

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ»**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΜΕ ΘΕΜΑ:

**«ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΤΟΥ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΦΕ ΚΑΙ
ΜΠΙΣΚΟΤΩΝ»**

ΠΑΚΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010



**Η ΕΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΔΕΝ ΥΠΟΔΗΛΩΝΕΙ ΤΗΝ
ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΓΝΩΜΩΝ ΤΟΥ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ.(Ν.5343/1932,ΑΡΘΡΟ
202)**



*Η μεταπτυχιακή διατριβή αφιερώνεται σε όλους
όσους με βοήθησαν να την ολοκληρώσω.*

*Τους ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς και εύχομαι ο Κύριος και η Παναγία να τους
χαρίζει ευλογία και υγεία.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αγροχημεία και Βιολογικές καλλιέργειες» που συνδιοργάνωσε το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και το Τ.Ε.Ι Ηπείρου.

Το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η έρευνα με θέμα «Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης και προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου σε δείγματα καφέ και μπισκότων» πραγματοποιήθηκε υπό την άμεση επίβλεψη της κ. Μ. Τασιούλα-Μάργαρη, Επίκουρης Καθηγήτριας Χημείας Τροφίμων, που ήταν η επιστημονική υπεύθυνη της πορείας της διατριβής. Ο κ. Ε. Παλαιολόγος, Χημικός του Γενικού Χημείου του Κράτους (Γ. Χ. Κ.) βοήθησε στο πειραματικό μέρος της εργασίας του καφέ, ενώ, η κ. Κ. Κώτσιου στο πειραματικό μέρος με τα μπισκότα και η κ.Τασιούλα-Μάργαρη στη συγγραφή.

Προς όλους τους ανωτέρω αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για τη διαρκή υποστήριξη και καθοδήγηση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για τη συμμετοχή τους σε αυτή καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	6
1.1 Καφές	6
1.2 Στοιχεία Βοτανολογίας.....	6
1.3 Ποικιλίες καφέ	7
1.4 Παραγωγή του καφέ.....	9
1.4.1 Ξηρός τρόπος παραγωγής.	9
1.4.2 Ο υγρός τρόπος παραγωγής	10
1.5 Καβούρδισμα καφέ (coffee roasting).....	10
1.6 Οι βιολογικές ιδιότητες του καφέ	13
1.7 Φαρμακευτικές ουσίες του καφέ.....	14
1.8 Συστατικά του καφέ	14
1.9 Είδη καφέ	16
1.10 Ακρυλαμίδιο.....	17
1.11 Σχηματισμός ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα	18
1.12 Το ακρυλαμίδιο στον καφέ	23
1.13 Ποιες είναι οι τοξικές επιπτώσεις του ακρυλαμιδίου στον οργανισμό	29
1.14 Τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα	31
1.15 Αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου.....	40
1.16 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	43
1.16.1 Εισαγωγή.....	43
1.16.2 Οργανολογία	44
1.16.3 Αντλίες	44
1.16.4 Κινητή φάση.....	45
1.16.5 Στατική φάση	45
1.16.6 Εισαγωγή δείγματος.....	46
1.16.7 Ανιχνευτές	47
1.16.8 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός.....	48
1.16.9 Εφαρμογές της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης	48
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	50
2.1 Υλικά.....	50
2.2 Παρασκευή διαλυτών	52
2.3 Μέθοδοι εκχύλισης δειγμάτων.....	53
2.3.1 1η Μέθοδος εκχύλισης δειγμάτων.....	53
2.3.2 2η Μέθοδος εκχύλισης δειγμάτων.....	53
2.3.3 Υπολογισμός ανάκτησης ακρυλαμιδίου από μπισκότα και παιδική τροφή.....	54
2.4 Αντικείμενο έρευνας	56
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
3.1 Πρότυπη καμπύλη ακρυλαμιδίου.....	57
3.2 Ανάλυση δειγμάτων καφέ	61
3.3 Ανάκτηση ακρυλαμιδίου από μπισκότα και παιδική τροφή.	73
3.4 Συγκριτική μελέτη προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου με τις μεθόδους HPLC-UV και HPLC-MS.	78
3.5 Συμπεράσματα	83
3.6 Περίληψη.....	84

3.7 ABSTRACT	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

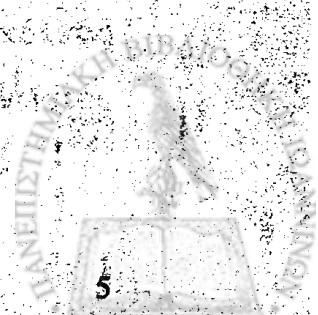
1. ΚΑΘΕΣ

Ο καθένας από εμάς, ως πολίτες, έχουμε την ευθύνη να διασφαλίσουμε την υγεία και την ευημερία της κοινωνίας. Για να το πετύχουμε, πρέπει να συνεργαστούμε και να λάβουμε μέτρα προφύλαξης. Η πρόληψη είναι το κλειδί για την αντιμετώπιση των ασθενειών και την προστασία της δημόσιας υγείας. Τα μέτρα αυτά περιλαμβάνουν την τήρηση των κανόνων υγιεινής, την χρήση μάσκας και την αποφυγή των μαζικών συναντήσεων. Η συνεργασία μεταξύ των πολιτών, των αρχών και των ειδικών είναι απαραίτητη για την επιτυχία της προσπάθειας.

2. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Το παρόν έγγραφο περιγράφει το επιχειρησιακό πρόγραμμα που έχει υιοθετήσει η Επιτροπή για την αντιμετώπιση της πανδημίας. Το πρόγραμμα βασίζεται σε τρεις βασικές αρχές: την πρόληψη, την αντιμετώπιση και την ανάρρωση. Οι δράσεις που περιλαμβάνονται στο πρόγραμμα είναι: η εκπαίδευση του κοινού, η παρακολούθηση των ασθενών, η παροχή ιατρικής βοήθειας και η υποστήριξη των ασθενών. Το πρόγραμμα θα υλοποιηθεί σε τρεις φάσεις: η πρώτη φάση θα επικεντρωθεί στην πρόληψη, η δεύτερη στην αντιμετώπιση και η τρίτη στην ανάρρωση. Η επιτυχία του προγράμματος θα εξαρτηθεί από την αποτελεσματική υλοποίηση των δράσεων και την συνεργασία των πολιτών.

Το παρόν έγγραφο αποτελεί μέρος του επιχειρησιακού προγράμματος που έχει υιοθετήσει η Επιτροπή για την αντιμετώπιση της πανδημίας. Το πρόγραμμα βασίζεται σε τρεις βασικές αρχές: την πρόληψη, την αντιμετώπιση και την ανάρρωση. Οι δράσεις που περιλαμβάνονται στο πρόγραμμα είναι: η εκπαίδευση του κοινού, η παρακολούθηση των ασθενών, η παροχή ιατρικής βοήθειας και η υποστήριξη των ασθενών. Το πρόγραμμα θα υλοποιηθεί σε τρεις φάσεις: η πρώτη φάση θα επικεντρωθεί στην πρόληψη, η δεύτερη στην αντιμετώπιση και η τρίτη στην ανάρρωση. Η επιτυχία του προγράμματος θα εξαρτηθεί από την αποτελεσματική υλοποίηση των δράσεων και την συνεργασία των πολιτών.



1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Καφές

Ο καφές είναι ένα παγκόσμια διαδεδομένο ρόφημα, το οποίο παρασκευάζεται από τα καβουρδισμένα και αλεσμένα σπέρματα της καφέας ή καφεόδεντρου. Ο καφές έχει αναζωογονητική δράση, η οποία οφείλεται στο βασικό του συστατικό, την καφεΐνη, ένα αλκαλοειδές συστατικό που υπάρχει στους σπόρους των καρπών του.

1.2 Στοιχεία Βοτανολογίας

Το φυτό απ' το οποίο προέρχεται ο καφές (κόκκοι) είναι ένας αειθαλής θάμνος, που ανήκει στην οικογένεια των Ρουβιιδών και μοιάζει πολύ με την κερασιά. Έχει 66 αναγνωρισμένες ποικιλίες και ονομάζεται καφεόδενδρο ή καφέα. Τα καφεόδενδρα ζουν περίπου 25 - 30 χρόνια



Εικόνα 1: Κόκκοι καφέ
(πηγή: <http://health.in.gr>).

και ευδοκιμούν κυρίως σε τροπικά κλίματα. Τα άγρια φυτά φτάνουν σε ύψος τα 9 μέτρα περίπου. Το ύψος όμως των καλλιεργούμενων περιορίζεται, για ευκολότερη συγκομιδή.

Οι κάλυκες του καφέ (καρπού) αναπτύσσονται κατά μήκος των κλαδιών και χρειάζονται σχεδόν ένα χρόνο μέχρι να ωριμάσουν, παίρνοντας ένα κοκκινωπό χρώμα. Ο κόκκος του καφέ είναι το κουκούτσι του καρπού του δέντρου· βρίσκεται στο κέντρο του, κάτω από τη σάρκα και το φλοιό του καρπού, που απομακρύνεται κατά την προεπεξεργασία του καφέ. Ο κόκκος χωρίζεται συνήθως σε 2 μέρη ή μπορεί να είναι ακόμη και μονός, γνωστός και ως μαργαριταρένιος (Pearl Coffee) (<http://news.cafecontrast.gr>).

Ένα δενδράκι παράγει 2,5 κιλά καρπούς το χρόνο που δίνουν 500 γραμμάρια πράσινου καφέ και 400 γραμμάρια ψημένου καφέ. Το βέλτιστο της παραγωγής είναι στο 8° με 10° έτος και από το 25° έτος μειώνεται. Η παγκόσμια παραγωγή αυξήθηκε κατά 46% από το 1960 (3.900τόνοι/χρόνο) στο 1990 (5.700 τόνοι/ χρόνο). Τις τρεις πρώτες θέσεις έχουν η Βραζιλία, η Κολομβία και η Ινδονησία και ακολουθούν το Μεξικό, η Ακτή Ελεφαντοστού και η Γουατεμάλα. Τα 2/3 της παραγωγής πάντως καλύπτουν οι χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Αντίθετα, η μεγαλύτερη κατανάλωση γίνεται στις βιομηχανικές χώρες της Δύσης. Τα σκήπτρα κατέχουν η Σκανδιναβία (>10 κιλά πράσινου καφέ το χρόνο ανά κεφαλή). Ακολουθούν οι γερμανόφωνες (6-9 κιλά), η Γαλλία, οι ΗΠΑ και ο Καναδάς (4-5,5 κιλά) και οι μεσογειακές χώρες. Στην Ελλάδα το 1986 καταναλώναμε κατά μέσο όρο 2,2 κιλά πράσινου καφέ το χρόνο ανά κεφαλή (<http://tastytour.pblogs.gr/tags/uncategorized.html>).

1.3 Ποικιλίες καφέ

Υπάρχουν δύο βασικά είδη καφεόδεντρου, τα οποία παράγουν τις δύο ποικιλίες οι οποίες και στηρίζουν το παγκόσμιο εμπόριο του καφέ: η καφέα Αράμπικα (arabica) και η καφέα Ρομπούστα (robusta) (Εικ. 2,3).



Εικόνα 2: Καρποί της coffee Arabica

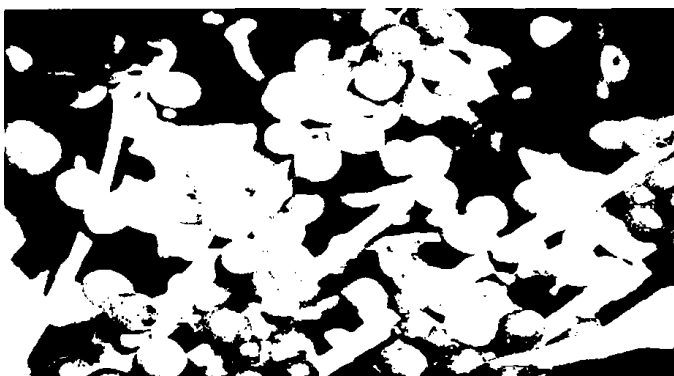
(πηγή:<http://el.wikipedia.org>)

α) Η ποικιλία Αράμπικα είναι η

αρχαιότερη από τις δύο ποικιλίες. Πιστεύεται ότι προέρχεται από την Αιθιοπία αλλά, όπως δηλώνει και η ονομασία της, καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά στην Αραβική Χερσόνησο. Το 78% της παγκόσμιας παραγωγής καφέ είναι της ποικιλίας 'arabica', ευδοκimeί καλύτερα σε

μεγάλα υψόμετρα, διαθέτει μία πολύ ραφιναρισμένη γεύση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη καφέ και περιέχει 1%καφεΐνη. Η ποικιλία arabica στις μέρες μας παράγεται κυρίως σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής και είναι γνωστή για την έντονη αρωματική γεύση που δίνει στον καφέ. Από την υψηλής ποιότητας ποικιλία arabica παρασκευάζονται οι διάφοροι τύποι ελαφρού καφέ (mild coffee).

b) Η ποικιλία robusta. Η ποικιλία robusta είναι ανθεκτικότερη στις ασθένειες του φυτού από την arabica, λόγω της σχεδόν διπλάσιας ποσότητας καφεΐνης που περιέχει (η καφεΐνη μπορεί να παραλύσει και σκοτώσει



Εικόνα 2: Καρποί της coffee Robusta (πηγή: <http://www.sweetmarias.com/coffeecherry.jpg>)

ορισμένα από τα έντομα που απειλούν το καφεόδεντρο). Είναι ένα "εύρωστο" είδος με υψηλή παραγωγή ανά φυτό. Ευδοκimeί σε χαμηλότερα υψόμετρα και διαθέτει μία πιο δριμεία, σκληρή γεύση. Η ποικιλία robusta, που αποτελεί το υπόλοιπο 22% της παγκόσμιας παραγωγής, έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζεται στα θερμά-υγρά κλίματα, στα οποία η arabica δεν ευδοκimeί. Παρά την περισσότερο ουδέτερη γεύση του σε σχέση με την arabica, η ποικιλία robusta έχει αυξημένη δημοτικότητα, ιδιαίτερα στη μορφή του διαλυτού καφέ. Καλλιεργείται κυρίως στην Ουγκάντα. Τα περισσότερα διακινούμενα σήμερα προϊόντα καφέ είναι συσκευασμένα μίγματα σε διάφορους συνδυασμούς των δύο ποικιλιών με διαφορετικά χαρακτηριστικά

προκειμένου να ικανοποιήσουν την επιθυμητή γεύση και άρωμα από το καταναλωτικό κοινό (<http://news.cafecontrast.gr>).

1.4 Παραγωγή του καφέ

Δύο είναι οι βασικές μέθοδοι παραγωγής του καφέ, ο ξηρός (φυσικός) και ο υγρός (με πλύση). Και οι δύο παρουσιάζουν ανάλογες διαδικασίες που περιλαμβάνουν τον καθαρισμό και την διαλογή.

1.4.1 Ξηρός τρόπος παραγωγής.

Ο ξηρός τρόπος παραγωγής του καφέ αποτελεί τον παλιότερο από τις δύο μεθόδους παραγωγής του πράσινου καφέ και περιλαμβάνει τα εξής στάδια: τη διαλογή, το στέγνωμα ολόκληρου του καρπού και την αποφλοιώση. Αυτός ο τρόπος παραγωγής χρησιμοποιείται για τον βραζιλιάνικο Arabica coffee και για τον Robusta coffee σε πολλές περιοχές. Ο ξηρός τρόπος παραγωγής θεωρείται ότι παράγει γενικά χαμηλότερης ποιότητας προϊόντα από αυτόν, που παράγεται με τον υγρό τρόπο, και κοστίζει λιγότερο. Η υψηλής ποιότητας Mocha coffee ωστόσο, παράγεται με τον ξηρό τρόπο παραγωγής. Η διαλογή περιλαμβάνει την κατάταξη των καρπών σε κατάλληλους και "χτυπημένους". Η διαδικασία γίνεται με τη βοήθεια του πλυσίματος των καρπών και την απόρριψη άχρηστων αντικειμένων όπως των πετρών και κλαδιών. Στη συνέχεια έχουμε το στέγνωμα με θερμό αέρα καθώς επίσης και το στέγνωμα με τη βοήθεια ήλιου. Τέλος, το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την αποφλοιώση του η οποία γίνεται είτε με το χέρι είτε με τη βοήθεια μιας μηχανής.

1.4.2 Ο υγρός τρόπος παραγωγής

Γενικά, ο υγρός τρόπος παραγωγής συμβάλλει στην παραγωγή υψηλής ποιότητας προϊόντος. Με εξαίρεση τη Βραζιλία, ο Arabica coffee παράγεται με την υγρή μέθοδο και σε αρκετές περιπτώσεις βρίσκει εφαρμογή και στον Robusta coffee. Και σ' αυτό τον τρόπο παραγωγής του καφέ εφαρμόζεται το στάδιο της διαλογής το καθάρισμα δηλαδή από πέτρες και κλαδιά και στη συνέχεια η κατάταξη με βάση το μέγεθος των καρπών. Στη συνέχεια εφαρμόζεται το "ξεφλούδισμα" των καρπών αφαιρώντας το μαλακό εξωτερικό περίβλημα του καρπού, και ύστερα ο καρπός αφήνεται να ζυμωθεί μέσα σε ένα κλειστό εξωτερικό περίβλημα. Η μικροβιακή χλωρίδα των γαλακτικών βακτηρίων, που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση της τιμής του pH από 6,8 σε 4,3. Τούτο βοηθά στην προστασία του καφέ από την ανάπτυξη ανεπιθύμητης μικροβιακής χλωρίδας. Η ζύμωση αυτή διαρκεί συνήθως 24 ώρες. Ύστερα από τη ζύμωση οι καρποί πλένονται. Στη συνέχεια ο καρπός μαζί με το εξωτερικό περίβλημα στεγνώνονται σε ένα στεγνό ρεύμα αέρα μέχρι την επίτευξη υγρασίας περίπου 12%.

1.5 Καβούρδισμα καφέ (*coffee roasting*)

Καβούρδισμα ονομάζεται η θερμική επεξεργασία των πράσινων κόκκων του καφέ, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη του χαρακτηριστικού αρώματος του καφέ. Είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, αφού εκατοντάδες χημικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στιγμιαία. Μερικές από αυτές είναι η αντίδραση Maillard, η αποικοδόμηση κατά Strecker (Τασιούλα-Μάργαρη 2004). Η αντίδραση Maillard προκαλεί μια αρμονική



αλληλεπίδραση πρωτεϊνών και σακχάρων, που δημιουργούν πολύ εντυπωσιακά αρώματα. (Flament, I. 2002).

Το καβούρδισμα γίνεται σε ειδικές διατάξεις χωρητικότητας 5 έως και 240 κιλών. Οι κόκκοι του καφέ ανακατεύονται αδιάκοπα και θερμαίνονται σταδιακά με θερμό αέρα μέχρι θερμοκρασίας 250°C. Το πρώτο στάδιο του καβουρδίσματος είναι ενδόθερμο (Τα σπέρματα απορροφούν θερμότητα), όπου τα πράσινα σπέρματα ξηραίνονται αργά έτσι ώστε να αποκτήσουν ένα κίτρινο χρώμα. Στους 100°C, οι κόκκοι κιτρινίζουν και μεγάλο μέρος της υγρασίας τους εξατμίζεται. Στους 150-160°C, οι κόκκοι, που έχουν αποκτήσει ένα ανοιχτό καστανό χρώμα, αρχίζουν να αναδίδουν το γνωστό άρωμα.

Το δεύτερο στάδιο, αρχικά περιλαμβάνει μια ενδόθερμη διαδικασία, που συχνά καλείται "first crack", λαμβάνει χώρα στους 205°C περίπου, όπου τα σπέρματα διπλασιάζονται σε μέγεθος, μετατρέπονται σε ανοιχτό καφέ χρώμα και υφίστανται απώλεια βάρους περίπου 5%. Στο στάδιο αυτό, η θερμοκρασία ανεβαίνει από τους 205°C στους 220°C περίπου και το χρώμα αλλάζει από ανοιχτό καφέ σε πιο σκούρο καφέ, και λαμβάνει χώρα απώλεια βάρους περίπου 13%. Η χημική διαδικασία που προκύπτει, ονομάζεται πυρόλυση και χαρακτηρίζεται από μια μεταβολή στη χημική σύσταση του σπέρματος καθώς και από απελευθέρωση CO₂. Στη συνέχεια ακολουθεί μια εξώθερμη διαδικασία (τα σπέρματα απελευθερώνουν θερμότητα), που καλείται "second crack". Αυτή η δεύτερη πυρόλυση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 225-230°C, το χρώμα των σπερμάτων, μετατρέπεται σε ενδιάμεσο-σκοτεινό καφέ και τα σπέρματα παίρνουν μια λάμψη (oily sheen).

Κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος θερμότητα μεταφέρεται από την επαφή των κόκκων καφέ με τα τοιχώματα της συσκευής ή μέσω θερμού αέρα. Το καβούρδισμα με άμεση επαφή δεν εφαρμόζεται πλέον λόγω του ότι η μεταφορά θερμότητας είναι ακανόνιστη και οι χρόνοι ψησίματος που

απαιτούνται είναι μεγάλοι (20-40 λεπτά). Στη διαδικασία καβουρδίσματος με θερμό αέρα ο χρόνος ψήσιματος μειώνεται αρκετά (6-15 λεπτά). Φυγοκεντρικές διατάξεις καβουρδίσματος, περιστρεφόμενα επίπεδα μεταλλικά δοχεία και κλίβανοι ρευστοστερεάς κλίνης χρησιμοποιούνται σε συνεχή ή ασυνεχή διαδικασία. Στη διαδικασία καβουρδίσματος σύντομου χρόνου (2-5 λεπτά) η μεταφορά θερμότητας είναι εξαιρετικά βελτιωμένη. Συνεπώς υπάρχει αρκετά μεγαλύτερη αύξηση στον όγκο των κόκκων καφέ σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Έτσι η πυκνότητα των κόκκων που ψήθηκαν με αυτή τη διαδικασία είναι 15-25% χαμηλότερη. Αμέσως ακολουθεί η ψύξη των κόκκων, με τη γρήγορη διακοπή της θερμότητας, για να αποφευχθεί η απανθράκωση τους από ίδια καύση, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που έχουν αναπτυχθεί (Belitz and Grosch, 1987; www.cosic.org, www.ultimate-coffees-info.com).

Κατά το καβούρδισμα καραμελοποιείται η σακχαρόζη και αποικοδομούνται οι πολυσακχαρίτες. Από τα αμινοξέα καταστρέφεται η αργινίνη, η κυστίνη, η λυσίνη και η σερίνη, ενώ αυξάνεται η ποσότητα της αλανίνης, του γλουταμινικού οξέος, της λευκίνης, της ισολευκίνης, της φαινυλαλανίνης, της προλίνης και της βαλίνης. Στα λιπίδια, ελαττώνεται η περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια από 81% περίπου σε 78,5%, ενώ αυξάνει το ασαπωνοποίητο κλάσμα κατά 2% περίπου. Επίσης κατά το καβούρδισμα μεταβάλλονται το χρώμα, το άρωμα και η γεύση του καφέ. Με την απώλεια του νερού αρχίζει ο σχηματισμός πτητικών ουσιών που συμβάλλουν στη χαρακτηριστική γεύση και το άρωμα του καφέ (De Maria, C.A.B 1996). Η αντίδραση Maillard παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της όψης και του αρώματος του καφέ κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος. Συγκεκριμένα η αντίδραση ξεκινά από ένα ανάγον σάκχαρο, όπως η γλυκόζη, το οποίο συμπυκνώνεται με μια ουσία που περιέχει ελεύθερη αμινομάδα (η ουσία μπορεί να είναι ένα αμινοξύ ή κάποιες πρωτεΐνες, ή η ε-αμινομάδα της λυσίνης, ή και η α-αμινομάδα του τελικού αμινοξέος). Η προέλευση των



πτητικών ουσιών που είναι υπεύθυνες για την γεύση και το άρωμα του καφέ, η ποσότητα και η ποιότητά τους εξαρτώνται από τις πρόδρομες ενώσεις-αμινοξέα, ανάγοντα σάκχαρα-καθώς και τις παραμέτρους της θερμικής επεξεργασίας, το pH και άλλα.

Στο καβούρδισμα ο χρόνος ψησίματος, εξαρτάται από τον τύπο και την προέλευση του καφέ. Κάθε χώρα επίσης έχει διαφορετικά γούστα, κι αυτό επηρεάζει τη διαδικασία του καβουρδίσματος. Η διαδικασία αυτή δεν υπόκειται σε ρυθμίσεις αλλά σε συνήθειες. Κατά το καβούρδισμα ο καφές μπορεί να περάσει από την όξινη γεύση (ανοιχτόχρωμο καβούρδισμα) έως και την πικράδα (σκούρο καβούρδισμα). Όσο περισσότερο διαρκεί, τόσο τονίζεται η γεύση. Ο λεγόμενος «γαλλικός» ή «ιταλικός» καφές απαιτεί συνήθως ένα σκούρο καστανό καβούρδισμα - οι Αγγλόφωνοι το ονομάζουν dark roast (230°C, απώλεια βάρους 20%). Το «αμερικάνικο» καβούρδισμα (American roast, brown roast ή medium roast) δίνει ένα μέτριο καφέ χρώμα: έτσι συνηθίζεται στην ανατολική ακτή των Ηνωμένων Πολιτειών (καβούρδισμα στους 200-220°C, 3-10 λεπτά, απώλεια βάρους 14-17%) (Belitz and Grosch, 1987; www.coffeeresearch.org).

1.6 Οι βιολογικές ιδιότητες του καφέ

Ο καφές περιέχει αρκετά βιολογικά ενεργά στοιχεία, τα οποία μπορεί να έχουν είτε ευεργετική, είτε βλαβερή επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα. Στα θετικά συγκαταλέγεται το ότι ο καφές αποτελεί μία πηγή πλούσια σε χλωρογενικά οξέα και αντιοξειδωτικά, που θεωρούνται ότι προστατεύουν, αλλά σε ανθρώπους με υπέρταση η επιβλαβής για την αρτηριακή πίεση επίδραση ακυρώνει τις όποιες ευεργετικές του ιδιότητες. Σύμφωνα με έρευνες δύο φλιτζάνια καφέ την ημέρα μπορούν να βοηθήσουν κάποιους καρδιοπαθείς να αποφύγουν περαιτέρω σοβαρά προβλήματα



υγείας, αρκεί η αρτηριακή τους πίεση να κυμαίνεται σε φυσιολογικά επίπεδα (<http://www.food.gr/>).

