



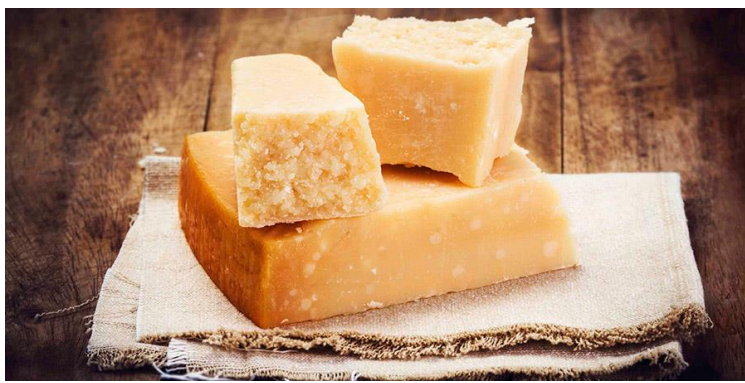
**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΚΡΗΤΗΣ**

**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ: ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Βελτιστοποίηση συνθηκών για την ανάλυση πτητικού προφίλ  
γαλακτοκομικών προϊόντων με μικροεκχύλιση, υπό συνθήκες κενού**

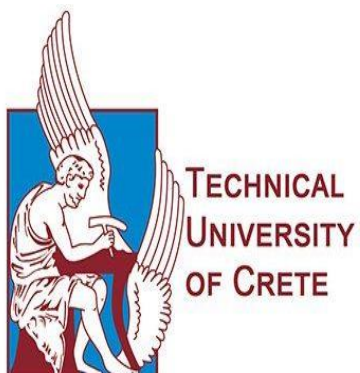
**ΤΖΑΝΕΤΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ**



Εξεταστική επιτροπή:

- Καθ. Ψυλλάκη Ελευθερία (επιβλέπουσα)
- Καθ. Καλογεράκης Νικόλαος
- Αναπλ. καθ. Βενιέρη Δανάη

Χανιά, 2021

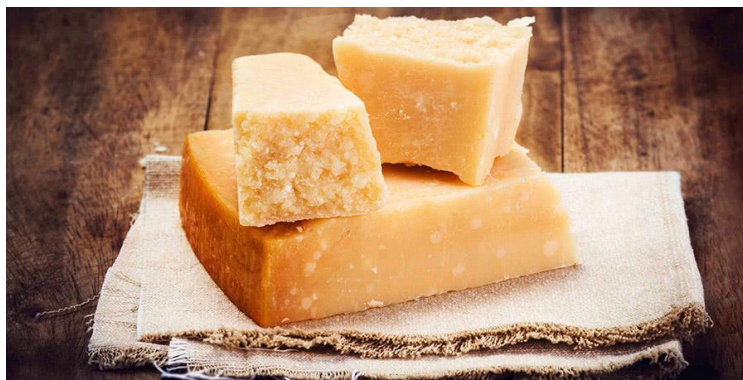


**Technical University of Crete**

School of Environmental engineering

**Optimization of vacuum-assisted microextraction for the analysis of  
the volatile profile of dairy products**

TZANETOU DIMITRA



Examination committee:

- Professor Psillaki Eleftheria (supervisor)
- Professor Kalogerakis Nikolaos
- Professor Venieri Danai

Chania, 2021

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξήχθη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020, στο εργαστήριο Υδατικής Χημείας του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος, του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, κα Ψυλλάκη Ελευθερία για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας, αλλά και για τη δημιουργική μας συνεργασία. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ευαγγελία Γιαντζή, την Αγγελική Πατεράκη και τη Νικολέτα Σολωμού, οι οποίες συνέβαλλαν έμπρακτα στην αναλυτική επεξήγηση των πειραματικών μας διαδικασιών και μαζί με τους συναδέλφους, με τους οποίους συνεργάστηκα άψογα, κατά τη διεξαγωγή της έρευνας μου, δημιούργησαν ένα ευχάριστο κλίμα θετικής ενέργειας και ευγενής άμιλλας.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Καλογεράκη Νικόλαο και την κυρία Βενιέρη Δανάη, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν, κατά τη διάρκεια της παρουσίας της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον καταλυτικό ρόλο που έπαιξε η οικογένεια μου, ιδιαίτερα τα αδέρφια και η ανιψιά μου, αλλά και οι αγαπημένοι μου φίλοι, οι οποίοι ανέκαθεν με στήριζαν και αποτελούσαν την κινητήριό μου δύναμη.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	7
Abstract .....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Πτητικές ενώσεις και άρωμα τυριών .....	10
1.2 Ανάπτυξη αρώματος στα τυριά.....	10
1.3 Βασικές τάξεις πτητικών ενώσεων που έχουν ταυτοποιηθεί στα τυριά .....	11
1.3.1 Αλκοόλες.....	11
1.3.2 Αλδεΐδες .....	11
1.3.3 Κετόνες .....	11
1.3.4 Λακτόνες.....	12
1.3.5 Εστέρες .....	12
1.3.6 Καρβονικά οξέα.....	12
1.4 Βασικά χαρακτηριστικά παρμεζάνας.....	12
1.5 Βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την ανάλυση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας .....	13
1.5.1 Ανάλυση παρμεζάνας, με τη μέθοδο της απευθείας απόσταξης, υπό συνθήκες κενού .....	13
1.5.2 Ανάλυση παρμεζάνας, με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο.....	17
1.6 Μέθοδοι εκχύλισης των πτητικών συστατικών του τυριού .....	19
1.7 Πλεονεκτήματα μικροεκχύλισης στερεής φάσης, για την ανάλυση πτητικού προφίλ τυριού, σε σύγκριση με προγενέστερες τεχνικές .....	20
1.8 Μικροεκχύλιση (Microextraction).....	21
1.8.1 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME).....	21
1.8.2 Τρόποι δειγματοληψίας SPME.....	23
1.9 Μικροεκχύλιση με λεπτό φιλμ (Thin Film MicroExtraction, TFME).....	33
1.9.1 Ανάλυση μεθόδου.....	33
1.9.2 Πλεονεκτήματα TFME σε σύγκριση με κλασσικές μεθόδους .....	35

1.10 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC).....	36
1.11 Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) .....	38
1.12 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας .....	39
2. Πειραματικό μέρος.....	41
2.1 Μικροεκχύλιση λεπτού φιλμ.....	41
2.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	41
2.1.2 Παράμετροι λειτουργίας μεθόδου στο GC-MS.....	42
2.1.3 Πειραματική διαδικασία.....	42
2.2 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο .....	45
2.2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	45
2.2.2 Παράμετροι λειτουργίας μεθόδου στο GC-MS.....	45
2.2.3 Πειραματική διαδικασία.....	46
3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση .....	47
3.1 Προκαταρκτικές μελέτες για TFME .....	47
3.1.1 Λόγοι επιλογής και ιδιότητες συγκεκριμένου λεπτού φιλμ.....	47
3.1.2 Ταυτοποίηση ενώσεων με την χρήση των χρόνων συγκράτησης αλκανίων .....	47
3.2 Ταυτοποίηση ενώσεων στην παρμεζάνα με TFME .....	48
3.3 Βελτιστοποίηση της TFME.....	54
3.3.1 Επίδραση πίεσης.....	54
3.3.2 Επίδραση θερμοκρασίας.....	56
3.3.3 Επίδραση χρόνου εκχύλισης.....	60
3.4 Προκαταρκτικές μελέτες για HSSPME.....	62
3.4.1 Λόγοι επιλογής και ιδιότητες συγκεκριμένης ίνας .....	62
3.4.2 Ταυτοποίηση ενώσεων με την χρήση των χρόνων συγκράτησης αλκανίων .....	62
3.5 Ταυτοποίηση ενώσεων στην παρμεζάνα με HSSPME .....	63
3.6 Βελτιστοποίηση της HSSPME .....	66
3.6.1 Επίδραση τρόπου δειγματοληψίας .....	66
3.6.2 Επίδραση κενού.....	66

3.6.3 Επίδραση θερμοκρασίας.....	68
3.6.4 Επίδραση χρόνου εκχύλισης.....	69
4. Σύγκριση μεθόδων.....	72
5. Συμπεράσματα.....	74
6. Βιβλιογραφία.....	75

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολούνται με την ανάλυση ποικίλων τροφίμων, μέσα από ένα πιο οικολογικό πρίσμα. Πιο συγκεκριμένα, ο ποιοτικός έλεγχος γαλακτοκομικών προϊόντων, ως προς το άρωμα και τη γεύση τους, αδιαμφισβήτητα διεγείρει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, καθώς η αυξανόμενη ρύπανση του περιβάλλοντος έχει άμεσο αντίκτυπο στην αυθεντικότητά τους.

Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας θεωρήθηκε η βελτιστοποίηση συνθηκών για την ποιοτική ανάλυση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας, με την χρήση δύο μεθόδων μικροεκχύλισης.

