχανικές επιδράσεις, όπως π.χ. η μηχανική συγκομιδή φρούτων και κηπευτικών.
2. Οι ιδιότητες ροής των προϊόντων κατά τη διάρκεια της κατεργασίας, διακίνησης και αποθήκευσής τους.
3. Η μηχανική συμπεριφορά των τροφίμων κατά την κατανάλωσή τους.

Η υφή των τροφίμων, όπως έδειξαν στατιστικές μελέτες, αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την αποδοχή ή όχι του προϊόντος απ' τον καταναλωτή. Ειδικά σε τρόφιμα που προσφέρονται στην κατανάλωση τραγανιστά (μπισκότα, πατατάκια τσιπς κτλ.) ο παράγοντας υφή είναι ο πρώτος που ο καταναλωτής λαμβάνει υπόψη κατά την επιλογή του προϊόντος.

Α. Χαρακτηριστικά της υφής

Τα χαρακτηριστικά της υφής μπορούν να καταταγούν σε τρείς κατηγορίες:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

1. Μηχανικά χαρακτηριστικά (σχετίζονται με τον τρόπο που αντιδρούν τα τρόφιμα στις δυνάμεις που εξασκούνται πάνω σ' αυτά από τη γλώσσα, τα δόντια, τον ουρανίσκο και τα δάκτυλα). Τα μηχανικά χαρακτηριστικά συνοψίζονται στον Πίνακα 20.2.
2. Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά (σχετίζονται με το σχήμα, το μέγεθος και την διάταξη των σωματιδίων που τα απαρτίζουν) π.χ. λείο, ινώδες, κρυσταλλικό, κοκκώδες κ.ο.κ.
3. Λοιπά χαρακτηριστικά (σχετίζονται με το ποσόν του περιεχόμενου νερού και λίπους στο τρόφιμο) π.χ. υγρό, ελαιώδες κ.ο.κ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 20.2

Μηχανικά χαρακτηριστικά της υφής

πρωτεύοντα χαρακτηριστικά	ορισμός	δευτερεύοντα χαρακτηριστικά	ορισμός
σκληρότητα	δύναμη που απαιτείται για επίτευξη ορισμένης παραμόρφωσης		
συνεκτικότητα	δύναμη εσωτερικών δεσμών του τροφίμου	ευθραστότητα	δύναμη που απαιτείται για τμήση του υλικού
		μάσησης	
		ικανότητα μάσησης	Ενέργεια που απαιτείται για τη μάσηση στερεού έως ότου καταστεί έτοιμο για κατάποση
		ικανότητα μετατροπής σε κολλώδη μάζα	Ενέργεια που απαιτείται για την μετατροπή ημιστερεού τροφίμου σε κολλώδη μάζα έτοιμη για κατάποση
ιξώδες	ρυθμός ροής ανά μονάδα εφαρμοζόμενης δύναμης		
ελαστικότητα	ρυθμός επαναφοράς παραμορφωμένου υλικού στην αρχική του κατάσταση μετά την άρση της δύναμης που προκάλεσε την παραμόρφωση		
συνάφεια	ενέργεια που απαιτείται για την υπερνίκηση των δυνάμεων μεταξύ επιφάνειας υλικού και επιφάνειας με την οποία το υλικό έρχεται σε επαφή		

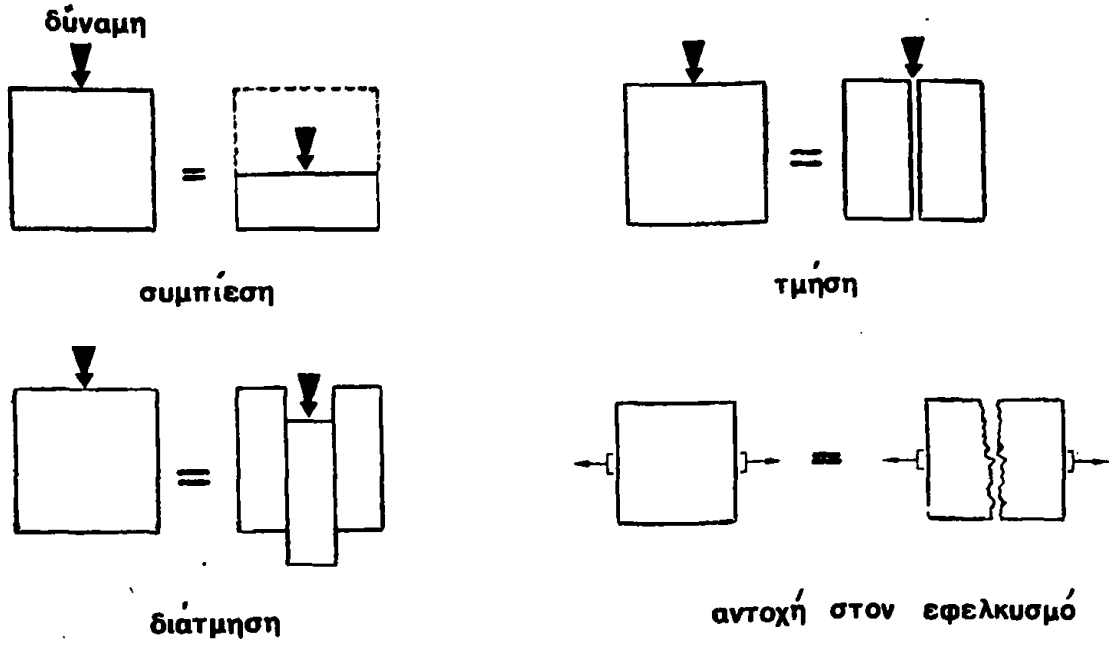
Από Szezesniah (1963)

Β. Αντικειμενική μέτρηση της υφής

Η μέτρηση της υφής μπορεί σύμφωνα με τον Πίνακα 20.2 να αναχθεί στην μέτρηση της αντίστασης που προκαλεί η εφαρμογή δύναμης πάνω σ' ένα υλικό (σχ. 20-6).

Η εξωτερικά εφαρμοζόμενη δύναμη μπορεί στα στερεά να προκαλέσει: συμπίεση, διάτμηση-τμήση, διείσδυση ή έκταση, ενώ στα ρευστά ροή.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

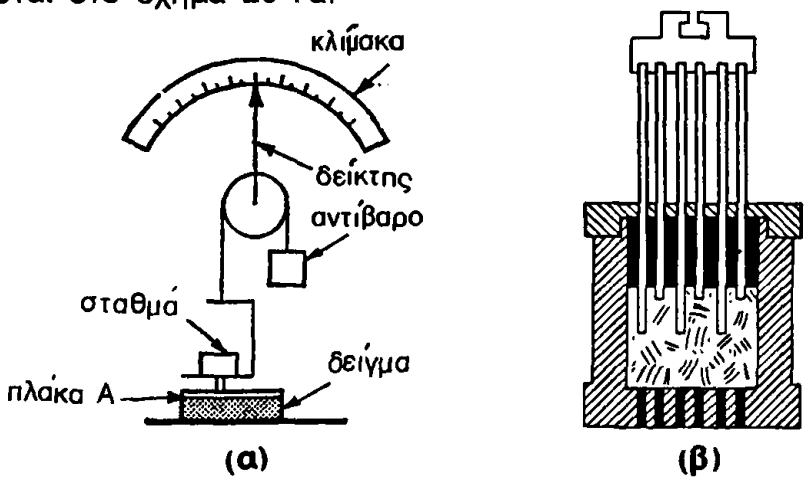


Σχ. 20-6. Αρχές μέτρησης υφής.
(Από Kramer and Twigg, 1970)

1. Συμπίεση (compression)

Συμπίεση παρατηρείται κατόπιν εφαρμογής δύναμης κάθετα πάνω στην επιφάνεια του δείγματος (π.χ. την αρτομάζα) και μετρείται με τον προσδιορισμό της τιμής εκείνης της δύναμης που προκαλεί ορισμένη παραμόρφωση στο εξεταζόμενο υλικό. Έμμεσα επομένως μετρείται η σχετική σκληρότητα του υλικού.

Στην πράξη για τη μέτρηση της συμπίεσης χρησιμοποιούνται όργανα γνωστά σαν συμπιεστόμετρα (compressimeter). Η αρχή λειτουργίας του οργάνου αυτού φαίνεται στο σχήμα 20-7α.



Σχ. 20-7. Όργανα μέτρησης υφής στα τρόφιμα (α) συμπιεστόμετρο (β) κυψελίδα συμπίεσης-διάτμησης Kramer.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Το δείγμα, συνήθως ψωμί, κέϊκ, μπισκότα, κράκερ κ.α. τοποθετείται σαν φέτα κάτω από στρογγυλή ή τετράγωνη πλάκα (Α). Ακολουθεί συμπίεση του δείγματος επί ορισμένο χρόνο που προκαλεί ορισμένη παραμόρφωση (π.χ. 2.5 mm). Η τιμή της δύναμης συμπίεσης δίνεται αυτόματα στην κλίμακα του οργάνου. Αν η επιφάνεια της πλάκας Α είναι μικρότερη από την αντίστοιχη επιφάνεια του δείγματος, τότε το όργανο εκτός από συμπίεση μετράει και διάτμηση.

2. Διάτμηση-τμήση (shearing-cutting)

Η μέτρηση της δύναμης που απαιτείται για διάτμηση (ολίσθηση μέρους του δείγματος πάνω στα λοιπά μέρη αυτού χωρίς τελική διαίρεση), αξιολογεί αφ ενός τη σκληρότητα και αφ' ετέρου τη συνοχή του υλικού.

Το πλέον χρησιμοποιούμενο όργανο για τη μέτρηση της δύναμης διάτμησης είναι η πρέσσα διάτμησης του Kramer η αρχή λειτουργίας της οποίας φαίνεται στο σχήμα 20-7 β. Το όργανο αποτελείται από κυψελίδα με ανοίγματα ορισμένων διαστάσεων στην επάνω επιφάνεια και ένα σύστημα παράλληλων λεπίδων οι οποίες έχουν την δυνατότητα να κινούνται κατά την κατακόρυφο κατεύθυνση, προκαλώντας διάτμηση στο περιεχόμενο στη κυψελίδα δείγμα. Η δύναμη η απαιτούμενη να προκαλέσει κάποια ορισμένη διάτμηση δίνεται αυτόματα σε κλίμακα κατάλληλα συνδεμένη με το σύστημα των λεπίδων. Αντίστοιχη είναι η μέτρηση της δύναμης που απαιτείται για πλήρη διαίρεση του δείγματος (τμήση).

3. Διείσδυση (penetration)

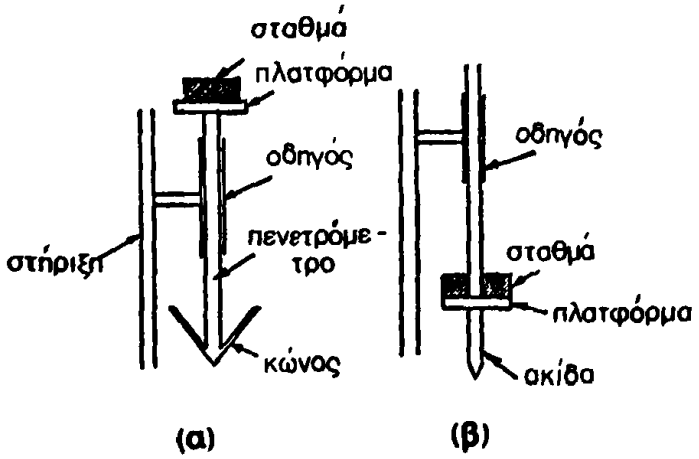
Εδώ, πάντα σε στερεά τρόφιμα, μετρείται η δύναμη που απαιτείται για τη διείσδυση τμήματος του οργάνου στο δείγμα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τα πενετρόμετρα (penetrometer), μικροπενετρόμετρα καθώς και το Instron, που αποτελούνται από ένα σύστημα διείσδυσης (βελόνα, λεπίδα, κώνο, σφήνα), έναν υποδοχέα για το εξεταζόμενο δείγμα και ένα σύστημα μέτρησης. Το σύστημα μέτρησης, μετράει την δύναμη που απαιτείται για τη διείσδυση π.χ. της βελόνας σε ορισμένη απόσταση μέσα στο τρόφιμο. Πρακτική εφαρμογή αυτού αποτελεί η μέτρηση της τρυφερότητας του κρέατος, με το **τρυφερόμετρο του κρέατος.** Η δύναμη που απαιτείται για τη διείσδυση των ακίδων του οργάνου στο κρέας αποτελεί μέτρο της τρυφερότητας του τελευταίου.

Στο σχήμα 20-8 φαίνονται δύο τύποι (κώνου, βελόνας) πενετρομέτρων.

4. Αντοχή στον εφελκυσμό (tensile strenght)

Εδώ μετρείται η δύναμη που απαιτείται για την διαίρεση του δείγματος κατά την έκταση. Η δύναμη αυτή (tensile strenght) είναι μέτρο της συνοχής των

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-8. Δύο τύποι πενετρομέτρων (α) κώνου (β) ακίδας-βελόνας.

μορίων του δείγματος. Ένα από τα χρησιμοποιούμενα για τις μετρήσεις αυτές, όργανα είναι το Instron.

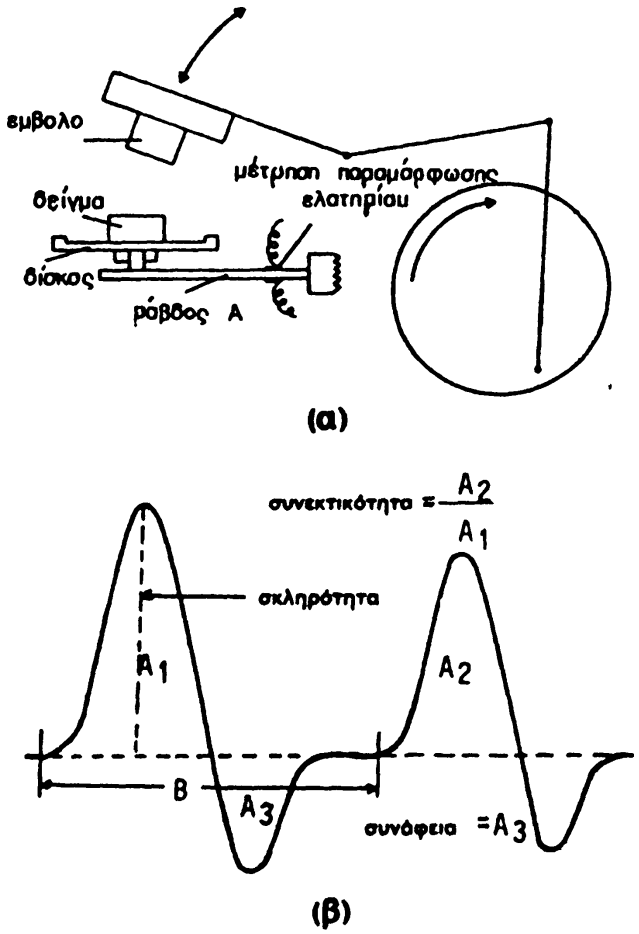
Τέλος πρέπει να τονιστεί ότι οι παραπάνω διεργασίες συνήθως εκτυλίσσονται ταυτοχρόνως, π.χ. κατά τη μάσηση της τροφής στο στόμα. Όργανα, όπως το General Foods Texturometer, μετρούν σύνολο παραμέτρων όπως σκληρότητα, συνοχή-συνεκτικότητα, συνάφεια, ελαστικότητα κ.α. που αντιστοιχούν στις παραπάνω διεργασίες.