1.7 Φαρμακευτικές ουσίες του καφέ

Τα κύρια φαρμακευτικά συστατικά του καφέ είναι η μέθυλο-ξανθίνη και η καφεΐνη οι οποίες είναι γνωστό ότι έχουν επίδραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού. Σε λογικές ποσότητες βελτιώνει τις πνευματικές ικανότητες γιατί προκαλεί εγρήγορση και μείωση της ανίας. Στον εγκέφαλο η καφεΐνη προκαλεί αγγειοσυστολή, ενώ στα περιφερειακά αγγεία, διαστολή. Υπερβολική κατανάλωση προξενεί νευρικότητα, άγχος, αϋπνία. Στα περισσότερα άτομα τα ανεπιθύμητα συμπτώματα παρατηρούνται με κατανάλωση καφεΐνης άνω των 600mg/ημέρα (=4 φλιτζάνια των 150mg). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι μπορεί να παρατηρηθεί εθισμός στον καφέ, όχι λόγω καφεΐνης, αλλά από ένα άλλο συστατικό του, την μέθυλο-ξανθίνη. Επίσης ορισμένες φαινολικές ενώσεις όπως το χλωρογενικό οξύ βρέθηκαν να έχουν αντιοξειδωτική δράση (<http://www.imdleo.gr/diaf/files/health/coffee.htm>).

1.8 Συστατικά του καφέ

Τα κυριότερα συστατικά που περιέχονται στον καφέ σε εκατοστιαία ποσότητα ξηρού βάρους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 1 (http://www.firstscience.com/home/perspectives/editorials/coffee-the-science-part-2-of-2_1817.html):

Η καφεΐνη περιέχεται και σε άλλα αφεψήματα, σε πολύ μικρότερη όμως ποσότητα όπως φαίνεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 1: Συστατικά του καφέ

Συστατικά	Arabica		Robusta		Στιγμαίος
	Πράσινος	Καβουρδισμένος	Πράσινος	Καβουρδισμένος	
Ανόργανα άλατα	3,0-4,2	3,5-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0	9,0-10,0
Καφεΐνη	0,9-1,2	~ 1,0	1,6-2,4	~ 2	4,5-5,1
Τριγονελίνη	1,0-1,2	0,5-1,0	0,6-0,75	0,3-0,6	-
Λιπίδια	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0	1,5-1,6
Συνολικό Χρωρογενικό οξύ	5,5-8,0	1,2-2,3	7,0-10,0	3,9-4,6	5,2-7,4
Αλειφατικά οξέα	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-2,0	1,0-1,5	-
Ολιγοσακχαρίτες	6,0-8,0	0-3,5	5,0-7,0	0-3,5	0,7-5,2
Ολικοί πολυσακχαρίτες	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	-	~ 6,5
Αμινοξέα	2,0	0	2,0	0	0
Πρωτεΐνες	11,0-13,0	13,0-15,0	11,0-13,0	13,0-15,0	16,0-21,0
Οργανικά οξέα	-	16,0-17,0	-	16,0-17,0	15,0

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα σε καφεΐνη διαφόρων ροφημάτων.

(πηγή: <http://health.in.gr>)

Περιεκτικότητα Καφεΐνης σε 150 ml

ποτού

Αλεσμένος καφές 90mg

Στιγμαίος καφές 60mg

Τσάι 40mg

Κόκα κόλα 16mg

Κακάο 4mg

Decafeine 3mg

Στην καφεΐνη οφείλει ουσιαστικά ο καφές τη δράση του στα διάφορα συστήματα του οργανισμού, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 3:

Πίνακας 3: Επίδραση του καφέ στα διάφορα συστήματα του οργανισμού
([http: el.wikipedia.org](http://el.wikipedia.org)).

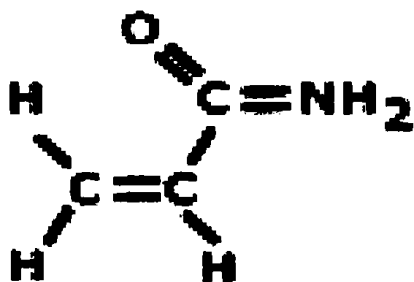
<i>Υπέρ</i>	<i>Κατά</i>
<i>Αύξηση της εγρήγορσης</i>	<i>Αύξηση νευρικότητας, άγχους, αϋπνίας</i>
<i>Μείωση της χολολιθίασης</i>	<i>Μπορεί να προκαλέσει εθισμό</i>
<i>Αύξηση των καύσεων του οργανισμού</i>	<i>Αύξηση του κινδύνου αποβολής στις εγκύους</i>

1.9 Είδη καφέ

- Ο Ελληνικός ή Τουρκικός καφές
- Ο Στιγμαίος καφές (Νες καφές)
- Ο καφές εσπρέσσο
- Ο καφές καππουτσίνο
- Ο Καφές φίλτρου ή γαλλικός καφές

1.10 Ακρυλαμίδιο

Το ακρυλαμίδιο (2-προπεναμίδιο) είναι ένα ενδιάμεσο μονομερές χαμηλού μοριακού βάρους, χρησιμοποιούμενο στη σύνθεση των πολύ-ακρυλαμιδίων τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα στον καθαρισμό του προς πόση ύδατος καθώς και στη βιομηχανική παραγωγή χάρτου. Το ακρυλαμίδιο βρίσκεται υπό μορφή λευκής άοσμης κρυσταλλικής σκόνης και είναι διαλυτό στο νερό, την αιθανόλη, τη μεθανόλη και την ακετόνη ενώ είναι αδιάλυτο στο επτάνιο και το βενζόλιο (Wenzl T et al. 2003). Η κύρια μέθοδος παραγωγής του ακρυλαμιδίου είναι χημική και συνίσταται στην επίδραση θειικού οξέος σε ακρυλονιτριλίου, παρουσία ανηγμένου χαλκού ως καταλύτη ενώ έχει αναφερθεί και βιοτεχνολογική παραγωγή ακρυλαμιδίου με τη χρήση στελεχών διαφόρων βακτηρίων (γέννη *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* spp.)(Food Safety Authority of Ireland Report 2002). Η χρήση του ακρυλαμιδίου στη χημική βιομηχανία θεωρείται ιδιαιτέρως ευρεία. Ετησίως, με τη χρήση χημικών και βιοτεχνολογικών μεθόδων, σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης, υπολογίζεται η παραγωγή του ακρυλαμιδίου σε ένα ποσό της τάξης των 80000-100000 τόνων. Παρακάτω φαίνεται η μοριακή δομή του ακρυλαμιδίου (Food Standards Agency Report 2002, Food Safety Authority of Ireland Report 2002, Kim and Hyun 2002).



Εικόνα 4. Μοριακή δομή του ακρυλαμιδίου.

1.11 Σχηματισμός ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα

Στις αρχές του 2002 ο Εθνικός Οργανισμός Τροφίμων της Σουηδίας και το Πανεπιστήμιο της Στοκχόλμης (Swedish National Food Administration) από κοινού ανακοίνωσαν ότι ορισμένες τροφές οι οποίες υπόκεινται σε επεξεργασία ή έψηση σε υψηλές θερμοκρασίες(>180°C) περιέχουν σχετικά υψηλά ποσοστά ακρυλαμιδίου. Στη συνέχεια σημαντική πρόοδος έγινε για την κατανόηση του πώς και από ποιές πρόδρομες ενώσεις σχηματίζεται το ακρυλαμίδιο στα διάφορα τρόφιμα. Σύμφωνα με τους Tareke et al. 2006, παρατηρούνται πολλές φορές σε άτομα, στα οποία δεν είναι γνωστή η έκθεσή τους σε τρόφιμα που περιέχουν ακρυλαμίδιο, προϊόντα αντίδρασης (σύμπλοκα) του ακρυλαμιδίου με την τελική αμινομάδα της αιμογλοβίνης. Το μέσο επίπεδο του συμπλόκου Hb που έχει μετρηθεί σε Σουηδούς, ενήλικες κυρίως, εκτιμάται ότι αντιστοιχεί σε μία ημερήσια λήψη που πλησιάζει το 100μg ακρυλαμιδίου. Επειδή αυτό το ποσοστό λήψης μπορεί να συνδέεται με σημαντικό κίνδυνο καρκίνου, θεωρήθηκε σημαντικό να εντοπιστεί η προέλευσή του. Τα παρακάτω αναλυτικά στοιχεία θεωρήθηκαν ως απόδειξη ότι το ακρυλαμίδιο σχηματίζεται σε υψηλές θερμοκρασίες μαγειρέματος. Μελέτες σε τροφές που θερμάνθηκαν σε εργαστήρια έδειξαν την εξάρτηση του σχηματισμού του ακρυλαμιδίου με τη θερμοκρασία. Μέτρια επίπεδα ακρυλαμιδίου (5-50μg/kg) βρέθηκαν σε θερμικά επεξεργασμένες τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες και υψηλότερα περιεχόμενα ακρυλαμιδίου (150-4000μg/kg) σε τροφές πλούσιες σε υδατάνθρακες όπως η πατάτα, τα τεύτλα καθώς και ορισμένα θερμικά επεξεργασμένα εμπορικά προϊόντα πατάτας και τραγανό ψωμί. Ακρυλαμίδιο δεν έχει ανιχνευτεί σε βρασμένα τρόφιμα (<5μg/kg) (<http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants>).

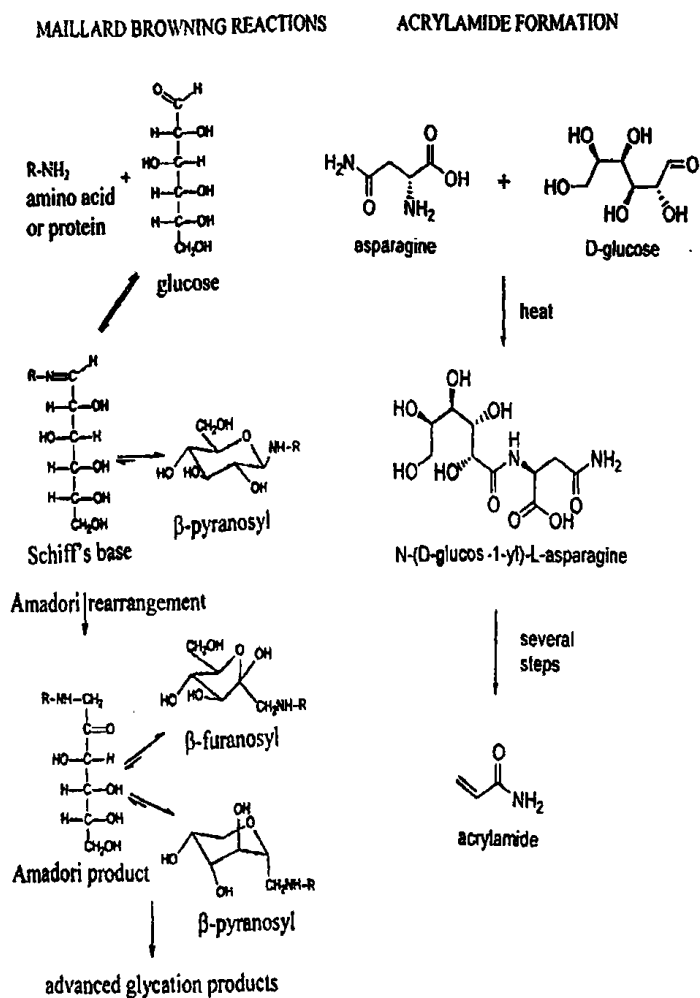
Οι καταναλωτικές συνήθειες δείχνουν ότι τα επίπεδα ακρυλαμιδίου στα θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα που μελετήθηκαν θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μια ημερήσια πρόσληψη μερικών δεκάδων μικρογραμμαρίων.

Το γεγονός ότι το ακρυλαμίδιο ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε τηγανητές πατάτες, πατατάκια, ψωμί και κριτσίνια (crisp bread) προκάλεσε

την άμεση ενεργοποίηση της ερευνητικής κοινότητας, όχι μόνο για εύρεση του μηχανισμού σχηματισμού του αλλά και των πιθανών τρόπων μείωσης του, καθώς τα συγκεκριμένα τρόφιμα καταναλώνονται ευρέως και από ένα μεγάλο αριθμό καταναλωτών. Αυτές οι κατηγορίες τροφίμων συμφωνούσαν καλά με την υπόθεση του σχηματισμού του κατά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων από την ασπαραγίνη και τα ανάγοντα σάκχαρα, πρόδρομες ενώσεις που βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία σε αυτά.

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι το ακρυλαμίδιο σχηματίζεται από την αντίδραση Maillard, από τη συμπύκνωση (condensation) του αμινοξέος ασπαραγίνη με ανάγοντα σάκχαρα όπως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, με θέρμανση σε θερμοκρασίες πάνω από τους 120°C. (Friedman M., 2003) Ενώ δεν έχει αναφερθεί ο σχηματισμός ακρυλαμιδίου σε βρασμένα τρόφιμα, άλλοι πιθανοί μηχανισμοί για το σχηματισμό του έχουν επίσης αναγνωριστεί ότι έχουν σαν αποτέλεσμα την παρουσία ακρυλαμιδίου σε ορισμένα τρόφιμα. Ο κύριος μηχανισμός αντίδρασης υπό συνθήκες χαμηλής υγρασίας εμπεριέχει το σχηματισμό μιας βάσης Schiff από την ασπαραγίνη και ένα ανάγον σάκχαρο που μπορεί περαιτέρω να αντιδράσει μέσω διάφορων προτεινόμενων μηχανισμών για να σχηματίσει το ακρυλαμίδιο. Στην εικόνα 5 φαίνεται μια πιθανή πορεία σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από ασπαραγίνη και γλυκόζη. Το σημαντικότερο βήμα-στάδιο της αντίδρασης είναι η αποκαρβοξυλίωση της βάσης Schiff που οδηγεί σε ενδιάμεσα προϊόντα Maillard, (αμίνες) που μπορούν είτε άμεσα να απελευθερώσουν ακρυλαμίδιο είτε έμμεσα μέσω της πρόδρομης ένωσης του 3-αμινοπροπινοαμιδίου.

Υπό ορισμένες συνθήκες σε πρότυπα συστήματα, έχει αναφερθεί ο σχηματισμός συγκεκριμένων ποσοτήτων ακρυλαμιδίου από αμμωνία και ακρολεΐνη απουσία ασπαραγίνης, μια πορεία που έχει προταθεί να παίζει σημαντικό ρόλο σε τρόφιμα πλούσια σε λιπαρές ύλες (Yasuhara, et al. 2003). Η ακρολεΐνη μπορεί να σχηματιστεί με θερμική αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων που υπάρχουν σε έλαια για τηγάνισμα. Αυτή η πορεία σχηματισμού ακρυλαμιδίου μέσω της ακρολεΐνης, παρόλα αυτά δεν φαίνεται να εμπλέκεται στο σχηματισμό του σε τηγανητές πατάτες. Επιπλέον, μια άλλη πορεία, που έχει πρόσφατα προταθεί, είναι η θερμική



Εικόνα 5: Πιθανή πορεία σχηματισμού του ακρυλαμιδίου από ασπαραγίνη και γλυκόζη (Friedman M., 2003)

αποικοδόμηση της καρνοζίνης που βρίσκεται στο κρέας. Αν και τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου που βρέθηκαν, βασισμένα σε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία πυρόλυσης, είναι σχετικά χαμηλά (Dybing et al, 2005). Οι Mottram D. et. al. 2002, πρότειναν το μηχανισμό σχηματισμού ακρυλαμιδίου μετά τη διάσπαση κατά Strecker των αμινοξέων ασπαραγίνη και μεθειονίνη παρουσία δικαρβονυλικών ενώσεων από την αντίδραση Maillard.

Σύμφωνα με τους Rydberg et. al. 2003, η περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου στα θερμαινόμενα τρόφιμα θα πρέπει να θεωρείται ως το αποτέλεσμα περίπλοκων αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό, τη μείωση ή διάσπαση αυτού του συστατικού (του ακρυλαμιδίου). Η μελέτη, περιελάμβανε κυρίως ομογενοποιημένη πατάτα που θερμάνθηκε σε φούρνο

και σχεδιάστηκε για να χαρακτηρίσει τις παραμέτρους που επηρεάζουν αυτές τις αντιδράσεις συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας θέρμανσης, τη διάρκεια θέρμανσης, το pH και τις συγκεντρώσεις των διαφόρων συστατικών. Υψηλότερη θερμοκρασία (200°C) σε συνδυασμό με παρατεταμένη θέρμανση παρήγαγαν μειωμένα επίπεδα ακρυλαμιδίου λόγω διαδικασιών μείωσης – διάσπασής του. Σε ορισμένες συγκεντρώσεις η παρουσία ασπαραγίνης ή μονοσακχαριτών (κυρίως φρουκτόζης και γλυκόζης και γλυκεραλδεϋδης) βρέθηκε να αυξάνει την περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο. Προσθήκη άλλων ελεύθερων αμινοξέων ή ενός συστατικού πλούσιο σε πρωτεΐνη μείωνε σε μεγάλο βαθμό την περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, πιθανώς με την προώθηση ανταγωνιστικών αντιδράσεων και / ή δεσμεύοντας ομοιοπολικά το ακρυλαμίδιο. Το παραγόμενο ακρυλαμίδιο, εξαρτάται από το pH, εμφάνισε μια μέγιστη τιμή περίπου στο pH 8. Ειδικότερα χαμηλότερο pH φάνηκε να ενισχύει την εξάλειψη και να επιβραδύνει τον σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Σε αντίθεση, οι επιδράσεις των αντιοξειδωτικών στο ακρυλαμίδιο ήταν μικρές ή μεγάλες ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (Zeng X. et al, 2008, Zhang Y. et al, 2009).

Είναι σαφές ότι τα κύρια αίτια σχηματισμού ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα είναι η παρουσία ασπαραγίνης και αναγόντων σακχάρων ή ενεργών καρβονυλίων. Η περιεκτικότητα των διαφόρων τροφίμων σε ασπαραγίνη εξαρτάται από τις καλλιεργητικές φροντίδες. Οι Muttucumaru N. et. al. 2006, ανέφεραν πως όταν το σιτάρι καλλιεργήθηκε υπό συνθήκες λιπάσματος με μειωμένα θειικά άλατα, βρέθηκαν δραματικές αυξήσεις στη συγκέντρωση ελεύθερης ασπαραγίνης στον καρπό του έως και 30 φορές περισσότερο σε σύγκριση με τα δείγματα που έλαβαν τα κανονικά επίπεδα θειικού άλατος. Η επίδραση αυτή παρατηρήθηκε τόσο στα φυτά που καλλιεργήθηκαν σε γλάστρες, όπου ελέγχονταν προσεκτικά τα επίπεδα των θρεπτικών



συστατικών, όσο και σε φυτά που καλλιεργήθηκαν δοκιμαστικά σε αγρούς με χώμα με ανεπαρκή επίπεδα φυσικών θρεπτικών συστατικών, όπου το λίπασμα θεικού άλατος χρησιμοποιήθηκε σε επίπεδα από 0 έως 40 Kg θείου /Ha. Πολλά από τα άλλα ελεύθερα αμινοξέα ήταν παρόντα σε υψηλότερα επίπεδα στο σιτάρι με το μειωμένο θεικό άλας, αλλά τα επίπεδα της ελεύθερης γλουταμίνης έδειξαν αυξήσεις παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στην ασπαραγίνη. Στα ψημένα προϊόντα δημητριακών, όταν τα άλευρα από το σιτάρι που παρήχθε με λίπανση με μειωμένο θεικό άλας θερμάνθηκαν στους 160°C για 20 λεπτά, τα επίπεδα ακρυλαμιδίου βρέθηκαν μεταξύ των 2600 και 5200 $\mu\text{g/kg}$ σε σύγκριση με τα 600 – 900 $\mu\text{g/kg}$ του σιταριού που καλλιεργήθηκε με φυσιολογικά επίπεδα λιπάσματος θεικού άλατος.

Οι Amrein T. et. al. 2004, ερεύνησαν την επίδραση των συστατικών, των πρόσθετων και των συνθηκών επεξεργασίας στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου στο ψωμί από τζίτζερ. Μετρήθηκαν τα ανάγοντα σάκχαρα η ελεύθερη ασπαραγίνη και αξιολογήθηκε η επίδραση των διαφόρων παραγόντων ψησίματος στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Το όξινο ανθρακικό αμμώνιο σε μεγάλο βαθμό ενίσχυσε το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου αλλά το άτομο του αζώτου (N) δεν είχε ενσωματωθεί στο ακρυλαμίδιο, ούτε το ακρυλικό οξύ σχημάτισε ακρυλαμίδιο στο ψωμί από τζίτζερ. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και η ένταση του ροδίσματος, αμφότερα, αυξήθηκαν με το χρόνο ψησίματος και υπήρχε συσχέτιση μεταξύ τους. Η χρήση όξινου ανθρακικού νατρίου ως παράγοντα ψησίματος μείωσε τη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου κατά λιγότερο του 60%. Η ελεύθερη ασπαραγίνη ήταν ένας περιοριστικός παράγοντας για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου, αλλά η περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου θα μπορούσε επίσης να μειωθεί με την αντικατάσταση των αναγόντων σακχάρων με σουκρόζη ή με την προσθήκη οργανικών οξέων. Συνάγεται το συμπέρασμα ότι η σημαντική

μείωση του ακρυλαμιδίου στο ψωμί από τζίτζερ μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση όξινου ανθρακικού νατρίου ως παράγοντα ψησίματος, ελαχιστοποιώντας την ελεύθερη ασπαραγίνη και αποφεύγοντας το παρατεταμένο ψήσιμο.

Ωστόσο, οι πιο πρόσφατες μελέτες που επέδειξαν την παρουσία ακριλαμιδίου σε μαύρες ελιές και σε χυμό δαμάσκηνο αλλά και στην τροφή πειραματόζων (εργαστηριακών ζώων) που αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (autoclaving) μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μιας διαφορετικής πορείας σχηματισμού κατά την κατεργασία των τροφίμων (αλάτισμα, ξήρανση-curing) ή και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. (Dybing et al, 2005), Οι Twaddle et al, 2004 σε σχετική μελέτη τους επέδειξαν ότι η διαδικασία της θερμικής αποστείρωσης που χρησιμοποιείται για την τροφή εργαστηριακών πειραματόζων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό σημαντικών επιπέδων ακρυλαμιδίου σε βασικές δίαιτες που χρησιμοποιούνται σε τεστ τοξικότητας.

Έτσι θα πρέπει να θεωρείται ότι διαφορετικοί μηχανισμοί σχηματισμού του ακρυλαμιδίου εμπλέκονται σε διαφορετικές κατηγορίες τροφίμων μιας και δεν είναι γνωστή μια συγκεκριμένη πηγή για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου. Ακόμη και αν η συνολική έκθεση του μέσου καταναλωτή στο ακρυλαμίδιο δεν επηρεάζεται από το ποσοστό ακρυλαμιδίου σε προϊόντα όπως ο χυμός δαμάσκηνου ή οι ελιές, ιδιαίτεροι τύποι τροφίμων μπορεί να σχετίζονται με συγκεκριμένες υποομάδες καταναλωτών, για παράδειγμα συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες, καταναλωτές με ειδική διαίτα λόγω ασθενειών ή πολιτισμικές υποομάδες.

1.12 Το ακρυλαμίδιο στον καφέ

Λίγες μελέτες έχουν δημοσιευτεί για το σχηματισμό και τις μεθόδους μείωσης του ακρυλαμιδίου στον καφέ. Οι Granby και Fagt (Granby and Fagt, 2004) εξέτασαν 25 διαφορετικά είδη αλεσμένου καφέ και πέντε δείγματα

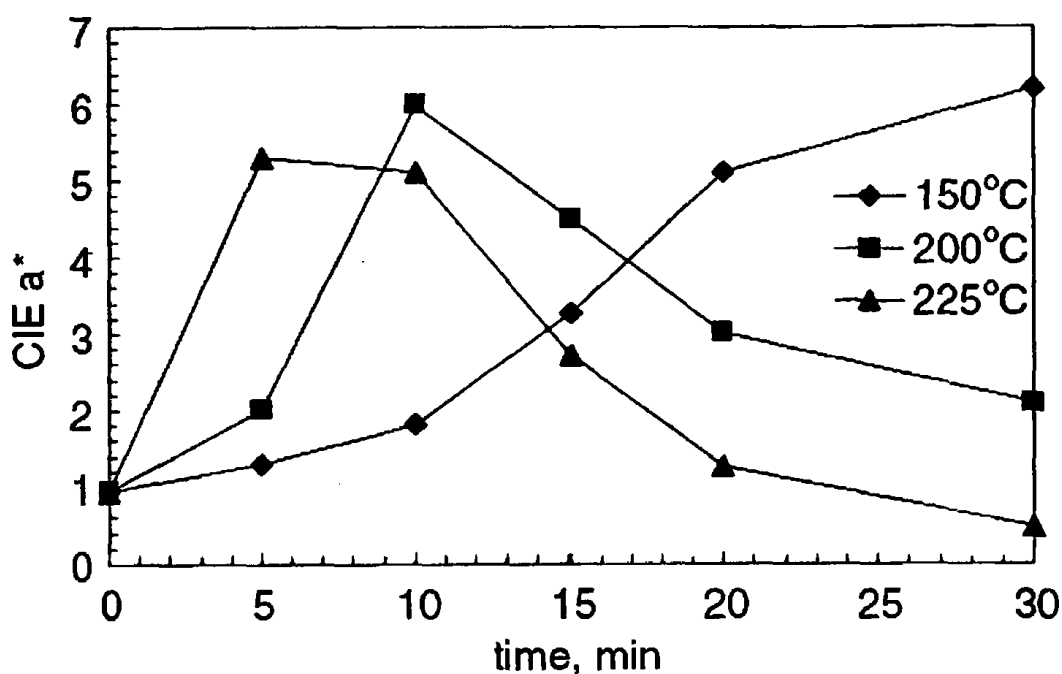


στιγμιαίου καφέ με την μέθοδο διαχωρισμού στερεής φάσης (SPE) σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία και φασματοσκοπία μαζών (LC-MS). Στα δείγματα του καφέ τα οποία ετοιμάστηκαν με απλή καφετέρια φίλτρου βρέθηκαν τιμές ακρυλαμιδίου κατά μέσο όρο 8 ± 3 $\mu\text{g/l}$, ενώ στα δείγματα στιγμιαίου καφέ αντίστοιχα 8 ± 2 $\mu\text{g/l}$. Τα δείγματα μέτριου καβουρδισμένου καφέ περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα ακρυλαμιδίου (περίπου 10 $\mu\text{g/l}$), από τα δείγματα έντονα καβουρδισμένου καφέ (περίπου 5 $\mu\text{g/l}$). Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι το ακρυλαμίδιο εξατμίζεται (σ.ζ. 193°C) ή αποσυντίθεται όταν υφίσταται επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες ή για μεγαλύτερους χρόνους. Τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου είναι υψηλά κατά την εκκίνηση του καβουρδίσματος των κόκκων και μειώνεται όσο αυξάνεται ο βαθμός καβουρδίσματος. Η θερμοκρασία καβουρδίσματος των κόκκων (210°C - 250°C) έχει πολύ μικρή επίδραση στα επίπεδα ακρυλαμιδίου σε σχέση με την διάρκεια του καβουρδίσματος. Τα επίπεδα ακρυλαμιδίου που βρέθηκαν από τους Granby και Fagt (2-16 $\mu\text{g/l}$) στα ροφήματα καφέ είναι παρεμφερή με αυτά που βρέθηκαν από τον οργανισμό FDA (6-16 $\mu\text{g/l}$) (Andrzejewski et al., 2004), αλλά χαμηλότερα σε σχέση με αποτελέσματα άλλων ερευνών (Dybing and Sanner, 2003). Αυτό κυρίως μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές ποσότητες καφέ που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των ροφημάτων καφέ στα διάφορα πειράματα. Επίσης σύμφωνα με τους Andrzejewski et al. (2004) τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στο κατακάθι του καφέ κυμαίνονται από 45 έως 374 ng/g και στους κρυστάλλους στιγμιαίου καφέ από 172 έως 539 ng/g .