Το **πρώτο σκέλος** της συγκεκριμένης διατριβής περιλαμβάνει το διαχωρισμό και την προσρόφηση των συστατικών με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης λεπτού φιλμ (Thin-Film MicroExtraction, TFME) και έπειτα, με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο (Headspace Solid Phase MicroExtraction, HSSPME). Το βασικό πλεονέκτημα των προαναφερθέντων μεθόδων είναι ότι δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον με οργανικούς διαλύτες και εμφανίζουν ευελιξία, ανάλογα με το είδος των ενώσεων που εξετάζονται.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία (4 °C και 50 °C), ο χρόνος εκχύλισης (20, 30 και 40 λεπτά) και η πίεση (μειωμένη και ατμοσφαιρική), δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην τελευταία.

Το **δεύτερο σκέλος** αποτελεί την σύγκριση των δύο μεθόδων, όσον αφορά την αποτελεσματικότητά τους.

Με βάση τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την ταυτοποίηση των εξεταζόμενων ενώσεων ήταν ο συνδυασμός μειωμένης πίεσης (vac) και υψηλής θερμοκρασίας (50 °C). Η μείωση της πίεσης οδηγεί στην αύξηση της κινητικής, κυρίως των ημι-πτητικών ενώσεων και μειώνει την αντίσταση στην μεταφορά μάζας των ενώσεων από την στερεή στην αέρια φάση, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνει τον συντελεστή διάχυσης και έχει σαν αποτέλεσμα, την αύξηση της ταχύτητας εκχύλισης του αναλύτη.

Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι στα περισσότερα πειράματα, ο πιο αποτελεσματικός χρόνος εκχύλισης ήταν τα 40 λεπτά. Με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης αυξανόταν και η απόκριση των ενώσεων στον αέριο χρωματογράφο, συμπεραίνοντας έτσι, ότι πριν τα 40 λεπτά, δεν έχει επέλθει η ισορροπία.

Σε γενικές γραμμές, ήταν εμφανές ότι η πιο αξιόπαινη τεχνική ήταν η vac-TFME, καθώς ταυτοποίησε τις τριπλάσιες ενώσεις στους 50 °C, σε σύγκριση με την vac-HSSPME. Επιπροσθέτως, εντύπωση προκαλεί ότι, με την χρήση της vac-TFME πραγματοποιήθηκε ανίχνευση πτητικών και ημι-πτητικών συστατικών, ακόμα και στους 4 °C, ενώ γενικά, σε χαμηλές θερμοκρασίες η εκχύλιση των ενώσεων από το δείγμα, καθίσταται πιο απαιτητική.



## Abstract

Over the past years, more and more scientists are monitoring the analysis of various foods, through a more ecological perspective. More specifically, the quality control of dairy products, as regards their flavor and aroma, undoubtedly, stimulates interest in virtue of the fact that the developing pollution of the environment has a direct impact on their authenticity.

Thus, the purpose of the present thesis is the optimization of the conditions for the qualitative analysis of the volatile profile of parmesan, with the use of two microextraction methods.

The **first part** of this dissertation consists of the extraction and adsorption of compounds with Thin Film MicroExtraction (TFME) and Head Space Solid Phase MicroExtraction (HSSPME). The main advantage of the methods mentioned above, is that both of them, do not burden the environment with the use of organic solvents and appear to be flexible according to the examined compounds.

The parameters that have been examined are the temperature (4 °C and 50 °C), the extraction time (20, 30 and 40 minutes) and the pressure (decreased and atmospheric), attending closely to the latter.

The **second part** embodies the contrast between these methods, in relation to their efficiency.

In accordance with the results, it can be observed that the optimal condition for the identification of the examined compounds was the combination of reduced pressure (vac) and high temperature (50 °C). The reduced pressure leads to acceleration of semi-volatile compounds' extraction kinetics and decreases the resistance of mass transfer from solid to gas phase, while high temperature, increases the diffusion coefficient, resulting in improved extraction rates of the analyte.

In addition, it was observed that the best extraction time was 40 minutes. Increasing extraction time led to higher areas of compounds on the gas chromatograph, concluding that equilibrium hasn't been reached, before that time.

Overall, vac-TFME was undeniably the most prominent method, due to the threefold increase in compounds at 50 °C, in comparison to vac-HSSPME. Furthermore, an astonishing result was, that vac-TFME has identified volatile and semi-volatile compounds, even at 4 °C, while, in general, the extraction of compounds is described as challenging, at lower temperatures.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Πτητικές ενώσεις και άρωμα τυριών

Τα τυριά αποτελούν τρόφιμα τα οποία εμφανίζονται σε ποικίλα χρώματα, σχήματα και επικαλύψεις. Αυτές οι ανομοιότητες στα χαρακτηριστικά τους, οφείλονται στα διαφορετικά είδη γάλακτος από τα οποία παρασκευάζονται, στις συνθήκες ωρίμανσης, καθώς και στη χημική σύσταση των τυριών.

Έτσι, τα τυριά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα, όπως και η παρμεζάνα, χαρακτηρίζονται από έντονη, πλούσια οσμή και εμφανίζουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενώ τα τυριά που παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα εμφανίζουν πιο ήπια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η ειδοποιός αυτή διαφορά, οφείλεται στους μικροοργανισμούς που συναντώνται στο νωπό γάλα, οι οποίοι επιταχύνουν την ωρίμανση και ευνοούν τη ζύμωση της πρώτης ύλης. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι, τα τυριά που παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλδεΐδες και κετόνες, ενώ αυτά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλες [1, 18].

### 1.2 Ανάπτυξη αρώματος στα τυριά

Το τυρί είναι το προϊόν ωρίμανσης του πήγματος, απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό βαθμό, το οποίο προέκυψε είτε από την επίδραση πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα, είτε από οξίνιση. Πολλές φορές, είναι απαραίτητη η προσθήκη καθορισμένων υλών στο τυρί, όπως το μαγειρικό αλάτι, το σορβικό νάτριο, αβλαβείς φυτικές χρωστικές και ειδικές καλλιέργειες βακτηρίων. Ιδιαίτερα αν πρόκειται για τυρί που προέρχεται από αγελαδινό γάλα, είναι πιθανή και η ενίσχυση του με χλωροφύλλες [18].

Το άρωμα των τυριών οφείλεται κυρίως σε πτητικά συστατικά που παράγονται από μικροοργανισμούς ή την χρήση πυτιάς, μέσω βιοχημικών αντιδράσεων, τόσο στην πρώτη ύλη, όσο και στο τελικό προϊόν, με σημαντικότερο στάδιο την ωρίμανσή τους. Οι αντιδράσεις, οι οποίες πραγματοποιούνται, καθ' όλη τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού, είναι οι εξής [1]:

Πρωτεόλυση: ονομάζεται η ενζυμική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, προς πεπτίδια και έπειτα, προς αμινοξέα. Ο καταβολισμός των τελευταίων, οδηγεί στο σχηματισμό αλκοολών, καρβοξυλικών οξέων, φαινολικών ενώσεων, ενώσεων του θείου, αμμωνίας και διοξειδίου του άνθρακα.

Λιπόλυση: ονομάζεται η ενζυμική αποικοδόμηση των τριακυλογλυκερολών του λίπους του γάλακτος, προς μονο-γλυκερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Από τα λιπαρά οξέα είναι δυνατό να προκύψουν αλκοόλες, καρβοξυλικά οξέα, που έχουν μικρότερο αριθμό ανθρακικών ατόμων και λακτόνες, ως προϊόντα ενζυμικών αντιδράσεων β-οξειδωσης.

Γλυκόλυση: ονομάζεται ο μεταβολισμός της λακτόζης, προς γαλακτικό οξύ, από το οποίο στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενζύμων μικροβιακής προέλευσης, προκύπτουν η αιθανόλη, πτητικά καρβοξυλικά οξέα, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα [1].

### 1.3 Βασικές τάξεις πτητικών ενώσεων που έχουν ταυτοποιηθεί στα τυριά

#### 1.3.1 Αλκοόλες

Οι αλκοόλες συμβάλλουν αρκετά, στο άρωμα της παρμεζάνας. Πιο συγκεκριμένα, η 1-hexanol προσδίδει στο τυρί ένα φρουτώδες άρωμα, ενώ η 1-heptanol ένα βαρύ, λιπαρό άρωμα [2].

Οι πρωτοταγείς αλκοόλες είναι προϊόντα της αναγωγής των κετονών και των αλδεϋδών, οι οποίες σχηματίζονται κατά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων. Εξαιρέση αποτελεί η αιθανόλη που σχηματίζεται, κατά το μεταβολισμό της λακτόζης, λόγω αναγωγής της ακεταλδεϋδης. Ακόμα, οι δευτεροταγείς αλκοόλες είναι κυρίως προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής των μεθυλοκετονών [1].