Η αρχή λειτουργίας του General Foods Texturometer καθώς και το σύστημα καμπυλών που καταγράφει το όργανο φαίνονται στο σχήμα 20-9.

Το δείγμα τοποθετείται σε δίσκο που στηρίζεται σε οριζόντια ράβδο της οποίας το άκρο Α είναι ελεύθερο να κινείται. Έμβολο ή ακίδα συνδεμένη με περιστρεφόμενο στρόφαλο πέφτει περιοδικά πάνω στο δείγμα, πράγμα που προκαλεί απόκλιση της ράβδου, το ποσοστό της οποίας μετρείται από είδικά ελατήρια προσαρτημένα στη ράβδο. Η παραπάνω κίνηση προσομοιάζει με την κίνηση των σιαγόνων κατά τη μάσηση της τροφής.

Η καμπύλη που δίνει το όργανο στον καταγραφέα ερμηνεύεται αρχής γενομένης από το αριστερό άκρο. Το εμβαδόν A_1 παριστάνει το έργο που καταναλίσκεται για την πρώτη «δαγκωματιά», ενώ το εμβαδόν A_2 παριστάνει το αντίστοιχο έργο δια τη δεύτερη «δαγκωματιά». Το εμβαδόν A_3 της «αρνητικής» κορυφής παριστάνει το έργο που απαιτείται για την απομάκρυνση του εμβόλου από το δείγμα. Αυτό αποτελεί μέτρο της συνάφειας του δείγματος. Το ύψος του τριγώνου εμβδαδού A_1 αντιστοιχεί στη σκληρότητα του δείγματος, ενώ το πηλίκον A_2/A_1 αντιστοιχεί στη συνοχή του δείγματος, μια και η τιμή αυτή είναι απ' ευθείας συνάρτηση του έργου που απαιτείται για την εξουδετέρωση των εσωτερικών δεσμών στα μόρια του υλικού. Η ελαστικότητα του δείγματος μετρείται από τη διαφορά C-B, όπου B η απόσταση που αντιστοιχεί μεταξύ πρώτης και δεύτερης επαφής του εμβόλου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-9. (α) Αρχή λειτουργίας του General Food Texturometer (β) καμπύλη οργάνου.

με το δείγμα και C η αντίστοιχη απόσταση για ένα εντελώς μη-ελαστικό υλικό όπως ο γύψος.

Τέλος οι δευτερεύουσες παράμετροι chewiness (ενέργεια που απαιτείται για την μάσηση στερεού τροφίμου) και Guminess (ενέργεια που απαιτείται γα τη πολτοποίηση ημιστερεού τροφίμου) εκφράζονται μαθηματικά από τα γινόμενα: Chewiness=σκληρότητα × συνοχή × ελαστικότητα

Guminess=σκληρότητα × συνοχή

5. Ροή-ιξώδες

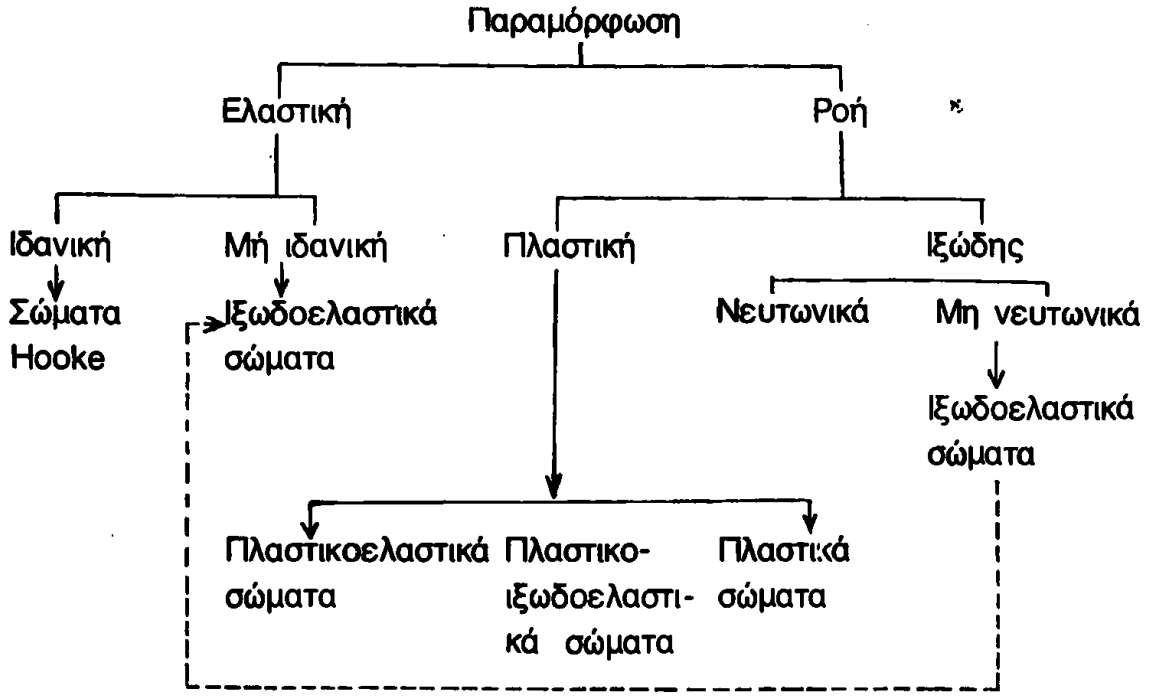
Οι παραμορφώσεις, που υφίστανται τα υλικά υπό την επίδραση δυνάμεων δυνατόν να είναι αντιστρεπτές, οπότε γίνεται λόγος για ελαστικότητα ή μη αντιστρεπτές, οπότε γίνεται λόγος για ροή. Το έργο που καταναλίσκεται στη μη αντιστρεπτική παραμόρφωση μετατρέπεται σε θερμότητα και αποδίδεται στο περιβάλλον, ενώ το έργο στην αντιστρεπτή παραμόρφωση ανακτάται με την επιτροφή του υλικού στην αρχική του κατάσταση.

Η συστηματική κατάταξη των παραπάνω δίνεται στον Πίνακα 20.3.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 20.3

Είδη παραμορφώσεων και υλικών σωμάτων



Αν και η ροή είναι χαρακτηριστικό όλων των ρευστών, εν τούτοις τα τελευταία δεν ρέουν όλα με την ίδια ευκολία. Η αντίσταση που εμφανίζουν στη ροή ή το ιξώδες οφείλεται στην έλξη μεταξύ των μορίων του ρευστού. Επόμενον είναι η εσωτερική αυτή τριβή να αυξάνει στην περίπτωση αλληλεπίδρασης μεγάλων μορίων ή διογκωμένων, π.χ. από το νερό, μορίων σε σχέση με μικρά μόρια. Μαθηματικά το ιξώδες ορίζεται ως εξής:

Αν F είναι η δύναμη που αναπτύσσεται λόγω της τριβής δύο νοητών επιφανειών του ρευστού εμβαδού S που απέχουν μεταξύ τους d_x και έχουν διαφορά ταχύτητας d_c τότε ισχύει η σχέση (20.3):

$$F = n\,S\,\frac{dv}{dx} \quad \text{ή} \quad \frac{F}{S} = n\,\frac{dv}{dx} \qquad (20.3)$$

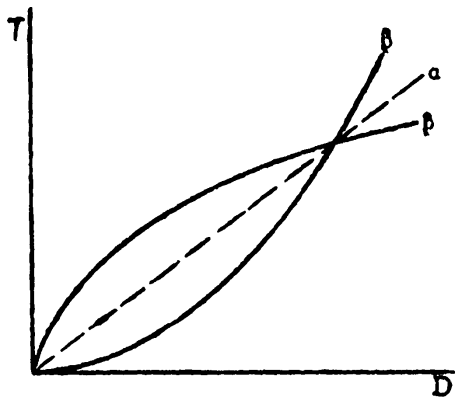
όπου n= ιξώδες του ρευστού

Η σχέση (20.3) αποτελεί έκφραση του νόμου του Newton για το ιξώδες. Στην πράξη το ιξώδες μετρείται σε centipoise (1 poise = 1 dyn.sec.cm^2). Το πηλίκον F/S καλείται διατμητική τάση (τ), ενώ το πηλίκον dv/d_x καλείται ταχύτητα διάτμησης (D), η οποία εκφράζει τη μέση τιμή της παραμόρφωσης του υλικού.

Ο νόμος του Newton ισχύει για όλα τα ομογενή υγρά και τα αραιά διαλύματα υδρόφιλων ουσιών, όχι όμως για τα πυκνά διαλύματα υδρόφιλων ουσιών και τα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

κολλοειδή διαλύματα. Στα πρώτα, γνωστά σαν Νευτωνικά υγρά (σχ. 20-10α), ο συντελεστής ιξώδους (η) είναι σταθερός και εξαρτάται μόνον από τη θερμοκρασία. Στα δεύτερα, γνωστά σαν μη Νευτωνικά υγρά (σχ. 20-10β), ο συντελεστής ιξώδους δεν είναι σταθερός, αλλά εξαρτάται από τη διατμητική τάση.



Σχ. 20-10. Καμπύλες (α) νευτωνικών και (β) μη νευτωνικών υλικών.

Στα υγρά αυτά αντί του ιξώδους χρησιμοποιείται το φαινομενικό ιξώδες (Α) το οποίο δίνεται από τη σχέση (20.4):

$$\tau = A.D^{n} \qquad (20.4)$$

όπου: n=εκθέτης που μπορεί να πάρει θετικές ή αρνητικές τιμές ανάλογα με το συγκεκριμένο υγρό.

Στα μη Νευτωνικά υγρά υπάγονται τέσσερις κατηγορίες υγρών με διαφορετική συμπεριφορά ροής.

(α) Συμπεριφορά ροής ανεξάρτητη από το χρόνο

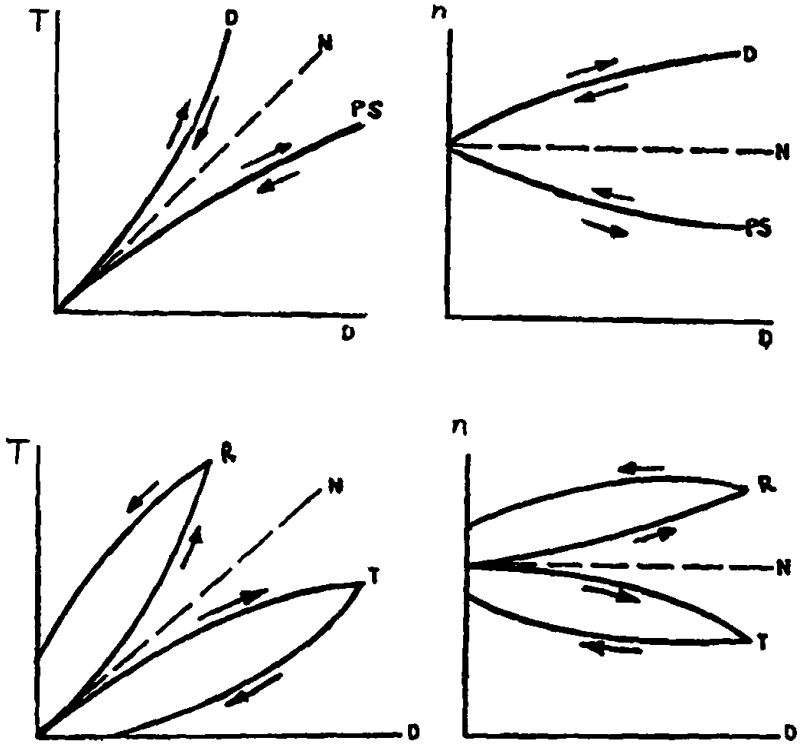
(i) ψευδοπλαστικά υλικά (pseudoplastic): Τα υλικά αυτά υπό την επίδραση υψηλών τιμών ταχύτητας διάτμησης (π.χ. ισχυρή ανάδευση) ελαττώνουν το ιξώδες τους (αραιώνουν), ενώ υπό την επίδραση χαμηλών τιμών ταχύτητας διάτμησης αυξάνουν το ιξώδες τους (γίνονται πυκνόρρευστα). Επομένως το ιξώδες των υγρών αυτών είναι μεν συνάρτηση της ταχύτητας διάτμησης, όχι όμως του χρόνου εκδήλωσης της ταχύτητας διάτμησης (σχ. 20-11 PS).

ii) εκτατά υλικά (dilatant): Τα υλικά αυτά αντίστροφα, γίνονται πυκνόρρευστα σε υψηλές τιμές ταχύτητας διάτμησης, λεπτόρευστα δε σε χαμηλές τιμές ταχύτητας διάτμησης (σχ. 20-11D).

(β) Συμπεριφορά ροής εξαρτώμενη από το χρόνο

i) θιξοτροπικά υλικά: Τα υλικά αυτά μοιάζουν με τα ψευδοπλαστικά αφού το φαινομενικό ιξώδες τους ελαττώνεται αυξανόμενης της ταχύτητας διάτμησης. Διαφέρουν όμως από τα ψευδοπλαστικά κατά το ότι η ελάττωση αυτή του

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-11. Καμπύλες ψευδοπλαστικών (PS), εκτατών (D) θιξοτροπικών (T) και ρεοπηκτικών υλικών (R).

ιξώδους είναι συνάρτηση και του χρόνου (σχ. 20 11τ).
Αποτέλεσμα της εξάρτησης της συμπεριφοράς των υλικών αυτών και από το χρόνο, είναι η λήψη βρόγχου υστέρησης μεταξύ εφαρμογής και αφαίρεσης της διατμητικής τάσης πάνω στο υλικό.
ii) ρεοπηκτικά υλικά: Τα υλικά αυτά αντίστροφα, γίνονται πυκνόρρευστα (αύξηση φαινομενικού ιξώδους), αυξανόμενης της ταχύτητας διάτμησης, αλλά και του χρόνου. Μοιάζουν δε με τα εκτατά υλικά με επιπλέον εξάρτηση του φαινομενικού ιξώδους τους από το χρόνο. (σχ. 20.11R).
Παραδείγματα Νευτωνικών υγρών αποτελούν: τα αναψυκτικά, τα αλκοολούχα ποτά, τα διαλύματα σακχάρων και του αλατιού, τα εκχυλίσματα κρέατος, το γάλα, τα αραιά διαλύματα κόμμεων, ορισμένα φυτικά λάδια (ηλιέλαιο, καλαμποκέλαιο κ.α.) και το νερό.
Παραδείγματα μη Νευτωνικών υγρών αποτελούν: τα διαλύματα υδροκολλοειδών, οι σούπες, ορισμένοι τύποι μελιού, ο χυμός ντομάτας κ.α. Για παράδειγμα το μέλι ερίκης συμπεριφέρεται σαν θιξοτροπικό υλικό, ενώ το μέλι ευκαλύπτου συμπεριφέρεται σαν ρεοπηκτικό ή και εκτατό υλικό. Με εκχύλιση των περιεχόμενων δεξτρανών, το μέλι ευκαλύπτου συμπεριφέρεται σαν Νευτωνικό υγρό.
Η σούπα συμπεριφέρεται καθαρά σαν θιξοτροπικό υλικό. Κόμμεα πηκτίνης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αμύλου, κυτταρίνης καθώς και το Αραβικό κόμμι συμπεριφέρονται κυρίως σαν ψευδοπλαστικά, αλλά και σαν θιξοτροπικά υλικά.