Οι Gokmen και Senyuva (Gokmen and Senyuva, 2006) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου θέρμανσης στην συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (με τη μέθοδο LC-MS) και στο χρώμα σε πράσινο αλεσμένο καφέ. Το χρώμα εύκολα μπορεί να μετρηθεί με ειδικό χρωματόμετρο και εκφράζεται μέσω των παραμέτρων L^* , a^* και b^* . Τα δείγματα καφέ που

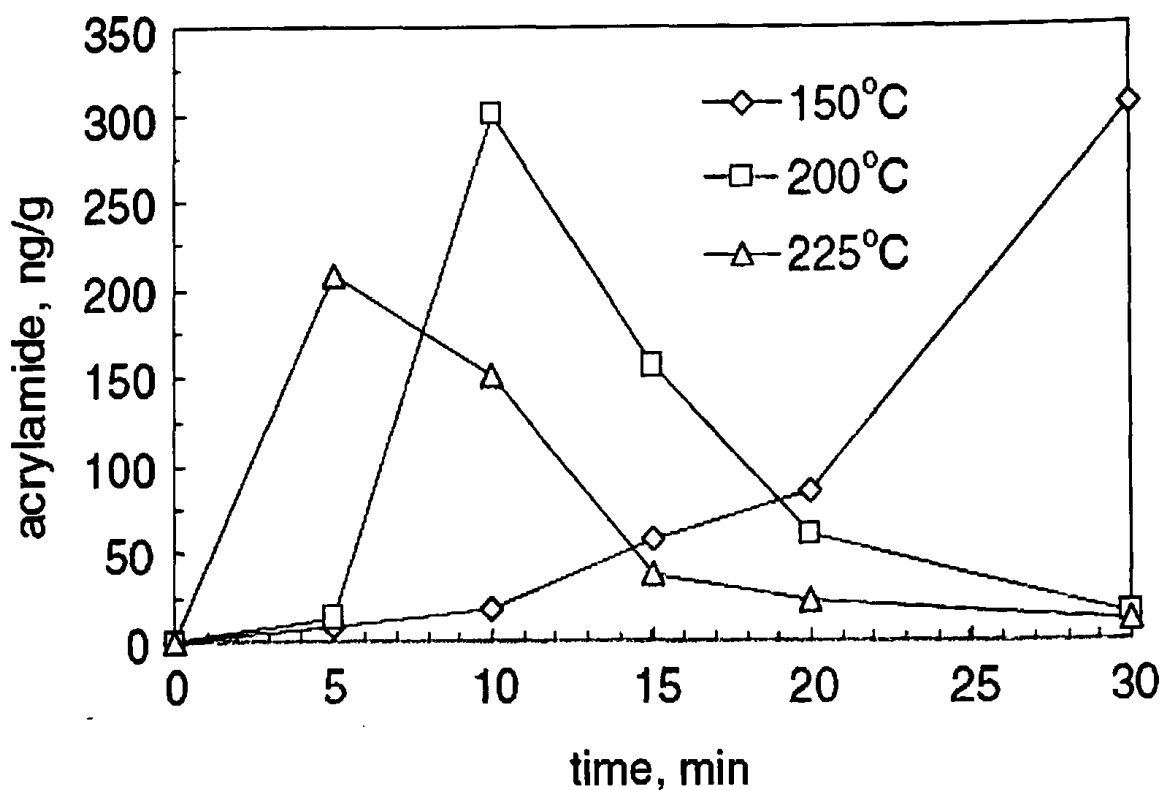
εξετάστηκαν θερμάνθηκαν σε θερμοκρασίες 150 °C, 200 °C και 225 °C για χρόνους 0, 5, 10, 15, 20 και 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται στα διαγράμματα (Εικόνα 6 και 7):

Ο συντελεστής a αυξάνεται γρήγορα στην έναρξη της θέρμανσης, φτάνει σε ένα μέγιστο και στο τέλος μειώνεται εκθετικά στους 200 °C και 250°C. Αντίθετα στους 150°C η αύξηση του συντελεστή a είναι συνεχής.



Εικόνα 6: Μεταβολή του συντελεστή a , στον καφέ με θέρμανση σε θερμοκρασίες 150, 200 και 225 °C.

Η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου αυξάνεται απότομα κατά την έναρξη της θέρμανσης, φτάνει σε ένα μέγιστο σημείο και στη συνέχεια μειώνεται εκθετικά, καθώς ο ρυθμός αποικοδόμησης είναι πιο μεγάλος από τον ρυθμό σύνθεσης στους 200 °C και 225°C. Αντίθετα στους 150°C η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου συνεχώς αυξάνεται.



Εικόνα 7: Μεταβολή της συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου στον καφέ με θέρμανση σε θερμοκρασίες 150, 200 και 225 °C.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα η μεταβολή της συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου και του συντελεστή χρώματος a παρουσιάζει την ίδια ακριβώς συμπεριφορά κατά την θέρμανση των δειγμάτων στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στον καφέ καθορίζονται από τη διαδικασία ψησίματος. Ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου είναι έντονος στην αρχή του ψησίματος και μειώνεται απότομα προς το τέλος του ψησίματος. Από όλα αυτά συμπεραίνεται ότι ο έντονα καβουρδισμένος καφές πιθανόν να περιέχει μικρότερη ποσότητα ακρυλαμιδίου από τον ελαφρώς καβουρδισμένο καφέ. Γενικά ο καφές ψήνεται σε θερμοκρασίες άνω των 200°C και το σημείο βρασμού του ακρυλαμιδίου είναι 193°C. Έχει δειχθεί ότι ο μέτρια ψημένος καφές περιέχει μεγαλύτερα ποσά ακρυλαμιδίου (10μg/l) σε σύγκριση με τον σκούρο καφέ (5μg/l) (Taeymans et al., 2004).

Επομένως μία εξήγηση για το χαμηλότερο περιεχόμενο ακρυλαμιδίου στο σκούρο καφέ, μπορεί να είναι η υψηλότερη θερμοκρασία επεξεργασίας ή ο παρατεταμένος χρόνος επεξεργασίας, κατά την διάρκεια των οποίων, το ακρυλαμίδιο ενδέχεται να εξατμιστεί ή να διασπαστεί. Συγκεκριμένα η θερμοκρασία ψήσιματος (210-250°C) έχει μια σημαντική επίδραση στο επίπεδο του ακρυλαμιδίου (CIAA Confederation of the Food and Drink Industries of the EU). Το περισσότερο ψήσιμο ως ενδεχόμενη επιλογή για τη μείωση του ακρυλαμιδίου θα μπορούσε ενδεχομένως να δημιουργήσει άλλα ανεπιθύμητα συστατικά και σίγουρα θα επηρεάσει τη γεύση/άρωμα του καφέ. Συνεπώς δεν διατίθενται πρακτικές λύσεις που θα μπορούσαν να μειώσουν τα επίπεδα ακρυλαμιδίου και παράλληλα να διατηρήσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του καφέ εφόσον ο τρόπος ψήσιματος δε μπορεί ν' αλλάξει θεμελιωδώς (Lantz et al. 2006).

Το ψήσιμο του καφέ σε περιβάλλον ατμού/πίεσης είναι μια εναλλακτική διαδικασία ψήσιματος – μολονότι όχι έτοιμη για εμπορική εφαρμογή – που έχει πρόσφατα μελετηθεί ως ενδεχόμενο μέτρο μείωσης του ακρυλαμιδίου (Theurillat et. al. 2006). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ψημένα στον ατμό δείγματα χρειάζονταν περισσότερη ώρα ψήσιμο για να φθάσουν σε ένα συγκριτικά τελικό χρώμα και άρα παρείχαν λιγότερο ακρυλαμίδιο. Με το συγκεκριμένο αυτό χρώμα και ώρα ψήσιματος το συμβατό ψήσιμο επέφερε παρόμοια επίπεδα ακρυλαμιδίου. Η εξήγηση αυτού είναι ότι το περισσότερο ψήσιμο ευνοεί μεν την αλλοίωση του ακρυλαμιδίου, αλλά έχει σημαντική επίδραση στις αισθητήριες (γευστικές) ιδιότητες του προϊόντος. Συνεπώς τα ψημένα στον ατμό προϊόντα δείχνουν μια όξινη αίσθηση και λιγότερο την αίσθηση του «ψητού». Όταν συγκρίνουμε προϊόντα όμοια στο άρωμα, η διαδικασία ψήσιματος μέσω ατμού προσφέρει μόνο μια ελαχιστη ενδεχόμενη μείωση του ποσοστού 10% (Theurillat et al. 2006).

Το ακρυλαμίδιο φαίνεται σταθερό στον καφέ μετά από ζύμωση 5 ωρών (Andrzejewski et al. 2004). Ωστόσο, διάφορες ομάδες που διεξάγουν έρευνα έχουν αναφέρει στοιχεία που δείχνουν ότι το ακρυλαμίδιο δεν είναι σταθερό στον εμπορικό ψημένο και αλεσμένο καφέ που είναι αποθηκευμένος στην αρχική του συσκευασία. Απώλειες του 40%-60% έχουν καταγραφεί σε ψημένους και αλεσμένους καφέδες που είναι αποθηκευμένοι σε θερμοκρασία δωματίου για περισσότερο από 6-12 μήνες (Delatour et al. 2004 / CIAA Acrylamide Toolbox). Δεν υπάρχει συσχέτιση του χρόνου αποθήκευσης και της θερμοκρασίας στα επίπεδα του ακρυλαμιδίου στον διαλυτό καφέ (CIAA Acrylamide Toolbox).

Οι μελέτες μέχρι τώρα έχουν δείξει ότι μόνο περιορισμένες επιλογές υπάρχουν για τη μείωση του ακρυλαμιδίου στον καφέ και κανένα μέτρο μέχρι στιγμής δεν μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς να επιδράσει σημαντικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος (Guenther et al. 2007).

Σύμφωνα με μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Νορβηγία, η καθημερινή μέση πρόσληψη του ακρυλαμιδίου από τον καφέ υπολογίστηκε ότι είναι 0,49 και 0,46 μg ανά kg του βάρους σώματος στους άνδρες και στις γυναίκες αντίστοιχα. Ενώ στη Σουηδία, έχει βρεθεί ότι η μέση πρόσληψη ακρυλαμιδίου από τον καφέ είναι 12 μg την ημέρα. Έχει υπολογιστεί ότι το καθημερινό επίπεδο πρόσληψης ακρυλαμιδίου από διάφορα τρόφιμα συμπεριλαμβανομένου και του καφέ, για 70 έτη στους άνδρες αντιστοιχεί σε κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε 6 στα 10000 άτομα. Γενικά η έκθεση του ακρυλαμιδίου από τον καφέ βρίσκεται ότι συμβάλλει ουσιαστικά στην συνολική έκθεση του ακρυλαμιδίου (Dybing, 2003).

1.13 Ποιες είναι οι τοξικές επιπτώσεις του ακρυλαμιδίου στον οργανισμό

Το ακρυλαμίδιο είναι γνωστό ότι προκαλεί καρκίνο στα ζώα. Κανείς δεν γνωρίζει εάν προκαλεί καρκίνο στον άνθρωπο (Tareke, E et al. 2000). Ο εντοπισμός του σε κοινά φαγητά οδήγησε σε σοβαρές ανησυχίες. Τα ερωτήματα που τίθενται είναι: σε ποιες τροφές ακριβώς περιέχεται, πως είναι δυνατόν να μετρηθούν τα επίπεδα του, τι ποσοστό των ανθρώπων το τρώνε και τι είδους επιπτώσεις έχει στην υγεία μας. Προκειμένου να επιλυθούν τα παραπάνω θέματα, προτάθηκε να ιδρυθεί ένα διεθνές δίκτυο για το φαγητό και το ακρυλαμίδιο.

Σε ό,τι αφορά τον άνθρωπο, το ακρυλαμίδιο θεωρείται πιθανός καρκινογόνος παράγοντας και κατηγοριοποιείται στο Group 2A της IARC (IARC, 1994) (International Agency for Research on Cancer), με το δεδομένο ότι ακόμη υπάρχουν ανεπαρκή δεδομένα για να καταταγεί η ουσία αυτή στο Group 1 (παράγοντας καρκινογόνος για τον άνθρωπο) αλλά αρκετά δεδομένα που δεικνύουν καρκινογένεση στα ζώα, ούτως ώστε να καταταγεί σε κατηγορία ανώτερη του Group 2B (δυνατός - possible καρκινογόνος παράγοντας για τον άνθρωπο). Μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους οι οποίοι εκτέθηκαν σε ακρυλαμίδιο στο χώρο της εργασίας τους δεν έδειξαν αύξηση σε εμφάνιση όγκων. Εκφράζεται ωστόσο η επιφύλαξη ότι οι μελέτες αυτές δεν ήταν πολύ ακριβείς και εξειδικευμένες ώστε να εντοπίσουν ακόμη και μικρά προβλήματα. Ο επικεφαλής της μελέτης, λέει ότι αυτή δεν είναι η πρώτη φορά που εντοπίζονται καρκινογόνα στο φαγητό, αλλά προσθέτει ότι αυτή είναι η πρώτη φορά που έχουμε να κάνουμε με ένα ενδεχόμενο καρκινογόνο που βρίσκεται σε τόσο υψηλά επίπεδα σε φαγητά που οι άνθρωποι θεωρούσαν ότι είναι αβλαβή.

Είναι γνωστό ότι το ακρυλαμίδιο, λόγω της χημικής του δομής, εμφανίζει δραστικότητα έναντι διαφόρων βιολογικών μορίων με απόρροια πρόκληση μεταλλάξεων στους οργανισμούς. Εκτεταμένες μελέτες έχουν γίνει σχετικά με τη μεταλλαξιογόνο και την καρκινογόνο δράση του ακρυλαμιδίου σε βακτήρια, πειραματόζωα. Το ακρυλαμίδιο προκαλεί νευροπάθειες τόσο στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και σε πειραματόζωα (Vattem and K. Shetty, 2003). Μελέτη με ειδική διατροφή σε ποντίκια έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ακρυλαμιδίου που βρίσκεται στη τροφή και παραγώγων της αιμογλοβίνης με ακρυλαμίδιο, ενώ το γλυκιναμίδιο αντιδρά με το DNA.

Κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι οι έγκυες γυναίκες, καθώς και αυτές που θηλάζουν πρέπει να αποφεύγουν τα τρόφιμα που περιέχουν ακρυλαμίδιο, διότι είναι πιθανό το ακρυλαμίδιο να διαπεράσει στο γάλα που θηλάζουν τα μωρά. Τέλος πρόσληψη μεγάλων ποσών ακρυλαμιδίου, έχει άμεσα ορμονολογικά αποτελέσματα, τα οποία είναι καλύτερα τεκμηριωμένα σε σχέση με τις μελέτες που αφορούν την καρκινογένεση. Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω, η έκθεση του ακρυλαμιδίου στους ανθρώπους πρέπει να διατηρηθεί όσο τον δυνατόν χαμηλότερη (Friedman M. 2003).

Σύμφωνα με έρευνα από τους Tardiff R.G. et.al. 2010, για τα όρια ασφαλούς ποσότητας ακρυλαμιδίου που πρέπει να καταναλώνεται καθημέρινα από τους ανθρώπους χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο σύγκρισης των εσωτερικών δόσεων του ακρυλαμιδίου και του μεταβολίτη του γλυκιναμιδίου σε ανθρώπους και ποντικούς. Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι τα ανεκτά όρια ημερήσιας πρόσληψης για νευροτοξικότητα για το ακρυλαμίδιο είναι 40 $\mu\text{g/kg}$ -ημέρα, ενώ για καρκίνο το όριο εκτιμήθηκε στα 2.6 και 16 $\mu\text{g/kg}$ - ημέρα για το ακρυλαμίδιο και το γλυκιναμίδιο, αντίστοιχα.

1.14 Τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα

Στον παρακάτω πίνακα 4 (Wenzl T.& E. Anklam 2007) φαίνονται οι ελάχιστες, οι μέγιστες και οι μέσες τιμές ακρυλαμιδίου σε διάφορα τρόφιμα. Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα τα τρόφιμα που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο είναι οι πατάτες, ο καφές τα μπισκότα και τα δημητριακά.

Γίνεται φανερό πως υπάρχει ανάγκη περαιτέρω μελέτης για μείωση των επιπέδων ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα. Προσπάθειες για να μειωθεί ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου έχουν γίνει από την Ευρωπαϊκή βιομηχανία τροφίμων και διάφορα ερευνητικά εργαστήρια. Στόχος των ερευνητικών προγραμμάτων είναι η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων όπως η σύσταση των πρώτων υλών (ανάγοντα σάκχαρα, π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη, αμινοξέα, ασπαραγίνη), η θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας, ο χρόνος θερμικής επεξεργασίας, η θερμοκρασία αποθήκευσης, η παρουσία διογκωτικών μέσων που περιέχουν αμμωνία, κ.τλ., στο επίπεδο του παραγόμενου ακρυλαμιδίου σε διάφορα προϊόντα.

Ερευνητικό εργαστήριο οργανωμένο από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Υγεία και προστασία των Καταναλωτών Γενική-Διεύθυνση (EU DG SANCO) το 2003 ανέλαβε να συντάξει μία αναφορά για τρόπους μείωσης σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων (<http://www.ciaa.eu/asp/documents>):

Πατάτες. Το περιεχόμενο σε ανάγοντα σάκχαρα φαίνεται να είναι σημαντικό αίτιο για το σχηματισμό του ακρυλαμιδίου σε πατάτες, έτσι η επιλογή καλλιεργειών χαμηλών σε ανάγοντα σάκχαρα και η αποθήκευση σε μέτριες θερμοκρασίες (όχι χαμηλότερα από 8-10° C) συντελούν στη μείωσή του. Έχει φανεί από μελέτες ότι το ζεμάτισμα στις πατάτες πριν το τηγάνισμα, η μείωση του pH και η αύξηση της υγρασίας μειώνουν τα επίπεδα του ακρυλαμιδίου. Επίσης, ως ένας τρόπος μείωσης σε οικιακή βάση



έχει προταθεί η επιδίωξη δημιουργίας ενός χρυσό-κίτρινου χρώματος παρά καφέ μετά το τηγάνισμα σε θερμοκρασίες όχι υψηλότερες από 175° C.

Πίνακας 4 : Επίπεδα ακρυλαμιδίου σε τρόφιμα σύμφωνα με την βάση δεδομένων της ευρωπαϊκής ένωσης (Wenzl T. & E. Anklam 2007)

Τρόφιμα	Ελάχιστο ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Μεσαίο ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Μέγιστο ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Τηγανητές πατάτες	5	186	4653
Μπισκότα φούρνου	4	145	3324
Ψωμί από τζίντζερ	5	303	7834
Πατατάκια	5	528	4215
Φρυγανιές	5	244	2838
Μπισκότα και γλυκά για διαβητικούς	5	230	3044
Διάφορα σνακ όπως ποπ κορν, και αλμυρά μπισκότα	5	145	3100
Δημητριακά	5	70	1649
Κόκκοι καβουρδισμένου καφέ	79	320	1188
Ψωμί και φρυγανιά	5	50	1987
Παιδική τροφή	5	67	432
Τηγανήτα από πατάτα	10	385	3072
Μπισκότα για βρέφη	5	79	910
Υποκατάστατα του καφέ	116	773	2955

Σύμφωνα με τους Wicklund T. et al. (2006) η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων είναι πιο σημαντικός παράγοντας από τα επίπεδα της ασπαραγίνης στο σχηματισμό του ακρυλαμιδίου στα πατατάκια. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση του θέματος, η οποία μέχρι τώρα βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο είναι η αποικοδόμηση της ασπαραγίνης χρησιμοποιώντας το ένζυμο ασπαραγινάση, η οποία φαίνεται να είναι

εφαρμόσιμη σε πατατάκια (η μείωση του ακρυλαμιδίου στο 97%) και σε τηγανητές πατάτες (η μείωση του ακρυλαμιδίου στο 80%), και είναι μια επεξεργασία με την οποία διατηρούνται αποδεκτά η γεύση και το χρώμα του προϊόντος.

Δημητριακά. Το μόνο που συνίσταται όσον αφορά τα δημητριακά με βάση τις μέχρι τώρα μελέτες είναι η αποφυγή της υπερβολικής αμαύρωσης (browning) κατά το ψήσιμο. Καθώς ο περιοριστικός παράγοντας για τον σχηματισμό ακρυλαμιδίου στα δημητριακά είναι το περιεχόμενο σε ασπαραγίνη, η επιλογή των ποικίλων δημητριακών με χαμηλό περιεχόμενο σε ασπαραγίνη είναι μια λύση. Η χρήση ασπαραγινάσης δεν έχει μέχρι τώρα δοκιμαστεί αν είναι εφαρμόσιμη σε προϊόντα δημητριακών. Ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου παρουσίασε μια ισχυρή αλληλεπίδραση με τη θερμοκρασία. Μετά το σχηματισμό του το ακρυλαμίδιο καταστρέφεται με πρόσθετες αντιδράσεις, με αμινοξέα ή πρωτεΐνες και ή με εξάτμιση. Συνιστώμενες θερμοκρασίες ψήσιματος περίπου 190-210° C. (*Brathen et al. 2005*).

Καφές. Μέχρι πρόσφατα δεν έχουν αναφερθεί πρακτικές λύσεις για τη μείωση των επιπέδων του ακρυλαμιδίου στον καφέ. Οποιαδήποτε αλλαγή στις συνθήκες επεξεργασίας (θερμοκρασία, διάρκεια του καβουρδίσματος) θα τροποποιήσει σημαντικά το τελικό προϊόν. Σε σχετική μελέτη παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του ακρυλαμιδίου σε καβουρδισμένους κόκκους καφέ με την πάροδο του χρόνου με απλή αποθήκευσή τους σε θερμοκρασία δωματίου, ένα γεγονός το οποίο απαιτεί περαιτέρω να ερευνηθεί. (*Dybing et al, 2005*).

Η ομοσπονδία βιομηχανιών τροφίμων και ποτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (CIAA), (<http://www.ciaa.eu/asp/documents/brochures>) με σκοπό να βοηθήσει σε οικιακό αλλά και σε βιομηχανικό επίπεδο την μείωση του παραγόμενου ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα, δημοσίευσε έναν αριθμό οδηγιών.