#### 1.3.2 Αλδεϋδες

Οι αλδεϋδες που συναντήθηκαν στα γαλακτοκομικά προϊόντα, προκύπτουν μέσω της β-οξειδωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων. Συμβάλλουν σε πολύ μικρό ποσοστό στα συνολικά, ουδέτερα πτητικά συστατικά της παρμεζάνας [2,3].

#### 1.3.3 Κετόνες

Οι κετόνες παίζουν καταλυτικό ρόλο στη γεύση των ώριμων τυριών και σχηματίζονται από τα *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti* και *Geotrichum candidum*. Οι πιο αντιπροσωπευτικές ενώσεις από την κατηγορία των 2-alkanones, με περιττό αριθμό ανθρακικών ατόμων, ήταν η 2-heptanone και η 2-nonanone, οι οποίες εντοπίζονται σε πληθώρα γαλακτοκομικών προϊόντων και η παραγωγή τους ακολουθεί δύο στάδια. Αρχικά, τα λιπαρά οξέα οξειδώνονται σε β-οξο οξέα, τα οποία έπειτα, αποκαρβοξυλιώνονται σε αντίστοιχα 2-alkanones, με ένα λιγότερο ανθρακικό άτομο [2, 3].

#### 1.3.4 Λακτόνες

Οι λακτόνες συνεισφέρουν στο άρωμα των τυριών, καθώς συμβάλλουν στη φρουτώδη οσμή και στη γλυκιά, κρεμώδη γεύση [1]. Σχηματίζονται λόγω αφυδάτωσης και κυκλοποίησης των 5-υδροξυλιωμένων λιπαρών οξέων που έχουν 8-16 άτομα άνθρακα στο μόριό τους και είναι προϊόντα της ενζυμικής οξείδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Οι λακτόνες που έχουν ανιχνευθεί στα τυριά είναι κυρίως δ-λακτόνες. Γενικά, η θέρμανση προκαλεί την μετατροπή των υδροξυλικών οξέων σε λακτόνες και κατά τη διάρκεια της παραγωγής της παρμεζάνας, είναι γνωστό ότι το τυρόπηγμα θερμαίνεται σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα και σε ποικίλες θερμοκρασίες [2].

#### 1.3.5 Εστέρες

Είναι προϊόντα της ενζυμικής εστεροποίησης των λιπαρών οξέων, η έκταση της οποίας καθορίζεται από τη συγκέντρωση των πρωτοταγών αλκοολών. Ωστόσο, μπορεί να είναι και προϊόντα της μετεστεροποίησης των τριακυλογλυκερολών.

Η φρουτώδης οσμή των περισσότερων εστέρων συμβάλλει στην άμβλυση της όξινης γεύσης των τυριών, η οποία οφείλεται στα οξέα και της πικρής γεύσης τους που οφείλεται στις αμίνες [3].

#### 1.3.6 Καρβονικά οξέα

Τα ευθείας αλυσίδας κορεσμένα, λιπαρά οξέα με 4-10 άτομα άνθρακα στο μόριό τους, είναι προϊόντα της λιπόλυσης των τριακυλογλυκερολών του λίπους του γάλακτος. Η υδρόλυση αυτή καταλύεται, πιθανότατα, από την προ-γαστρική εστεράση που υπάρχει στην πυτιά και από την λιποπρωτεϊνική λιπάση του νωπού γάλακτος.

Τα οξέα, τα οποία ενδέχεται να είναι και παραπροϊόντα της γλυκόλυσης ή της πρωτεόλυσης, έχουν και έμμεση συνεισφορά στο άρωμα των τυριών, καθώς είναι πρόδρομες ενώσεις των μεθυλοκετονών και των αλκοολών, αλλά και των λακτονών ή διαφόρων εστέρων. Για παράδειγμα, το οξικό οξύ είναι προϊόν του μεταβολισμού της λακτόζης, από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, σε αναερόβιες συνθήκες [3].

### 1.4 Βασικά χαρακτηριστικά παρμεζάνας

Η παρμεζάνα είναι ένα ευρέως καταναλόμενο τυρί, το οποίο παράγεται στην Ιταλία, από απαστερίωτο, αγελαδινό γάλα. Συνιστά μία σύνθετη, λιπώδη μήτρα, η οποία αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής και είναι γνωστή για τα αναρίθμητα οφέλη της και την αξιοθαύμαστη ποιότητα της. Η αυθεντικότητα της

συνδέεται άρρηκτα με ένα περίπλοκο, αρωματικό προφίλ, το οποίο βασίζεται σε διάφορες παραμέτρους (παραγωγική διαδικασία, αποθήκευση κλπ.) [30].

Διαθέτει μεγάλη περιεκτικότητα σε ασβέστιο, αλλά και σε λίπος. Γενικά, τα κίτρινα τυριά περιέχουν πολύ περισσότερα λιπαρά, τα οποία είναι κορεσμένα, αφού προέρχονται από ζωικό λίπος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το λίπος είναι ένα συστατικό του γάλακτος, στο οποίο δίνεται μεγάλη σημασία και πολλές φορές συνδέεται με την ποιότητά του. Ακόμα, αποτελεί πλούσια πηγή πρωτεΐνης, υψηλής βιολογικής αξίας και παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα. Λόγω της ωρίμανσης του, η πρωτεΐνη διασπάται με αποτέλεσμα να αφομοιώνεται πλήρως από τον οργανισμό και να είναι περισσότερο εύπεπτη [4].

Επιπροσθέτως, περιέχει ανόργανα στοιχεία, όπως ο ψευδάργυρος και ο φώσφορος, τα οποία φυσικά συμβάλλουν στην υγεία του ανθρώπου [4]. Ειδικότερα, μια μερίδα 30 gr παρμεζάνας αποτελείται από 10,7 gr πρωτεΐνης, 7,8 gr λίπους, 20 mg χοληστερίνης, 336 mg ασβεστίου και 481 mg νατρίου [40].

Όσον αφορά την παραγωγή της διαδικασίας, η παρμεζάνα παρουσιάζει ιδιομορφίες σε σχέση με άλλα τυριά. Σε πρώτη φάση, γίνεται ανάμειξη απαστερίωτου αγελαδινού γάλακτος, με αποβουτυρωμένο. Το μίγμα θερμαίνεται και στην πορεία γίνεται προσθήκη της πυτιάς, ενός ενζύμου που προκαλεί την πήξη του γάλακτος.

Το πήγμα που προκύπτει, θρυμματίζεται σε μικρούς κόκκους και αφήνεται να αποξηρανθεί σε θερμοκρασία 53-55 °C. Με την πτώση της θερμοκρασίας, οι θρυμματισμένοι κόκκοι, καθιζάνουν στον πυθμένα του καζανιού και στο σημείο αυτό, γίνεται η συλλογή τους. Έπειτα, οι κόκκοι χωρίζονται σε δυο τμήματα και τοποθετούνται σε καλούπια, όπου παραμένουν για 2-3 μέρες.

Με το πέρας αυτού του διαστήματος, το τυρί βυθίζεται σε άλμη για 20 μέρες. Η άλμη συμβάλλει αισθητά στην ωρίμανση της παρμεζάνας, καθώς και στην γεύση της. Μετά την απορρόφηση του αλατιού, η παρμεζάνα ωριμάζει για ακόμα 12 μήνες και στη συνέχεια, είναι πλέον έτοιμη για κατανάλωση [1, 18].

## **1.5 Βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την ανάλυση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας**

### **1.5.1 Ανάλυση παρμεζάνας, με τη μέθοδο της απευθείας απόσταξης, υπό συνθήκες κενού**

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν το πτητικό προφίλ της παρμεζάνας, δεν θεωρούνται επαρκή. Ωστόσο, μετά από ενδελεχή έρευνα σε διάφορες δημοσιεύσεις

διαπιστώθηκε ότι, τα κύρια συστατικά που συμβάλλουν στο άρωμα και την γεύση της παρμεζάνας, ανήκουν στις κατηγορίες των εστέρων, αλκοολών, κετονών, αλδεϋδών, αζωτούχων ενώσεων και λακτονών [2].

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια μέθοδο εκχύλισης των πτητικών συστατικών, η οποία βασίζεται στην απευθείας απόσταξη, υπό συνθήκες κενού. Με αυτή τη διαδικασία, παράγεται ένα υδατικό απόσταγμα, το οποίο περιέχει πτητικά συστατικά και επακόλουθα, εκχυλίζεται με οργανικούς διαλύτες και συμπυκνώνεται.

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν, με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας και του φασματομέτρου μάζας, ανάλογα με την κατηγορία που ανήκουν, καθώς και τα χαρακτηριστικά αρώματα τους, τα οποία προσδιορίστηκαν, με τη χρήση οσφρητικών οργάνων [2].