6. Μέτρηση του ιξώδους

Για τον πειραματικό προσδιορισμό του ιξώδους χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι που βασίζονται:

α) στη ροή μέσα σε τριχοειδείς σωλήνες

β) στην πτώση στερεάς σφαίρας μέσα στο υγρό και

γ) στην ροπή της δύναμης που απαιτείται για την περιστροφή κυλίνδρου μέσα στο υγρό.

α) Μέθοδοι ροής μέσα σε τριχοειδείς σωλήνες.

Η κυριώτερη μέθοδος προσδιορισμού του ιξώδους των υγρών είναι η μέθοδος του ιξωδόμετρου Ostwald. Στηρίζεται στην μέτρηση του χρόνου που απαιτείται για τη ροή ορισμένου όγκου υγρού μέσα σε τριχοειδή σωλήνα ορισμένων διαστάσεων. Η ροή ακολουθεί το νόμο του Poiseuille ο οποίος δίνει τον όγκο Q του υγρού που διέρχεται μέσα από σωλήνα μήκους L και ακτίνας r σε χρόνο t.

$$Q = \frac{\pi p t r^4}{8Ln} \qquad (20.5)$$

όπου: n= συντελεστής ιξώδους του υγρού και

p= η διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο άκρων του σωλήνα που προκαλεί τη ροή.

Πειραματικά το ιξώδες υγρού υπολογίζεται με βάση ένα υγρό γνωστού ιξώδους, π.χ. του νερού. Στην περίπτωση αυτή ισχύει:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{t_1 \cdot \rho_1}{t_2\ \rho_2} \qquad (20.6)$$

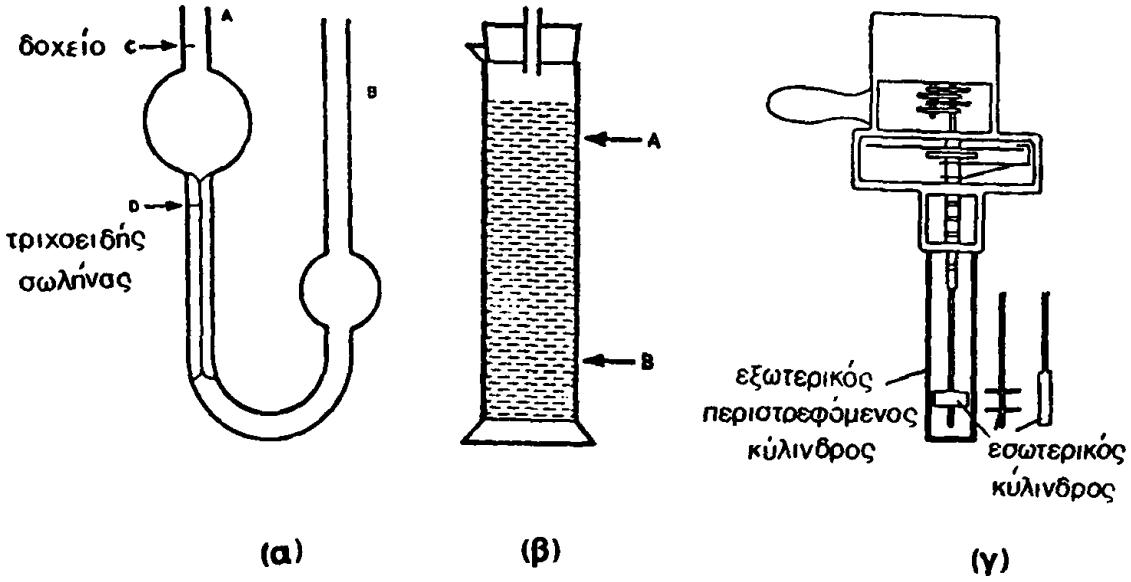
όπου: ρ_1 και ρ_2 = οι πυκνότητες των δύο υγρών ($\rho_{,\ 25^oC}$=0.8937 spoise). Στο σχήμα (20-12α) φαίνεται η διάταξη του ιξωδόμετρου Ostwald. Σ' αυτό μετρείται ο χρόνος που απαιτείται για να αδειάσει το νερό που τοποθετείται στο δοχείο της συσκευής από ένα κοντό τριχοειδή σωλήνα που βρίσκεται στόν ένα βραχίονα του δοχείου.

Η μέθοδος εφαρμόζεται στα Νευτωνικά και μη Νευτωνικά υγρά πλην των θιξοτροπικών και ρεοπηκτικών.

β) μέθοδοι πτώσης σφαίρας

Στηρίζονται στην μέτρηση της οριακής ταχύτητας πτώσης σφαίρας μέσα στο εξεταζόμενο υγρό. Η οριακή ταχύτητα της σφαίρας (ταχύτητα που αποκτά η σφαίρα όταν το άθροισμα των δυνάμεων της τριβής και της άνωσης ισούται αριθμητικά με το βάρος της) δίνεται από τον τύπο του Stokes:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-12. Μέθοδοι μέτρησης ιξώδους: (α) μέθοδος ροής σε τριχοειδή σωλήνα (ιξωδόμετρο Ostwald (β), μέθοδος πτώσης σφαίρας (γ) μέθοδος στρέψης κυλίνδρου (ιξωδόμετρο Brookfield).

$$\frac{4}{3}\pi R^3 (\rho_s - \rho) g = 6\pi n R v \quad \text{ή} \quad \frac{4}{3} R^2 (\rho_s - \rho) g = 6 n v \qquad (20.7)$$

όπου: R= ακτίνα της σφαίρας (m)

ρ_s= πυκνότητα σφαίρας (kg/m^3)

n= συντελεστής ιξώδους σε (Pl ή N . sec/m^2)

v= ταχύτητα σφαίρας (m/sec)

πειραματικά το ιξώδες υπολογίζεται με βάση υγρό γνωστού ιξώδους από τη σχέση (20.8):

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{(\rho_s - \rho_1)}{(\rho_s - \rho_2)} \times \frac{t_1}{t_2} \qquad (20.8)$$

όπου: t_1 και t_2 οι χρόνοι (sec) πτώσης της σφαίρας στα δύο υγρά μεταξύ των σημείων A και B (σχημ. 20-12β).

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ιξώδους μόνο Νευτωνικών υγρών.

γ) μέθοδοι στρέψης κυλίνδρου

Στηρίζονται στη μέτρηση της γωνίας στρέψης κυλίνδρου βυθισμένου στο εξεταζόμενο υγρό το οποίο περιέχεται σε περιστρεφόμενο δοχείο. Στην πράξη χρησιμοποιείται το ιξωδόμετρο Brookfield (σχημ. 20-12γ) το οποίο αποτελείται από δύο ομοαξονικούς κυλίνδρους, τον εξωτερικό που περιέχει το υγρό, που είναι κοίλος και δύναται να περιστραφεί με ορισμένη γωνιακή ταχύτητα και τον εσωτερικό που κρέμεται από ακίνητο νήμα και είναι βυθισμένος στο υγρό. Κατά την περιστροφή του ο εξωτερικός κύλινδρος

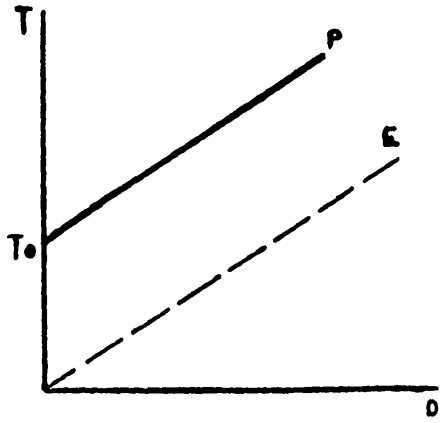
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

παρασύρει σε κίνηση το υγρό το οποίο με την σειρά του αναγκάζει τον εσωτερικό κύλινδρο να στραφεί κατά ορισμένη γωνία. Η γωνία αυτή αποτελεί μέτρο της ταχύτητας διάτμησης (D) που εξασκεί το υγρό. Το όργανο που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία για νευτωνικά και μη νευτωνικά υγρά δίνει ανάλογα με το όργανο μέτρησης που φέρει, απ' ευθείας το ιξώδες ή το φαινομενικό ιξώδες του υγρού. Ένας άλλος συνηθισμένος τύπος ιξωδόμετρου είναι το ιξωδόμετρο του MacMichael. Το όργανο αυτό αποτελείται από ειδικό κυλινδρικό δοχείο που έχει την δυνατότητα να περιστρέφεται (10-40 r.p.m), ενώ ταυτόχρονα θερμαίνεται. Στο δοχείο αυτό αιωρείται έμβολο γνωστών διαστάσεων που εξαρτάται από ειδικό σύρμα. Το προς εξέταση ρευστό τοποθετείται μέσα στο κυλινδρικό δοχείο που τίθεται σε περιστροφή, ενώ θερμαίνεται. Η αντίσταση που αναπτύσσεται μεταξύ του ρευστού και του έμβολου μετρείται με ειδική διάταξη. Το όργανο καλιμπράρεται (διαβαθμίζεται) προηγουμένως με ρευστά γνωστού ιξώδους και η αυθαίρετη κλίμακα του οργάνου μετατρέπεται σε Centipoise.

7. Πλαστικά, ελαστικά και ιξωδοελαστικά υλικά.

Η ρεολογία εκτός των παραμορφώσεων των υγρών ασχολείται και με τις αντίστοιχες παραμορφώσεις των στερεών υλικών.

Πλαστική συμπεριφορά δείχνουν υλικά τα οποία κάτω από την ίδια επίδραση μικρής τάσης π.χ. της βαρύτητας συμπεριφέρονται σαν στερεά, ενώ υπό την επίδραση κάποιας τιμής τάσης μεγαλύτερης της οριακής ρέουν σαν υγρά. Η οριακή αυτή τιμή τάσης καλείται όριο αντοχής του υλικού (T_o.) Το διάγραμμα τάσης-ταχύτητας διάτμησης για τα πλαστικά υλικά δίνεται στο σχήμα 20.13.



Σχ. 20-13. Καμπύλες τάσης-ταχύτητας διάτμησης για πλαστικά και ελαστικά υλικά.

Παραδείγματα πλαστικών υλικών αποτελούν ο πουρές, η μαρέγκα, το βούτυρο, τα λίπη, οι κρέμες, το κετσάπ, η λειωμένη σοκολάτα κ.α. Στην πραγματικότητα τα παραπάνω υλικά συμπεριφέρονται σαν πλαστικοελαστικά ή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πλαστικο-ιξωδο-ελαστικά, η συμπεριφορά των οποίων αποτελεί συνδυασμό των πλαστικών, ιξωδών και ελαστικών υλικών.
Η αντίσταση στη ροή των πλαστικών υλικών ονομάζεται συνεκτικότητα (consistency) και είναι αντίστοιχη προς το ιξώδες και φαινομενικό ιξώδες των υγρών.
Η μέτρηση της πλαστικότητας στην περιοχή τάσης μεγαλύτερης του τ_0 γίνεται όπως και στα υγρά με τριχοειδή και ομοκεντρικά (Brookfield) ιξωδόμετρα, πενετρόμετρα, συμπιεστόμετρα, εξωθητές (extruder).
Ελαστικά (elastic ή Hookean) καλούνται τα υλικά των οποίων η συμπεριφορά ακολουθεί το νόμο του Hooke:

$$\tau_n = e\ D_e \qquad (20.9)$$

όπου: τ_n= τάση συμπίεσης ή έκτασης
D_e= ελαστική παραμόρφωση
e= σταθερά ελαστικότητας (elasticity modulus) ή σταθερά του Young
Η γραφική παράσταση της σχέσης 20.9 δίνεται στο σχήμα 20-13. Η μορφή της καμπύλης αυτής παραμένει σταθερή μέχρι του λεγόμενου «ορίου ελαστικότητας» πέρα από το οποίο το στερεό σώμα υφίσταται μόνιμη παραμόρφωση. Η τιμή της σταθεράς ελαστικότητας ποικίλλει από υλικό σε υλικό. Όσο μικρότερη η σταθερά ελαστικότητας, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ελαστική παραμόρφωση για δοσμένη τάση.
Παραδείγματα τέτοιων υλικών αποτελούν το ψωμί, τα κέικ κ.α.
Τέλος ιξωδοελαστικά ή βισκοελαστικά καλούνται τα υλικά των οποίων η συμπεριφορά είναι ενδιάμεση των ιξωδών υγρών και των ελαστικών στερεών. Η διττή αυτή συμπεριφορά σε αντίθεση με τα πλαστικά υλικά εκδηλώνεται ταυτόχρονα χωρίς την παρεμβολή του ορίου αντοχής. Για παράδειγμα η αρτομάζα υπό την επίδραση τάσης έκτασης υφίσταται επιμήκυνση (ελαστικό σώμα) η οποία μετατρέπεται σε ροή (ιξώδες υγρό) εάν η επίδραση της τάσης εξακολουθήσει. Βασικό ρόλο συνεπώς στη συμπεριφορά αυτών των υλικών παίζει ο χρόνος (για τη μέτρηση της υφής της αρτομάζας βλ. κεφ. 20.5).
Άλλα παραδείγματα ιξωδοελαστικών σωμάτων αποτελούν τα ζελέ (gels) από άμυλο και ζελατίνη.

Γ. Οργανοληπτική εξέταση της υφής

Στο είδος αυτό της εξέτασης η υφή του τροφίμου αξιολογείται κατόπιν μασήματος και πίεσής του μεταξύ των δακτύλων. Για λεπτομέρειες πάνω στην οργανοληπτική εξέταση της υφής βλ. κεφ. 20.6.

20.5 Εφαρμογές υφής

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Α. Κρέας

Η υφή του κρέατος περιγράφεται συνήθως από το βαθμό τρυφερότητάς του η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από το είδος των μυικών ινών, την περιεκτικότητα σε λίπος, την ποιότητα και ποσότητα του κολλαγόνου κ.α. Τα διάφορα προϊόντα κρέατος (φρέσκο, κατεψυγμένο, θερμικά κατεργασμένο, αλλαντικά κ.ο.κ.) παρουσιάζουν διαφορετική ρεολογική συμπεριφορά, π.χ. το φρέσκο κρέας συμπεριφέρεται μάλλον σαν ελαστικό σώμα, ενώ ο κυμάς εμφανίζει συμπεριφορά ιξωδοελαστικού υλικού.

Ο προσδιορισμός της υφής των προϊόντων του κρέατος έγινε με τη διατμητική πρέσσα του Kramer[36] (βλ. κεφ. 20.4 Β2)σε νωπό βοδινό κρέας και με τροποποιημένη μορφή της πρέσσας αυτής[37]. Με εξωθητή[38] στο βοδινό κρέας όπου μετρείται η πίεση που απαιτείται για την διέλευση κομματιού κρέατος μέσω οπής ορισμένης διαμέτρου. Η τιμή της πίεσης εξώθησης αποτελεί μέτρο της τρυφερότητας του κρέατος. Ακόμη με κοινή κρεατομηχανή[39] όπου η καταναλισκόμενη ηλεκτρική ισχύς για την άλεση του κρέατος αποτελεί μέτρο της τρυφερότητας αυτού. Τέλος με το Instron για τη μέτρηση της τρυφερότητας του χοιρινού κρέατος[40], λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης[41] και νωπού βοδινού[42].