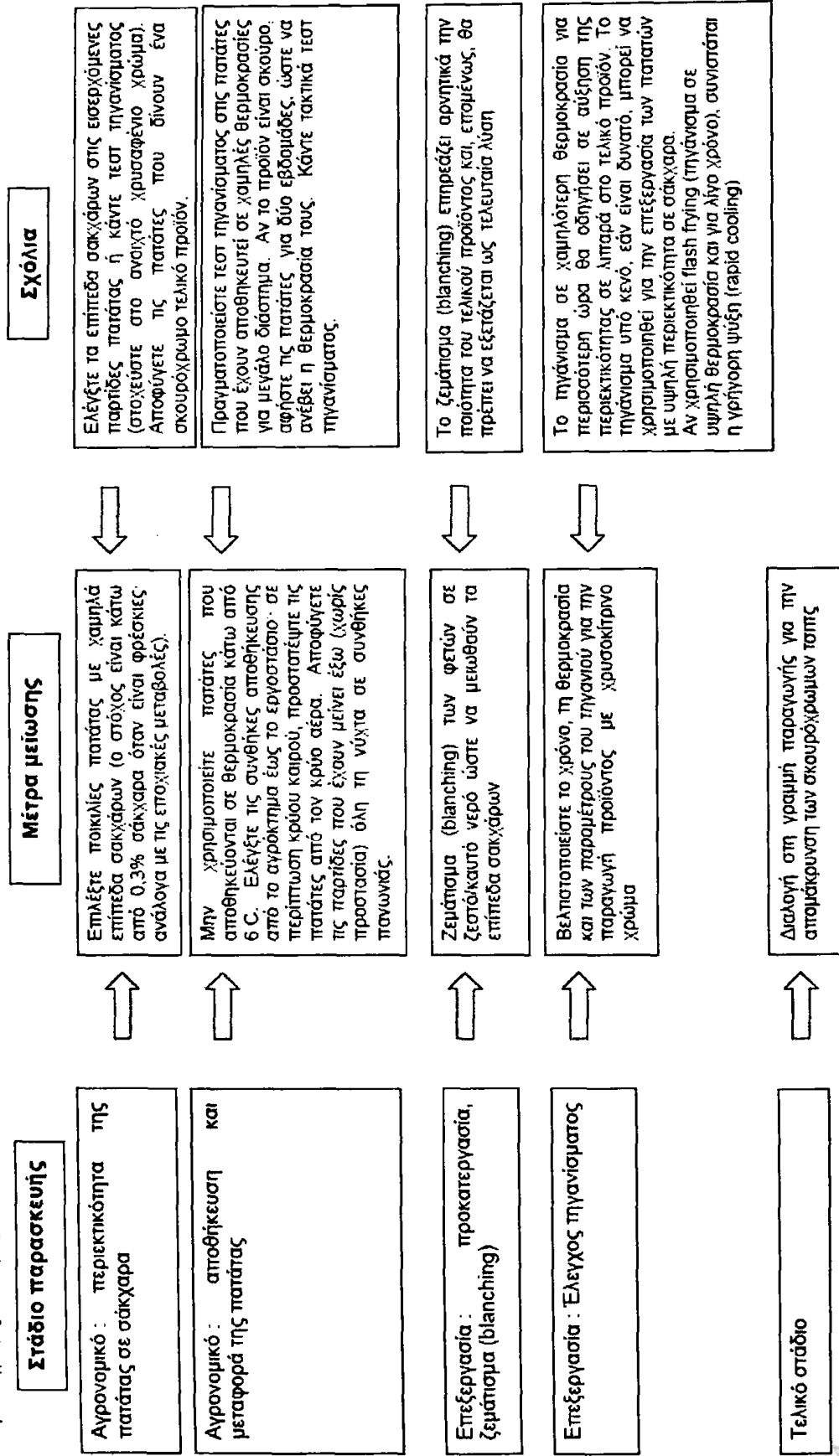
Οι οδηγίες αυτές είναι γνωστές ως «εργαλειοθήκη» (toolbox) και αφορούν την μείωση ακρυλαμιδίου στα εξής τρόφιμα: μπισκότα, κράκερ, προϊόντα αρτοποιίας, δημητριακά, πατατάκια και τηγανητές πατάτες. Οι οδηγίες της ομοσπονδίας βιομηχανιών τροφίμων και ποτών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (CIAA) για:

1. Τηγανητά πατατάκια
2. Τηγανητές πατάτες
3. Δημητριακά
4. Μπισκότα, κράκερ, φρυγανιές και
5. Προϊόντα άρτου

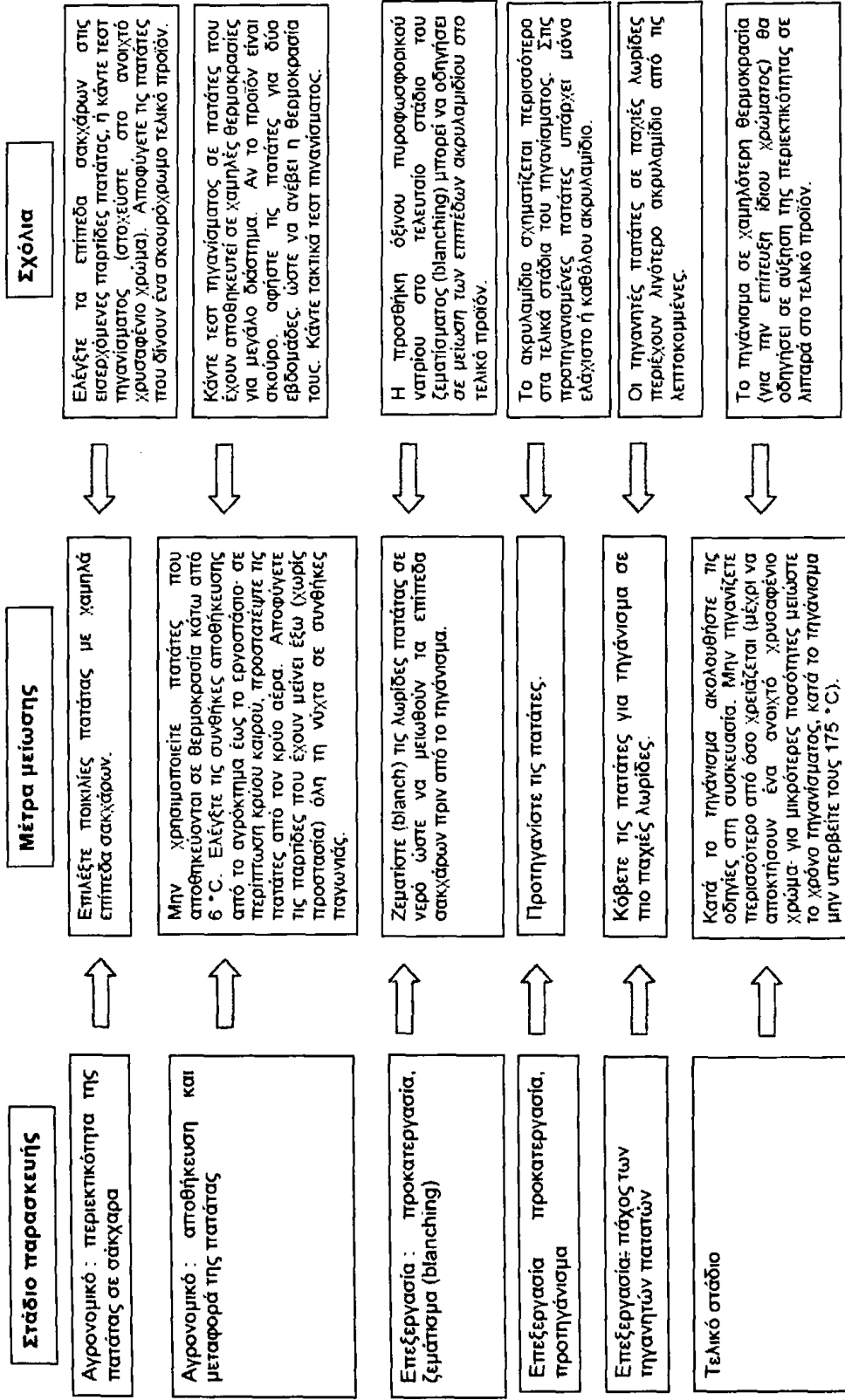
παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (5-9).

Τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου στα τηγανητά πατατάκια

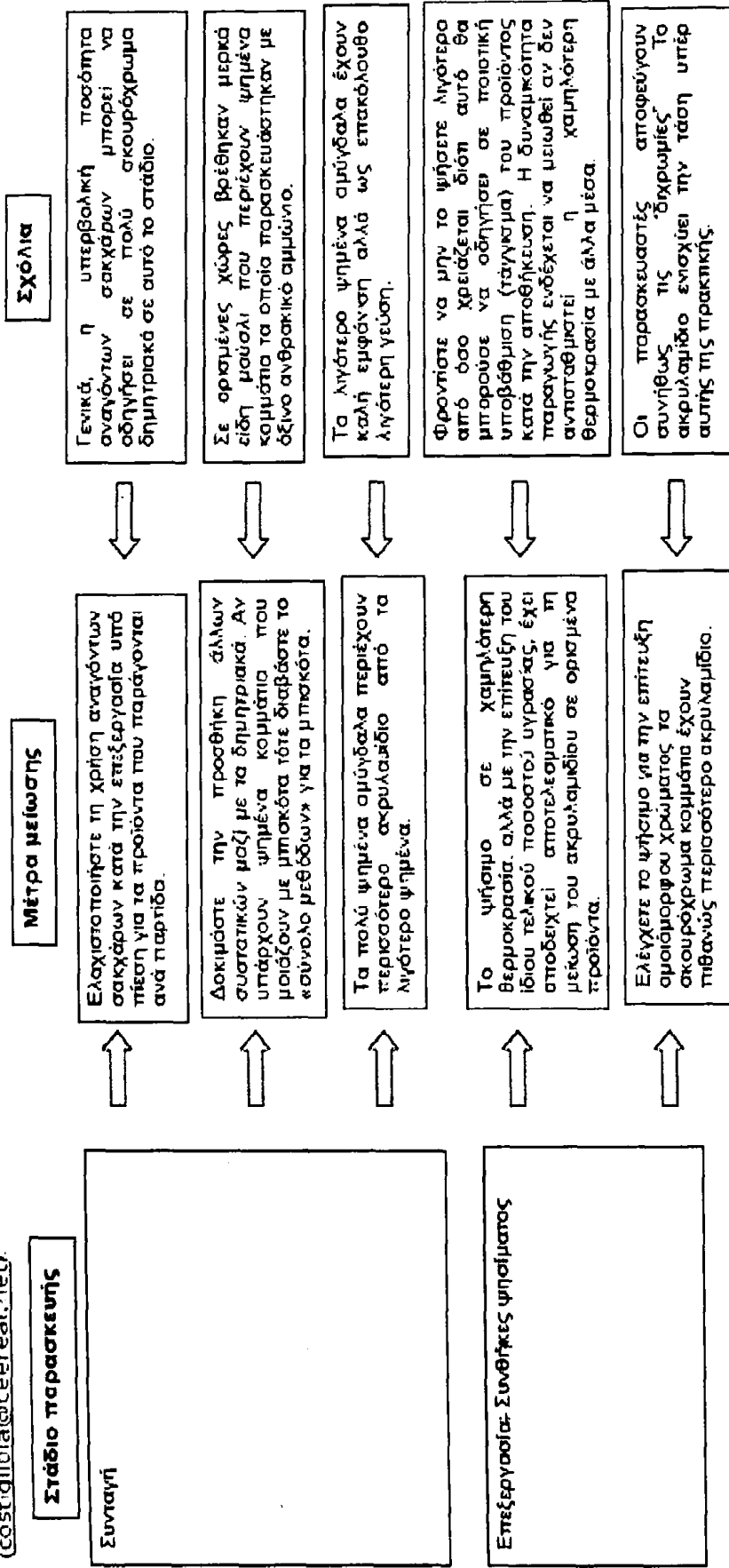
Οι ακόλουθες «μέθοδοι» χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τη μείωση των επιπέδων ακρυλαμιδίου στα τηγανητά πατατάκια. Συνιστάται στους παρασκευαστές να επιλέξουν τις πλέον κατάλληλες μεθόδους ανάλογα με τον τύπο του προϊόντος τους, τις μεθόδους επεξεργασίας και τις προδιαγραφές ποιότητας του προϊόντος.



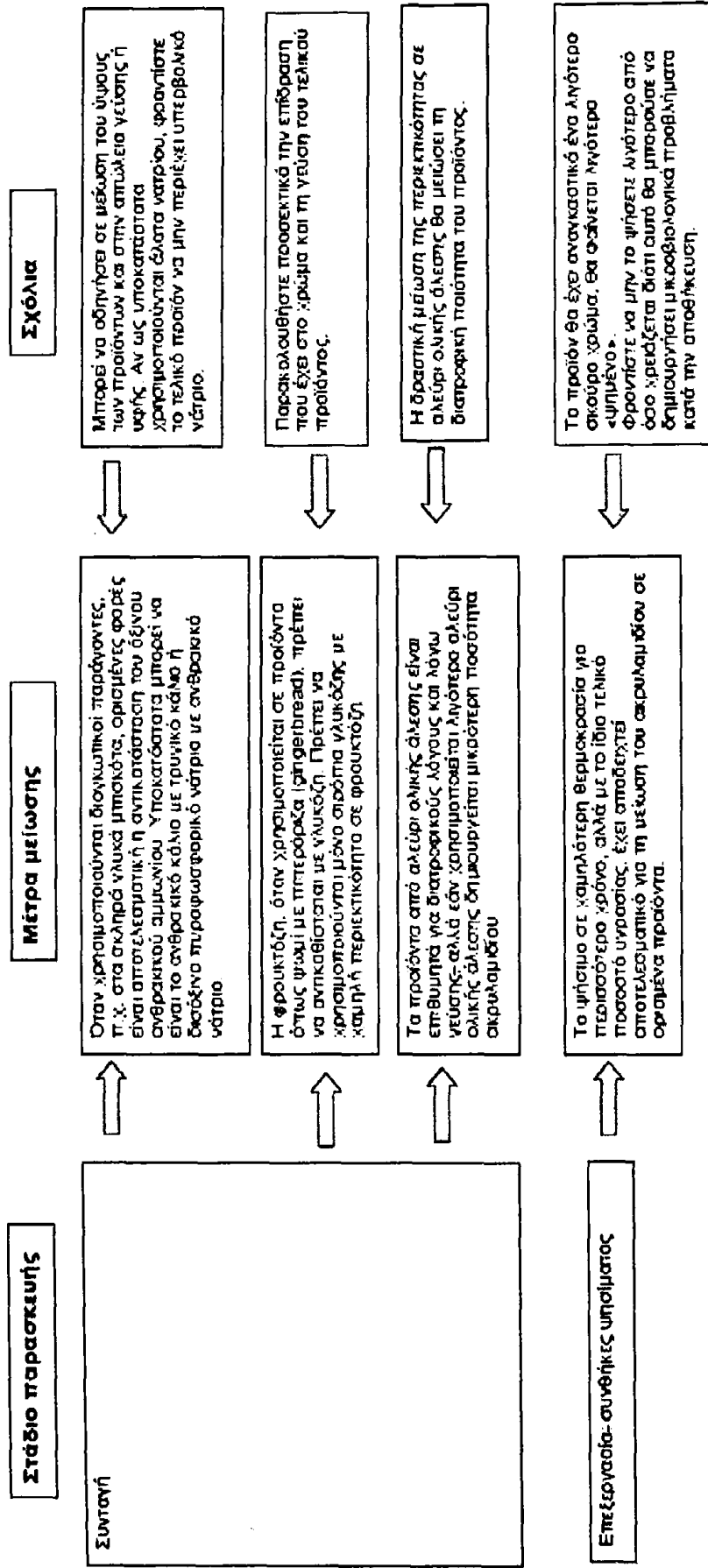
Τρόποι μείωσης του ακρυλαμιδίου για τις τηγανητές πατάτες
Οι ακόλουθες «μέθοδοι» χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τη μείωση των επιπέδων ακρυλαμιδίου στις τηγανητές πατάτες. Συνιστάται στους παρασκευαστές να επιλέξουν τις πλέον κατάλληλες μεθόδους ανάλογα με τον τύπο του προϊόντος τους, τις μεθόδους επεξεργασίας και τις προδιαγραφές ποιότητας του προϊόντος.



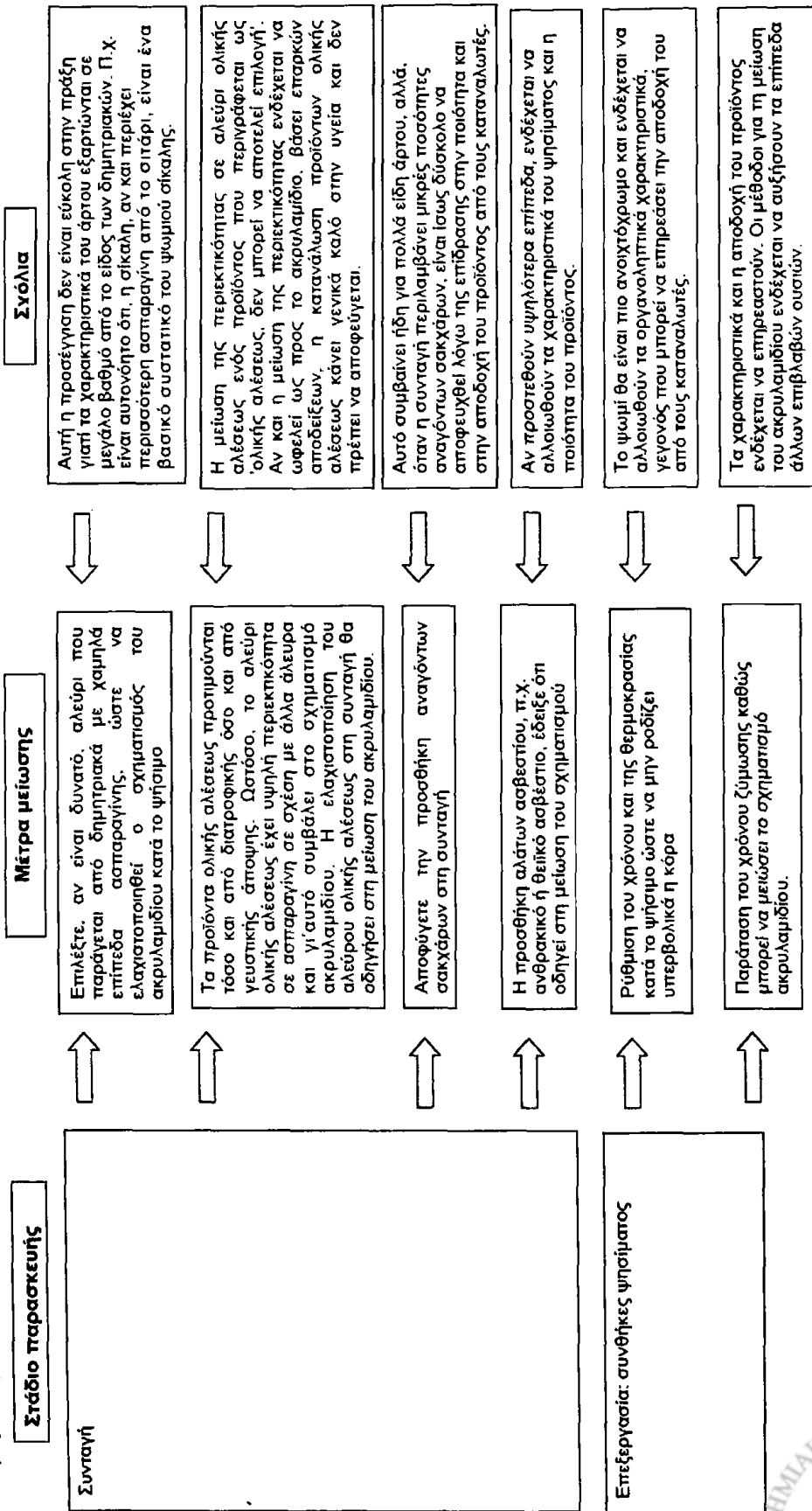
Τρόποι μείωσης για τα δημητριακά (πρωινό) Λόγω του μεγάλου αριθμού των συνταγών, των συστατικών και των διαδικασιών που χρησιμοποιεί η βιομηχανία παραγωγής δημητριακών πρωινού, δεν υπάρχει ένας απλός τρόπος για τη μείωση του σχηματισμού ακρυλαμίδιου. Για παράδειγμα, τα δημητριακά με βάση το σιτάρι περιέχουν γενικά περισσότερο ακρυλαμίδιο από ότι τα δημητριακά με βάση το ρύζι ή τον αραβόσιτο αλλά κάθε σπόρος έχει τα δικά του ιδιαίτερα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Συνιστάται στους παρασκευαστές να επιλέξουν τις πλέον κατάλληλες μεθόδους ανάλογα με το είδος του προϊόντος τους και για περισσότερες πληροφορίες να έρθουν σε επαφή με την CEEREAL, την Ευρωπαϊκή Ένωση Παρασκευαστών Δημητριακών (πρωινού) (costigliola@ceereal.net).



Τρόποι μείωσης του ακρυλαμίδιου στα μπισκότα, στα κράκερς και στις φρυγανιές
Τα ακόλουθα «εργαλεία» χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τη μείωση των επιπέδων ακρυλαμίδιου σε ορισμένα είδη τροφίμων. Ωστόσο, λόγω του μεγάλου αριθμού των συνταγών, συστατικών και διαδικασιών που χρησιμοποιούνται, η παραδοσιακή μικροτοβιοχημία, δεν υπάρχει ένας απλός τρόπος για τη μείωση του ακρυλαμίδιου. Για παράδειγμα, οι φρυγανιές που υφίστανται ζύμωση, κατά κανόνα περιέχουν πολύ λιγότερο ακρυλαμίδιο από τις αντίστοιχες φρυγανιές που δεν έχουν υφιστάται ζύμωση, αλλά κάθε τύπος έχει τα δικά του διακριτικά χαρακτηριστικά. Συνιστάται στους παρασκευαστές να επιλέξουν τα πλέον κατάλληλα εργαλεία για το είδος του προϊόντος τους και να έρθουν σε επαφή με την Ένωση Βιομηχανιών Σοκολατοποιίας, Μησικοτοποιίας, και Ζαχαρώδων Προϊόντων της ΕΕ (CAOBISCO) για περισσότερες πληροφορίες. caobisco@caobisco.be



Τρόποι για τη μείωση των επιπέδων ακρυλαμίδιου στα προϊόντα άρτου.
Τα ακόλουθα "εργαλεία" χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τη μείωση των επιπέδων ακρυλαμίδιου στα προϊόντα άρτου.
Συνιστάται στους παρασκευαστές να επιλέξουν τα πλέον κατάλληλα "εργαλεία" για το είδος των προϊόντων τους, τις μεθόδους επεξεργασίας και τις προδιαγραφές ποιότητας του προϊόντος.



1.15 Αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου

Δεδομένου ότι το ακρυλαμίδιο θεωρείται πιθανή καρκινογόνος ουσία, έχει αρχίσει παγκοσμίως να ελέγχεται η παρουσία του στα διάφορα τρόφιμα. Οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες αναλυτικές μεθόδους είναι βασισμένες στη φασματομετρία μάζας (MS) ως καθοριστική τεχνική ανίχνευσης, είτε από υγρή χρωματογραφία (LC) είτε από αέρια χρωματογραφία (GC) με ή χωρίς την παραγωγοποίηση (διαδικασία εισαγωγής χαρακτηριστικών ομάδων σε μόρια).

Η φασματομετρία μαζών, είναι μια τεχνική χαρακτηρισμού μοριακής δομής, που βασίζεται στον ιοντισμό μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την παρατήρηση της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο m/z . Έως τώρα μπορεί να συνοψιστεί από τις πρόσφατες μελέτες, ότι η συζευγμένη τεχνική αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC - MS) καθώς και η συζευγμένη υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης-φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS), εμφανίστηκαν ως οι πιο χρήσιμες και αξιόπιστες μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου.

Όσον αφορά την μέθοδο GC-MS, ο φασματογράφος MS επέχει θέση ανιχνευτή σε αεριοχρωματογράφο παρακολουθώντας το ιοντικό ρεύμα καθορισμένου λόγου ή λόγων m/z προερχόμενο εκ των συστατικών του εκλούσματος. Είναι μία ευαίσθητη και εκλεκτική μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανίχνευση του ακρυλαμιδίου ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα μέχρι $1 \mu\text{g/kg}$.

Αρχικά οι αναλύσεις του ακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκαν με GC-MS μετά από την βρωμίωση με 2,3 - dibromopropionamide (Ono, H.et al.2003). Αν και αυτή η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη, η παραγωγοποίηση είναι

επίπονη και χρονοβόρα. Επιπλέον αναπτύχθηκε μέθοδος η GC-MS και εφαρμόστηκε επιτυχώς στον άμεσο προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου χωρίς την παραγωγοποίηση αυτού (Tateo, F., et al. 2003).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν LC/MS εφαρμόζονται για την ανίχνευση του ακρυλαμιδίου σε επίπεδα ιχνών, σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων όπως είναι οι τηγανητές πατάτες, τα καρύδια, τον ψημένο καφέ, τα δημητριακά και άλλα (Gökmen V. 2006). Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι το ακρυλαμίδιο μπορεί να αναλυθεί χωρίς προγενέστερη παραγωγοποίηση, η οποία απλοποιεί και επισπεύδει την ανάλυση. Έτσι ο προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου γίνεται άμεσα μετά την εκχύλιση και τον καθαρισμό, χρησιμοποιώντας LC – MS/MS ή LC – MS.

Η εκχύλιση του ακρυλαμιδίου από τα τρόφιμα περιλαμβάνει απολίπανση με πετρελαϊκό αιθέρα, εκχύλιση με υδατικό διάλυμα NaCl. Ο καθαρισμός γίνεται με την μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Microextraction, SPM). Επίσης, χρησιμοποιείται το $^{13}\text{C}_3$ ισότοπο ακρυλαμιδίου ως εσωτερικό πρότυπο, που προστίθεται στα δείγματα στο αρχικό βήμα κατά την διαδικασία προετοιμασίας, για να βελτιώσει σημαντικά την ακρίβεια των μετρήσεων.

Η χρήση της εκχύλισης με υδατικό διάλυμα NaCl καθώς και ο καθαρισμός πριν από την έγχυση του δείγματος, έχουν παρουσιαστεί πολύ αποτελεσματικά στην απομάκρυνση των ομο-εκχυλισμένων ουσιών που πιθανότατα να παρεμβαίνουν. Αυτά τα δύο μέτρα καθαρισμού επιτρέπουν μια πολύ καλή ευαισθησία, με ένα όριο ανίχνευσης και ένα όριο ποσοτικού προσδιορισμού στα 1 και 3 μg/kg αντίστοιχα.

Οι Gökmen et. al. 2006 μελέτησαν μια μέθοδο προετοιμασίας ενός δείγματος τροφίμου για τον προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα. Η μέθοδος περιλαμβάνει εκχύλιση με μεθανόλη, καθαρισμό με διαλύματα Carrez I και II, εξάτμιση, διαλυτοποίηση σε νερό και καθαρισμός με Oasis

HLB (SPE). Το τελικό εκχύλισμα αναλύθηκε με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (LC-MS) για την ποσοτικοποίηση. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε ODS-3 στήλη χρησιμοποιώντας το ισοκρατικό μείγμα 0,01mM οξικού οξέος σε νερό, με ταχύτητα ροής 0,6ml/min στους 25°C. Οι τιμές του ακρυλαμιδίου από τα πατατάκια, τα μπισκότα και τον καφέ κυμάνθηκαν μεταξύ 92,8 και 101,5% με σχετικές τυπικές αποκλίσεις του 4,1% ή λιγότερο. Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ήταν 2 ng /g και 6 ng/g βάση του σήματος στις αναλογίες θορύβου 3:1 και 9:1 αντίστοιχα.

Επίσης οι διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, δείχνουν ότι η ελλιπής εκχύλιση είναι η πλέον πιθανή αιτία των λανθασμένων αποτελεσμάτων του ακρυλαμιδίου. Αυτό μάλλον συμβαίνει όταν τα τρόφιμα δεν ομογενοποιούνται αρκετά, όταν χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης εκχύλισης, ένας σύντομος χρόνος εκχύλισης καθώς και χαμηλή θερμοκρασία εκχύλισης και ειδικότερα όταν υπάρχουν αυτοί οι παράγοντες σε συνδυασμό. Άλλες πιθανές πηγές λάθους είναι η καταστροφή ή ο σχηματισμός του ακρυλαμιδίου κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυξανόμενα επίπεδα ακρυλαμιδίου παρατηρήθηκαν σε παρατεταμένους χρόνους εκχύλισης.

Περισσότερο χρησιμοποιείται η εκχύλιση με νερό (water extraction), επειδή το ακρυλαμίδιο είναι ιδιαίτερα διαλυτό στο νερό και λιγότερο διαλυτό στους οργανικούς διαλύτες. Η εκχύλιση γίνεται μετά την απολίπανση του τροφίμου με πετρελαϊκό αιθέρα. Οι παραλλαγές στο χρόνο εκχύλισης (15,30 και 60 min) δεν είχαν επιπτώσεις στην ποσότητα του ακρυλαμιδίου. Εντούτοις για την εξασφάλιση της αποτελεσματικής εκχύλισης ακόμη και σε πολύ σύνθετες μήτρες τροφίμων, αυτό το βήμα πραγματοποιήθηκε για 30 min. Τέλος η διαδικασία του καθαρισμού πρέπει να είναι όσο το δυνατόν εφαρμόσιμη στους διαφορετικούς τύπους μήτρων τροφίμων. Τις

περισσότερες φορές ο καθαρισμός πραγματοποιείται με μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPM).