**Πίνακας 1:** Πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην παρμεζάνα, με **απευθείας απόσταξη, υπό συνθήκες κενού**

<b>Εστέρες</b>	
<b>Πτητική ένωση</b>	<b>Περιγραφή αρώματος</b>
Methyl butanoate	
Ethyl butanoate	Φρουτώδες, γλυκό
Isopropyl butanoate	Φρουτώδες
3-Methylbutyl acetate	Φρουτώδες
Propyl butanoate	
Methyl hexanoate	Ανανάς
Butyl butanoate	Ανανάς, φρουτώδες
Isoamyl isobutyrate	Μέλι
Ethyl hexanoate	Φρουτώδες, κρασί
Isopropyl hexanoate	
3-Methylbutyl butanoate	
Ethyl heptanoate	Φρουτώδες, κρασί
Methyl octanoate	Φρουτώδες
Isobutyl hexanoate	Μήλο
Butyl hexanoate	Φρουτώδες, κρασί

Ethyl octanoate	
2-Methylbutyl hexanoate	
Ethyl nonanoate	Λιπαρό, φρουτώδες
Ethyl decenoate	
Ethyl dodecanoate	
<b>Κετόνες</b>	
2-Pentanone	Γλυκό, φρουτώδες, τυρί
3-Hydroxy-2-butanone	Βούτυρο
2-Hexanone	
5-Hepten-2-one	
2-Heptanone	Κανέλα, πικάντικο
2-Methyl-6-hepten-5-one	
2-Octanone	
8-Nonen-2-one	
2-Nonanone	Φρουτώδες
2-Decanone	
2-Undecanone	
<b>Αλκοόλες</b>	
1-Butanol	
2-Pentanol	
3-Methyl-3-buten-1-ol	Ποώδες
3-Methyl-1-butanol	Ούισκι
2-Methyl-1-butanol	Ούισκι
1-Pentanol	
3-Methyl-2-buten-1-ol	Λεβάντα
Furfuryl alcohol	Ζάχαρη
1-Hexanol	Φρουτώδες
2-Heptanol	Ελαιώδες
1-Heptanol	Ελαιώδες
1-Octen-3-ol	Μανιτάρι

2-Nonanol	Πεπόνι
1-Butanol	
<b>Αλδεΐδες</b>	
3-Methyl-butanal	Μήλο
3-Methyl-thiopropional	
Benzaldehyde	Αμύγδαλο
Nonanal	Λιπαρό
Decanal	Πορτοκάλι
Undecanal	
3-Methyl-butanal	Μήλο
<b>Πυραζίνες</b>	
2,6-Dimethyl pyrazine	Κακάο, καφές
2,3-Dimethyl pyrazine	Καφές, φυστικοβούτυρο
Trimethyl pyrazine	Πατάτα, κακάο
3-Ethyl-2,5-Dimethyl pyrazine	Καφές
2-Methyl-3,5-diethyl pyrazine	Κακάο
<b>Λακτόνες</b>	
γ-Decalactone	Φρουτώδες, ροδάκινο
δ-Decalactone	Καρύδα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, ανιχνεύθηκαν 57 πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν 20 εστέρες, 11 κετόνες, 13 αλκοόλες, 6 αλδεΐδες, 5 πυραζίνες και 2 λακτόνες.

Οι **εστέρες** αποτελούσαν τα βασικά συστατικά στο υδατικό απόσταγμα της παρμεζάνας, σχεδόν κατά το ήμισυ των συνολικών πτητικών συστατικών. Το αμέσως μεγαλύτερο ποσοστό των πτητικών συστατικών ανήκει στις **αλκοόλες**, η παρουσία των οποίων, υποδεικνύει την αδύναμη διαδικασία της ζύμωσης, κατά τη διάρκεια του τυροπήγματος. Αυτό, δικαιολογείται από το γεγονός ότι, στο φρέσκο γάλα οι αλκοόλες αποτελούν το 2-5 % των συνολικών πτητικών ενώσεων [2].



Έπειτα, ακολουθούν οι **κετόνες**, δίνοντας ιδιαίτερη σημασία στις 2-αλκανόνες, όπως η 2-πεντανόνη, η 2-επτανόνη και η 2-νονανόνη, όπου εντοπίζονται αισθητά στην παρμεζάνα και προκύπτουν από την οξείδωση και έπειτα, την αποκαρβοξυλίωση [2].

Τα μικρά ποσοστά των **αλδεϋδών** υποδηλώνουν ωρίμανση, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ η παρουσία των **πυραζίνων** σχετίζεται με το τηγάνισμα και το ψήσιμο ποικίλων τροφίμων, όπως οι τηγανητές πατάτες και ο καφές. Για αυτό εξάλλου, προσδίδουν και αυτό το άρωμα, στα προαναφερθέντα τρόφιμα.

Τέλος, οι **λακτόνες** αποτελούν πολύ μικρό ποσοστό και η παρουσία τους δικαιολογείται από το γεγονός ότι, κατά τη διάρκεια της παραγωγής της παρμεζάνας, το τυρόπηγμα θερμαίνεται σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα και σε ποικίλες θερμοκρασίες [2].

#### 1.5.2 Ανάλυση παρμεζάνας, με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο

Μία επιπρόσθετη τεχνική που εφαρμόστηκε για την συγκέντρωση του αρώματος της παρμεζάνας και για την μετέπειτα ανάλυση της, σε αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο μάζας, ήταν η μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο, (HSSPME) [12].

Η διατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν στους 4 °C, μέχρι την χρήση τους. Έπειτα, η παρμεζάνα ζυγιζόταν (7 gr) και τοποθετούταν σε 20 ml headspace vial, το οποίο σφραγιζόταν άμεσα με ειδικό καπάκι. Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν ίνες 75 mm CAR/PDMS, οι οποίες εκτίθονταν στον υπερκείμενο χώρο, στους 22 °C και για χρόνο εκχύλισης 16 ώρες.

Οι πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, αφού συγκρίθηκαν με προηγούμενες δημοσιεύσεις, παρουσιάστηκαν στον παρακάτω πίνακα [12].

**Πίνακας 2:** Πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην παρμεζάνα με HSSPME

Πτητική ένωση	Περιγραφή αρώματος
Methanethiol	
Dimethyl sulfide	Σκόρδο
2-Butanone	Ακετόνη
Methyl butanoate	Μήλο

Diacetyl	Γλυκό, βούτυρο
Ethyl butanoate	Φρουτώδες, πεπόνι
Dimethyl disulfide	Κρεμμύδι, σκόρδο
Methyl-butanal	
Ethyl pentanoate	Γλυκό, πεπόνι
2-Heptanone	Γλυκό
Ethyl hexanoate	Φρουτώδες, πεπόνι, σταφύλι
Methyl pyrazine	Ξηροί καρποί
Methylbutyl butanoate	Φρουτώδες
2-Octanone	Φρουτώδες
1-Octene-3-one	Μούχλα
2,5-Dimethyl pyrazine	Ξηροί καρποί
2,6-Dimethyl pyrazine	Ξηροί καρποί
Dimethyl trisulfide	Πικάντικο, σκόρδο
Methyl propyl pyrazine	Ξινό
2-Ethyl-5-methyl pyrazine	Φυστικοβούτυρο
2-nonanone	Ροδάκινο
Trimethyl pyrazine	
Dimethylethyl pyrazine	Ωμή πατάτα
Methional	Ψημένη πατάτα
Tetramethyl pyrazine	Ωμή πατάτα
Acetic acid	Ξύδι
2-Nonenal	Αγγούρι
3,5-Diethyl 2-methyl pyrazine	Ξινό
Sesquiterpene	Μούχλα
Butanoic acid	
Isovaleric acid	Μουχλιασμένο τυρί
Naphthalene	
Methylthiol propanol	Σκόρδο
1,4-Dimethyl tetrasulfide	
Pentanoic acid	
γ-Hexalactone	Καρύδα, γλυκό

Hexanoic acid	Έντονο, γίδα
$\gamma$ -Octalactone	
$\delta$ -Decalactone	
2-Phenylethyl alcohol	
Heptanoic acid	Έντονο, γίδα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, ταυτοποιήθηκαν 41 ενώσεις, πολλές από τις οποίες ( $\gamma$ -Octalactone,  $\delta$ -Decalactone, Methyl butanoate κλπ.), ταυτίζονται με την προηγούμενη μέθοδο.

Πιο συγκεκριμένα, οι **εστέρες** αποτελούν μεγάλο ποσοστό των συνολικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στην παρμεζάνα. Ωστόσο, μόνο οι ethyl butanoate, ethyl pentanoate και ethyl hexanoate, συμβάλλουν αισθητά στο άρωμα του τυριού, με βάση τα οσφρητικά όργανα.

Το ίδιο ισχύει και για τις **κετόνες**, οι οποίες αν και πολυάριθμες, δεν επηρεάζουν αξιοσημείωτα το άρωμα της. Όσον αφορά τις **πυραζίνες**, οι trimethyl- και tetramethyl-pyrazine, συναντώνται συχνά σε σκληρά τυριά και προσδίδουν ένα άρωμα, που παραπέμπει σε ξινή πατάτα και φασόλια.