Β. Δημητριακά και προϊόντα τους

Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι ρεολογικές ιδιότητες του αλευριού κατά την παρασκευή της αρτομάζας, μια και αυτό αποτελεί το κύριο στάδιο παρασκευής του ψωμιού. Από τις ιδιότητες αυτές εξαρτάται μεταξύ άλλων η ποιότητα του ψωμιού καθώς και η τυποποίηση της παρασκευής του.

Ο έλεγχος της αρτοποιητικής ικανότητας του αλευριού γίνεται με:

1. τον Φαρινογράφο (Farinograph) σχ. 20-14α που είναι ένα είδος ζυμωτήρα και προσδιορίζει τη ζυμωτική ικανότητα και την ικανότητα απορρόφησης νερού από το αλεύρι. Το φαρινογράφημα (σχ. 20-14β) δίνει πληροφορίες για:

α) την επί τοις εκατό πρόσληψη νερού από το αλεύρι για σχηματισμό αρτομάζας ορισμένης συνεκτικότητας π.χ. 500 μονάδων φαρινογράφου.

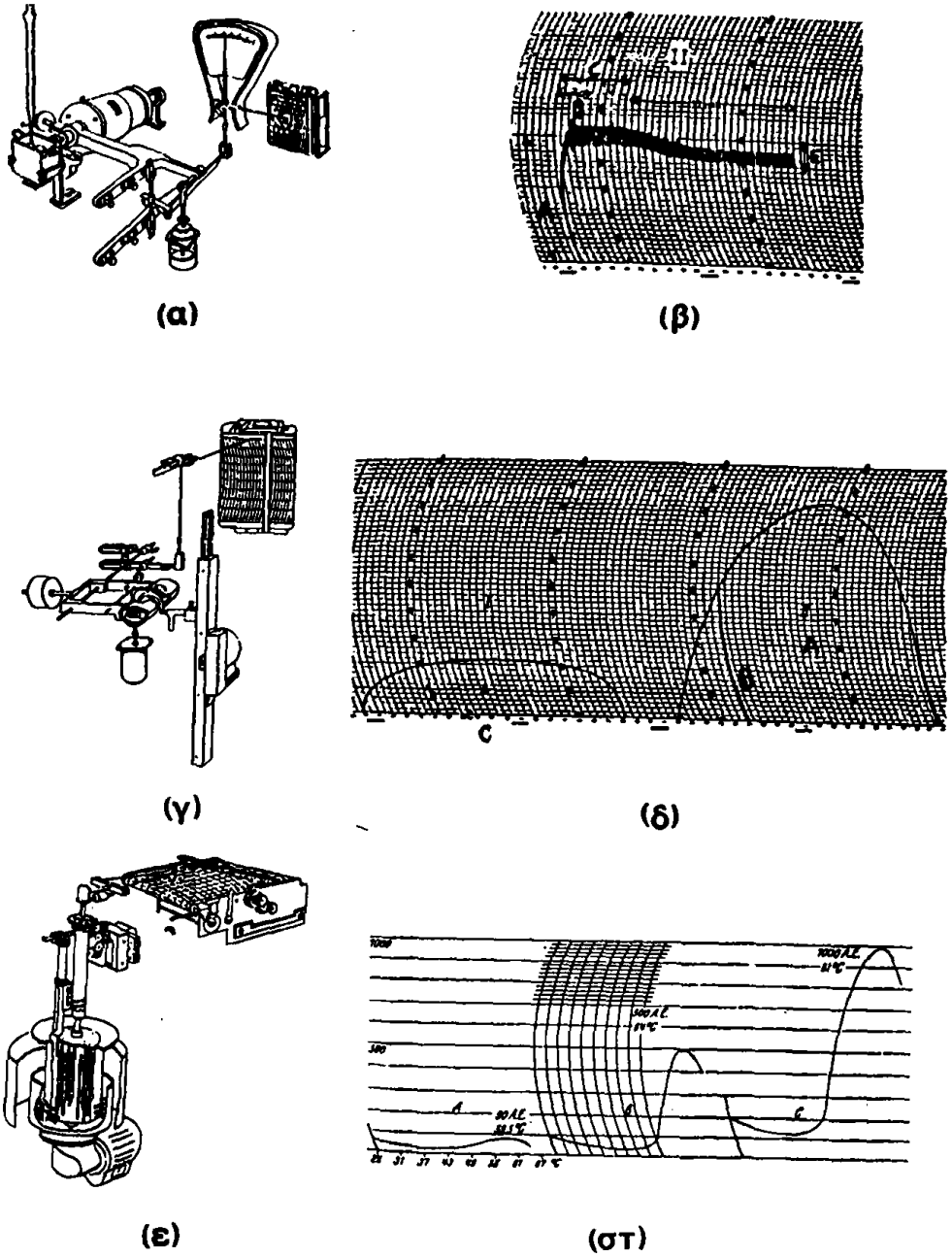
β) το χρόνο που χρειάζεται το αλεύρι να ζυμωθεί με νερό για να δώσει καλής ποιότητας αρτομάζα (σχ. 20-12β, Β).

γ) το χρόνο κατά τον οποίο, συνεχιζόμενης της ανάμειξης, παραμένει σταθερή η συνεκτικότητα της αρτομάζας (σχ. 20-14β C) και

δ) τη μείωση της αντίστασης της αρτομάζας (σχ. 20-14β Ε) κατά τα επόμενα 12min της ανάμειξης.

2. τον Εξτενσιογράφο (σχ. 20-14γ) ο οποίος δίνει πληροφορίες για τις πλαστικές ιδιότητες της αρτομάζας. Με το εξτενσιογράφημα (σχ. 20-14δ) υπολογίζονται:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-14. Φαρινογράφος (α), φαρινογράφημα (β), Εξτενσιογράφος (γ), εξτενσιογράφημα (δ), αμυλογράφος (ε), αμυλογράφημα (στ).

α) η δυνατότητα επιμήκυνσης της αρτομάζας (C) σε min (σχ. 20-14δ C)

β) η αντίσταση της αρτομάζας στην επιμήκυνση (B) σε απόσταση 50 mm από την αρχή της καμπύλης (σχ. 20-14δ, B)

γ) η συνολική ενέργεια (A), που απαιτείται για την επιμήκυνση. Μέτρο αυτής αποτελεί το εμβαδόν που περικλείεται από την καμπύλη (σχ. 20-14δ),A και

δ) η σχέση B/C που χαρακτηρίζει τον τελικό όγκο της αρτομάζας μετά την ωρίμανση.

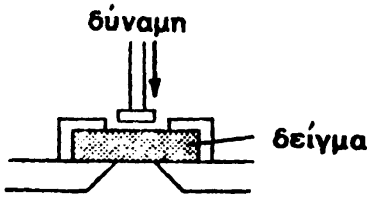
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Συνήθως λαμβάνονται τρία εξτενσιογραφήματα κάθε δείγματος αρτομάζας 45,90 και 135 min μετά την παρασκευή της, ώστε να διαπιστωθεί η εξέλιξη των ιδοτήτων της κατά την ωρίμανση.

3. τον Αμυλογράφο (σχ. 20-14 ε)[43] ο οποίος δίνει πληροφορίες για την μεταβολή του ιξώδους της αρτομάζας με την αύξηση της θερμοκρασίας που προηγείται του ψησίματος. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται κυρίως στην ενζυματική διάσπαση του αμύλου και δίνονται συναρτήσει της θερμοκρασίας θέρμανσης στο αμυλογράφημα. Η μορφή της καμπύλης επιτρέπει τη διαπίστωση επάρκειας ή μη της αρτομάζας σε α-αμυλάση που οδηγεί σε υγρή (σχ. 20-14 στ. Β) ή κανονική ψίχα (σχ. 20-14 στ. C)

Στα σιτάρια γίνονται μετρήσεις σκληρότητας για να γίνει διαφοροποίηση των σκληρών από τα μαλακά. Η σκληρότητα του κόκκου επηρεάζεται από το περιεχόμενο σε πρωτέϊνη και την υγρασία. Η μέτρηση της σκληρότητας γίνεται στη συσκευή Brabender, μύλο δηλαδή συνδεμένο με δυναμόμετρο και καταγραφέα. Το δυναμόμετρο μετράει τη ροπή που απαιτείται για την περιστροφική λειτουργία του μύλου καθ' ον χρόνον αλέθεται το σιτάρι.

Τέλος σε προϊόντα όπως τα μπισκότα, τα κράκερς κ.τ.λ. μετρείται το όριο αντοχής του συγκεκριμένου προϊόντος με συσκευή η αρχή λειτουργίας της οποίας φαίνεται στο σχ. 20-15.



Σχ. 20-15. Όργανο μέτρησης τραγανότητας μπισκότων και κράκερς (μέτρηση αντοχής, διατμητικής τάσης).

Γ. Γαλακτοκομικά προϊόντα

Κύριο χαρακτηριστικό προσδιορισμού της υφής του γάλακτος (νωπού και συμπυκνωμένου), της κρέμας και των παγωτών είναι το ιξώδες. Αντίστοιχα στο βούτυρο και τη μαργαρίνη η ποιότητα του προϊόντος είναι συνάρτηση της ελαστικότητας, της συνεκτικότητας, της ικανότητας επάλειψης, του βαθμού απαλότητας της υφής κ.ο.κ.

Για τον έλεγχο των ιδιοτήτων αυτών χρησιμοποιείται μεγάλη ποικιλία οργάνων που ήδη περιγράφηκαν προηγουμένως π.χ. ιξωδόμετρα, πενετρόμετρα, συμπιεστόμετρα[44] κ.α.

Αντίστοιχα όργανα χρησιμοποιούνται και στα τυριά[45] η ποικιλία και τα ελαττώματα των οποίων έχουν σαν αποτέλεσμα τη λήψη υφής αρκετά διαφοροποιημένης.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Δ. Οπωροκηπευτικά

Η υφή των φρούτων και των κηπευτικών αποτελεί κριτήριο ποιότητας ή και ωριμότητάς των. Ο προσδιορισμός της υφής σε νωπό και κονσερβοποιημένο καλαμπόκι έγινε με την διατμητική πρέσσα του Kramer[46] και το Instron[47] του αρακά με το τρυφερόμετρο[48].

Για τα προϊόντα όπως μήλα, αχλάδια, ροδάκινα, η αξιολόγηση της υφής γίνεται με τη συσκευή denture tenderometer[47] η οποία αποτελείται από μηχανικά κινούμενο σύστημα δύο σιαγόνων που προσομοιάζουν με τη λειτουργία των σιαγόνων του στόματος. Το όργανο μετράει παραμέτρους όπως τη σκληρότητα, την ευθραυστότητα, την ικανότητα μάσησης κ.α.

Για χυμούς οπωροκηπευτικών χρησιμοποιείται το χυμόμετρο (succulometer) και τα διάφορα ιξωδόμετρα[49]. Το χυμόμετρο αποτελείται από πρέσσα η οποία μηχανικά πιέζει το δείγμα και μετράει τον όγκο του παραγόμενου χυμού. Τέλος για τη διαπίστωση ύπαρξης σκληρών ινών σε σπαράγγια και φασολάκια χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ινόμετρα (fibrometer).

Ε. Διάφορα

Σε προϊόντα όπως οι πηκτές (jelé) η υφή αξιολογείται με το πηκτόμετρο Bloom (Bloom gelometer). Σ' αυτό μετρείται η δύναμη που απαιτείται για τη βύθιση του εμβόλου του οργάνου στο κέντρο της πηκτής. Η μέτρηση γίνεται σε σχέση πάντα με πρότυπες πηκτές.

Στο μέλι το ιξώδες προσδιορίζεται με ιξωδόμετρα. Σε ημίρευστα τρόφιμα όπως κέτσαπ, κρέμες, μουστάρδα, μαγιονέζα, ο έλεγχος του ιξώδους γίνεται με ιξωδόμετρα στρέψης κυλίνδρου (Brookfield viscometer). Τέλος η υφή προϊόντων όπως ο τοματοπολτός ελέγχεται με ειδικές συσκευές προσδιορισμού της συνοχής (consistometers), που μετρούν το βαθμό ροής, του υλικού υπό καθορισμένες συνθήκες.

20.6 Εξέταση της γεύσης και οσμής

Η γεύση και η οσμή (flavor) αναφέρονται στα αισθήματα που προκαλεί η τροφή στο στόμα και τη μύτη αντίστοιχα. Δηλαδή η γεύση και η οσμή είναι ιδιότητες του τροφίμου αφενός και του δέκτη (ατόμου) αφετέρου. Η χημεία της γεύσης και οσμής ασχολείται με τις ενώσεις εκείνες που δίνουν στο τρόφιμο τις πιο πάνω χαρακτηριστικές οργανοληπτικές ιδιότητες καθώς και με την αλληλεπίδραση των ενώσεων αυτών με τους δέκτες στα αισθητήρια όργανα του ανθρώπου. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί κάποιο σήμα, μέσω του νευρικού συστήματος, το οποίο μεταφερόμενο στον εγκέφαλο δημιουργεί την εντύπωση της συγκεκριμένης γεύσης ή οσμής ή και των δύο.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Α. Γεύση

Τα κύρια γευστικά ερεθίσματα είναι τέσσερα: το γλυκό, το πικρό, το ξινό και το αλμυρό. Η αίσθηση της γεύσης γίνεται αντιληπτή με τη βοήθεια των γευστικών καλύκων, δηλ. των συσσωματωμάτων των γευστικών κυττάρων τα οποία μοιάζουν με τους κάλυκες των ανθέων (απ' όπου και η ονομασία τους). Οι γευστικοί κάλυκες είναι εξειδικευμένοι σε ομάδες, ώστε να δέχονται ένα ορισμένο είδος γευστικού ερεθίσματος και να μεταβιβάζουν , μέσω των κατάλληλων νεύρων που απολήγουν σ' αυτούς, τη σχετική πληροφορία στον εγκέφαλο. Οι γευστικοί κάλυκες βρίσκονται κυρίως πάνω στη γλώσσα διαταγμένοι κατά τέτοιο τρόπο ώστε το αίσθημα του γλυκού να εντοπίζεται στο οξύ άκρο της γλώσσας, του πικρού στο πίσω άκρο, του αλμυρού και ξυνού στα δύο πλάγια άκρα της γλώσσας.

Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ της ουσίας που αποτελεί τον φορέα της γεύσης και του δέκτη της γεύσης δεν είναι ξεκαθαρισμένος. Πιστεύεται πάντως ότι οι πιο πάνω φορείς της γεύσης αντιδρούν με ειδικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στα κύτταρα του δέκτη. Την άποψη αυτή επιβεβαιώνει η απομόνωση ειδικής πρωτεΐνης από τον επιθηλιακό ιστό της γλώσσας βοδιού που εμφάνισε τις ιδιότητες του δέκτη του γλυκού ερεθίσματος. Όσον αφορά το δεσμό μεταξύ φορέα και δέκτη της γεύσης είναι γενικά αποδεκτό ότι είναι ασθενής και ότι το φαινόμενο της γεύσης είναι αντιστρεπτό. Πιστεύεται ότι ο φορέας της γεύσης προσροφάται ασθενώς στον δέκτη (γλώσσα) προκαλώντας διατάραξη της ισορροπίας των ιόντων στην επιφάνειά του, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ηλεκτρικού σήματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της αλληλεπίδρασης φορέα-δέκτη και της αντίληψης του αισθήματος της γεύσης είναι της τάξης των 20-30 millisecond. Η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης του φορέα και απόκρισης του δέκτη δεν είναι απλή. Καταρχήν με την αύξηση της πρώτης αυξάνεται και η δεύτερη. Υπάρχει όμως μία οριακή τιμή της πρώτης, πάνω απ' την οποία η δεύτερη παραμένει σταθερή.