Μία εναλλακτική λύση των μεθόδων HPLC-MS, που έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, βασίζεται στην φασματομετρία υπεριώδους και είναι η κανονικής φάσης ή ανάστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (Normal Phase High Performance Liquid Chromatography, NP-HPLC) με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) στα 202 nm (Paleologos, 2004). Κατά την NP-HPLC χρησιμοποιείται πολική στήλη και θειικό οξύ 0.01M σε νερό, σαν κινητή φάση. Επίσης, με την εισαγωγή ακετονιτριλίου 20% στην κινητή φάση επιτυγχάνεται ενίσχυση του σήματος, περιορισμό του χρωματογραφικού χρόνου σε περίπου 15min και μείωση των χρόνων ανάλυσης του ακρυλαμιδίου. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος στερείται της εκλεκτικότητας και του πρόσθετου βαθμού βεβαιότητας του αναλυτή που απαιτείται για να επιβεβαιώσει την παρουσία ενός μικρού μορίου όπως είναι το ακρυλαμίδιο σε μια σύνθετη μήτρα τροφίμων.

1.16 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1.16.1 Εισαγωγή

Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος στην τεχνική αυτή βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ μιας στατικής φάσης αποτελούμενης από μικρόκοκκο υλικό (3, 5 ή 10 μm) που βρίσκεται μέσα σε ειδικές στήλες και μιας κινητής φάσης η οποία είναι υγρή. Η κινητή φάση διοχετεύεται συνεχώς με πίεση μέσα στις στήλες με αντλίες. Τα διαχωριζόμενα συστατικά ανιχνεύονται παρουσία ή μετά την απομάκρυνση του διαλύτη. Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνονται εξίσου καλοί διαχωρισμοί με την αέρια

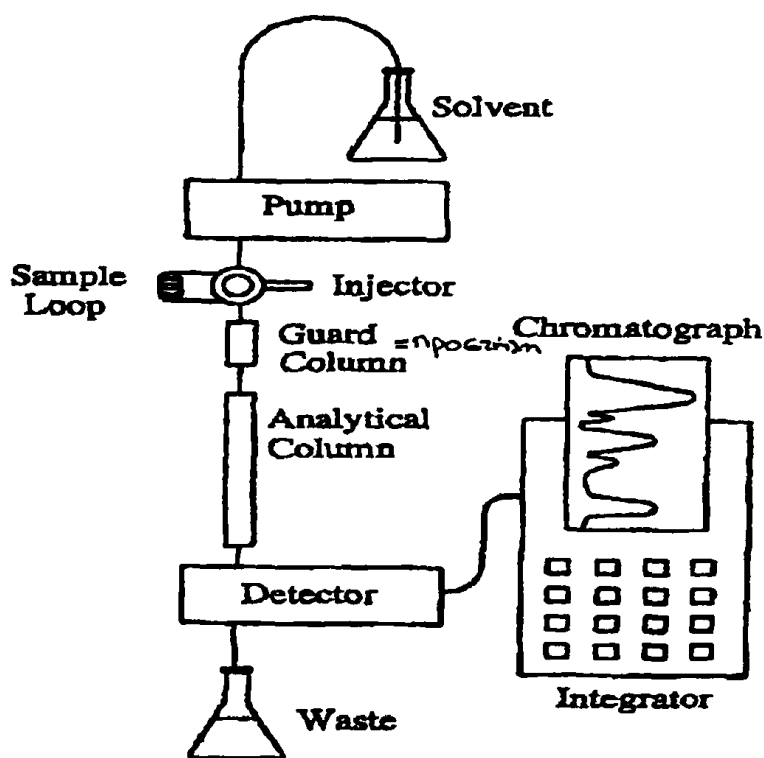
χρωματογραφία και επιπλέον επιτρέπει το διαχωρισμό μη πτητικών ενώσεων και θερμοασταθών ενώσεων.

1.16.2 Οργανολογία

Για την υγροχρωματογραφική ανάλυση ενός δείγματος χρησιμοποιείται ειδική συσκευή, ο υγρός χρωματογράφος. Τα κύρια μέρη ενός υγρού χρωματογράφου δίνονται στην εικόνα 8.

1.16.3 Αντλίες

Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται για αναλυτικούς σκοπούς επιτρέπουν ταχύτητες ροής μέχρι 10 ml/min και οι πιέσεις που αναπτύσσονται είναι μέχρι 5000 psi και εξαρτώνται από τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες και τις στήλες.



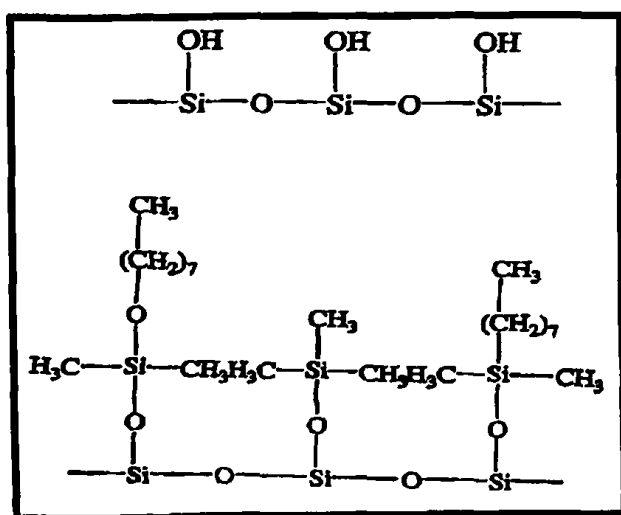
Εικόνα 8: Τμήματα υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης

1.16.4 Κινητή φάση

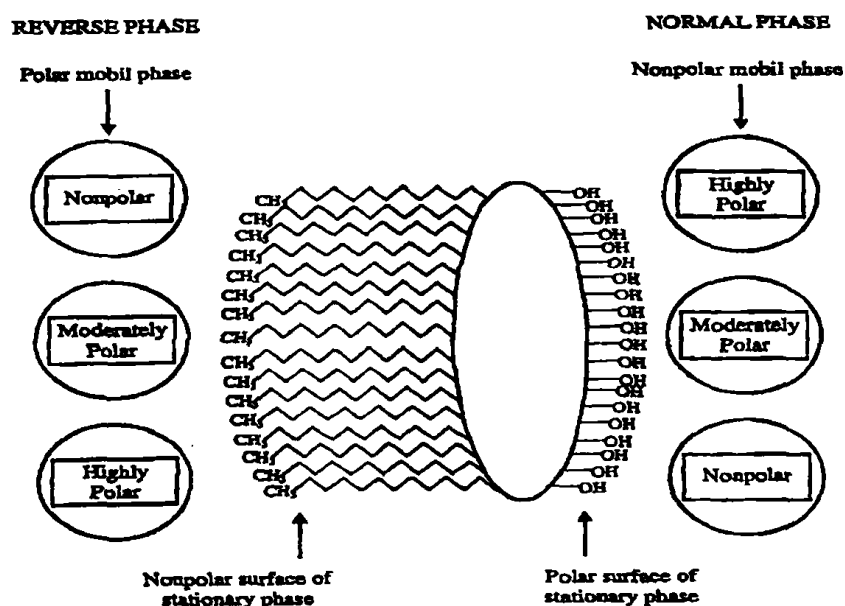
Η κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία είναι υγρή και λέγεται διαλύτης έκλουσης (elution solvent). Η έκλουση των ουσιών γίνεται είτε με σταθερή σύσταση διαλυτών (ισοκρατικό σύστημα, isocratic elution) ή με βαθμιαία μεταβολή της σύστασης των διαλυτών οι οποίοι αντλούνται από διαφορετικά δοχεία (βαθμωτή έκλουση, gradient elution) (συνήθως 2 ή 3 διαλύτες).

1.16.5 Στατική φάση

Η στατική φάση βρίσκεται μέσα σε στήλες συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα (100-200 mm μήκος x 4 mm εσωτερική διάμετρο) πληρωμένες από υψηλή πίεση. Ως στατική φάση χρησιμοποιούνται διάφορα υλικά (οξείδιο του πυριτίου, ή πολυμερή) τα οποία περιβάλλονται από στιβάδα με ελεγχόμενο πορώδες. Ανάλογα με το υλικό επίστρωσης η HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χρωματογραφία προσρόφησης, ιονανταλλαγής, κατανομής. Όταν το υλικό με το οποίο είναι πληρωμένη η στήλη είναι πολικό (π.χ. διοξείδιο του πυριτίου) τότε η χρωματογραφία ονομάζεται κανονικής φάσης (Normal Phase High Performance Liquid Chromatography, NP-HPLC).



Όταν το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι μη πολικό τότε η χρωματογραφία ονομάζεται αντίστροφης φάσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC).



Όταν η στατική φάση είναι πολική (π.χ. silica) τότε η κινητή φάση που χρησιμοποιείται είναι μη πολική. Συνήθως χρησιμοποιείται εξάνιο, ή επτάνιο με μικρή ποσότητα (1-2%) ισοπροπανόλης. Όταν η στατική φάση είναι μη πολική (χρωματογραφία αντίστροφης φάσης) τότε η κινητή φάση είναι πολική. Συνήθως χρησιμοποιούνται μίγματα οργανικών διαλυτών, όπως ακετόνη, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη καθώς και νερό. Το νερό που χρησιμοποιείται στην HPLC πρέπει να είναι εξαιρετικά υψηλής καθαρότητας.

1.16.6 Εισαγωγή δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με τη βοήθεια μικροσύριγγας μέσω βαλβίδας εισαγωγής και ο εισαγόμενος όγκος κυμαίνεται μεταξύ 5-20μl.

1.16.7 Ανιχνευτές

Τα συστατικά που βγαίνουν από τη στήλη μεταφέρονται (από την κινητή φάση) στον ανιχνευτή όπου ανιχνεύονται και στη συνέχεια καταγράφονται με τη μορφή κορυφών. Το εμβαδόν της κάθε κορυφής είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα. Ο πιο συνηθισμένος ανιχνευτής για την HPLC είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους – ορατού (UV-VIS). Οι ουσίες που μπορούν να αναλυθούν με αυτόν τον τρόπο πρέπει να απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος 190-700nm.

Ο δεύτερος πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι το διαφορικό διαθλασίμετρο (refractive Index, RI). Ο ανιχνευτής αυτός μετρά τη διαφορά στο δείκτη διάθλασης μεταξύ καθαρού διαλύτη και προϊόντων (που βγαίνουν από τη στήλη+διαλύτης). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πολλών ενώσεων αλλά είναι πολύ ευαίσθητος στις μεταβολές της θερμοκρασίας. Χρειάζεται καθορισμένη θερμοκρασία κυψελίδας και επομένως έχει σύστημα σταθεροποίησης της θερμοκρασίας. Χρησιμοποιείται μόνο σε ισοκρατική έκλουση.

Ο ηλεκτροχημικός (αμπερομετρικός) ανιχνευτής χρησιμοποιείται για ουσίες που οξειδώνονται ή ανάγονται εύκολα. Υπάρχουν επίσης εκλεκτικοί ανιχνευτές όπως φθορισμού και συστοιχίας διόδων λυχνιών.

Ο ανιχνευτής φθορισμού χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενώσεων που φθορίζουν (π.χ. ανάλυση βιταμίνης E). Ο ανιχνευτής φθορισμού είναι πολύ πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή UV.

Ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων λυχνιών επιτρέπει τη σάρωση του φάσματος απορρόφησης της ουσίας που περνά από την κυψελίδα του ανιχνευτή σε όλη την περιοχή του υπεριώδους ή ορατού φάσματος. Η χρήση του φασματογράφου μάζας ως ανιχνευτή (σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με φασματογράφο μάζας) δεν έχει πλατιά χρήση λόγω



υψηλού κόστους της μονάδας αλλά και τεχνικών δυσκολιών λόγω της παρουσίας της υγρής φάσης.

1.16.8 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός

Η ταυτοποίηση των συστατικών που βγαίνουν από τη στήλη και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή γίνεται με βάση τη σύγκριση των χρόνων συγκράτησης (ο χρόνος που κάνει το συστατικό να βγει από τη στήλη από τη στιγμή που εισάγεται το δείγμα στο χρωματογράφο) με τον αντίστοιχο χρόνο πρότυπων ενώσεων. Ακόμη ταυτοποίηση μπορεί να γίνει με καταγραφή του φάσματος της ουσίας που περνά από τον ανιχνευτή (ανιχνευτής συστοιχίας διόδων λυχνιών) ή ακόμη όταν ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται ο φασματογράφος μάζας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με βάση καμπύλη αναφοράς (συγκέντρωση-εμβαδόν κορυφής) που γίνεται με χρήση διαλυμάτων πρότυπων ενώσεων με γνωστές συγκεντρώσεις. Ακόμη χρησιμοποιείται η τεχνική του εσωτερικού προτύπου.

1.16.9 Εφαρμογές της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Η HPLC παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Στα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται η ταχύτητα, η εξειδίκευση, η υψηλή ευαισθησία, η ικανότητα ανίχνευσης χαμηλών συγκεντρώσεων, η απλή σχετικά προετοιμασία δείγματος. Σχεδόν ότι υπάρχει στα τρόφιμα μπορεί να ανιχνευθεί και να προσδιορισθεί με HPLC με την προϋπόθεση να μπορεί αυτό να διαλυτοποιηθεί σε κατάλληλο διαλύτη. Υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, βιταμίνες, αμινοξέα, ευχυμικές ενώσεις, πρόσθετα, ανεπιθύμητα συστατικά (μυκοτοξίνες, νιτροδωενώσεις,

κατάλοιπα φυτοφαρμάκων και υδρογονανθράκων (και πολυαρωματικών υδρογονανθράκων) είναι παραδείγματα συστατικών των τροφίμων που έχουν ανιχνευθεί και προσδιορισθεί με HPLC (Παπαδογιάννης, Ι.Ν., Σαμανίδου, Β.Φ).

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα είδη καφέ. και μεπικόταν

Τα είδη καφέ που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

Πίνακας 10: Είδη καφέ που χρησιμοποιήθηκαν

A/A	Είδος καφέ
1	Ελληνικός καφές Λουμίδης Παπαγάλος
2	Ελληνικός καφές Brano
3	Ελληνικός καφές σκούρος
4	Ελληνικός καφές ξανθός
5	Ρεβίθι (καφές)
6	Κριθάρι (καφές)
7	Ρεβίθι και κριθάρι (καφές)
8	Nescafe classic
9	Nescafe χωρίς καφεΐνη
10	Καφές φίλτρου Jacobs
11	Καφές φίλτρου Douwe egbets
12	Καφές φίλτρου La Meloise Filcafe

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων:

- Ακρυλαμίδιο,
- Μεθακρυλαμίδιο,
- Νερό HPLC.

1. για την εκχύλιση των δειγμάτων καφέ:

- a) TCA (τριχλωροξικό οξύ) 6% σε νερό
- b) Μεθανόλη (HPLC)
- c) Carrez 1: $K_4Fe(CN)_6$ 150gr/l
- d) Carrez 2: $ZnSO_4$ 300gr/l

2. HPLC

a) οι διαλύτες για την κινητή φάση της HPLC είναι:

- 20% ακετονιτρίλιο - 80% νερό
- 0,01M θειικό οξύ σε νερό

b) Στήλη: Aminex HPX-87H (300mmx7,8mm)(Bio-Rad)

c) Συνθήκες ανάλυσης

- Θερμοκρασία : $T = 30^{\circ}C$
- Πίεση: $P = 218psi$
- Μέγιστη πίεση: $P = 400psi$
- Μήκος κύματος : $\lambda = 200nm$
- Ροή: $f = 0,6ml/min$

2.2 Παρασκευή διαλυτών

Για να παρασκευάσουμε ένα διάλυμα ακρυλαμίδιου 200ppm. Ζυγίζουμε 0,01gr ακρυλαμίδιου και το διαλύουμε σε 50 ml νερό.

Για να παρασκευάσουμε ένα διάλυμα μεθυλακρυλαμίδιου 200ppm. Ζυγίζουμε 0,01gr μεθυλακρυλαμίδιου και το διαλύουμε σε 50 ml νερό.

Αραιώσεις

Φτιάχνουμε διάλυμα 50 ml ακρυλαμίδιου 1ppm από διάλυμα ακρυλαμίδιου 200ppm χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$C_{αρχ.} \cdot V_{αρχ.} = C_{τελ.} \cdot V_{τελ.}$$

$$200ppm \cdot V_{αρχ.} = 1ppm \cdot 50ml \rightarrow \boxed{V_{αρχ.} = 0,25ml}$$

Από 1ppm Acrylamide (Ισχύει 1ppm = 1000ppb) με τις παρακάτω αραιώσεις

Αρα για	50ppb	παίρνουμε	0,5ml	από 1ppm	και προσθέτουμε 0,5ml μεθακρυλαμίδιο* σε τελικό όγκο v = 10ml
	100ppb		1ml		
	250ppb		2,5ml		
	500ppb		5ml		

προκύπτουν τα:

50ppb (0,05ppm)
100ppb (0,1ppm)
250ppb (0,25ppm)
500ppb (0,5ppm)

$$\left. \begin{array}{l} C_{αρχ.} \cdot V_{αρχ.} = C_{τελ.} \cdot V_{τελ.} \\ 1ppm \cdot V_{αρχ.} = 0,05ppm \cdot 10ml \rightarrow \\ V_{αρχ.} = 0,5ml \end{array} \right\}$$

*Μεθακρυλαμίδιο 10ppm (εσωτερικό πρότυπο). Προκύπτει όταν 0,5ml μεθακρυλαμίδιο 200 ppm διαλύονται σε 10ml νερό.

2.3 Μέθοδοι εκχύλισης δειγμάτων

2.3.1 1η Μέθοδος εκχύλισης δειγμάτων

Ζυγίζουμε 2gr δείγματος και προσθέτουμε 0,5ml εσωτερικό πρότυπο Μεθακρυλαμίδιο 200ppm. Επίσης προσθέτουμε 10ml TCA 6% κάνουμε ανάδευση και τοποθετούμε τα δείγματά μας σε υδρόλουτρο στους 70° C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα τοποθετούμε στους υπέρηχους για 30 λεπτά και τα φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά. Από το υπερκείμενο μεταφέρονται 20μl στην HPLC με μικροσύριγγα.

2.3.2 2η Μέθοδος εκχύλισης δειγμάτων

Ζυγίζουμε 2gr δείγματος προσθέτουμε 50μl εσωτερικό πρότυπο 10ppm μεθακρυλαμίδιο. Στη συνέχεια προσθέτουμε 10ml μεθανόλης (HPLC) και αναδεύουμε κάθε δείγμα για 2 λεπτά στο vortex. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 20 λεπτά στις 6.000 στροφές, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε άλλο σωληνάκι και προσθέτουμε 300μl carrez 1 και 300μl carrez 2. Γίνεται μία τελευταία φυγοκέντρωση για 20 λεπτά στις 6.000 στροφές. Από το υπερκείμενο παίρνουμε 4ml και το τοποθετούμε σε σωληνάκι για να εξατμιστεί μέχρι ξηρό. Η ξήρανση γίνεται είτε με την τοποθέτησή του μέσα σε φούρνο στους 50°C ή με την παραμονή τους σε συνθήκες δωματίου.

Προσθέτω στο ξηρό δείγμα 0,5ml νερό. Αφήνω τα δείγματα για 10 λεπτά στους υπέρηχους. Από το υπερκείμενο μεταφέρονται 20μl στην HPLC με μικροσύριγγα.

2.3.3 Υπολογισμός ανάκτησης ακρυλαμιδίου από μπισκότα και παιδική τροφή.

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης του ακρυλαμιδίου στα μπισκότα και την παιδική τροφή προστέθηκε γνωστή ποσότητα ακρυλαμιδίου (100μl από το διάλυμα των 10.000ppm) ως εσωτερικό πρότυπο και τα δείγματα (με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο), εκχυλίστηκαν και προσδιορίστηκε το περιεχόμενο ακρυλαμίδιο από την εξίσωση

$$E = \alpha x + \beta \text{ όπου } [x = C \text{ (}\mu\text{g/lit ακρυλαμιδίου)}], E = \text{εμβαδό}$$

$$\Rightarrow X1 = (E - \beta) / \alpha * V_{\text{τελ}}$$

$$\Rightarrow X2 = (E - \beta) / \alpha * V_{\text{τελ}} / V_{\text{ενδ}}$$

$$\Rightarrow X4 = V_{\text{αρχ}} / m * V_{\text{τελ}} / V_{\text{ενδ}} * (E - \beta) / \alpha$$

Παραδείγματος χάριν:

A) Μπισκότα

Δείγμα m(g) 8g $\rightarrow$ 20.8ml ($V_{\text{αρχ}}$) $\rightarrow$ 12ml ($V_{\text{ενδ}}$) $\rightarrow$ 1ml ($V_{\text{τελ}}$)

Area E = 182.734

$$\Rightarrow X4 = V_{\text{αρχ}} / m * V_{\text{τελ}} / V_{\text{ενδ}} * (E - \beta) / \alpha$$

$$\Rightarrow X4 = 20,8 / 8 * 1 / 12 * (182,734 - (-6,77493)) / 382,3308$$

$$\Rightarrow X4i = 107.3946 \mu\text{g/kg}$$

$$X4ii = 128.8142 \mu\text{g/kg} \quad \left. \vphantom{X4ii} \right\} \text{ M.O.} = 117.38 \mu\text{g/kg}$$

Δείγμα + IS

1. 8g $\rightarrow$ 21ml ($V_{\text{αρχ}}$) $\rightarrow$ 12ml ($V_{\text{ενδ}}$) $\rightarrow$ 1ml ($V_{\text{τελ}}$)

Area E = 608.11

Ακολουθώντας την παραπάνω πορεία προκύπτει:

$$X4i = 351,81 \mu\text{g/kg}$$

2. $4g \rightarrow 10,5ml \text{ (Vαρχ)} \rightarrow 6ml \text{ (Vενδ)} \rightarrow 1ml \text{ (Vτελ)}$

Area E = 280,57

$X_{4ii} = 328,81 \mu g/kg$

Από X_{4i} και X_{4ii} ο M.O. = $341,50 \mu g/kg$

Δείγμα + IS($\mu g/kg$)	Δείγμα ($\mu g/kg$)	Διαφορά	IS	Ανάκτηση %
341,50	117,39	224	250	$224/250=89,6\%$

B) Παιδική τροφή

1. Δείγμα $4g \rightarrow 10.4ml \text{ (Vαρχ)} \rightarrow 3ml \text{ (Vενδ)} \rightarrow 1ml \text{ (Vτελ)}$

Area E = 106,207

$\Rightarrow X_{4i} = 256,11 \mu g/kg$

2. Δείγμα $4g \rightarrow 10.4ml \text{ (Vαρχ)} \rightarrow 4ml \text{ (Vενδ)} \rightarrow 1ml \text{ (Vτελ)}$

Area E = 134,83

$\Rightarrow X_{4ii} = 240,74 \mu g/kg$

Από X_{4i} και X_{4ii} ο M.O. = $247.46 \mu g/kg$

Δείγμα + IS

$4g \rightarrow 10.5ml \text{ (Vαρχ)} \rightarrow 4ml \text{ (Vενδ)} \rightarrow 1ml \text{ (Vτελ)}$

1. Area E = 248.94

$X_{4i} = 438.92 \mu g/kg$

2. Area E = 221.11

$X_{4ii} = 391.15 \mu g/kg$

Από X4i και X4ii ο Μ.Ο. = 415.05μg/kg

Δείγμα IS(μg/kg)	+	Δείγμα (μg/kg)	Διαφορά	IS	Ανάκτηση %
415.05		247.46	168	250	168/250=67,2%

2.4 Αντικείμενο έρευνας

Το αντικείμενο της έρευνας ήταν η διερεύνηση :

1. της δυνατότητας χρήσης του ανιχνευτού UV για τον προσδιορισμό ακρυλαμιδίου σε δείγματα καφέ και μπισκότων.
2. της εκχύλισης του ακρυλαμιδίου, με χρήση των διαλυτών νερού και μεθανόλης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

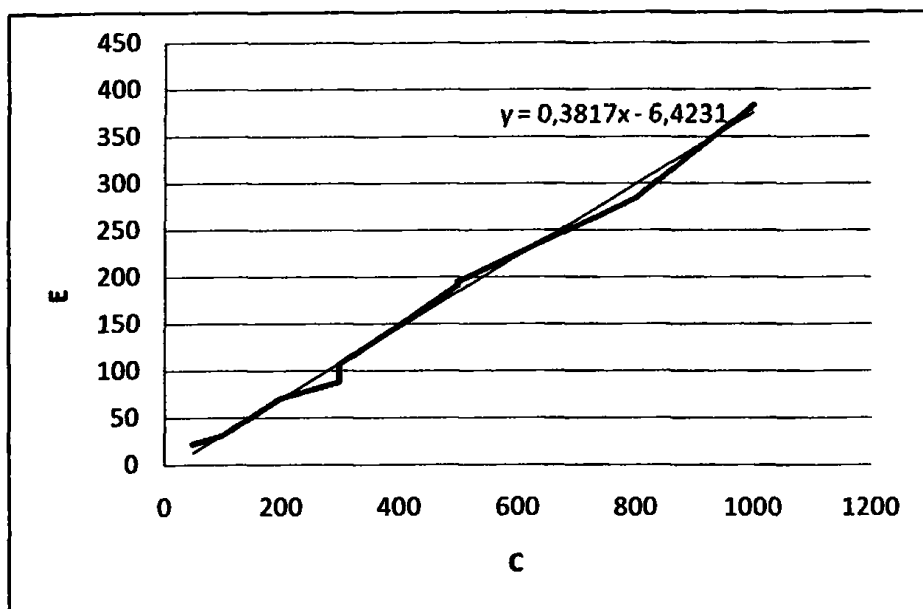
3.1 Πρότυπη καμπύλη ακρυλαμιδίου.

Στον παρακάτω πίνακα 11 φαίνονται οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου και τα αντίστοιχα εμβαδά καθώς και ο χρόνος κατακράτησης. Τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν από την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την εκτέλεση των πειραμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων που προέκυψαν από την εκτέλεση των πειραμάτων.