Τέλος, σχετικά με τις **λακτόνες**, βρέθηκε ότι η  $\delta$ -decalactone, διαθέτει μια ήπια οσμή, η οποία παραπέμπει σε καρύδα και αποτελεί σημαντικό συστατικό της παρμεζάνας [12].

### 1.6 Μέθοδοι εκχύλισης των πτητικών συστατικών του τυριού

Η εκχύλιση των πτητικών συστατικών πρέπει να πραγματοποιείται, χωρίς την οποιαδήποτε ποσοτική και ποιοτική μεταβολή στην σύστασή τους. Μερικές τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί, με σκοπό την ανάλυση πτητικών ενώσεων στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι [1, 12]:

- Απόσταξη, υπό συνθήκες κενού
- Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού
- Τεχνικές που βασίζονται στην εξυγίανση και την “παγίδευση” (purge & trap techniques)
- Απόσταξη ατμών
- Τεχνικές headspace (static & dynamic headspace)
- Μικροεκχύλιση στερεής φάσης

## 1.7 Πλεονεκτήματα μικροεκχύλισης στερεής φάσης, για την ανάλυση πτητικού προφίλ τυριού, σε σύγκριση με προγενέστερες τεχνικές

Οι αναλύσεις ενώσεων του τυριού με παραδοσιακές μεθόδους, συνήθως περιλαμβάνουν τη χρήση εξοπλισμού συγκέντρωσης-εκχύλισης. Μερικές από αυτές είναι η απόσταξη, υπό συνθήκες κενού, η μικροεκχύλιση υγρού-υγρού και πιο πρόσφατα, τεχνικές που αφορούν την εξυγίανση και την παγίδευση.

Η απόσταξη, υπό συνθήκες κενού, αν και αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο, συνεπάγεται τη χρήση εύθραυστου εξοπλισμού, οργανικού διαλύτη και απαγορευτικά, αυξημένης κατανάλωσης χρόνου.

Η μικροεκχύλιση υγρού-υγρού συμφέρει οικονομικά, αλλά διαθέτει ένα σημαντικό μειονέκτημα, απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες, έχοντας ως συνέπεια, χημικά σφάλματα και απώλεια πτητικών ενώσεων.

Επιπροσθέτως, οι προσεγγίσεις που σχετίζονται με εξυγίανση και παγίδευση, μολονότι χαρακτηρίζονται πετυχημένες, απαιτούν ειδικό εξοπλισμό, ενώ η απόσταξη ατμών μπορεί να προκαλέσει απώλεια πτητικών ενώσεων, καθώς και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, χαρακτηρίζονται ως επιβλαβείς.

Η static headspace ανάλυση, αν και θεωρείται απλή, δε διαθέτει ευαισθησία, ενώ η dynamic headspace, μολονότι ξεπερνά αυτό το πρόβλημα, κοστίζει πολύ και οδηγεί στην αυξημένη κατανάλωση χρόνου.

Στον αντίποδα, η μικροεκχύλιση στερεής φάσης, καταφέρνει να αντιμετωπίσει τα παραπάνω προβλήματα και επομένως, καθίσταται η πιο κατάλληλη μέθοδος για αναλύσεις πτητικών ενώσεων.

Η προαναφερθείσα μικροεκχύλιση μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και παρέχει μία γρήγορη, απλή, χωρίς διαλύτη μέθοδο, για τη συγκέντρωση ενώσεων σε γαλακτοκομικά προϊόντα, με σκοπό την ανάλυσή τους στον αέριο χρωματογράφο και το φασματομέτρο μάζας. Αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο και διαθέτει πολλά πλεονεκτήματα, σχετικά με την ευαισθησία και την ευελιξία της, καθώς υπάρχει μία ποικιλία επικαλύψεων για την ίνα, η οποία βρίθκει εκχυλιστικών φάσεων.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος δε στερείται μειονεκτημάτων. Το βασικότερο είναι η μικρή διάρκεια ζωής της ίνας, σε συνδυασμό με το μεγάλο κόστος της, γεγονότα που την καθιστούν ιδιαίτερα κοστοβόρα. Μολονότι, όταν

πραγματοποιείται δειγματοληψία στον υπερκείμενο χώρο, αυξάνεται δραστικά η διάρκεια ζωής της, το κόστος της διαδικασίας παραμένει υψηλό [29].

Συμπερασματικά, η μικροεκχύλιση στερεής φάσης, αν και διαθέτει κάποια μειονεκτήματα, παίζει καταλυτικό ρόλο στην ανάλυση ενώσεων, οι οποίες συναντώνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, στο κρασί, καθώς και σε άλλα προϊόντα ζύμωσης [12, 27].

## 1.8 Μικροεκχύλιση (Microextraction)

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται όλο και περισσότερο η παγκόσμια ζήτηση για την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων, μέσω μιας πιο οικολογικής προσέγγισης. Έτσι, αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος, η οποία ονομάζεται **μικροεκχύλιση**. Η συγκεκριμένη τεχνική οδήγησε στην ευκολότερη προετοιμασία δείγματος, σε μειωμένη κατανάλωση εκχυλιστικού μέσου και σε απλούστευση της αρχικής τεχνικής [10, 11].

Αποτελεί ουσιαστικά, την σμίκρυνση των κλασσικών τεχνικών εκχύλισης και συνέβαλε έμπρακτα στην ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος και της ποσότητας της εκχυλιστικής φάσης, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος. Ωστόσο, το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου μικροεκχύλισης είναι η επιτάχυνση μεταφοράς της μάζας, κατά την διαδικασία της ρόφησης και της εκρόφησης στο αναλυτικό όργανο, ενώ συγχρόνως εμποδίζει την έμφραξη του αναλυτικού οργάνου από προσμίξεις.

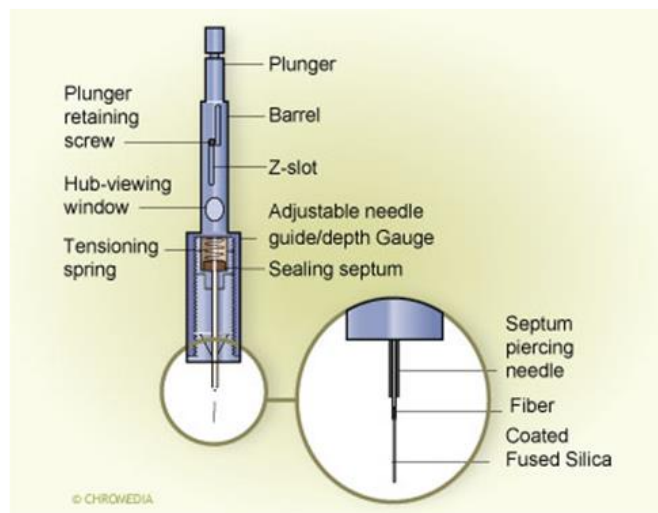
Υπάρχουν δύο βασικές τεχνικές μικροεκχύλισης, η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME) και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) [21].

### 1.8.1 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME) αποτελεί μία καινοτόμο, οικολογική μέθοδο ανάλυσης πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων σε δείγματα. Εφευρέθηκε από τον J. Pawliszyn και την εργαστηριακή του ομάδα στο πανεπιστήμιο του Waterloo στον Καναδά, το 1989 [19].

Η συσκευή δειγματοληψίας της αποτελείται από μια τριχοειδή ίνα, από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) και επικαλύπτεται από υμένιο υγρό πολυμερικού υλικού, το οποίο μπορεί να είναι, είτε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), είτε Carboxen (CAR). Κάθε ίνα είναι συνδεδεμένη με μία στατική φάση, πάνω στην

επιφάνεια της οποίας, βρίσκεται το υλικό που πραγματοποιεί την ρόφηση (στατική φάση) [20].



**Εικόνα 1:** Συσκευή δειγματοληψίας SPME [5]

Στο εμπόριο κυκλοφορούν διάφοροι τύποι ινών, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους στο πάχος και στο υλικό της στατικής φάσης. Η επιλογή της στατικής φάσης εξαρτάται από το είδος των εξεταζόμενων ουσιών. Γενικά, για πολικές ουσίες χρησιμοποιούνται πολικές στατικές φάσεις, ενώ για μη πολικές ουσίες, όπως είναι η πλειοψηφία των πτητικών ενώσεων, μη πολικές στατικές φάσεις. Για τις πτητικές ενώσεις, συνιστάται μεγαλύτερο πάχος επίστρωσης, σε αντίθεση με τις ημι-πτητικές που προτιμούνται τα λεπτότερα.