Πειράματα έδειξαν ότι σοβαρές διαφορές όσον αφορά την ευαισθησία στη γεύση δεν υπάρχουν μεταξύ των δύο φύλων και των διαφορετικών ηλικιών. Εντούτοις παράγοντες όπως το κάπνισμα και οι ασθένειες επιφέρουν ελάττωση στην ευαισθησία του ατόμου να συλλαμβάνει τις διάφορες γεύσεις. Τη γεύση του γλυκού προκαλούν τα σάκχαρα (σακχαρόζη) και οι συναφείς προς αυτά ουσίες, τα αμινοξέα: λευκίνη, βαλίνη, σερίνη και θρυπτοφάνη καθώς και συνθετικές ουσίες, όπως η σακχαρίνη, τα κυκλαμικά άλατα κ.α. Τη γεύση του ξινού προκαλούν τα οξέα και τα προϊόντα με σημαντική περιεκτικότητα οξέων (οξικό, κιτρικό, φουμαρικό, αδιπικό κ.α.). Τη γεύση του αλμυρού προκαλούν γενικά τα άλατα (NaCl), ενώ τη γεύση του πικρού

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

προκαλεί μεγάλη ποικιλία ουσιών ανοργάνων και οργανικών, όπως διάφορα αμινοξέα, πεπτίδια μικρού Μ.Β., αλκαλοειδή, γλυκοζίτες, ιωδιούχο κάλιο κ.α. Κατώτατα όρια ανίχνευσης των τεσσάρων παραπάνω γεύσεων είναι:
πικρό – συγκεντρ. (κινίνη): 0.0016%
ξινό – συγκεντρ. (HCl): 0.007%
αλμυρό – συγκεντρ. (NaCl): 0.25%
γλυκό – συγκεντρ. (σακχαρόζη): 0.5%

Άλλοι παράγοντες της γεύσης

Εκτός από τα τέσσερα κύρια γευστικά ερεθίσματα το πικρό, το ξινό, το αλμυρό και το γλυκό, υπάρχουν και άλλα δευτερεύοντα που συντελούν στη γεύση. Τα σπουδαιότερα απ' αυτά είναι:
α. Το αλκαλικό ερέθισμα που αποδίδεται στο -OH. Το ανθρώπινο αισθητήριο έχει όριο ευαισθησίας της αλκαλικής γεύσης σε διάλυμα, 0.01%.
β. Το στιφό ερέθισμα που αποδίδεται στις ταννίνες, π.χ. το τσάι.
γ. Το δροσιστικό ερέθισμα που είναι χαρακτηριστικό της μενθόλης, π.χ. οι τσίχλες, καραμέλες μενθόλης κ.α.
δ) Το καυστικό ερέθισμα, χαρακτηριστικό των μπαχαρικών, πιπεριού, πιπεριάς κ.τ.λ. Η γεύση του πιπεριού οφείλεται στην παρουσία της πιπερίνης, ενώ η γεύση της πιπεριάς οφείλεται στην παρουσία της καψαϊσίνης.
ε) Το μεταλλικό ερέθισμα που αποδίδεται στα άλατα των μετάλλων κυρίως του Hg, Ag, Fe και Zn. Το όριο ανίχνευσης για τη γεύση αυτή είναι 20-30 ppm.
στ) Κατά την ανάμιξη διάφορων γευστικών ουσιών προκύπτει η σύνθετη γεύση που είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γλυκού και ξινού (αναλογία σακχάρων/οξέων) στα φρούτα.

Β. Οσμή

Ο μηχανισμός της όσφρησης είναι κατά πολύ πολυπλοκώτερος από εκείνον της γεύσης. Υπάρχουν χιλιάδες διαφορετικές οσμές και η ευαισθησία του οργάνου της όσφρησης είναι κατά 10,000 φορές μεγαλύτερη από την ευαισθησία του οργάνου της γέυσης.
Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα που έχει το σύστημα όσφρησης του ανθρώπου να ξεχωρίζει χιλιάδες οσμές, να αποθηκεύει τις αντίστοιχες πληροφορίες στη μνήμη του εγκέφαλου και να τις χρησιμοποιεί για την ταυτοποίηση των διάφορων οσμών ακόμη και μετά πάροδο μακρών χρονικών διαστημάτων. Η ικανότητα της όσφρησης, επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η ηλικία, η λήψη φαρμάκων, οι ασθένειες κ.α. Η συνολική οσμή των διάφορων τροφίμων είναι συνήθως συνισταμένη μεγάλου αριθμού οσμηρών ουσιών.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Γ. Θεωρίες της όσφρησης

Όταν μία οσμηρή ουσία, φτάσει στο όργανο της όσφρησης (μύτη) συμβαίνει αντίδραση μεταξύ του οσμηρού μόριου και του δέκτη της όσφρησης που οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτρικού σήματος. Το ηλεκτρικό αυτό σήμα, μέσω του νευρικού συστήματος, φτάνει στον εγκέφαλο όπου γίνεται η ταυτοποίηση της συγκεκριμένης οσμής. Ο ακριβής μηχανισμός της αντίδρασης αυτής παραμένει άγνωστος. Ο αριθμός, πάντως, των δεκτών της όσφρησης στη μύτη είναι της τάξης των 100 εκατομμυρίων. Σύμφωνα με τη θεωρία του Amoore η διάκριση των διαφορετικών οσμηρών μορίων γίνεται με βάση το μέγεθος και το σχήμα του μόριου. Οι οσμηρές αυτές ενώσεις εισχωρούν και καλύπτουν τους αντίστοιχους δέκτες της όσφρησης όπως το κλειδί στην κλειδαριά. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι περισσότερες οσμηρές ενώσεις κατατάσσονται σε επτά κατηγορίες βάσει των επτά πρωταρχικών οσμών που φαίνονται στον Πίνακα 20.4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 20.4

Οι κύριες οσμές και οι ενώσεις που τις αναδίδουν

Κύρια οσμή	Οσμηρές ενώσεις
Καμφοράς (camphoraceous)	καμφορά, πενταμεθυλαιθυλαλκοόλη
δριμεία (pungent)	αλλυλική αλκοόλη, φορμαλδεΰδη, μυρμηκικό οξύ
αιθερική (ethereal)	ακετυλένιο, τετραχλωράνθρακας, χλωροφόρμιο
ανθέων (floral)	γερανιόλη, φαινυλαιθυλαλκοόλη, τερπένια
μέντας (pepermint)	μενθόλη, κυκλοεξανόνη
μόσχου (musk)	κυκλοδεκαεξανόνη
σαπίλας (putrid)	καδαβερίνη, υδρόθειο, ινδόλιο, σκατόλιο

(Από Amoore et al., 1964)

Δ. Αντικειμενικός προσδιορισμός οσμής και γεύσης

Κάθε οσμή μπορεί να περιγραφεί από το συνδυασμό των τιμών του όριου ανίχνευσης και της ποιότητάς της. Η πρώτη τιμή αναφέρεται στον παράγοντα ένταση, η δεύτερη στον χαρακτήρα του αρώματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις το άρωμα οφείλεται σε περιορισμένο αριθμό ενώσεων, οπότε οι ενώσεις

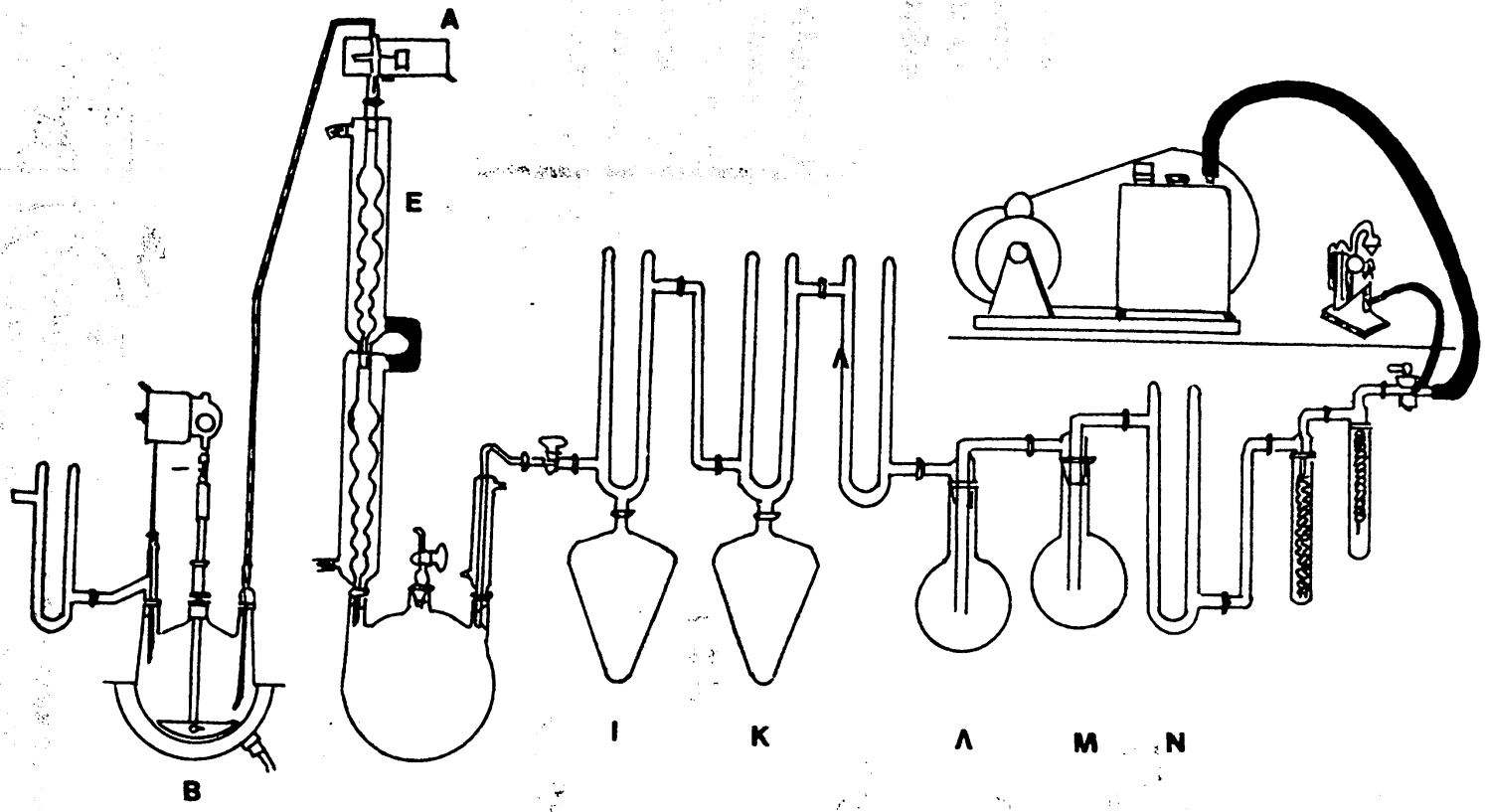
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

αυτές ονομάζονται «βασικά συνεισφέρουσες οσμηρές ενώσεις» π.χ. οι πυραζίνες στις πιπεριές. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις το συνολικό άρωμα ενός τροφίμου είναι η συνισταμένη μεγάλου αριθμού ενώσεων.
Η κλίμακα προσδιορισμού της έντασης μιας οσμής αποτελείται συνήθως από είκοσι πέντε υποδιαιρέσεις. Η απόσταση δύο διαδοχικών υποδιαιρέσεων της κλίμακας ονομάζεται ελάχιστη αντιληπτή διαφορά (JND) (just noticeable difference). Το όριο ανίχνευσης μιας οσμηρής ένωσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες ο πιο σημαντικός είναι το περιβάλλον, στο οποίο βρίσκεται η υπό προσδιορισμόν ουσία, π.χ. υδατικό ή λιπαρό περιβάλλον.
Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις η ευαισθησία του αισθητηρίου της όσφρησης είναι τόσο μεγάλη (της τάξης των ολίγων ppb) που για να επιτευχθεί αντικειμενική μέτρηση της οσμής απαιτείται η χρήση μικροαναλυτικών μεθόδων.
Για το σκοπό αυτό απαιτείται απομόνωση των πτητικών αρωματικών υλών που συνεισφέρουν στο άρωμα του τροφίμου, εμπλουτισμός του αρωματικού κλάσματος, διαχωρισμός των αρωματικών ουσιών και ταυτοποίησή τους.

1. Απομόνωση πτητικών αρωματικών υλών.