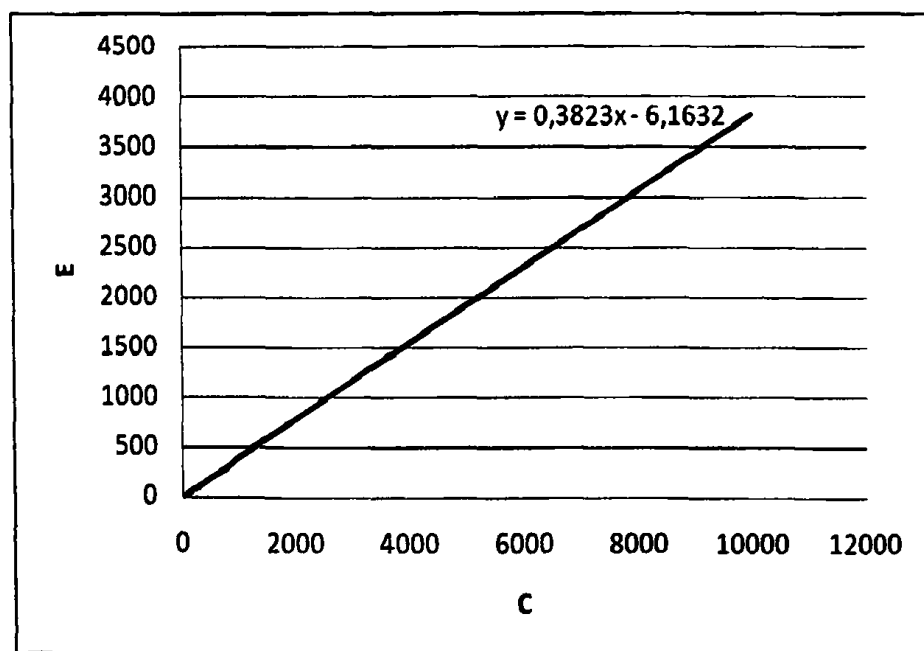
Πίνακας 11. Χρόνος κατακράτησης, συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και αντίστοιχα εμβαδά.

Rt (min)	C (ppb)	E (mv/s)
25,97	50	22,2
25,48	100	29,94
25,46	200	69,62
25,65	300	87,77
25,65	300	105,64
25,46	400	147,23
25,47	500	190,19
25,62	500	191,2
26,33	500	194,44
25,66	800	283,61
25,44	1000	382,55
25,34	5000	1915,25
25,32	10000	3811,65

Για συγκέντρωση μέχρι 1000ppb προκύπτει η παρακάτω γραφική παράσταση και εξίσωση.



Για συγκέντρωση μέχρι 10.000ppb προκύπτει η παρακάτω γραφική παράσταση και εξίσωση.



Από τα παρακάτω στοιχεία (πίνακες 12 και 13) προκύπτει ότι το νερό με 0.01M θειικό οξύ, ως διαλύτης έκλουσης μας δίνει χειρότερα αποτελέσματα από ότι το νερό με 20% ακετονιτρίλιο, διότι ο μέσος όρος

(171,18±21,02) (Πιν. 12) από τα εμβαδά που προέκυψαν από ανάλυση με HPLC-UV ακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 500ppb έχει μεγαλύτερη τυπική απόκλιση από το μέσο όρο (191,93±2,20) με διαλύτη έκλουσης νερό με 20% ακετονιτρίλιο (Πίν 13).

Πίνακας 12. Μέσος όρος και Τυπική απόκλιση για το νερό ως διαλύτη έκλουσης.

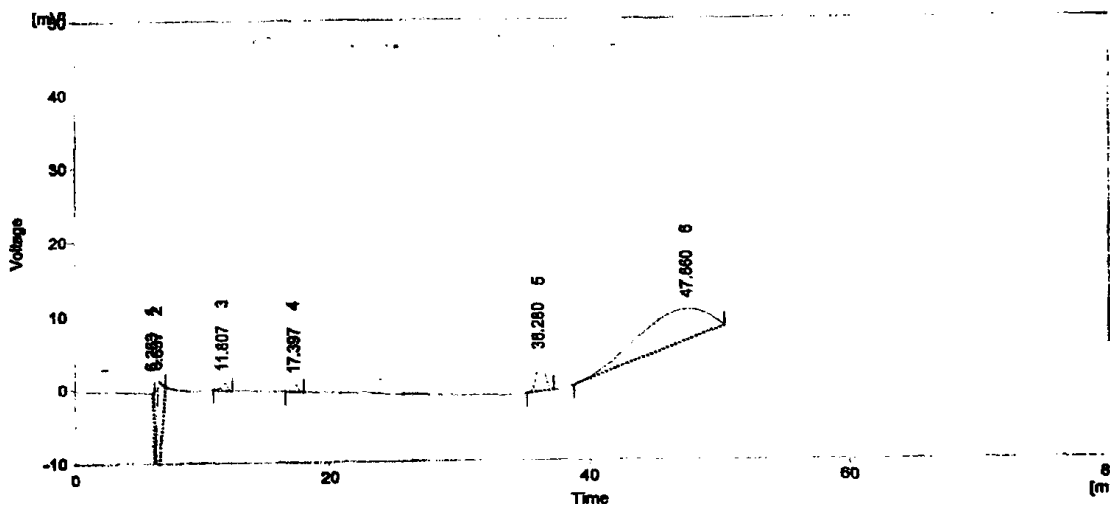
Νερό	
C (ppb)	E (mv/s)
500	192,01
500	171,55
500	149,97
M.O.±S.D.	171,18±21,02

Πίνακας 13. Μέσος όρος και Τυπική απόκλιση για τη νερό/ακετονιτρίλιο ως διαλύτη έκλουσης.

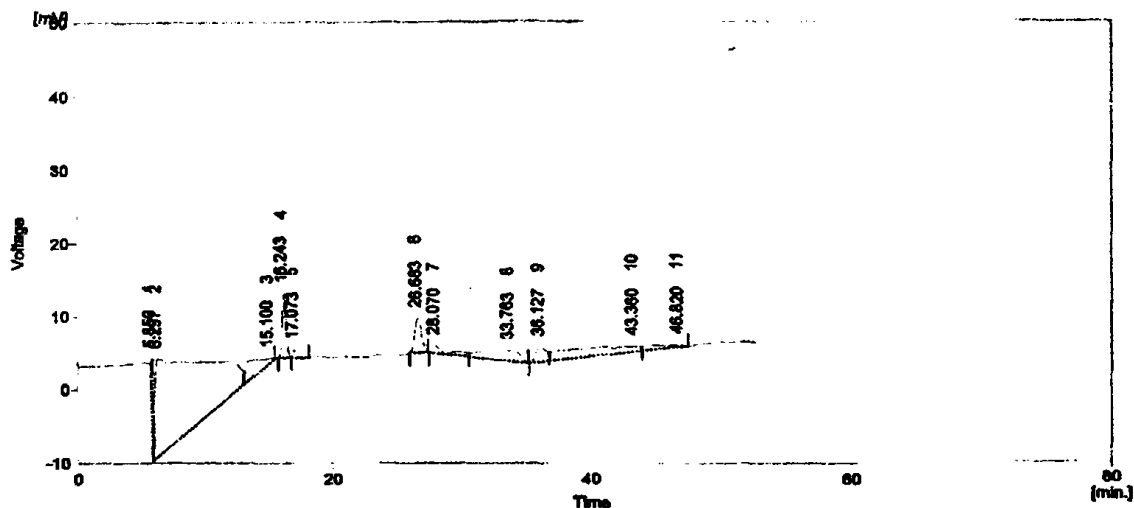
Νερό/Ακετονιτρίλιο	
C (ppb)	E (mv/s)
500	194,4
500	191,2
500	190,19
M.O.±S.D.	191,93±2,20

Στις παρακάτω εικόνες 9 και 10 φαίνεται ο χρόνος κατακράτησης του ακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 500 ppb, σε δύο διαλύτες έκλουσης: 20 % ACN σε νερό (0.01M H₂SO₄) και νερό (0.01M H₂SO₄). Σε αυτή την περίπτωση, που χρησιμοποιείται στήλη κανονικής φάσης, ο χρόνος κατακράτησης του ακρυλαμιδίου είναι 26,6 λεπτά και 36,2 λεπτά αντίστοιχα. Ο χρόνος κατακράτησης του ακρυλαμιδίου σε στήλη κανονικής φάσεως είναι πολύ μεγαλύτερος από τον χρόνο κατακράτησης σε στήλη

ανάστροφης φάσης που είναι περίπου 8 λεπτά. Με αυτή τη στήλη αναμένεται - είναι αντικείμενο διερεύνησης - να υπάρξει καλύτερος διαχωρισμός από παρεμποδίζουσες ουσίες που πιθανόν συνεκλούνται.



Εικόνα 9: Χρωματογράφημα Ακρυλαμιδίου 500ppb με διαλύτη έκλουσης νερό (0.01M H₂SO₄).



Εικόνα 10 : Χρωματογράφημα Ακρυλαμιδίου 500ppb σε διαλύτη έκλουσης 20 % ACN σε νερό (0.01M H₂SO₄).

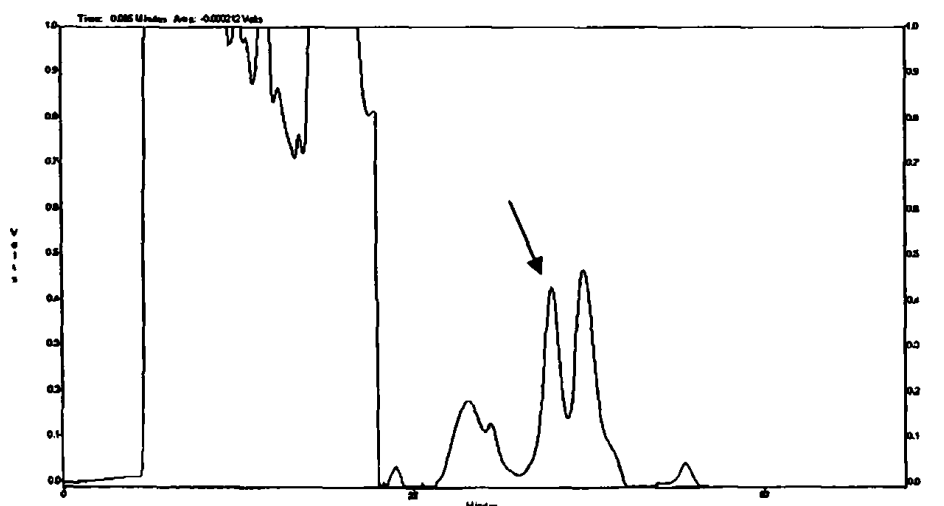
3.2 Ανάλυση δειγμάτων καφέ

1^η μέθοδο εκχύλισης

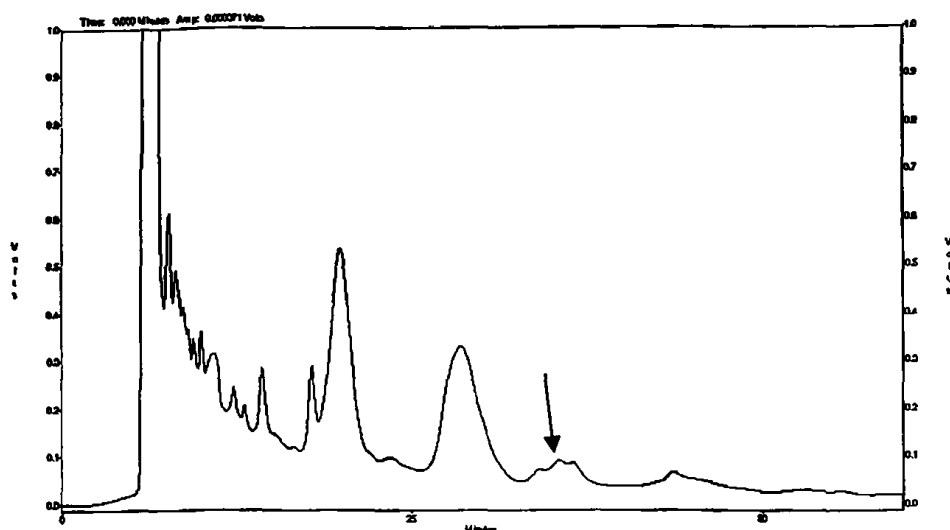
Στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την δυνατότητα χρήσης της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή UV και στήλη κανονικής φάσης για τον προσδιορισμό ακρυλαμιδίου σε καφέ με ή και χωρίς καθαρισμό (clean up). Ο καφές θεωρείται ένα ιδιαίτερα δύσκολο δείγμα και απαιτείται επιπλέον καθαρισμός για την απομάκρυνση των παρεμποδίζουσών ουσιών. Χρησιμοποιήσαμε διάφορα δείγματα καφέ, σε μια προσπάθεια κάλυψης όλων των ειδών και μορφών καφέ, που υπάρχουν στο εμπόριο. Έτσι χρησιμοποιήσαμε όλα τα είδη ελληνικού καφέ σκούρο και ξανθό, από καφεκοπτείο και συσκευασμένο, κριθάρι και ρεβίθι, δύο είδη Nes καφέ, χωρίς και με καφεΐνη καθώς και τρία είδη καφέ φίλτρου.

Τα παρακάτω χρωματογράφημα αναφέρονται στην μέθοδο εκχύλισης, κατά την οποία χρησιμοποιήσαμε διαλύτη TCA 6% σε νερό.

Στον Ελληνικό καφέ (εικ. 11) φαίνεται πως εκλούνται και άλλες ενώσεις που επικαλύπτουν το ακρυλαμίδιο, ενώ στην (εικ. 12) δεν υπάρχει σαφής κορυφή.

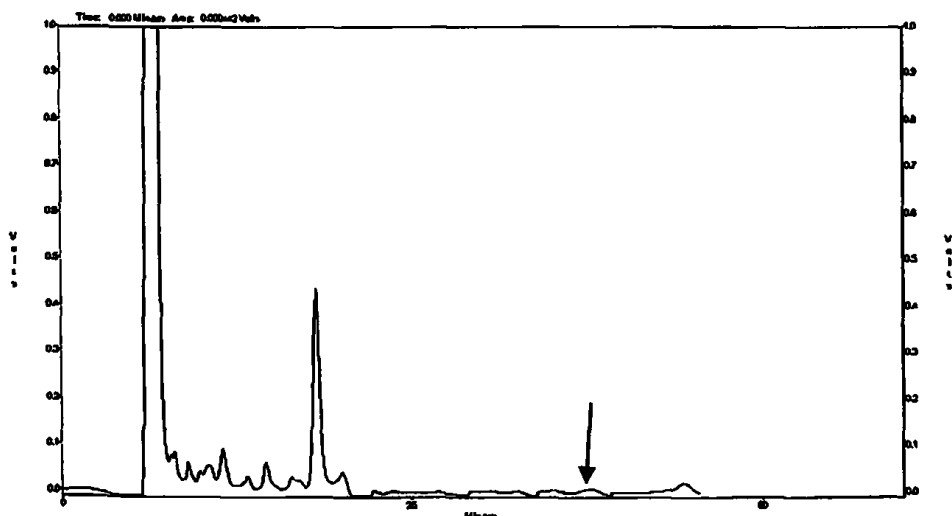


Εικόνα 11: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος Ελληνικού Καφέ Λουμίδης Παπαγάλος (δείγμα1).

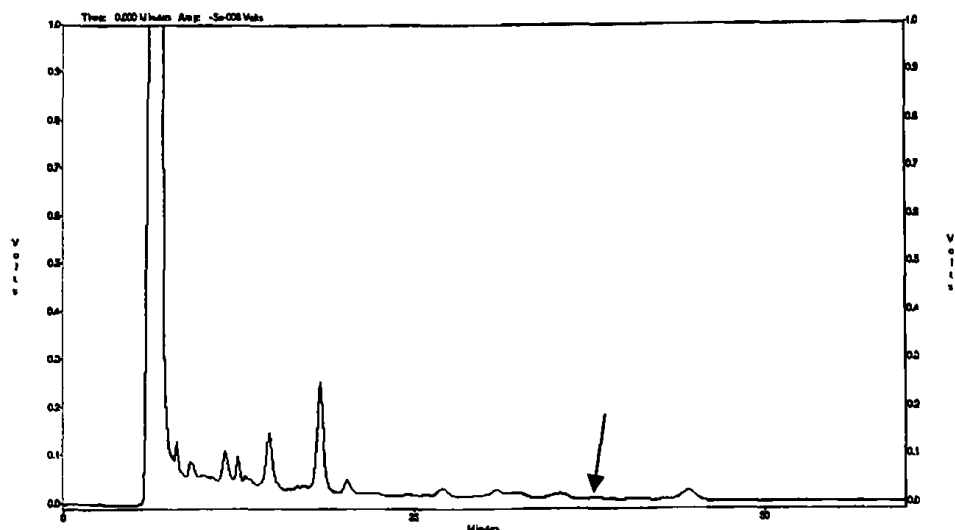


Εικόνα 12: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος Ελληνικού Καφέ Bravo (δείγμα2).

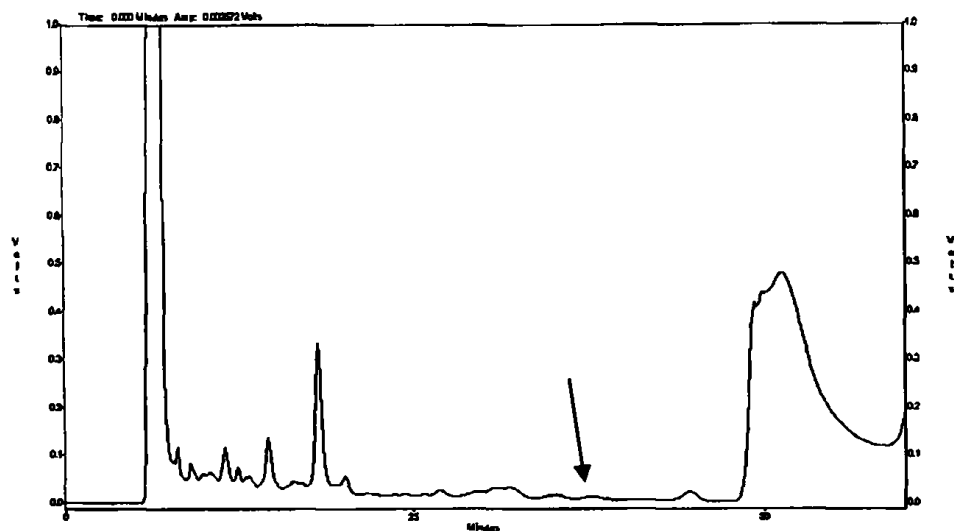
Τα χρωματογραφήματα των εικόνων 13,14 και 15, που είναι υποκατάστατα του καφέ και προέρχονται από ρεβίθι, κριθάρι και μίγμα αυτών, είναι πιο καθαρά από παρεμποδίζουσες ουσίες, αλλά η ποσότητα του ακρυλαμιδίου είναι μικρή και χρειάζεται προσυγκέντρωση του δείγματος.



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος υποκατάστατου καφέ από Ρεβίθι (δείγμα5).



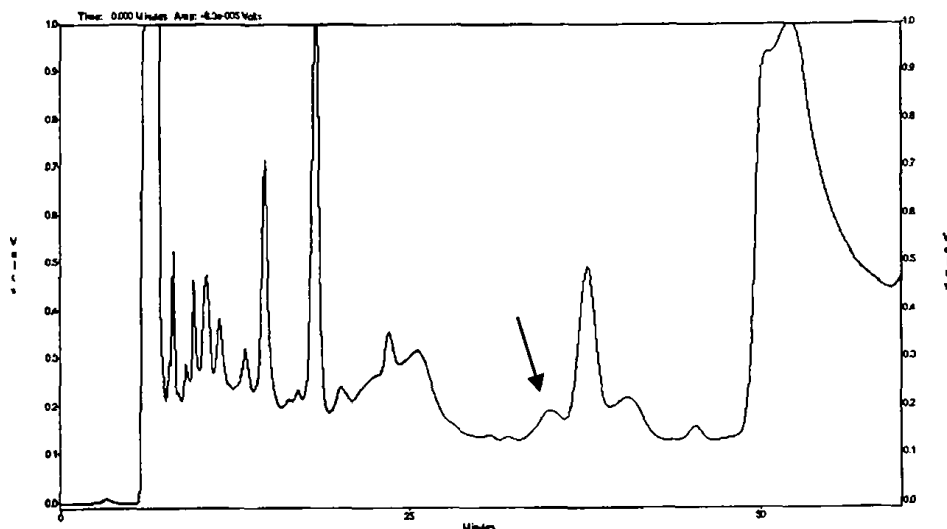
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος υποκατάστατου καφέ από Κριθάρι (δείγμα 6).



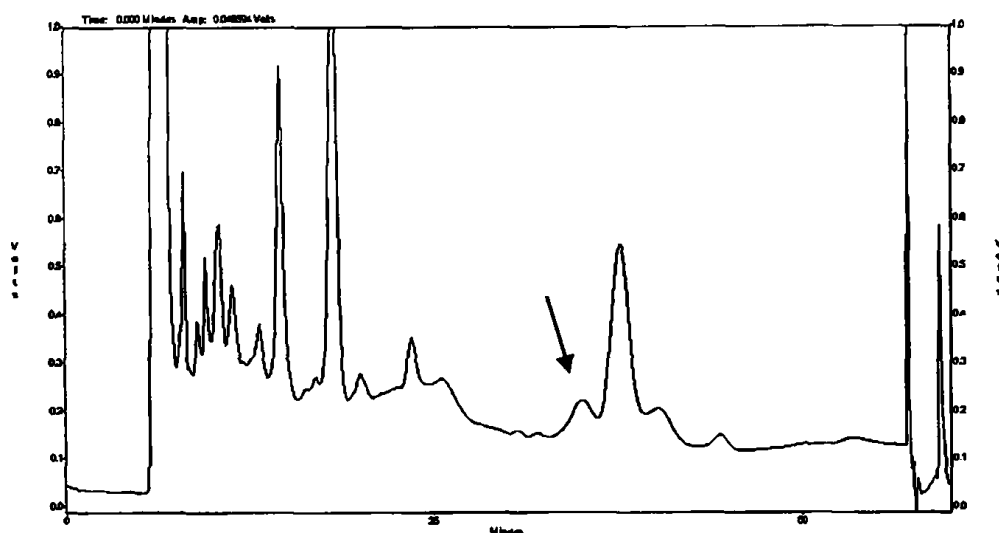
Εικόνα 15: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος υποκατάστατου καφέ από Ρεβίθι και Κριθάρι (δείγμα 7).

Στα παρακάτω χρωματογραφήματα των εικόνων 16 και 17, που αναφέρονται σε δείγματα Νες καφέ, παρατηρούμε ότι στην περιοχή έκλυσης του ακρυλαμιδίου εκλύονται και άλλες ενώσεις που απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος με πολύ μεγαλύτερη απορρόφηση με συνέπεια να

καθιστούν αδύνατο τον προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου που βρίσκεται σε ελάχιστη ποσότητα (0-1000ppb).

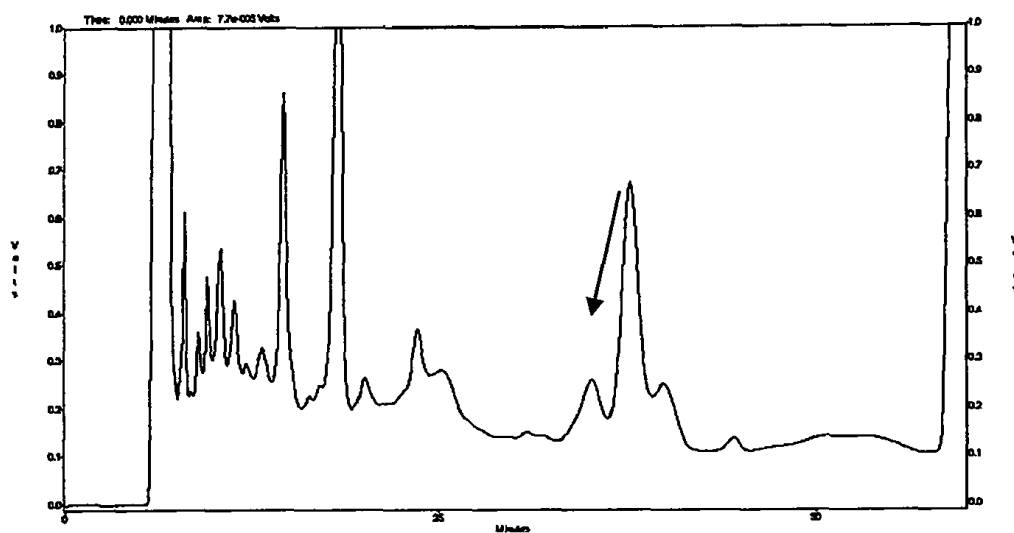


Εικόνα 16: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος Nescafe classic (δείγμα 8).

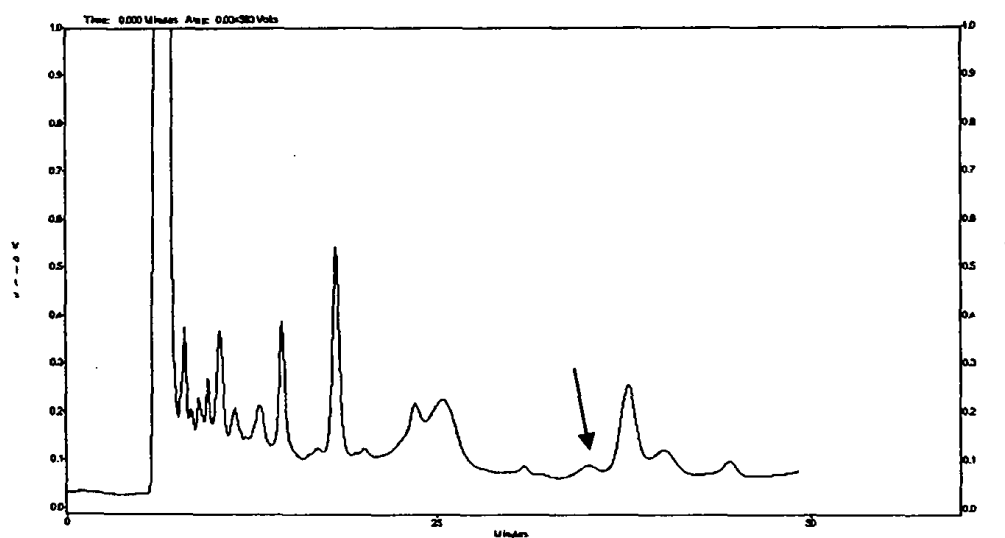


Εικόνα 17: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος Nescafe χωρίς καφεΐνη (δείγμα 9).