Αναλυτικά τα **στάδια** της SPME είναι [10, 11]:

1. διάτρηση του ελαστικού διαφράγματος του φιαλιδίου από το έμβολο
2. πίεση εμβόλου προς τα κάτω και έκθεση της ίνας
3. μεταφορά των συστατικών στην ίνα
4. προστασία της ίνας εντός της βελόνας και απόσυρσή της από το φιαλίδιο
5. εισαγωγή της βελόνας στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου
6. εκρόφηση των επιθυμητών συστατικών από την ίνα και μεταφορά τους από την κινητή φάση, προς τη χρωματογραφική στήλη
7. εξαγωγή της βελόνας από τον εισαγωγέα δείγματος

Μερικοί **παράγοντες** που επηρεάζουν την εκχυλιστική ικανότητα του SPME είναι [10, 11]:

- ✓ η επικάλυψη της ίνας
- ✓ η πίεση
- ✓ η θερμοκρασία
- ✓ ο χρόνος εκχύλισης
- ✓ η ανάδευση του δείγματος
- ✓ ο όγκος της υπερκείμενης φάσης
- ✓ το pH

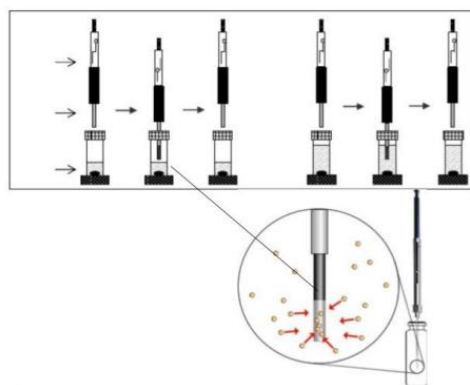
### 1.8.2 Τρόποι δειγματοληψίας SPME

Η μέθοδος SPME μπορεί να εφαρμοστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους, κατά το στάδιο της δειγματοληψίας.

Η πρώτη είναι με απευθείας εισχώρηση της ίνας στο δείγμα (Direct SPME), η δεύτερη είναι με την τοποθέτησή της, στην υπερκείμενη φάση (Headspace SPME) και η τρίτη με την απευθείας έκθεση της ίνας στο μίγμα, χρησιμοποιώντας ειδική μεμβράνη (MembraneProtection SPME) [10].

**Πίνακας 3:** Κριτήρια επιλογής τρόπου δειγματοληψίας [6]

Τρόπος δειγματοληψίας	Πτητικότητα	Μήτρες
Απευθείας εισχώρηση της ίνας στο δείγμα ( <b>Direct SPME</b> )	Μεσαία =>Χαμηλή	Χωρίς προσμίξεις αέρια ή υγρά δείγματα
Με την τοποθέτηση της ίνας, στην υπερκείμενη φάση ( <b>Headspace SPME</b> )	Υψηλή =>Μεσαία	Πολύπλοκες, στερεές μήτρες
Με την απευθείας έκθεση της ίνας στο μίγμα, χρησιμοποιώντας ειδική μεμβράνη ( <b>MembraneProtection SPME</b> )	Χαμηλή	Πολύπλοκα δείγματα



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση δειγματοληψίας στον υπερκείμενο χώρο μεταξύ του πώματος και της επιφάνειας υγρού (2η περίπτωση) και απευθείας μέσα στο υγρό (1η περίπτωση) [7]

#### **1.8.2.1 Άμεση δειγματοληψία στερεής φάσης (Direct SPME)**

Η απευθείας εκχύλιση των εξεταζόμενων συστατικών, δηλαδή με απευθείας εμβάπτιση της ίνας στο διάλυμα του δείγματος, εφαρμόζεται όταν η εξεταζόμενη ένωση εμφανίζει πολύ μικρή ή καθόλου πτητικότητα. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να αποφεύγονται οι ιδιαίτερα όξινες ή αλκαλικές συνθήκες, για την αποφυγή της καταστροφής της ίνας.

Η εφαρμογή της Direct SPME προϋποθέτει την έκθεση της ίνας στο διάλυμα του δείγματος, σε ορισμένη θερμοκρασία που ποικίλλει (30–100°C), με ταυτόχρονη ανάδευση για 15–60 λεπτά, ενώ έπεται ο καθαρισμός της, με εμβάπτιση της ίνας σε διαλύτη, πριν την έγχυση στο GC ή LC για ανάλυση [10, 11].

#### **1.8.2.2 Δειγματοληψία με μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο (Headspace Solid Phase Micro Extraction, HSSPME)**

Συγκριτικά με τους προαναφερθέντες τρόπους δειγματοληψίας, η **μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο**, προτιμάται κατά την ανάλυση σύνθετων μιγρών, καθότι η επιστρωμένη ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο, χωρίς να έρθει σε επαφή με το δείγμα προς ανάλυση. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η προστασία της ίνας.

Ακόμα, η HSSPME επιλέγεται στην περίπτωση που το επιθυμητό συστατικό είναι μία πτητική ή ημιπτητική ουσία, ειδικά αν θα ήταν αδύνατη η εκχύλιση της ουσίας και η προσρόφηση της από την ίνα. Όσον αφορά τις τελευταίες ουσίες, ο χρόνος που απαιτείται για να επέλθει η ισορροπία είναι μεγάλης διάρκειας και για αυτό πολλές φορές, η HSSPME συνδυάζεται με ανάδευση ή αύξηση της θερμοκρασίας.



Βέβαια, στις αναλύσεις που σχετίζονται με τρόφιμα, όπως και η δοθείσα, αποφεύγονται οι υψηλές θερμοκρασίες, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε αποσύνθεση ενώσεων, χημικές αντιδράσεις ή ακόμα και παραγωγή παραπροϊόντων. Για αυτό το λόγο, προτείνεται η δειγματοληψία σε ήπιες θερμοκρασίες και υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης (vac-HSSPME), συνδυασμός ο οποίος πετυχαίνει υψηλή αποτελεσματικότητα εκχύλισης και ευαισθησία σε μικρότερο χρόνο εκχύλισης, από ότι σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (regular-HSSPME) [30].

Η βασική αρχή της HSSPME είναι η διαδικασία διαχωρισμού της ισορροπίας μεταξύ του αναλύτη και των τριών φάσεων (δείγμα ή φάση της μήτρας, υπερκείμενη φάση και φάση εκχύλισης της ίνας). Έτσι, στην συγκεκριμένη περίπτωση, κατά τη διάρκεια δειγματοληψίας, οι εξεταζόμενες ενώσεις μεταφέρονται από τη παρμεζάνα, στον υπερκείμενο χώρο και έπειτα στην ίνα και μεταξύ δύο διεπιφανειών (παρμεζάνας/υπερκείμενου χώρου και υπερκείμενου χώρου/ίνας). Η μεταφορά μάζας ενώσεων στη διεπιφάνεια υπερκείμενου χώρου/ίνας αποτελεί γρήγορη διαδικασία, σε αντίθεση με τη μεταφορά μάζας αναλυτών από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο, όπου ανάλογα με την πτητικότητα του αναλύτη, καθορίζεται ο ρυθμός που πραγματοποιείται η εκχύλιση [30].

Υποθέτοντας ότι έχει περάσει επαρκής χρόνος δειγματοληψίας για να επέλθει ισορροπία, είναι εμπεριστατωμένο ότι, η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίστηκε από την ίνα δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$C_f^{\infty} V_f = \frac{K_f K_g V_s V_f}{K_f K_g V_f + K_g V_g + V_s} C_s^0 \quad (1)$$

- $C_s^0$ : συγκέντρωση του δείγματος, πριν την έκθεση του στην ίνα
- $V_s$ : όγκος του δείγματος
- $V_g$ : όγκος του υπερκείμενου χώρου
- $V_f$ : όγκος της επικάλυψης της ίνας
- $K_g = C_g^{\infty} / C_s^{\infty}$ : συντελεστής κατανομής υπερκείμενης/υγρής φάσης
- $K_f = C_f^{\infty} / C_g^{\infty}$ : συντελεστής κατανομής ίνας/αέριας φάσης
- $C_s^{\infty}$ : συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας στο δείγμα, σε συνθήκες ισορροπίας
- $C_f^{\infty}$ : συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας στην ίνα, σε συνθήκες ισορροπίας
- $C_g^{\infty}$ : συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας στον υπερκείμενο χώρο, σε συνθήκες ισορροπίας

Πριν την εισαγωγή της ίνας, το δείγμα αφήνεται να ισορροπήσει με τον υπερκείμενο χώρο. Μετά από αυτή την περίοδο, η ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο και αρχίζει αμέσως να απορροφά τα μόρια της εξεταζόμενης ουσίας από την αέρια φάση.

Σε αυτό το στάδιο, σχετικά με την ανάλυση υγρών δειγμάτων, για ενώσεις που διαθέτουν υψηλή τιμή σταθεράς Henry, όπως είναι οι πτητικές, η ποσότητα αναλυόμενης ουσίας που έχει απορροφήσει η ίνα, μπορεί να είναι πολύ μικρή σε σχέση με αυτή που υπάρχει ήδη στον υπερκείμενο χώρο, με αποτέλεσμα την επίτευξη μίας γρήγορης ισορροπίας, μεταξύ των τριών φάσεων που εμπλέκονται.