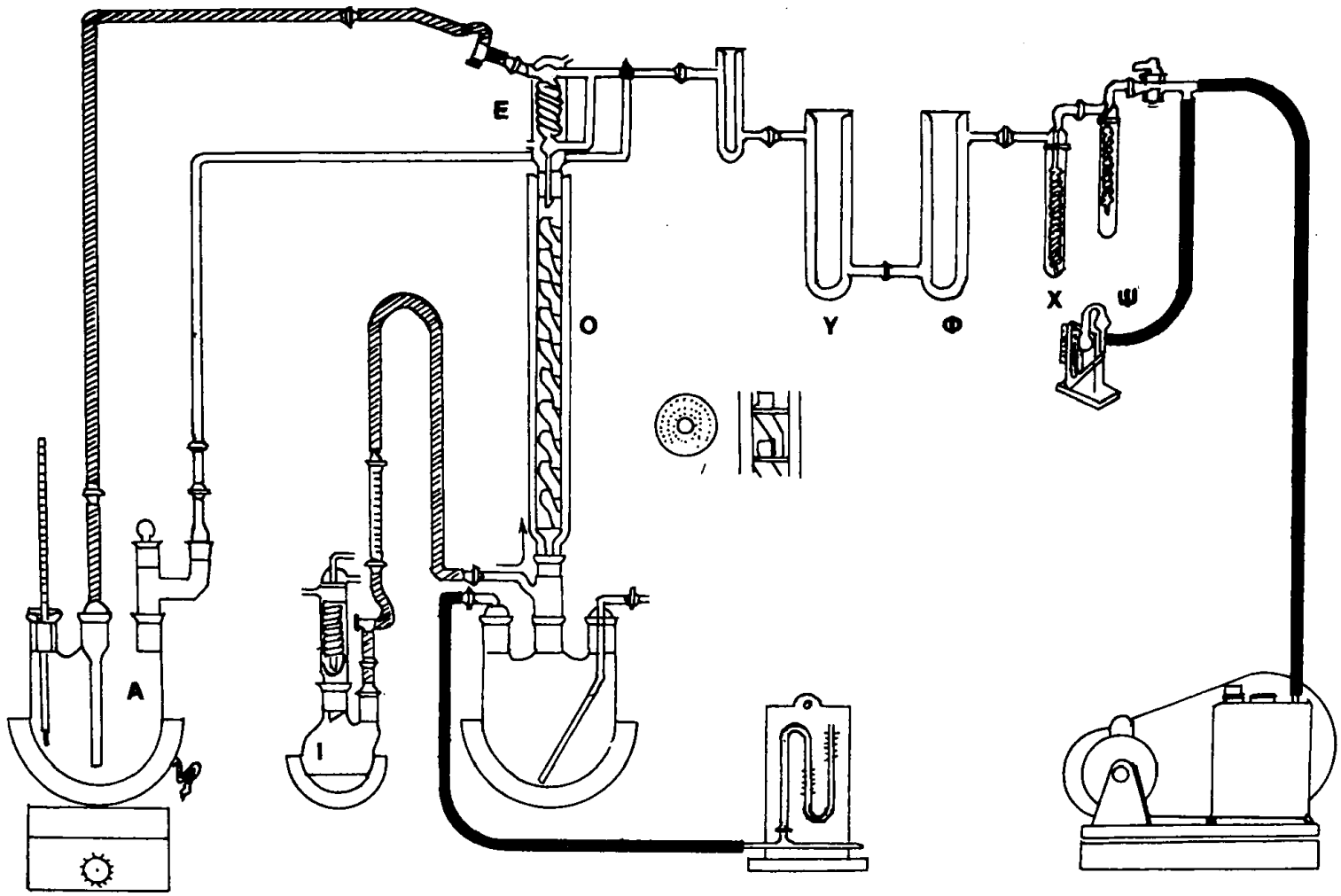
Η διαδικασία είναι χρονοβόρα και απαιτείται συνήθως μεγάλη ποσότητα δειγμάτων (δεκάδες κιλά τουλάχιστον). Ανάλογα με την φύση του δείγματος (ελαιώδες, υδατικό ή στερεό) χρησιμοποιούνται διαφορετικές συσκευές.
(α) Στην περίπτωση υδατικού τροφίμου (μπύρα, χυμός μήλου κ.α.) ή στερεού (κρέας, τηγανιτές πατάτες) χρησιμοποιείται συσκευή ανάλογη με εκείνη του σχημ. 20-16.
Το υγρό δείγμα (στην περίπτωση στερεού, παρασκευάζεται αιώρημα αυτού σε νερό με την βοήθεια μπλέντερ) τροφοδοτείται με τη βοήθεια αντλίας (A) σε εξατμιστή (E) που λειτουργεί υπό υψηλό κενό. Ο εξατμιστής θερμαίνεται με την βοήθεια λουτρού γλυκερίνης στους 105°C. Το τρόφιμο στον εξατμιστή εξατμίζεται ακαριαία (λόγω δραστικής πτώσης της πίεσης ~ 15 mm Hg) και ρέει στα εσωτερικά τοιχώματα του εξατμιστή υπό μορφή λεπτού υμένα. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες οι αρωματικές ουσίες και το νερό απομακρύνονται από το τρόφιμο και συλλέγονται κατόπιν συμπύκνωσης στις παγίδες I-N. Οι πρώτες πέντε παγίδες ψύχονται με ξηρό πάγο, ενώ οι τρείς τελευταίες με υγρό άζωτο. Η πίεση στην έξοδο των παγίδων είναι περίπου 3 mm Hg. Το τρόφιμο στον υποδοχέα B θερμαίνεται για πολύ μικρό διάστημα ($t \leqslant 5min$) για αποφυγή σχηματισμού νέων πτητικών προϊόντων της θέρμανσης.
(β) Στην περίπτωση ελαιώδους τροφίμου χρησιμοποιείται συσκευή ανάλογη εκείνης του σχημ. 20-17.
Η απομόνωση των αρωματικών συστατικών στηρίζεται στην κατ' αντιρροή

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-16. Συσκευή απομόνωσης πτητικών συστατικών από υδατικό τρόφιμο.
Από Chang (1973).[50]

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-17. Συσκευή απομόνωσης πτητικών συστατικών από ελαιώδη τρόφιμα.
Από Chang (1977).[51]

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

απόσταξη με υδρατμούς υπό κενό (0.01 mm Hg). Το υγρό δείγμα (λιπαρά στερεά πήκονται κατόπιν θέρμανσης στον υποδοχέα Α) από τον υποδοχέα Α μεταφέρεται στον εναλλάκτη θερμότητας Ε με τη βοήθεια του κενού της συσκευής, όπου και θερμαίνεται συνεχώς στους 70°C. Ακολούθως το δείγμα εισέρχεται στο άνω άκρο στήλης Oldershaw (O), ενώ ταυτόχρονα ατμός παραγόμενος στην φιάλη Ι, εισέρχεται στο κάτω άκρο της στήλης Ο. Ο ατμός ερχόμενος σε κατ' αντιρροήν επαφή με λεπτό υμένιο (film) του λαδιού στις «πλάκες» της στήλης συμπαρασύρει μαζί του προς την κορυφή της τα αρωματικά συστατικά του ελαιώδους δείγματος. Το ρεύμα αυτό διαβιβάζεται κατ' αρχήν μέσω κενής παγίδας που συγκρατεί ίχνη λαδιού και στη συνέχεια μέσω των παγίδων Υ, Φ, Χ και Ψ όπου συμπυκνώνονται οι υδρατμοί και τα αρωματικά συστατικά.

(γ) Μία εναλλακτική μέθοδος απομόνωσης των πτητικών συστατικών ενός τροφίμου αποτελεί η διέλευση ρεύματος αζώτου δια μέσου του ελαφρώς θερμαινόμενου δείγματος και συλλογής του συμπυκνώματος σε σύστημα παγίδων[51,52].

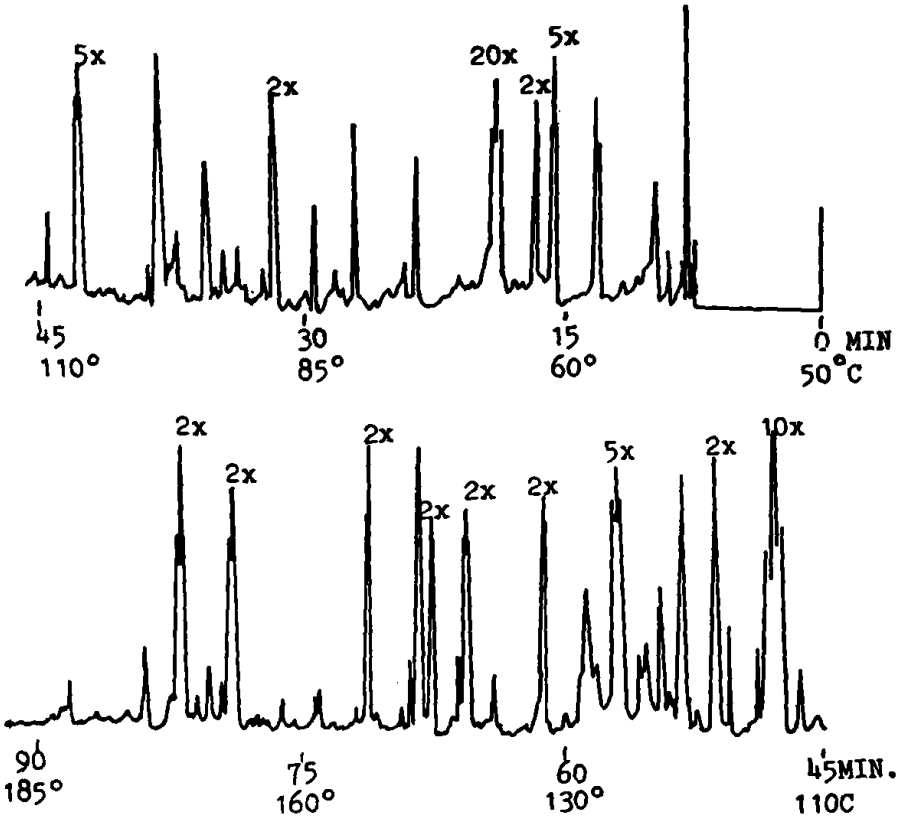
2. Κλασμάτωση αρωματικών συστατικών

Το περιεχόμενο των παγίδων εκχυλίζεται με αιθέρα σε συσκευή εκχύλισης κατ' αντιρροή (βλ. κεφ. 9.1), ξηραίνεται με προσθήκη Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται με στήλη Oldershaw μέχρις όγκου 5 ml περίπου. Ακολουθεί κλασμάτωση των αρωματικών ουσιών σε στήλη αερίου χρωματογράφου ο οποίος έχει εφοδιαστεί με διαχωριστή δείγματος (sample splitter), έτσι ώστε ένα μικρό μέρος του τελευταίου να φθάνει στον ανιχνευτή, ενώ το υπόλοιπο να συλλέγεται σε κατάλληλη έξοδο της συσκευής. Στην έξοδο αυτή τοποθετείται το άκρο γυάλινης παγίδας σχήματος U η οποία ψύχεται με μίγμα ξηρού πάγου/ακετόνης. Με την τεχνική αυτή το συμπύκνωμα των αρωματικών υλών χωρίζεται σε κλάσματα, το καθένα από τα οποία χρωματογραφείται εκ νέου μέχρις λήψης καθαρών ουσιών σε χωριστές παγίδες. Αεριοχρωματογράφημα του αρώματος της φράουλας φαίνεται στο σχήμα 20-18.

3. Ταυτοποίηση αρωματικών υλών

Η πιο διαδομένη τεχνική ταυτοποίησης περιλαμβάνει το συνδυασμό τριχοειδούς στήλης αέριας Χρωματογραφίας/Φασματογραφίας Μαζών (GC/MS) (βλ. κεφ. 2.8). Συχνά εξ άλλου χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές όπως ο Μαγνητικός Πυρηνικός Συντονισμός (NMR), η Υπέρυθρη Φασματοσκοπία (IR) κ.α. Στο σχήμα 20-19 δίνονται τα φάσματα NMR, Μαζών και IR της ουσίας Νεο-ισοπουλεγόλη, συνυπεύθυνης για το άρωμα του πορτοκαλελαίου.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-18. Αεριοχρωματογράφημα του αρώματος της φράουλας στήλη: open tubular column 60m x 0.25m I.D. στατική φάση: Tween 20.

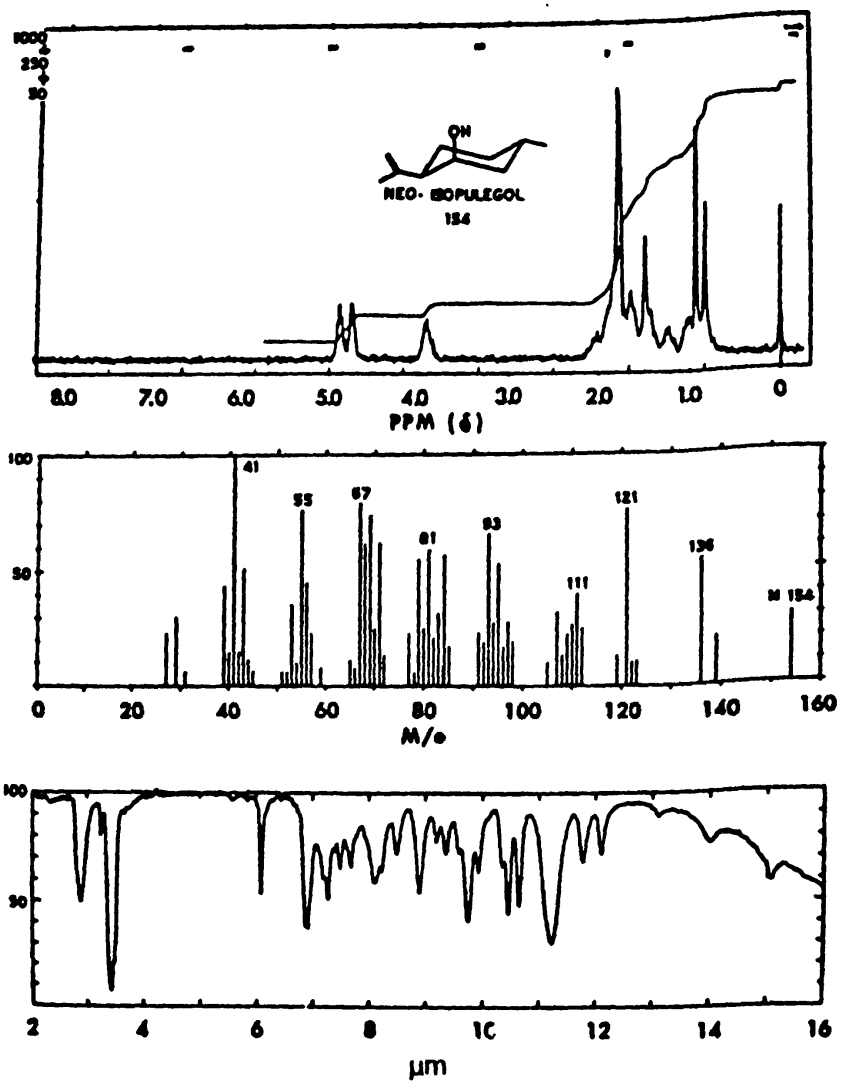
(Από Johnson et al. 1958).

Ε. Αντικειμενικός προσδιορισμός της γεύσης

Η γλυκύτητα σιροπιών, χυμών ή υδατικών εκχυλισμάτων σακχάρων προσδιορίζεται με τη μέτρηση του δείκτη διάθλασης του φωτός στο αντίστοιχο μέσο. Η αίσθηση του ξινού (οξύτητα) προσδιορίζεται με το πεχάμετρο σε λογαριθμική κλίμακα από 0–14. Πολλές φορές εκτός από την συγκέντρωση των Η (pH) ενδιαφέρει το % ποσοστό των συνολικών οξέων στο δείγμα τροφίμου. Δηλαδή όλα τα μόρια, με όξινη αντίδραση του δείγματος μπορεί να μην ιονίζονται παρά μόνο σε ουδέτερο pH. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα βάσης μέχρι pH=7, πράγμα που καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό των συνολικών οξέων. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε g άνυδρου οξέος (π.χ. κιτρικού) ανά 100g προϊόντος.

Η αίσθηση του αλμυρού οφείλεται στην παρουσία ορισμένων κατιόντων όπως το NH_4^+, Na^+, K^+, Cu^{2+}, Mg^+ , Li^+ που είναι συνδεμένα με ανιόντα όπως το SO_4^{2-} Cl^- Br^- S^{2-} HCO_3^- ή NO_3^-. Επειδή το πιο συχνό απ' αυτά είναι το NaCl, η ανάλυση των κατιόντων Na αποτελεί το μέτρο του βαθμού αλμυρότητας του τροφίμου. Ο προσδιορισμός του Na/K γίνεται φλογοφωτομετρικά. Ακόμη για τον

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



Σχ. 20-19. Φάσματα NMR, μαζών και IR της Νεο-ισο-πουλεγόλης συνυπεύθυνης για το χρώμα πορτοκαλέλαιου.

παραπάνω προσδιορισμό χρησιμοποιούνται εκλεκτικά ηλεκτρόδια.