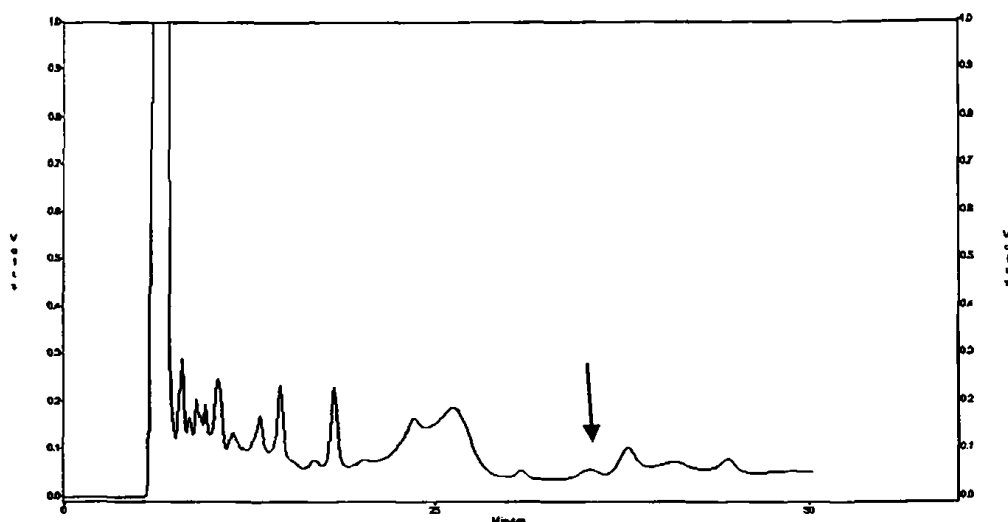
Τέλος στα δείγματα των καφέδων φίλτρου (εικ.18,19,20) φαίνεται να συνεκλούνται και άλλες ενώσεις που απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος και κατά συνέπεια παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του ακρυλαμιδίου



**Εικόνα 18: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
καφέ φίλτρου Jacobs (δείγμα 10).**



**Εικόνα 19: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Καφέ φίλτρου Douwe egbets (δείγμα 11).**



Εικόνα 20: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος καφέ φίλτρου La Melloise Filcafe (δείγμα 12).

Συνολικά παρατηρούμε, ότι χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη εκχύλισης του ακρυλαμιδίου και χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, στα χρωματογραφήματα εικ. 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, που αντιστοιχούν σε καφέδες Ελληνικούς, Νες και φίλτρου, δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του ακρυλαμιδίου, γιατί συνεκλούνται κι άλλες ενώσεις και φαίνεται να παρεμποδίζουν την ανίχνευση του, ενώ στα χρωματογραφήματα εικ. 13, 14, 15, που αντιστοιχούν σε υποκατάστατα καφέ, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση από ξένες ουσίες, αλλά η ποσότητα είναι πολύ μικρή και δεν ανιχνεύεται το ακρυλαμίδιο, οπότε χρειάζεται συμπύκνωση του δείγματος (όριο ποσοτικοποίησης 150ppb).

2^η μέθοδο εκχύλισης

Εν συνεχεία χρησιμοποιήσαμε μεθανόλη ως διαλύτη εκχύλισης και διαλύματα Carrez 1 και 2 για καθαρισμό. Η μεθανόλη συμπυκνώνεται εύκολα και θα μπορούσαμε να πετύχουμε μια προσυγκέντρωση του δείγματος.

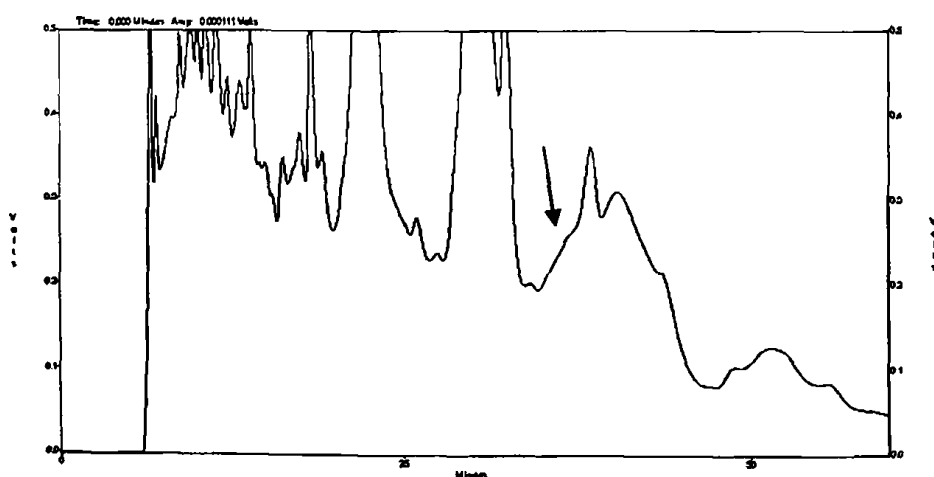
Όπως φαίνεται σε όλα τα παρακάτω χρωματογραφήματα όλων των ειδών καφέ, υπάρχει μια δραματική αύξηση της βασικής γραμμής και των

ενώσεων που απορροφούν στο μήκος κύματος των 200nm. Ειδικότερα, στα χρωματογραφήματα των εικόνων 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 30, παρατηρούμε ότι στην περιοχή των 36 λεπτών που εκλούεται το ακρυλαμίδιο, εμφανίζονται κι άλλες ενώσεις που έχουν υψηλή απορρόφηση και φαίνεται να παρεμποδίζουν την ανίχνευση του ακρυλαμιδίου.

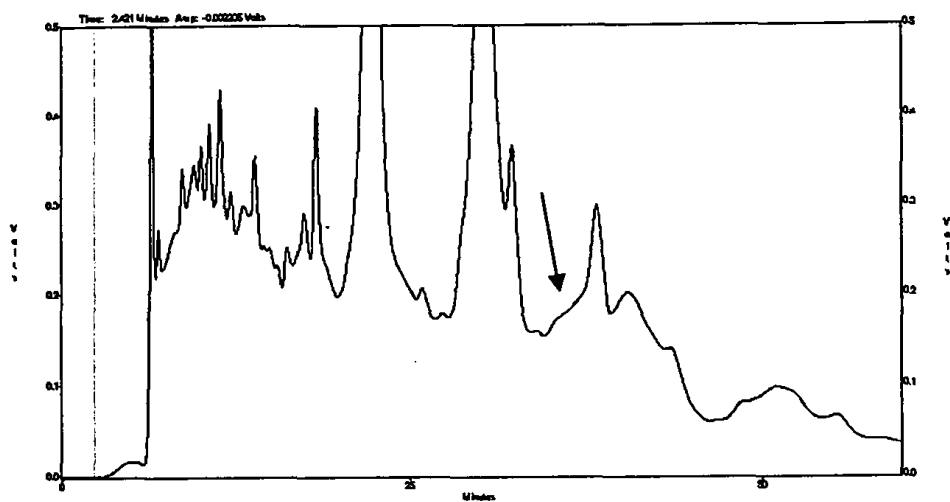
Στα χρωματογραφήματα 27 και 29, που αντιστοιχούν σε Ελληνικό καφέ και καφέ από κριθάρι, το εμβαδόν που αντιστοιχεί στο ακρυλαμίδιο είναι πολύ μικρό και είναι ασαφής η εκτίμηση για το ποια ακριβώς κορυφή είναι.

Με τον ανιχνευτή UV δε δίνεται καμία πληροφορία για την ταυτότητα της ουσίας και επιπλέον υδρόλυση του ακρυλαμιδίου και ταυτοποίηση του ακρυλικού οξέος δεν είναι δυνατή σε αυτά τα δείγματα, αφού υπάρχει μια πληθώρα ενώσεων που έχουν πολύ μεγάλη απορρόφηση και εκλύονται σε χρόνο 0-37min.

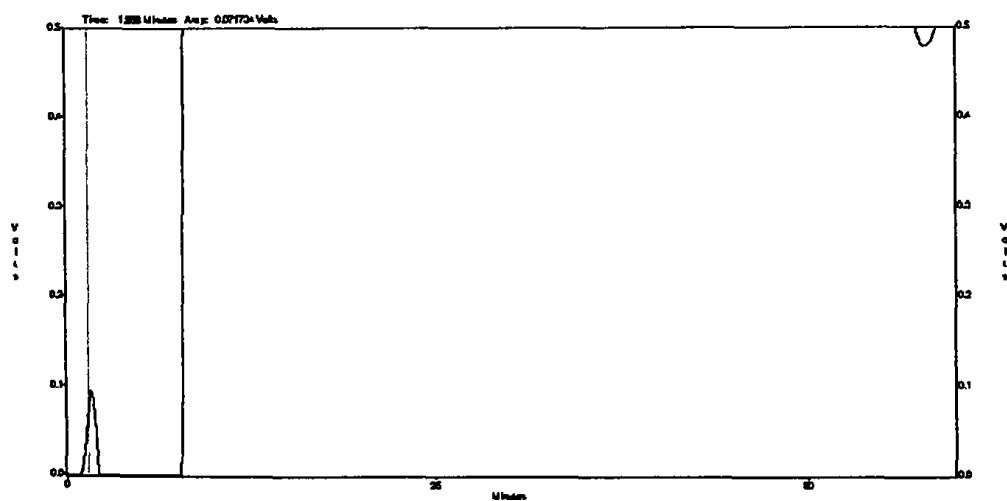
Συνεπώς απαιτείται περεταίρω καθαρισμός με solid phase extraction για απομάκρυνση των παρεμποδίζουσων ουσιών και επιπλέον ταυτοποίηση με φασματογράφο μάζας που έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και συγχρόνως μπορεί να ταυτοποιήσει το ακρυλαμίδιο.



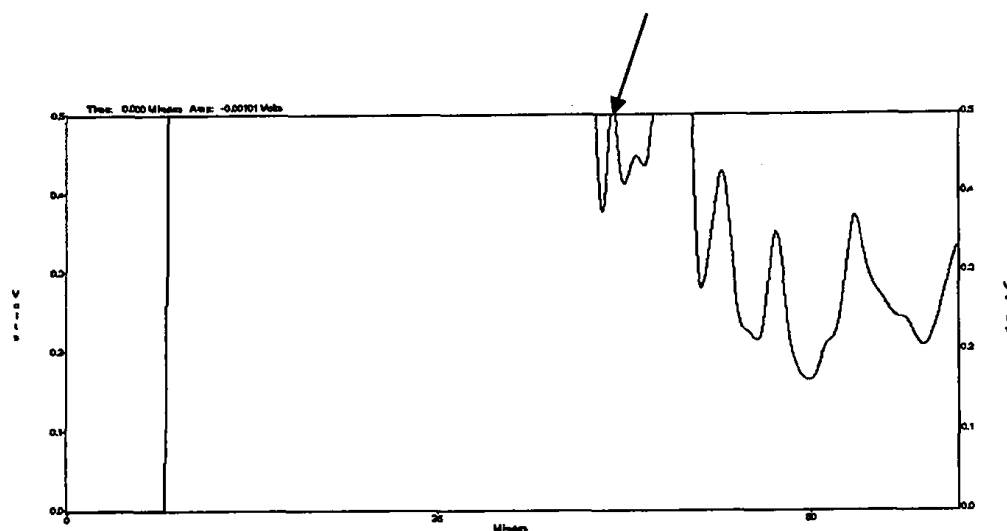
**Εικόνα 21: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Ελληνικού Καφέ Λουμίδης Παπαγάλος (δείγμα 1).**



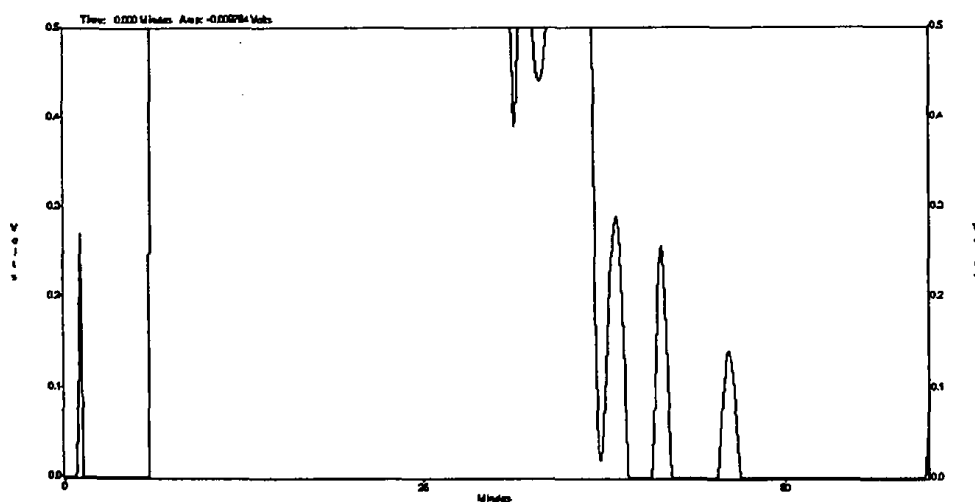
**Εικόνα 22: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Ελληνικού Καφέ Brano (δείγμα 2).**



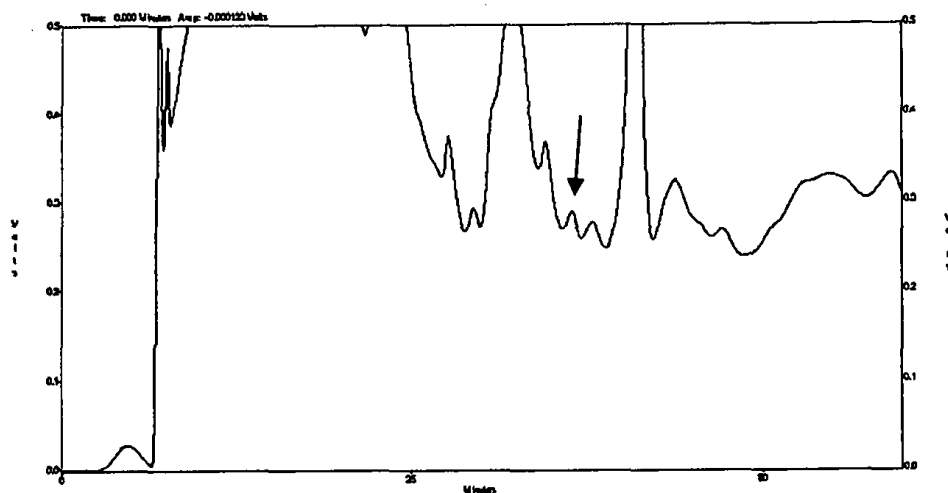
**Εικόνα 23: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Nescafe classic (δείγμα 8).**



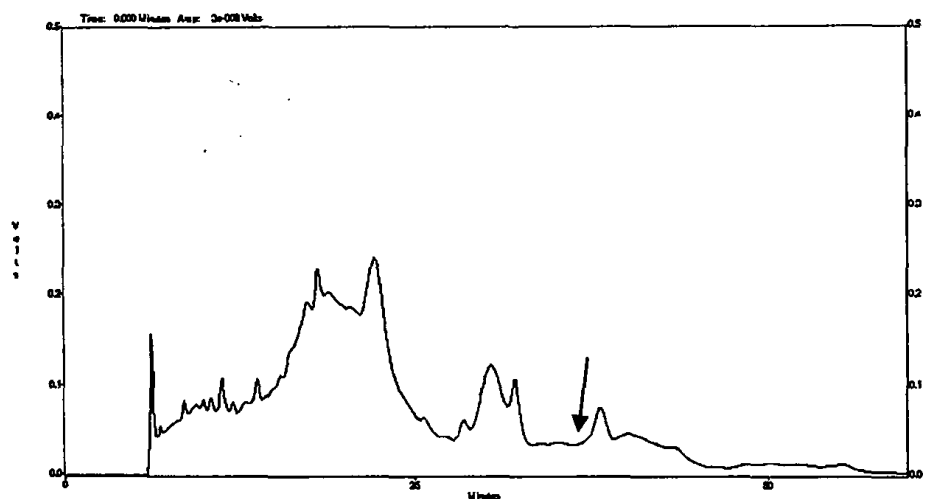
**Εικόνα 24: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Nescafe χωρίς καφεΐνη (δείγμα 9).**



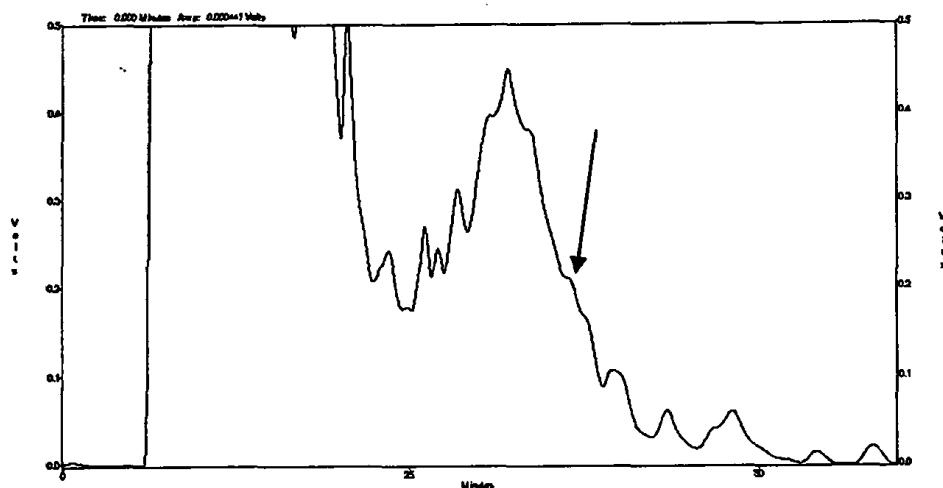
**Εικόνα 25: Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος καφέ
φίλτρου Jacobs (δείγμα 10).**



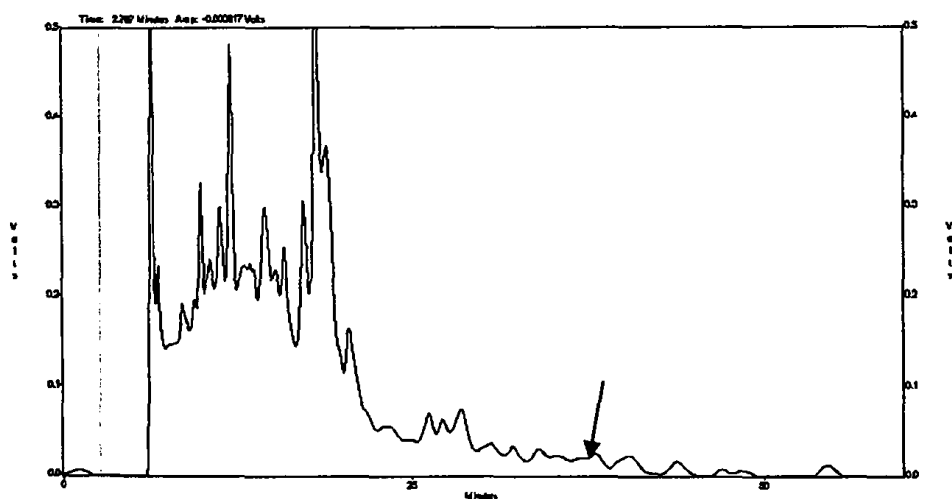
**Εικόνα 26 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Ελληνικού καφέ σκούρου (δείγμα 3).**



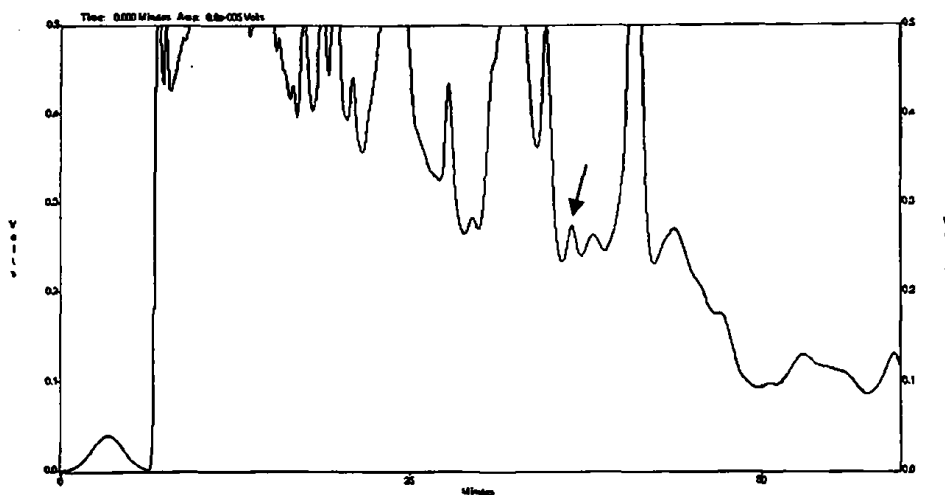
**Εικόνα 27 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Ελληνικού καφέ ξανθού (δείγμα 4).**



**Εικόνα 28 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Ελληνικού καφέ από κριθάρι (δείγμα 6).**

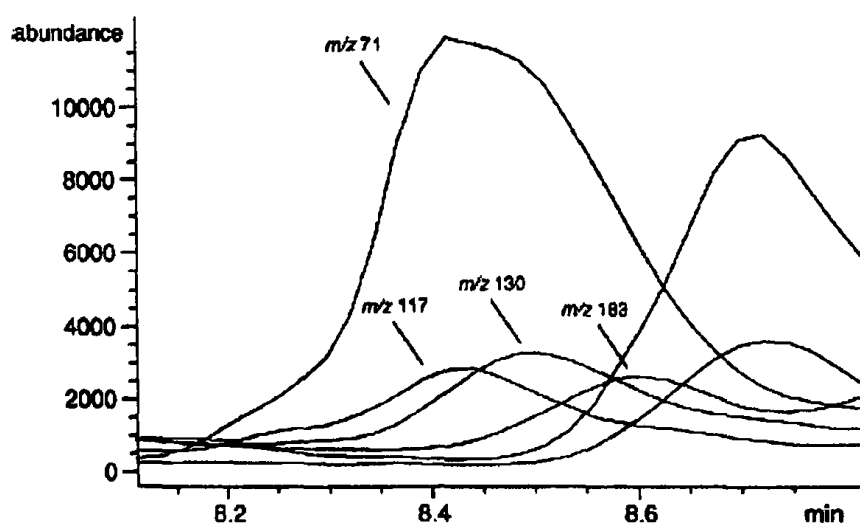


**Εικόνα 29 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος
Ελληνικού καφέ από ρεβίθι (δείγμα 5).**



Εικόνα 30 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος Καφέ φίλτρου La Meloise Filcafe (δείγμα 12).

Αυτό έχει ήδη αναφερθεί και αποδειχτεί για τον καφέ, με τη χρήση στήλης ανάστροφης φάσης και ανιχνευτή μαζών (Gökmen et. al., 2006). Στο σχήμα 1 φαίνονται οι μάζες των ενώσεων που συνεκλούνται με το ακρυλαμίδιο, όπως γλυκίνη κτλ. Ως εκ τούτου, οι συγγραφείς, προτείνουν την χρήση HPLC-MS-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό ακρυλαμιδίου σε δείγματα καφέ.



Σχήμα 1 : Μάζες ενώσεων που συνεκλούνται και συνυπολογίζονται με το ακρυλαμίδιο.

3.3 Ανάκτηση ακρυλαμιδίου από μπισκότα και παιδική τροφή.

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης του ακρυλαμιδίου στα μπισκότα και την παιδική τροφή προστέθηκε γνωστή ποσότητα ακρυλαμιδίου (100μl από το διάλυμα των 10.000ppm) ως εσωτερικό πρότυπο και τα δείγματα (με και χωρίς εσωτερικό πρότυπο), εκχυλίστηκαν και προσδιορίστηκε το περιεχόμενο ακρυλαμίδιο.

Ο υπολογισμός του εμβαδού του εσωτερικού προτύπου (IS) στον τελικό όγκο γίνεται ως εξής:

$$10\text{ppm} \cdot 100 \cdot 10^{-3}\text{ml} = 30.5\text{ml} \cdot x \Rightarrow x = 0.03279$$

$$15\text{ml} \cdot 0.03279\text{ppm} = 1\text{ml} \cdot x_1 \Rightarrow x_1 = 491.80\text{ppb}$$

$$15\text{ml} \cdot 0.03279\text{ppm} = 1.15\text{ml} \cdot x_2 \Rightarrow x_2 = 427.66\text{ppb}$$

$$\text{Area θεωρητική: } E = ax + \beta \Rightarrow E(\text{IS θεωρητικό}) = 0.3823 \cdot x - 6.1632$$

$$\begin{array}{l} \text{Για } x_1: E_1 = 181,85 \\ \text{Για } x_2: E_2 = 157,33 \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Για } x_1: E_1 = 181,85 \\ \text{Για } x_2: E_2 = 157,33 \end{array}} \right\} \text{M.O.} = 169,59\text{mv/s}$$

Η ανάκτηση υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\text{Ανάκτηση} = E(\text{δείγματος} + \text{εσωτερικό πρότυπο}) / E_{\text{δείγματος}} + E_{\text{IS θεωρητικό}}$$

Παιδική Τροφή: Φαρίν Λακτέ

Παρακάτω θα υπολογιστεί η ανάκτηση του ακρυλαμιδίου στην παιδική τροφή.

Δείγμα χωρίς εσωτερικό πρότυπο.

m	V _{αρχ}	V _{ενδ}	V _{τελ}
8g	30,4ml	15ml	1ml

$$\begin{array}{l}
 E \text{ (mv/s)} \\
 59,25 \\
 55,71 \\
 66,85
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} E \text{ (mv/s)} \\ 59,25 \\ 55,71 \\ 66,85 \end{array}} \right\} M.O. = 60.603 \text{mv/s}$$

Με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου (IS).

A.

m	Varx	Vενδ	Vτελ
8g	30,5ml	15ml	1ml

$$E \text{ (mv/s)} = 208,71$$

B.

m	Varx	Vενδ	Vτελ
8g	30,5ml	15ml	1,15ml

$$E \text{ (mv/s)} = 157,37$$

$$\text{Ανάκτηση} = 208,71 / (60,603 + 169,59) = 90.70\%$$

Μπισκότα Πτι Μπερ Αλλατίνη με μέλι και γάλα

Παρακάτω θα υπολογιστεί η ανάκτηση του ακρυλαμιδίου σε μπισκότα.

Δείγμα χωρίς εσωτερικό πρότυπο.

m	Varx	Vενδ	Vτελ
8g	30,4ml	15ml	1ml

$$\begin{array}{l} E \\ (\text{mv/s}) \\ 54,76 \\ 61,53 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} E \\ (\text{mv/s}) \\ 54,76 \\ 61,53 \end{array}} \right\} \text{M.O.} = 58,15$$

Με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου (IS).

m	Vαρχ	Vενδ	Vτελ
8g	30,5ml	15ml	1ml

$$E (\text{mv/s}) = 211,51$$

Ο υπολογισμός του εσωτερικού προτύπου (IS) στον τελικό όγκο γίνεται ως εξής:

$$10\text{ppm} \cdot 100 \cdot 10^{-3}\text{ml} = 30.5\text{ml} \cdot x \Rightarrow x = 0.03279$$

$$15\text{ml} \cdot 0.03279\text{ppm} = 1\text{ml} \cdot x_1 \Rightarrow x_1 = 491.80\text{ppb}$$

$$\text{Area θεωρητική: } E = \alpha x + \beta \Rightarrow E = 0.3823 \cdot x - 6.1632$$

$$E = 181,85\text{mv/s}$$

m	Vαρχ	Vενδ	Vτελ
8,01g	30,4ml	20ml	1,05ml

$$\text{Ανάκτηση} = 211,51 / (58,15 + 181,85) = 88.13\%$$

Μπισκότα Μιράντα Παπαδοπούλου

Παρακάτω θα υπολογιστεί η ανάκτηση του ακρυλαμιδίου σε μπισκότα.