Η αίσθηση του πικρού δεν προκαλείται από μία μόνο ένωση. Όταν στην κάθε περίπτωση επισημανθεί η ένωση που ευθύνεται για την πικρή γεύση του τροφίμου, τότε χρησιμοποιείται κλασική χημική ανάλυση για τον προσδιορισμό της. Για την περίπτωση των ταννινών, στις οποίες οφείλεται μεγάλο μέρος της πικρής γεύσης, το δείγμα εκχυλίζεται με νερό και στο εκχύλισμα προστίθεται το αντιδραστήριο Folin-Denis (φωσφορομολυβδαινικό νάτριο) για το σχηματισμό χαρακτηριστικού μπλε χρώματος, η απορρόφηση του οποίου μετρείται στα 725 nm σε φασματοφωτόμετρο.

ΣΤ. Οργανοληπτική εξέταση οσμής, γεύσης, υφής και χρώματος.

Η οργανοληπτική εξέταση των τροφίμων γίνεται από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό που στην περίπτωση της αξιολόγησης της οσμής και γεύσης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

πρέπει να έχει κάποια ιδιαίτερη ευαισθησία στα αντίστοιχα αισθητήρια όργανα. Μέσα σε λογικά όρια, η ηλικία και το κάπνισμα δεν αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την απόρριψη κάποιου σαν κριτή, τα δύο φύλα μπορούν να είναι εξ ισου καλοί κριτές, ενώ οι άρρωστοι σαφώς μειονεκτούν στην ικανότητα οργανοληπτικής αξιολόγησης. Η οργανοληπτική εξέταση γίνεται σε χρόνο μεταξύ των τριών γευμάτων από ομάδα 6–12 ατόμων, σε ειδικούς θαλάμους ομοιόμορφα φωτισμένους, επαρκώς εξαεριζόμενους. Οι θάλαμοι περιέχουν τον πάγκο όπου γίνονται οι δοκιμές και καρέκλα και επικοινωνούν με το περιβάλλον με μικρό παράθυρο απ' όπου ο κριτής λαμβάνει τα προς εξέταση δείγματα. Τα δείγματα πρέπει να είναι του ιδίου μεγέθους και να έχουν θερμοκρασία δωματίου. Ο αριθμός των δειγμάτων ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο τρόφιμο, την εξέταση και την μέθοδο αξιολόγησης. Συνήθως επί τριών δειγμάτων εκ των οποίων τα δύο είναι ίδια και το τρίτο διαφέρει καλείται ο κριτής να ξεχωρίσει το διαφορετικό αυτό δείγμα (triangle test). Σε άλλη παραλλαγή της δοκιμής αυτής ο κριτής εν γνώσει του δοκιμάζει το πρώτο από τα δύο ίδια δείγματα και καλείται να βρει το διαφορετικό απ' αυτό μεταξύ δευτέρου και τρίτου δείγματος (duo-trio test).
Ο κριτής εξετάζει κάθε δείγμα (στην περίπτωση αξιολόγησης της γεύσης μεταξύ δύο διαδοχικών δοκιμών, ξεπλένει το στόμα του με νερό) και το βαθμολογεί, σε κλίμακα αριθμητική ή βασισμένη στην προκαλούμενη ευχαρίστηση (edonic), σε ειδικό έντυπο (σχ. 20-20).
Επαναλαμβάνεται η εξέταση των ίδιων δειγμάτων από τον κριτή με διαφορετική όμως σειρά και η επαναβαθμολόγηση.

Τα αποτελέσματα όλων των δοκιμασιών αναλύονται στατιστικά και προσδιορίζεται ο βαθμός αποδοχής του προϊόντος από τον καταναλωτή.

20.7 Εφαρμογές γεύσης και οσμής

Η γεύση και η οσμή έχουν μελετηθεί στα εξής τρόφιμα:

Α. Γαλακτοκομικά προϊόντα

Στο παστεριωμένο και αποστειρωμένο (UHT)[52] γάλα, σε σχέση με τη δυσοσμία την προερχόμενη από την θέρμανση· στο βούτυρο[53], κύρια αρωματικά συστατικά του οποίου είναι το διακετύλιο και η ακετόνη· στα τυριά τύπου Gouda[54], Αμερικής[55] και Emmental[56] με κύρια αρωματικά συστατικά τα: μεθυλοκετόνες, διακετύλιο, αλκυλοβενζόλια, εστέρες, λακτόνες και αλκυλοπυραζίνες.

Β. Κρέας-ψάρια

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΚΑΡΡΟΤΩΝ

ΟΝΟΜΑ ΚΡΙΤΗ: _____ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ:

ΧΡΩΜΑ ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: _____

Συνολικό χρώμα: κίτρινο | κίτρινο-πορτοκαλί | πορτοκαλί | κόκκινο-πορτοκαλί | καφέ-πορτοκαλί

Επιφανειακή εμφάνιση: καθόλου στιλπνή | ελαφρά στιλπνή | πολύ στιλπνή

κλίμακα αποδοχής εμφάνισης: κακή | ανεκτή | καλή | πολύ καλή | άριστη

ΥΦΗ ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: _____

εντύπωση πρώτης δαγκωματιάς: μαλακό | κρυσανιστό | σκληρό

κρυσανιστό: καθόλου κρυσανιστό | αρκετά κρυσαντιστό | πολύ κρυσανιστό

χυμώδες: στεγνό | αρκετά χυμώδες | πολύ χυμώδες

κλίμακα αποδοχής υφής: κακό | ανεκτό | καλό | πολύ καλό | άριστο

ΓΕΥΣΗ ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: _____

πικρό: καθόλου πικρό | αρκετά πικρό | πολύ πικρό

γλυκό: άγλυκο | αρκετά γλυκό | πολύ γλυκό

Συνολική γεύση: άγευστο | αρκετά γευστικό | πολύ γευστικό

κλίμακα αποδοχής γεύσης: κακό | ανεκτό | καλό | πολύ καλό | άριστο

Σχόλια: _____

Σχ. 20-20. Έντυπο οργανοληπτικής εξέτασης καρρότων.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η γεύση και το άρωμα των τροφίμων αυτών αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της θερμικής κυρίως κατεργασίας που υφίστανται, π.χ. ψήσιμο, βράσιμο, κάπνισμα κ.ο.κ. Στο βοδινό κρέας[57] ταυτοποιήθηκαν ενώσεις όπως ενδεκάνιο, 1-οκτενόλη, οξικός αιθυλεστέρας, εξανάλη, 3-δωδεκανόνη, βενζόλιο, βενζαλδεΰδη κ.α.
Ανάλογες ενώσεις προσδιορίστηκαν στο κοτόπουλο[58], στο αρνί[59], στο χοιρινό[60] και στα ψάρια[61].

Γ. Φρούτα και κηπευτικά

Στα φρούτα: μπανάνα[62], σε σχέση με τον χρόνο ωρίμανσης, στα αχλάδια[63], στις φράουλες[64], στα εσπεριδοειδή[65], τα κύρια αρωματικά συστατικά των οποίων περιλαμβάνουν: βουτυλικό αιθυλεστέρα, εξανάλη, ακεταλδεΰδη, γερανιόλη, λιναλοόλη κ.α.· στα μήλα[66] κ.ο.κ.
Στα κηπευτικά: κρεμμύδια[67], κατεψυγμένα καρρότα και αφυδατωμένη πατάτα[68], σκόρδο[69] πατατάκια chips[70], κονσερβοποιημένο καλαμπόκι και σπαράγγια[71], πορτοκαλοχυμό[52] κ.α.

Δ. Διάφορα

Στο αλεσμένο σιτάρι[72] που βρέθηκε να περιέχει: ακεταλδεΰδη, βουτυρική αλδεΰδη, επτανάλη, εξανάλη, οξικό αιθυλεστέρα, κροτοναλδεΰδη κ.α.
Στα αλκοολούχα ποτά κρασί[52], μπύρα[52] και στα αποστάγματα ούζο[73] whiskey, vodka, brandy[74] κ.α., όπου απομονώθηκαν ενώσεις όπως α-πινένιο, καμφορά, βενζαλδεΰδη, ανηθόλη, β-και γ-καρυοφυλλένιο, σεσκιτερπένια κ.α.
Στα λίπη και λάδια όπως ελαιόλαδο[75] καλαμποκέλαιο[76] καθώς και στα προϊόντα που προκαλούν την τάγγιση αυτών π.χ. στο σογιέλαιο[77] ταυτοποιήθηκε η ένωση 2-πεντυλοφουράνιο που προκαλεί δυσοσμία στο προϊόν λόγω τάγγισης.
Στα τρόφιμα σε σχέση με τα υλικά συσκευασίας. Από τα τελευταία είναι δυνατόν κάτω από ορισμένες συνθήκες η μεταφορά ουσιών όπως διαλύτες από πλαστικές μεμβράνες[78], λάκες από κουτιά κονσερβών[79] κ.ο.κ. οι οποίες αλλοιώνουν τη γεύση και την οσμή των πρώτων.

Ειδική βιβλιογραφία

1. **Kramer A** and **Twigg BA:** Fundamentals of Quality Control for the Food Industry AVI. Publ. Co. Westport Conn. (1962)
2. **Bowers JA, Harrison DL** and **Kropf DH** J Food Sci 33, 147 (1968)
3. **Borchgrevink NC** and **Charley H** J. Amer. Diet. Assoc. 49, 116 (1966)
4. **Greene BE** Lipid Oxidation and Pigment Changes in Fresh and Irradiated Beef. Ph. D, Dissertation, Florida State University Library, Tallahassee, Fla (1966)
5. **Nickerson D** U.S. Dept. Agr. Misc. Publ. No 580 (1946)
6. **Noble IT** J. Home Econ. 50, 780 (1958)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

7. **Worthington OJ.** Food Tech. 15, 283 (1961)
8. **Zolber KK** and **Jacobson M** J. Home Econ. 54, 387 (1962)
9. **Kramer A** and **Hart WJ** Food Tech. 8, 55 (1954)
10. **Hunter RS** and **Yeatman JN** J. Optical Soc. Amer. 51, 552 (1961)
11. **Yeatman JN, Sidwell AP** and **Norris KH** Food Tech. 14, 16 (1960)
12. **Francis FJ** Food Tech. 17(5), 38, 44 (1963)
13. **Francis FJ** Food Tech. 23(1), 32 (1969)
14. **Pomeranz Y** and **Meloan CE** Food Analysis: Theory and Practice, AVI Publ. Co, Westport Conn. (1971)
15. **Francis FJ** Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 69, 296 (1957)
16. **Bradley C** and **Dyck RL** Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 93, 402 (1968)
17. **Kattan AA, Moore KW** and **Fleming JW** Proc. Amer. Soc. 93, 408 (1968)
18. **Gold HJ** and **KG Weckel** Food Tech. 13(5), 281, (1959)
19. **Barron RW, Maraulja MD** and **Huggart RL** Proc. Fla. State Hort Soc 80, 308 (1967)
20. **Gullet EA, Francis FJ** and **Clydesdale FM** J. Food Sci 37, 389 (1970)
21. **Hunter RS** Food Tech. 21, 906 (1967)
22. **Stevenson FT** and **Gunrisngham CE** Amer. Pot. J. 38, 105 (1961)
23. **Johnson RM** Cereal Chem 43, 461 (1966)
24. **Johnson RM** Cereal Chem 42, 167 (1964)
25. **Landrock AH** and **Wallace GA** Food Tech. 2, 194 (1955)
26. **Brown WD, Tappel AL** and **Olcott HS** Food Res 23, 262 (1958)
27. **Zerban FW, Martin J** and **Erb C** Anal. Chem. 24, 168 (1952)
28. **Ehman EP:** The Measurement of Beer Color. Ph. D Thesis Dept of Food Sci. Univ. Mass. Amherst Mass.
29. **Robinson WB, Bertine JJ** and **Whiticombe JE.** Amer. J. Enol. Vit. 17, 118 (1966)
30. **Ashton Et.** and **Fletcher DA** Pountry Sci. 41, 1903 (1962)
31. **Pohle WD** and **Tierney SE** J. Am. Oil Chem. Soc. 34, 485 (1957)
32. **Deman JM** Food in Canada, March (1966)
33. **Francis FJ** Penn. Manuf. Confect Assoc Ann Proc. 21, 24 (1967)
34. **Townsend GF** J. Apic. Res. 8, 29 (1969)
35. **Γαλανού Δ** και **Βουδούρη Ε** «Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων» Εκδόσεις Παν/μίου Αθηνών, Αθήνα (1975).
36. **Bailey ME, Hedrick HB, Parrisch FC** and **Naumann HD** Food Tech. 16(12), 99(1962)
37. **Voisey PW** and **Hansen H** Food Tech 21, 37A (1967)
38. **Sperring DD, Platt WJ** and **Hiner RL** Food Tech 13, 155 (1959)
39. **Voisey PW** and **Deman JM** Can. Inst. Food Tech. J. 3, 14 (1970)
40. **Kulwich R, Decker R** and **Alsmeyer RH** Food Tech. 17, 201 (1963)
41. **Simon S, Field JC, Kramlich WE** and **Tauber FW** Food Tech. 19, 410 (1965)
42. **Stanley DW, Pearson GP** and **Coxworth VE** J Food Sci 36, 256 (1971)
43. **Voisey PW** and **Nunes A** J. Inst. Can. Technol. Aliment 1(4), 128 (1968)
44. **Frazeur DR,** Ice Cream Field March: 34(1964)
45. **Richardson GH, Gandhi NR, Divatia MA** and **Ernstro, CA** J. Dairy Sci 54(2), 48(1971)
46. **Kramer A** and **Cooler JC** Proc. Amer. Soc. Hort Sci 81, 421 (1962)
47. **Bourne MC, Moyer JC** and **Hand OB,** Food Tech. 20 (4), 170 (1966)
48. **Kramer A** Food Scientist 5,7, (1961)
49. Lab. Exercise 10, Food Analysis Course, Dept of Food Science, Rutgers Univ. ΗΠΑ (1979)
50. **Chang SS** Food Tech. 27(4), 27 (1973)
51. **Chang SS, Vallese FM, Hwang LS, Hsieh OA** and **Min DS** J. Agr. Food Chem 25(3)450, (1977)
52. **Badings AT, Jong CO, Dooper RPM** and **De Nijs RCM** Prog. in Flavor Res. 523(1984)
53. **Winter M, Stoll M, Warnhoff EW, Grueter F** and **Buchi G** J. Food Sci 28(5), 554 (1963)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

54. **Sloot D** and **Harkers PD** J. Agr. Food Chem. 23(2), 356 (1975)
55. **Lin SS** J. Agr. Food Chem 24(6), 1252 (1976)
56. **Sloot D** and **Harkers PD** J. Agr. Food Chem 23(2), 358 (1975)
57. **Hirai C, Harz KO, Pokorny J** and **Chang SS** J. Food Sci 38, 393 (1973)
58. **Bouthilet RJ** Food Research 16, 201 (1951)
59. **Cramer DA** Food Tech, May:249(1983)
60. **Caporaso F, Sink JD, Dimick PS, Mussinan CJ** and **Sanderson A** J. Agric. Food Chem 25, 1230 (1977)
61. **Charm SE, Learson RJ, Ronsivall LJ** and **Schwartz M** Food Tech, July, 65 (1972)
62. **McCarthy AI, Palmar JK, Shaw CP** and **Anderson EE,** J. Food Sci 28, 379 (1963)
63. **Heinz DE, Sevenants MR** and **Jennings WC** J. Food Sci 31, 63 (1966)
64. **Teranishi R, Lorse JW, McFadden WH, Black DR** and **Morgan AI.** J. Food Sci 29, 478 (1963)
65. **Bruemmer JH** Food Tech, Jan, 67 (1975)
66. **Williams AA** Food Tech, Jan, 68 (1975)
67. **Carson JF** and **Wong FF** J. Agr. Food Chem. 9, 140 (1961)
68. **Buttery RC** and **Teranishi R** J. Agr. Food Chem 11, 504 (1963)
69. **Saghir AR, Mann LK, Bernard RA** and **Jacobsen JV** Proc. Amer. Soc. Hort Sci. 84, 386 (1964)
70. **Deck RE** and **Chang SS** Chem and Ind. July, 1343 (1965)
71. **Hayakawa KJ, Timbers GE** and **Stier E.F.** J. Food Sci 43, 944 (1978)
72. **McWilliams M** and **McKey AC** J. Food Sci 34, 493 (1969)
73. **Kontominas M.G.** J. Agr. Food Chem. 34, 847 (1986)
74. **Erikson FJ** Flavor of Foods and Beverages, **Charalambous G** (edit) Academic Press. New York (1978)
75. **Flath RA, Forrey RR** and **Guadagni DG** J. Agr. Food Chem. 21, (6) 948 (1973)
76. **Min D.** J. Food Sci 46, 1453 (1981)
77. **Krishnamurthy RG** and **Chang SS** J Food Sci 32(4), 372 (1967)
78. **Kontominas MG** and **Voudouris EK** Chim. Chron. New Series 11, 215 (1982)
79. **Peled R** and **Manbeim CH** Modern Packaging April, 45 (1977)
80. **Βουδούρη ΕΚ** και **Κοντομηνά ΜΓ.** Εισαγωγή στη Χημεία των Τροφίμων, Ιωάννινα (1985)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΑΛΦΑΒΗΤΙΚΟ ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ

Α

Αζώτου προσδιορισμός 269
Ακρίβεια μεθόδου 13
Άλεση 8
Άρωμα 419
Αλκαλικότητα τέφρας 258
Αλκοόλη 350
Αλκοομετρία 349
Αλκοολόμετρο 224, 350
Αμινοξέων προσδιορισμός 275
Αμυλάσες 370, 374
Άμυλο 321, 374
Αμυλογράφος 415
Αμυλοσιρόπι 328
Ανίχνευση φωσφατάσης 376
Ανίχνευση σακχάρων 309
Ανίχνευση πρωτεϊνών 272
Ανιχνευτής-θερμικής αγωγιμότητας 64
-ιονισμού φλόγας 66
-σύλληψης ηλεκτρονίων 67
Αντίδραση Νινυδρίνης 297
-Bellier 207
-Κώνστα-Συνοδινού 298
-Kreis 298
-Οζαζόνης 310
-Φορμόλης 274
Αντιδραστήριο Fehling 309
-Karl Fischer 247
Αντιοξειδωτικά BHA, BHT, PG, TBHQ
ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες 361
Αξιοπιστία ανάλυσης 15
Απόδοση στήλης 69
Απόρριψη τιμών 18
Αποτέφρωση ξηρή 259
Αραιόμετρα 224
Αριθμός ιωδίου 292
-Kirschner 290
-Reichert Meissl 290
-Polenske 290
-σαπωνοποίησης 289
-υπεροξειδίων 294
Ασκορβικό οξύ 335
Ατομική διάθλαση 205
Ασβεστίου προσδιορισμός 143
Ατομοποίηση 137
Ατομοποιητής ράβδου άνθρακα 140

Β

Βαθμοί Brix, Baumé 226
Βαθμός οξύτητας 288
Βακτηριολογικός έλεγχος γάλακτος 386
Βενζοϊκό οξύ 359
Βελτιωτικά αλευριών 364
Βιταμίνες 331
Βιταμίνη C 335
Βιολογική αξία πρωτεϊνών 278
Βουτυρόμετρο Gerber 300
Βουτυρόμετρο Van Gulik 300
Βουτυροδιαθλασίμετρο 207

Γ

Γαλακτικό οξύ 348
Γαλακτοματοποιητές 363
Γαλακτόζη 373
Γεύση 417
Γλυκαντικές ύλες 365
Γλυκερίνη 351
Γλυκαγόνο 324
Γλυκόζη 312, 372
Γνωμάτευση ανάλυσης 21

Δ

Δείκτης διάθλασης 203
» KOVATS 73
Δεξτρίνες 322
Δειγματοληψία τροφίμων 4
Διαιτητική ίνα 326
Διαθλασιμετρία 203
Διαθλασίμετρο Abbé 206
Διαστολομετρία 195
Δισακχαρίτες 307
Διαφορική διαθλασιμετρία 196
Διοξείδιο θείου 356
2,6-Διχλωροφαινολινδοφαινόλη 336

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Δοκιμές κυανού του μεθυλενίου, γάλα 386
–t (student) 16
–Θειοβαρβιτουρικού οξέος, λιπαρά 296, 299

Ε

Ειδικό βάρος 222
Ειδική απορροφητικότητα 113
Ειδική στροφή 214
Εκχύλιση συνεχής (Soxhlet) 230
-κατ' αντιρροή 231
Ενεργότητα νερού 251
Εμβαπτιζόμενο διαθλασίμετρο 207
Έκφραση αποτελεσμάτων ανάλυσης 19
Ένζυμα 369
Ενζυματική ανάλυση 370
Ενεργοποίηση νετρονίων, ανάλυση 260
Εξτενσιογράφος 413
Επαναληπτικότητα μεθόδου 13
Επίπεδο αξιοπιστίας 15
Εξίσωση van Deemter 70
Εύρος τιμών ανάλυσης 15

Ζ

Ζυγός Westphal 223

Η

Ηλεκτροφόρηση 177
Ηλεκτροφόρηση ελευθέρου μετώπου 183
-ζώνης 184
-χαρτιού 185
-οξικής κυτταρίνης 187
-πηκτής 188
-συνεχούς ροής 191
Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία 101
Ηλεκτροσμωτική ροή 182
Ημικυτταρίνες 326

Θ

Θείου, προσδιορισμός 272
Θερμοζεύγος 123
Θερμική ανάλυση 195
Θερμοκρασία Titer 286
Θειώδες οξύ, συντηρητικό 356
Θειαμίνη 332

Ι

Ιονανταλλακτικές ρητίνες 34
Ιξώδες 409
Ισοηλεκτρικό σημείο 190
Ισοηλεκτρική εστίαση 190
Ιχνοστοιχείων, προσδιορισμός 140, 142

Κ

Καλίου, προσδιορισμός 135
Καλαμοσάκχαρο 318
Κατανομή Gauss 15
Κατανομή κατ' αντιρροή 231, 285
Κριτήριο 4d 18
Κριτήριο Q 18
Κυτταρίνη 326

Λ

Λακτόζη 328
Λεύκανση, αλευριών 364
Λήκυθοι 222
Λιγνίνη 326
Λιπαρών οξέων, ανάλυση 288
Λιπαρές ύλες 281
Λυχνίες κοίλης καθόδου 139

Μ

Μαλτόζη 373
Μέσος όρος τιμών 14
Μεθανόλη 351
Μέθοδος Dean Stark 246
-Gerber-Van Gulik 300
-Karl Fischer 247
-Kjeldhal 269
-Kolthoff 317
-Lane Eynon 315
-Schmidt-Bondzynski 301
-Schrool Regenbogen 316
-Soxhlet 299
Μέλι 327
Μέση απόκλιση 15
Μικροοργανισμών, προσδ. 387
Μικροβιολογική ανάλυση 381
Μοριακό ιόν 150

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Μοριακή διάθλαση 204
Μονοχρωμάτορες 106
Μονοσάκχαρα 307
Μυρμηκικό οξύ 347

Ν

Νατρίου, προσδιορισμός 135
Νιτρικά ιόντα 357
Νιτρώδη ιόντα 357
Νόμος Lambert-Beer 110

Ξ

Ξήρανση πλακών TLC 46

Ο

Όγκος κατακράτησης 68
Ολική μεσοφίλη χλωρίδα (OMX) 385
Οξύτητα ογκομετρούμενη, κρασιών 346
πτητική, κρασιών 347
Οξύτητα, λαδιών 288
Οξυμετρία 343
Οπτική στροφή 213
Οργανοληπτική εξέταση 391
Όρια αξιοπιστίας ανάλυσης 15
Οσμή 418

Π

Παρασκευαστική χρωματογραφία 52
Πηκτινικές ουσίες 325
Πολυσακχαρίτες 321
Πολυστροφισμός, σακχάρων 215
Πολυφαιναλοξειδάση 376
Πολωσιμετρία 213
Πρίσματα Amici 206
Προσροφητές, 28, 44
χρωματογραφίας 47, 63
Προετοιμασία δειγμάτων τροφίμων 8
Πρόσθετα τροφίμων 355
Πρωτεΐνες 263
Πτητικές ουσίες 419
Πυκνομετρία 221
Πυκνόμετρα 222, 224

Ρ

Ροή 406
Ριβοφλαβίνη 333

Σ

Σακχάρων, ανάλυση 314
Σακχαρόζη 313, 372
Σακχαρίνη 366
Σημαντικά ψηφία 20
Σορβικό οξύ (Νάτριο) 359
Σορβιτόλη 365
Στερεό υπόλειμμα 226
Στατιστική ανάλυση 14
Στοιχειακή ανάλυση 142
Σφάλματα δειγματοληψίας 7
Σφάλματα ανάλυσης 19
Συντήρηση δειγμάτων 11
Συντηρητικά τροφίμων 355
Σχέση Fleischman 226
Σύζευξη spin-spin 163
Σωλήνας Bondzynski 301

Τ

Τέφρα 255, 256
Τεχνητό μέλι 327
Τριγλυκεριδίων ανάλυση 288
Τιμή Rf 50
Τοκοφερόλες 339
Τρυγικό οξύ 349
Τυπική απόκλιση 15
Τυπικό σφάλμα 15

Υ

Υδατάνθρακες 307
Υγρασίας, προσδιορισμός 244
Υγρή χώνευση 259
Υγρό Fehling 309
Υπολογισμός εμβαδού κορυφών 74
Υφή 400

Φ

Φαρινογράφος 413
Φάσμα απορρόφησης 104
Φάσμα εκπομπής 104
Φασματοφωτομετρία
Υπεριώδους 104
-Ορατού 104

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

-Υπέρυθρου 121
-Ατομικής απορρόφησης 135
-Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού 156
-Μαζών 144
Φελίγγειο υγρό 309
Φθορισμομετρία 129
Φυγοκέντριση 236
Φυγόκεντροι 238
Φλογοφωτομετρία 135
Φυτική ίνα 326
Φρουκτόζη 318, 372
Φωσφατάσης, δοκιμή 376
Φωσφόρου, προσδιορισμός 272
Φωτολυχνία 109

Χ

Χημική μετατόπιση 162
Χοληστερόλη 375
Χρόνος κατακράτησης 68
Χρώμα 392
Χρωστικές τροφίμων 397
Χρωστικές αντιδράσεις πρωτεϊνών 272
-λιπαρών υλών 297
Χρωστικές, πρόσθετα 360
Χρωματογραφία αέρια 57, 360
-ανεστραμμένης φάσης 84
-ιονανταλλαγής 32
-κατανομής 30
-πηκτής 38
-προσρόφησης 26
-λεπτής στοιβάδας 43
-στήλης 43
-υγρή (HPLC) 78

Ψ

Ω

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΠΑΡΟΡΑΜΑΤΑ

Σελ.	Σειρά	Διόρθωση
VII	3	τον αντί το
XII	23	σβύνει το υδρόμετρα
XIII	9	... 260
14	17	στην τελευταία σειρά λεζάντας να προστεθεί υ = τιμή μέτρησης
17	22	μέσος αντί μέσορ
33	15	να σβυστεί το + μετά το 2KCl
36	19/21	πίεση/ιονανταλλαγής
53	13/16	έλαια αντί λάδια / ελαίων αντί λαδιών / ελαίων αντί λαδιών
64	22	αλειφατικοι αντί αλιφατικοί
73	8	δείκτη αντί δείκτης
75	5	ανάλυση αντί ανάλυσης
85	15	τριαιθυλενογλυκόλη αντί τριαιθυλενογλυκόζη
91	18	τριελαΐνης αντί τριολεΐνης
92	8	τριελαΐνης αντί τριολεΐνης
107	9	κρυσταλλική
108	Σχ.3.8	φράγμα αντί φάσμα
109	1	συνήθεις αντί συνήθειες
116	10	λινελαϊκό αντί λινολεϊκό
118	1	Gibb αντί Gibbs
120	-	διαλλυλοδισουλφίδιο αντί diallyldisulphide
123	8	°C αντί C
125	25	συντηρητικού:
127	19	να σβυστεί το μέχρι
133	25	να σβυστούν τα Po, P
133	35	g/g αντί ppm
134	-	αφλατοξίνη αντί αλφατοφίνη (δύο φορές)
136	17	να προστεθεί (3.29)
136	23	(K) αντί (°K)
136	24	(K) αντί (°K)
141	4	(K) αντί (°K)
149	τελευτ.	/M+2) αντί M+Z
152	5	θετικά αντί θετικό
155	7	να αντί το
162	14	χημική αντί χαμηλή
163	15	πίνακας αντί πίνακα
165	7	constant αντί constent
167	20	εμβαδόν αντί εμβδόν

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σελ.	Σειρά	Διόρθωση
167	23	Σχ. 3 - 43β αντί 3-3β
181	10	δώσει την αντι δώσειτην
187	13	συστατικά αντί συτατικά
199	19	να σβυστεί το μη
199	19	[C] αντί [G]
220	24	στροφής αντί στρ-ής
225	7	βάθους αντί βάρους
232	9	1 αντί 2
238	3	Vs αντί Us
240	31	χρησιμοποιείται αντί χρησιμοποείται
253	τελευτ.	προσδιορισμό αντί προδιορισμό
258	18	7 CO_2 αντί 7 O_2
270	23/24/25	συνδέεται / φιάλη / περιεχόμενο
275	27	διάφορες αντί διαφόρους
299	13	Γενικές αντί Γενικαί
321	25	β-γαλακτοζο-δεϋδρογενάση αντί β-γαλκτοζο-δεϋδρογενάση
329	8	να προστεθεί : διάφορα μονο- και ολιγοσάκχαρα
332	21	χρωματογραφείται αντί χρωμογραφείται
332	τελευτ.	προσδιορίζεται αντί προσιορίζεται
339	προτελ.	διαχωρίζονται αντί διαχωρίζοναι
349	6	(Van Slyke)
349	20	καταβύθισης του, αντί καταβύθισης, του
352	13	προσδιορισμό αντί πρσδιορισμό
366	23	χρωματογραφία αντί χρωαμτογραφία
381	1	ΕΞΕΤΑΣΗΣ αντί ΕΞΕΤΑΣΙΣ
386	ΠΙΝ.19.2	Δ (πολύ κακή) αντί πολύ καλή
387	10	βιοχημικές αντί βιομηχικές
387	21	παράγοντες αντί απράγοντες
392	26	K αντί °K
406	9	dv αντί dc
409	22	cpoise αντί spoise
413	30	σχ. 20-14β αντί 10-12β
425	λεζάντα	άρωμα αντί χρώμα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