Δείγμα χωρίς εσωτερικό πρότυπο.

E
(mv/s)
70,47

Με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου (IS).

m	Varx	Vενδ	Vτελ
8,02g	30,5ml	20ml	1,05ml

$$E \text{ (mv/s)} = 224,95$$

Ο υπολογισμός του εσωτερικού προτύπου (IS) στον τελικό όγκο γίνεται ως εξής:

$$10\text{ppm} \cdot 100 \cdot 10^{-3}\text{ml} = 30.5\text{ml} \cdot x \Rightarrow x = 0.03279$$

$$20\text{ml} \cdot 0.03279\text{ppm} = 1.05\text{ml} \cdot x_1 \Rightarrow x_1 = 624.51\text{ppb}$$

$$\text{Area θεωρητική: } E = \alpha x + \beta \Rightarrow E = 0.3823 \cdot x - 6.1632$$

$$E = 232,59\text{mv/s}$$

$$\text{Ανάκτηση} = 224,95 / (70,47 + 232,59) = 74.23\%$$

Τελικά, η ανάκτηση ακρυλαμιδίου από μπισκότα φαίνεται στον πίνακα 14 και κυμαίνεται από 74%-89%

Πίνακας 14. Ανάκτηση ακρυλαμιδίου από μπισκότα

Δείγμα	Ανάκτηση %
Μπισκότα (ring)	89,6
Μπισκότα Πτι Μπερ Αλλατίνη με μέλι και γάλα	88,13
Μπισκότα Μιράντα Παπαδοπούλου	74,23

Η ανάκτηση ακρυλαμιδίου από παιδική τροφή φαίνεται στον πίνακα 15 και κυμαίνεται από 67-90% .

Πίνακας 15. Ανάκτηση ακρυλαμιδίου από παιδική τροφή.

Δείγμα	Ανάκτηση%
Παιδική Τροφή: Φαρίν Λακτέ	90,70
Παιδική τροφή (ring)	67,2

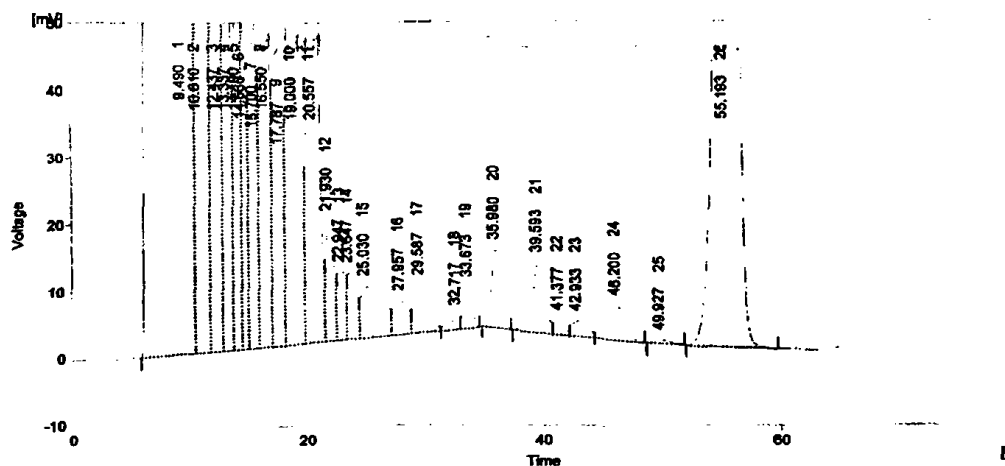
Η ανάκτηση στα μπισκότα ήταν καλύτερη από αυτή της παιδικής τροφής γιατί η παιδική τροφή περιείχε συστατικά γάλακτος, σχηματιζόταν ένα παχύρευστο γαλάκτωμα, που δυσχέραινε τον διαχωρισμό. Η ανάκτηση , εν τούτοις είναι ικανοποιητική , αν λάβουμε υπόψιν ότι ο διαλύτης εκχύλισης είναι μεθανόλη, όπου το ακρυλαμίδιο παρουσιάζει μικρότερη διαλυτότητα σε σχέση με το νερό.(Gokmen et al. 2009)

3.4 Συγκριτική μελέτη προσδιορισμού του ακρυλαμιδίου με τις μεθόδους HPLC-UV και HPLC-MS.

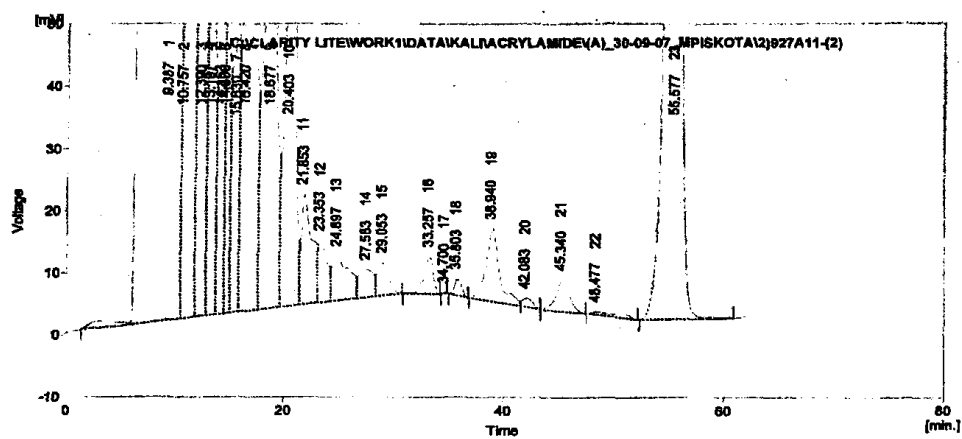
Απ' όλα τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου με τη μέθοδο HPLC-UV στα είδη του καφέ που μελετήσαμε.

Έγινε, εν συνεχεία, μέτρηση ακρυλαμιδίου σε μπισκότα (κωδικός δείγματος 927 A) και παιδική τροφή (κωδικός δείγματος 927B) (Kotsiou K. and Tasioula-Margari M2009) με τη μέθοδο HPLC-UV και σύγκριση με τη μέθοδο HPLC-MS/MS σε ένα διεργεστηριακό έλεγχο.

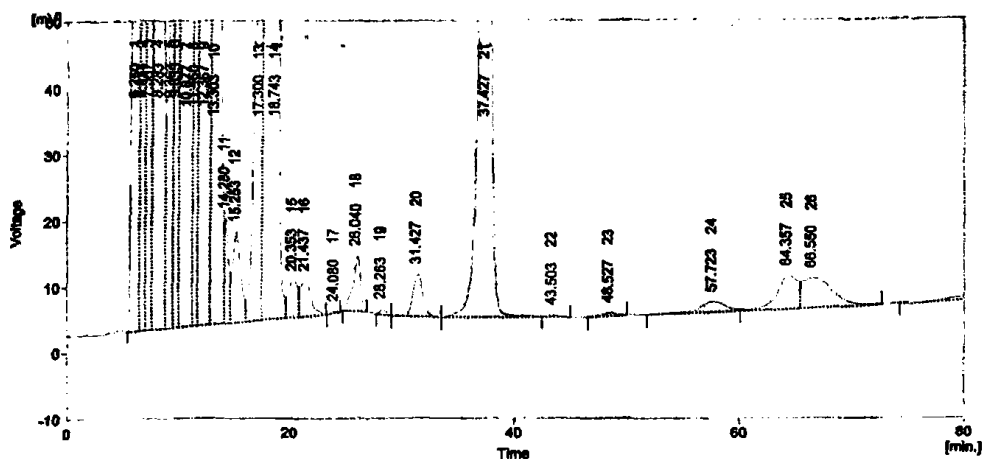
Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η κορυφή του ακρυλαμιδίου σε χρόνο 35,9 min για το δείγμα μπισκότων και σε χρόνο 26min για την παιδική τροφή, χρησιμοποιώντας νερό (0.01M H₂SO₄) και 20% ACN σε νερό (0.01M H₂SO₄) αντίστοιχα.



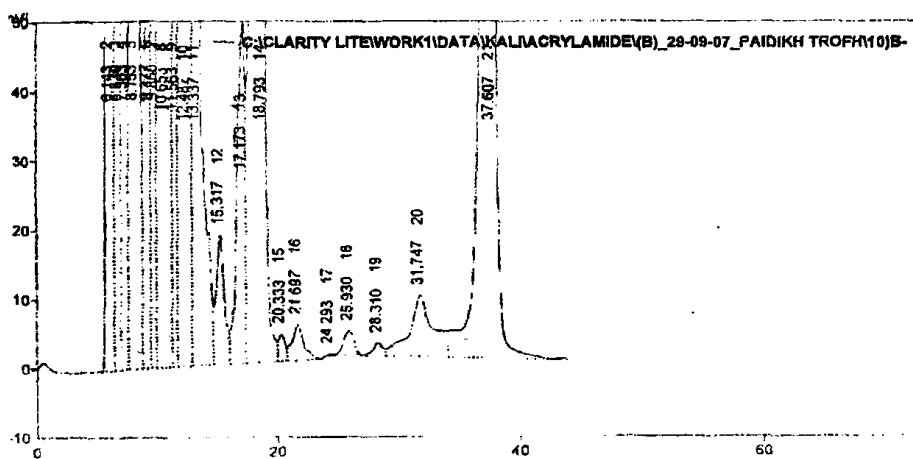
Εικόνα 31 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος μπισκότου με προσθήκη σταθερής ποσότητας ακρυλαμιδίου (+500ppb).



Εικόνα 32 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος μπισκότου χωρίς προσθήκη σταθερής ποσότητας ακρυλαμιδίου.



Εικόνα 33 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος παιδικής τροφής με προσθήκη σταθερής ποσότητας ακρυλαμιδίου (+500ppb).



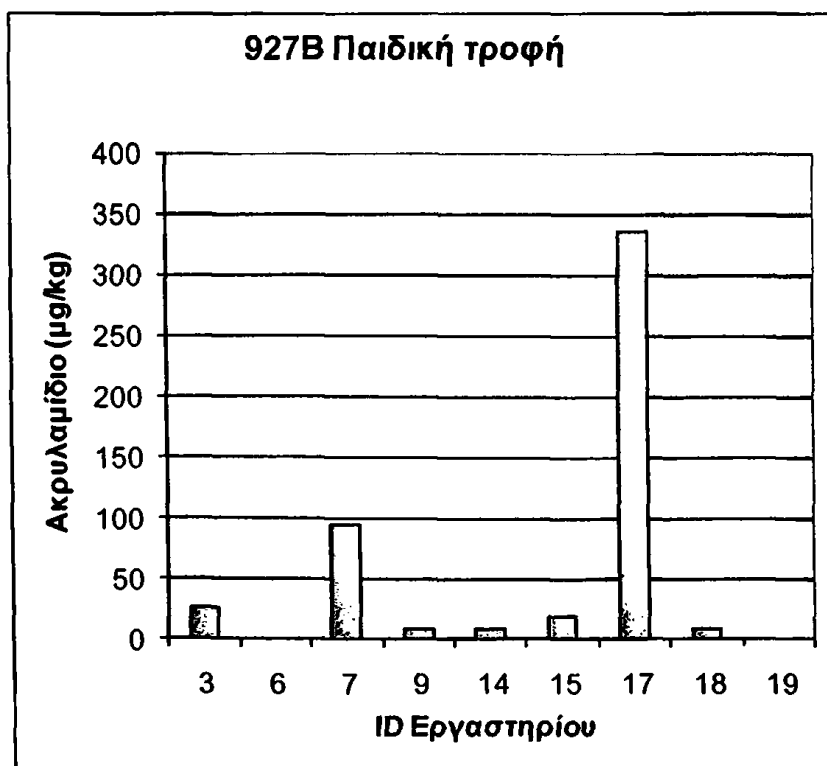
Εικόνα 34 : Χρωματογράφημα HPLC-UV δείγματος παιδικής τροφής χωρίς προσθήκη σταθερής ποσότητας ακρυλαμιδίου.

Στον πίνακα 16 φαίνονται τα αποτελέσματα δοκιμής μέτρησης ακρυλαμιδίου μεταξύ 9 εργαστηρίων. Το εργαστήριό μας είχε τον κωδικό 17 (ID)

Πίνακας 16: Αποτελέσματα δοκιμής μέτρησης Ακρυλαμιδίου.

	927A (Μπισκότα)	927B(Παιδική τροφή)
ID	ACR $\mu\text{g/kg}$	ACR $\mu\text{g/kg}$
3	611	26
6	714	< LoQ
7	315	95
9	900	9
14	581	10
15	407	19
17	132	336
18	121	10
19	499	< LoQ

Σχήμα 2 Γράφημα Κατανομής του Ακρυλαμιδίου σε Παιδική τροφή.



Πίνακας 17: Αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε όπως αναφέρεται από τους συμμετέχοντες

ID	Διαλύτης	Θερμοκρασία °C	Χρόνος min	Εσωτερικά πρότυπα	SPE προστήλη	LC
3	νερό	nd	30	d ₃	ENV + & STRATA X-C	ms/ms
6	νερό/DCM (95:5)	δωματίου	15	¹³ C ₃	HLB + ACCUTAT	ms/ms
7	νερό	20	10	όχι	HLB + MCX	ms
9	νερό	60	30	d ₃	ENV +	ms/ms
14	νερό	δωματίου	60	d ₃	IST – MM	ms/ms
15	νερό	δωματίου	5	¹³ C ₃	HLB	ms
17	μεθανόλη	δωματίου	2	όχι	όχι	uv
18	μεθανόλη	δωματίου	20	d ₃	όχι	ms/ms
19	νερό	δωματίου	1	¹³ C ₃	NANOSEP	ms/ms

Στα παραπάνω δείγματα δεν υπάρχει συμφωνία αποτελεσμάτων. Ειδικότερα στην παιδική τροφή, που δεν υπήρχε ακρυλαμίδιο (ποσότητα < από 10μg /Kg) με τη μέθοδο HPLC-UV βρέθηκαν 336μg /Kg(σχήμα 2). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι συνεκλούνται κι άλλες ενώσεις και είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση του ακρυλαμιδίου με φασματοφωτομετρία μάζας.

Στα μπισκότα η ποσότητα ήταν πολύ μικρότερη από την διάμεση τιμή 499 μg/kg (φαίνεται μεγάλο εύρος τιμών), γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει πρόβλημα ανάκτησης και επαναληψιμότητας της μεθόδου, ιδιαίτερα με τη χρήση μεθανόλης, ως διαλύτη έκλουσης, αφού τα εργαστήρια 17,18

που χρησιμοποίησαν αυτόν τον διαλύτη παρουσίασαν την μικρότερη ανάκτηση(σχήμα 3).

3.5 Συμπεράσματα

Γίνεται σαφές ότι η μεθανόλη σαν διαλύτης εκχύλισης δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί, γιατί διαλύει και άλλα συστατικά που απορροφούν σε μήκος κύματος 200nm που συνεκλούνται με το ακρυλαμίδιο ή πριν από αυτό και αυξάνουν πολύ τη βασική γραμμή με συνέπεια να καθίσταται αδύνατη η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του ακρυλαμιδίου.

Με την πρώτη μέθοδο εκχύλισης με νερό, φαίνεται να εκλούνται λιγότερα συστατικά που απορροφούν σε αυτή την περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας, αλλά η κορυφή που αντιστοιχεί στο ακρυλαμίδιο είναι μικρή, χρειάζεται συμπύκνωση αφού με τη συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ποσότητα > 150 ppb. Επίσης απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός με στήλη στερεάς φάσης και η χρησιμοποίηση ανιχνευτή MS για ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μικρών ποσοτήτων της τάξεως των ppb, που υπάρχει στα τρόφιμα.

Η ανάκτηση του ακρυλαμιδίου στα μπισκότα κυμαίνεται από 74% μέχρι 89%, ενώ η ανάκτηση ακρυλαμιδίου στην παιδική τροφή κυμαίνεται από 67% μέχρι 90%. Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι η ανάκτηση στα μπισκότα ήταν καλύτερη από αυτή της παιδικής τροφής.

Είναι εμφανές ότι η μικρή συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και η συνέκλωση άλλων ενώσεων σε συνδυασμό με την έλλειψη ευαισθησίας του ανιχνευτή UV, καθιστούν αδύνατη τη χρήση αυτού για την ανάλυση του ακρυλαμιδίου με υγρή χρωματογραφία σε πολύπλοκα υποστρώματα, όπως είναι τα τρόφιμα. Συνεπώς δεν είναι δυνατή η χρήση ανιχνευτή UV για το προσδιορισμό ακρυλαμιδίου στα τρόφιμα.

3.6 Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε την δυνατότητα χρήσης του ανιχνευτού UV για τον προσδιορισμό ακρυλαμιδίου σε τρόφιμα, όπως ο καφές και τα μπισκότα καθώς και την εκχύλιση του ακρυλαμιδίου, με χρήση των διαλυτών νερού και μεθανόλης. Προς το παρόν δεν υπάρχουν επίσημες μέθοδοι ανίχνευσης του ακρυλαμιδίου σε προϊόντα διατροφής. Ως σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούνται η αέρια και υγρή χρωματογραφία σε συνεργασία με την φασματομετρία μάζας. Η υγρή φασματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) με ανιχνευτή UV δε μας δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα στην ανάλυση ακρυλαμιδίου σε πολύπλοκα υποστρώματα, όπως ο καφές, οι παιδικές τροφές και τα μπισκότα. Το νερό ως διαλύτης εκχύλισης είναι πιο αποτελεσματικός από τη μεθανόλη για την αποτελεσματικότερη εκχύλιση του ακρυλαμιδίου. Η μεθανόλη ως διαλύτης εκχύλισης διαλύει και άλλα συστατικά των προϊόντων διατροφής που αποτελούν παρεμποδίζουσες ουσίες.

Επειδή τα υπόλοιπα συστατικά των τροφών δεν μπορούν να απομακρυνθούν πλήρως κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και του καθαρισμού χρησιμοποιώντας αναλυτικές μεθόδους με UV ανιχνευτή συνήθως αποτυγχάνουν στο στάδιο της ανίχνευσης λόγω του αναποτελεσματικού χρωματογραφικού διαχωρισμού, ακόμη και όταν χρησιμοποιείται στήλη ανταλλαγής ιόντων ο οποίος έχει υψηλότερο δείκτη ικανότητας σε σύγκριση με την στήλη ανάστροφης φάσης.

3.7 ABSTRACT

At present, no official analytical method is available for the determination of acrylamide in foodstuffs. The methods are based on GC and LC coupled to mass spectrometry detection as the final determinative technique. High Performance Liquid Chromatography coupled with UV detection does not provide reliable results in the analysis of acrylamide in complex matrices, such as coffee, baby food and cookies. Water extraction is more effective than methanol for the complete extraction of acrylamide. Potential interfering substances are food matrix dependent and are more easily extracted using methanol. Since co-extractives cannot be completely removed during extraction and cleanup, analytical methods using UV detection, usually fail in the detection step as a result of poor chromatographic separation, even with ion-exchange column which have higher capacity factor value compared to reversed-phase columns.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Amrein, T.M., Schönbachler, B., Escher, F., Amado, R. (2004) Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 4282-4288.
- 2) Amrein, T.M., Bachmann, S., Noti, A. (2003) Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: a comparison of cultivars and farming systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 5556-5560.
- 3) Andrzejewski, D., Roach, J.A., Gay, M.L., Musser, S.M. (2004) Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 1996-2002.
- 4) Becalski, A., Lau, B.P.-Y., Lewis, D., Seaman, S. (2003). Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 802-808.
- 5) Belitz, H.-D. & Grosch, W. (1987). *Food Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 874-883.
- 6) Brathen E. and Knutsen S. H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread.. *Food Chemistry*, 92, pp. 693-700
- 7) De Maria, C.A.B., Trugo, L.C., Aquino Neto, F.R., Moreira, R.F.A. & Alviano, C.S. (1996). Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chem.*, 55(3), pp. 203-207.
- 8) Dybing E., Farmer P.B., Andersen M., Fennell T.R., Lalljie S.P.D., Muller D.J.G., Olin S., Petersen B.J., Schlatter J., Scholz G., Scimeca J.A., Slimani N., Tornqvist M., Tuijelaars S., Verger P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical*

Toxicology, 43, pp. 365–410.

- 9) Dybing E., Sanner T. (2003). Risk Assessment of Acrylamide in Foods. *Toxicol. Sci.*, 75, pp. 7–15.
- 10) Food Standards agency, (2002). Study of Acrylamide in Food. Background information and research findings, pp. 3-7.
- 11) Food Safety Authority of Ireland Report, (2002). Food safety authority comment on Swedish study into cancer chemicals in food. pp. 1-2.
- 12) Flament, I. (2002). Coffee flavor chemistry. John Wiley and Sons, England, pp. 37-53, pp. 81-343.
- 13) Friedman M (2003). Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp. 4504-4526.
- 14) Gökmen Vural and Hamide Z. Senyuva (2005), Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating, *Food Chemistry*, 99, pp. 238-243.
- 15) Gökmen V., Senyuva, H.Z., (2006) A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. *Journal of Chromatography A*, 1120, pp. 194-198.
- 16) Gökmen V, Morales F, J., Atac, Arda Serpen a Gema Arribas-Lorenzo (2009) Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods *Journal of Food Composition and Analysis* 22, pp.142–147
- 17) Granby, K., Fagt, S. (2004). Analysis of acrylamide and dietary exposure to acrylamide from coffee. *Analytica Chim. Acta.*, 520, pp. 177-182.
- 18) Guenther Helmut; Elke Anklam b; Thomas Wenzlc; Richard H. Stadler (2007) Acrylamide in coffee: Review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Addit Contam.*, 24, pp. 60-70.

- 19) IARC, International Agency for Research on Cancer. (1994) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Industrial Chemicals No. 60, IARC, Lyon, France,.
- 20) Kim, B.Y., Hyun, H.H. (2002). Production of acrylamide using immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrus* M33. *Biotechnol Bioproc Eng* 7, pp. 194-200.
- 21) Kotsiou Kali and Maria Tasioula-Margari, Comparison of Analytical Methods for Acrylamide Determination in Foods, 6th IMA (International Methods of Analysis,) Athens 2009, pp.285.
- 22) Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T., (2002) Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, pp. 448.
- 23) Muttucumaru N, Halford NG, Elmore JS, Dodson AT, Parry M, Shewry PR, Mottram DS. (2006) Formation of High Levels of Acrylamide during the Processing of Flour Derived from Sulfate-Deprived Wheat. *J Agric Food Chem.*, 54, pp. 8951-8955.
- 24) Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Kobayashi, H., Yoshida, M. (2003). Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives and Contaminants*, 20, pp. 215-220.
- 25) Paleologos E. K. and Kontominas M. G. (2005), Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1077, pp. 128-135.
- 26) Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenberg L, Törnqvist M.. (2003) Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foodstuffs. *J Agric Food Chem.*, 51, pp. 7012-7018.
- 27) Sagratini Gianni, Fabbri Armando, Marucci Gabriella, Ricciutelli Massimo, Vittori Sauro, Ammendola Sergio, (2006), HPLC-MS validation of QualisaFoo[®] biosensor kit for cost-effective control of acrylamide levels in Italian coffee. *Food control*, 18, 1267-1271.
- 28) Swedish National Food Administration. Information about Acrylamide in Food. 24th April 2002. www.slv.se

- 29) Taeymans, D., Wood, J., Ashby, P., Blank, I., Studer, A., Stadler, R.H., et al. (2004). A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp. 323-347.
- 30) Tardiff R.G., Gargas M.L., Kirman C.R., Carson M.L., Sweeney L.M. (2010). Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp. 658-667.
- 31) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 4998-5006.
- 32) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., and Törnqvist, M., (2000) Acrylamide: A cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology*, 13, pp.517-522.
- 33) Tateo, F., Bononi, M. (2003). A GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food. *Italian Journal of Food Science*, 15, pp. 149-151.
- 34) Twaddle N. C., M. I. Churchwell, L. P. McDaniel, D. R. Doerge (2004). Autoclave Sterilization Produces Acrylamide in Rodent Diets: Implications for Toxicity Testing. *J.Agric. Food Chem*, 52, pp. 4344-4349.
- 35) Vatter, D. A. - Shetty, K.: (2003), Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, pp. 331-338.
- 36) Yayalayan, V.-A., Wnorowski, A., Perez-Locas, C. (2003). Why asparagines needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, pp. 1753-1757.
- 37) Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M., Shibamoto, T. (2003) Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 3999-4003.
- 38) Wenzl T. and Anklam E. (2007) European Union database of acrylamide levels in food: Update and critical review of data collection. *Food Additives and Contaminants*, Supplement 1, 24, pp 5-12.

- 39) Wenzl T., Maria Beatriz De La Calle M. B., Anklan E. (2003) Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food additives and Contaminants*, 20, pp. 885-902.
- 40) Wicklunda T., Østliea H., Lothea O., Knutsenb S. H., Branthen E., Kita A. (2006) Acrylamide in potato crisp—the effect of raw material and processing. *LWT*, 39, pp. 571–575.
- 41) Williams, J.S.E. (2005). Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. *Food Chemistry*, 90, pp.875-881.
- 42) Zeng, X., Cheng, K. W., Jiang, Y., Lin, Z. X, Shi J. J., Oud, S. Y., Chen, F., Wanga, M. (2009) Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Food Chemistry*, 116, pp.34–39.
- 43) Zhang, Y., Zhang, Y. (2008) Effect of natural antioxidants on kinetic behavior of acrylamide formation and elimination in low-moisture asparagine–glucose model system. *Journal of Food Engineering*, 85, pp.105–115.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- 44) Παπαδογιάννης, Ι.Ν., Σαμανίδου, Β. Φ. Εργαστηριακές εφαρμογές διαχωριστικών τεχνικών στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος 2000, 1η Έκδοση, Θεσσαλονίκη 1999.
- 45) Τασιούλα-Μάργαρη Μ. (2004) Προχωρημένη Χημεία και Ανάλυση Τροφίμων. Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Προγράμματος, Ιωάννινα.

Ιστοσελίδες

<http://el.wikipedia.org>
<http://health.in.gr>
<http://www.sweetmarias.com/coffeecherry.jpg>
<http://www.coffeeresearch.org>
<http://www.efet.gr>
<http://www.efet.gr/acrilamidio.html>
<http://www.ultimate-coffees-info.com>
<http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants>
<http://www.ciaa.eu/asp/documents/brochures>
<http://www.ciaa.eu/asp/documents/>
http://www.firstscience.com/home/perspectives/editorials/coffee-the-science-part-2-of-2_1817.html
<http://news.cafecontrast.gr>
<http://tastytour.pblogs.gr/tags/uncategorized.html>
<http://www.food.gr>
<http://www.imdleo.gr/diaf/files/health/coffee.htm>