Στον αντίποδα, για ενώσεις με χαμηλή τιμή σταθεράς Henry, όπως είναι οι ημι-πτητικές, γίνεται ταχεία απορρόφηση αναλυόμενης ουσίας από την ίνα [22, 23].

Στην συνέχεια, θα γίνει ανάλυση των παραμέτρων που επηρεάζουν την τεχνική και τα αποτελέσματα της. Η θεωρία της θερμοδυναμικής μπορεί να προβλέψει τα αποτελέσματα που προκύπτουν όταν μεταβάλλουμε κάποιες παραμέτρους, με αποτέλεσμα τη μείωση των επαναλήψεων των πειραμάτων που απαιτούνται [31].

### **Επίδραση ίνας**

Αρχικά, η επιλογή της ίνας γίνεται με βάση τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των ουσιών που εμπεριέχονται στο εξεταζόμενο δείγμα, δηλαδή με βάση το μοριακό τους βάρος, το σημείο βρασμού τους, την πτητικότητα και την πολικότητά τους. Πιο συγκεκριμένα, τα πτητικά, αρωματικά συστατικά ανήκουν στην κατηγορία των μη πολικών ουσιών και επομένως, η βέλτιστη επιλογή ίνας για την ανάλυση τους θα ήταν μία μη πολική.

Το πάχος της επικάλυψης παίζει εξίσου καταλυτικό ρόλο, καθώς όσο πιο παχιά είναι, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα αναλύτη εκχυλίζεται. Επίσης, οι ίνες με μεγαλύτερο πάχος επιλέγονται για τις πιο πτητικές ενώσεις, ενώ οι λεπτότερες, για τις λιγότερο πτητικές [11].

Υπάρχουν οι εξής τύποι ινών [10, 28]:

- ✚ Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)
- ✚ Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)
- ✚ Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS)
- ✚ Carboxen/Polydimethylsiloxane (Carboxen/PDMS)
- ✚ Polyacrylate
- ✚ PolyethyleneGlycol (PEG)
- ✚ Polycrate (PA)

### Επίδραση όγκου υπερκείμενου χώρου

Οι κινητικές εκχύλισης στη δειγματοληψία, στον υπερκείμενο χώρο, εξαρτώνται από τον όγκο του. Εάν είναι επαρκώς μεγάλος, ο αναλύτης εκχυλίζεται σχεδόν αποκλειστικά από την αέρια φάση και η ισορροπία επέρχεται γρήγορα. Από την άλλη, αυτό οδηγεί στη μείωση της ευαισθησίας της τεχνικής.

Η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την ίνα, ανεξάρτητα από το είδος της δειγματοληψίας υπολογίζεται από την εξίσωση (1).

Για πτητικές ενώσεις, το  $K_g$  είναι συνήθως κοντά στο 1, το οποίο σημαίνει ότι ο όγκος του υπερκείμενου χώρου μπορεί να αγνοηθεί, μόνο όταν είναι κοντά στο μηδέν.

Οι ημι-πτητικές ενώσεις έχουν πολύ χαμηλότερο  $K_g$ . Για αυτό ο όρος  $K_g V_g$  είναι ασήμαντα μικρός. Ωστόσο, μια τέτοια υπόθεση μπορεί να μεταβληθεί. Ο συνδυασμός των  $K_g$  και  $K_f K_g$  μίας ένωσης μπορεί να καθορίσει το μέγεθος της επίδρασης του όγκου δείγματος στην ποσότητα που εκχυλίζεται στο σύστημα τριών φάσεων.

Υποθέτοντας ότι, λιγότερο από το 1% της αρχικής ποσότητας που βρίσκεται στο δείγμα εκχυλίζεται από την ίνα, δηλαδή,  $n = C_f^0 V_f \leq 0,01$ , η εξίσωση (1) παίρνει την εξής μορφή:

$$V_s \geq \frac{99 V_f K_f K_g}{1 + \alpha K_g} \quad (2)$$

- $\alpha = V_g / V_s$

Από την εξίσωση (2) μπορεί να υπολογιστεί ο μικρότερος όγκος δείγματος που δεν επηρεάζει την ποσότητα του αναλύτη, που εκχυλίζεται από την ίνα. Εάν ο αναλύτης “ελκύεται” από την πολυμερή φάση της SPME, σημαίνει ότι ο όρος  $K_f K_g$  είναι πολύ μεγάλος και  $K_g K_f V_f \gg K_g V_g + V_s$ , επακόλουθα η εξίσωση (2) έχει τη μορφή [31]:

$$n = V_s C_s^0 \quad (3)$$

### **Επίδραση θερμοκρασίας**

Τόσο η συγκέντρωση των ημι-πτητικών ενώσεων, στην αέρια φάση, σε θερμοκρασία δωματίου, όσο και οι ρυθμοί εκχύλισης, στον υπερκείμενο χώρο, είναι αναλογικά χαμηλοί. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί στην αύξηση των συντελεστών Henry και του συντελεστή διάχυσης, αλλά σε μείωση της ποσότητας των εξεταζόμενων ουσιών που εκχυλίζονται στην ισορροπία. Έτσι, αυτή η αύξηση μπορεί να έχει αξιοσημείωτη επίδραση στην ταχύτητα εκχύλισης. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία της δειγματοληψίας, ο συντελεστής κατανομής υπερκείμενου χώρου-δείγματος  $K_g$ , οδηγεί σε γρηγορότερους χρόνους ισορροπίας και ανανεώνει τις ενώσεις στον υπερκείμενο χώρο, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης [10, 28].

Το μειονέκτημα της υπερβολικής αύξησης της θερμοκρασίας της δειγματοληψίας και εκχύλισης είναι ο περιορισμός του συντελεστή κατανομής ίνας-υπερκείμενου χώρου,  $K_f$  και μετέπειτα της χωρητικότητας της επικάλυψης,  $K_g K_f V_f$ . Το σύστημα θα οδηγήσει σε πιο γρήγορους χρόνους ισορροπίας, θυσιάζοντας την ευαισθησία της τεχνικής. Ένας τρόπος για να λυθεί αυτό το πρόβλημα είναι με την βελτιστοποίηση όλων των άλλων παραμέτρων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης [31].

### **Επίδραση ανάδευσης**

Για τις ενώσεις που έχουν μεγάλο συντελεστή κατανομής επικάλυψης/δείγματος,  $K_f K_g$ , ο χρόνος δειγματοληψίας μπορεί να είναι σχετικά μεγάλης διάρκειας. Οι χρόνοι εκχύλισης μειώνονται αισθητά, όταν οι αναλύτες εξετάζονται έμμεσα από τον υπερκείμενο χώρο, πάνω από το δείγμα. Η διάχυση των αναλυτών στην αέρια φάση είναι τέσσερις τάξεις μεγαλύτερη από ότι στην υγρή φάση [28, 31].

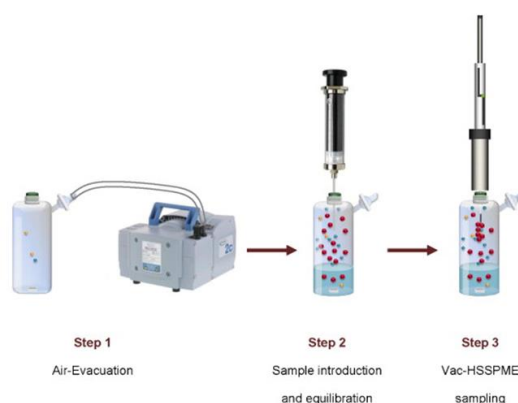
Με συνεχή ανάδευση της υδάτινης φάσης μπορεί να επέλθει γρήγορα ισορροπία μεταξύ της υγρής και αέριας φάσης. Με την έντονη ανάδευση ανανεώνεται διαρκώς η επιφάνεια και καινούργια μόρια έρχονται σε αυτήν. Ωστόσο, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί, ώστε η ανάδευση να είναι σταθερή και συνεχόμενη, ειδάλλως μπορεί να επηρεαστεί η ακρίβεια της τεχνικής [28, 31].

Βέβαια, στην δοθείσα εργασία η μήτρα ήταν στερεή, επομένως η ανάδευση μπορεί να λειτουργήσει διαφορετικά και για αυτό το λόγο, δεν δόθηκε ιδιαίτερη σημασία σε αυτή τη παράμετρο.

### 1.8.2.3 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο, υπό συνθήκες κενού

Μία επιπρόσθετη παράμετρος που μελετήθηκε ενδελεχώς, είναι η πίεση. Ο Brunton θεωρήθηκε ο πρώτος επιστήμονας που παρουσίασε τα οφέλη της μειωμένης πίεσης, στη μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο, διεκπεραιώνοντας πειράματα που σχετίζονται με ομογενοποιημένο, ωμό κρέας γαλοπούλας και υδατικά standards.

Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, η εκκένωση του αέρα πραγματοποιούνταν, αφού είχαν προστεθεί 25 mL δείγματος στα 100 mL του δειγματοληπτικού συστήματος. Για χρόνο δειγματοληψίας 30 λεπτών, παρατηρήθηκε βελτίωση στα χρωματογραφήματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες κενού, σε σύγκριση με αυτά που διεκπεραιώθηκαν υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Επομένως, η vac-HSSPME οδηγεί στη μείωση απωλειών των εξεταζόμενων ενώσεων και σε καλύτερη επαναληψιμότητα της τεχνικής [9].

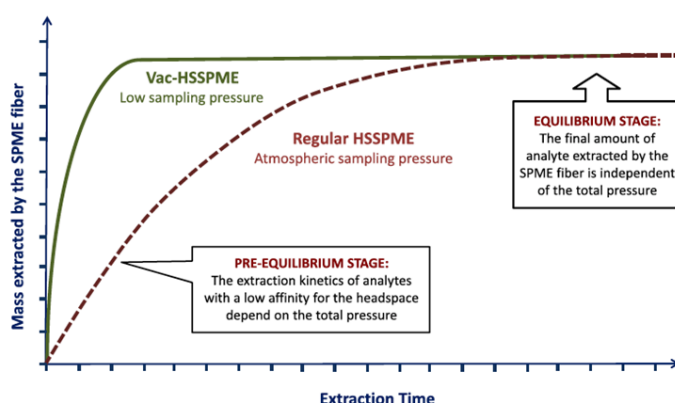


**Εικόνα 3:** Δημιουργία κενού, τοποθέτηση δείγματος με σύριγγα κενού, δειγματοληψία μέσω μικροεκχύλισης στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο, υπό συνθήκες κενού [8]

Σύμφωνα με τη θεωρία της θερμοδυναμικής, στην ισορροπία, οι μερικές πιέσεις και οι συγκεντρώσεις είναι ανεξάρτητες της ολικής πίεσης, αφού οι συντελεστές κατανομής και οι σταθερές Henry επηρεάζονται μόνο σε υψηλές πιέσεις λειτουργίας ( $P > 500$  kPa). Συνεπώς, στην ισορροπία, η ποσότητα του αναλύτη που θα εκχυλιστεί από την ίνα, κάτω από μειωμένη πίεση ή κανονική, θα είναι ίδια. Ωστόσο, η πίεση δειγματοληψίας έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει το ρυθμό εκχύλισης και επακόλουθα τη δυναμική αντίδραση της διαδικασίας δειγματοληψίας μικροεκχύλισης στερεής φάσης σε υπερκείμενο χώρο [37].

Αν και οι συγκεντρώσεις ισορροπίας είναι ανεξάρτητες της ολικής πίεσης του φιαλιδίου, παρατηρήθηκε ότι η μείωση της πίεσης επιφέρει, πριν το στάδιο της ισορροπίας, την αύξηση της κινητικής των ημι-πτητικών ενώσεων. Για τις ενώσεις αυτές, η εφαρμογή της Vac-HSSPME έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης στην μεταφορά μάζας των ενώσεων από την υγρή στην αέρια φάση.

Η Vac-HSSPME έχει υψηλότερη αποδοτικότητα και ευαισθησία σε μικρότερο χρονικό διάστημα και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες δειγματοληψίας σε σύγκριση με τη regular-HSSPME. Το κύριο πλεονέκτημα αυτή της μεθόδου είναι η μείωση του χρόνου ισορροπίας και κατ' επέκταση δειγματοληψίας σε συνθήκες ήπιων θερμοκρασιών. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή διαφόρων προβλημάτων, όπως την αποσύνθεση των προς ανάλυση ενώσεων και η δημιουργία παραπροϊόντων.



**Εικόνα 4:** Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης-ποσότητας αναλύτη που εκχυλίζεται, με τη μέθοδο της vac-HSSPME (πράσινο) και regular-HSSPME (κόκκινο) [37]

Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται ότι στη μέθοδο Vac-HSSPME η ισορροπία του συστήματος έχει επέλθει σε πολύ πιο σύντομο χρονικό διάστημα, συγκριτικά με την regular-HSSPME. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα, στη μέθοδο vac-HSSPME, να μειώνεται ο χρόνος δειγματοληψίας, χωρίς να επηρεάζεται η απόδοση της μεθόδου.

Ωστόσο, ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας τους συστήματος ή της ποσότητας που εκχυλίζεται από την ίνα δεν επηρεάζονται όταν στο εξεταζόμενο διάλυμα οι ενώσεις στόχοι είναι πτητικές, καθώς εκχυλίζονται με γρήγορο ρυθμό. Επομένως, σε περιπτώσεις που οι ενώσεις χαρακτηρίζονται από μεγάλη πτητικότητα, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις δύο μεθόδους δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά.

Γενικά, πριν την εισχώρηση της ίνας του SPME, είναι συνετό να έχει επέλθει ισορροπία. Την στιγμή που η ίνα εκτίθεται στο κενό, αρχίζει να απορροφά μόρια της εξεταζόμενης ουσίας από την υπερκείμενη φάση. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση της ουσίας να μειώνεται γρήγορα και να αναπληρώνεται με την μεταφορά των ουσιών από το δείγμα στο κενό. Έτσι, η μεταφορά μάζας στο κενό αποτελεί μια ταχεία διαδικασία.

Για τις ημιπτητικές ουσίες, η εξάτμιση από το δείγμα στο κενό, καθορίζει το ρυθμό με τον οποίο διεξάγεται η συγκεκριμένη μέθοδος.

Ακόμα, η εξάτμιση των οργανικά, διαλυμένων ουσιών στο νερό, θεωρείται αντίδραση πρώτης τάξεως και η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης στην υγρή φάση ( $C_s$ ) και του χρόνου ( $t$ ) αναλύεται από τον παρακάτω τύπο [22, 23]:

$$C_s = C_s^0 e^{-kt} \quad (4)$$

- **k**: σταθερά ρυθμού εξάτμισης
- $C_s$ : συγκέντρωση στην υγρή φάση
- $C_s^0$ : αρχική συγκέντρωση
- **t**: χρόνος

Ακόμα, προσαρμόζοντας την χημική ισορροπία μάζας, στο υδάτινο σώμα προκύπτει η παρακάτω εξίσωση:

$$V_s \frac{dC_s}{dt} = -K_L A (C_s - C_i) \quad (5)$$

- $C_i$ : συγκέντρωση του αναλύτη στη διεπιφάνεια νερού-αέρα
- **A**: επιφάνεια μεταξύ του δείγματος και της αέριας φάσης
- $K_L$ : συντελεστής ολικής μεταφοράς μάζας στην διεπιφάνεια αέριας φάσης-δείγματος

Θεωρούμε ότι η σταθερά ταχύτητας εξάτμισης ( $k$ ) δίνεται από την εξίσωση [22] :

$$k = \frac{K_L}{L} \quad (6)$$

- $K_L$ : συντελεστής ολικής μεταφοράς μάζας στην διεπιφάνεια αέριας-υγρής φάσης
- **L**: βάθος του διαλύματος σε φιαλίδιο με ομοιόμορφη κατανομή

Ειδικότερα, ο συντελεστής  $K_L$  περιγράφεται από την εξίσωση (7), η οποία ακολουθεί και βασίζεται στη θεωρία των δύο φάσεων, γνωστή ως “two-film theory”, στο μοντέλο πλήρους ανάδευσης συστήματος και θεωρώντας ότι η συνολική μεταφορά

μάζας προέρχεται, είτε από το λεπτό στρώμα της αέριας φάσης, είτε της υγρής ή και από τα δύο στρώματα, τα οποία είναι δίπλα στη διεπιφάνεια δείγματος-αέριας φάσης [38, 39].

$$K_L = \left[ \frac{1}{k_L} + \frac{RT}{k_H k_g} \right]^{-1} \quad (7)$$

- $k_L$ : συντελεστής μαζικής μεταφοράς υγρής φάσης
- $k_g$ : συντελεστής μαζικής μεταφοράς αέριας φάσης
- $K_H$ : συντελεστής Henry
- $T$ : απόλυτη θερμοκρασία
- $R$ : σταθερά αερίων

Η σχέση του συντελεστή μεταφοράς μάζας  $k_g$  και του συντελεστή μοριακής διάχυσης στην αέρια φάση  $D_g$ , είναι ανάλογη υψωμένη σε δύναμη  $m$ , η οποία συνήθως παίρνει τιμές 0.5, 2/3 και 1.

$$k_g \propto D_g^m \quad (8)$$

Για τον υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης εφαρμόζεται το μοντέλο Fuller-Schettler-Giddings για μη πολικές ενώσεις, όπως είναι και οι αρωματικές, υπό χαμηλή πίεση και δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$D_g = \frac{0.001 \times T^{1.75} \sqrt{\frac{1}{M_{air}} + \frac{1}{M_c}}}{P[(\sum V_{air})^{\frac{1}{3}} + (\sum V_c)^{\frac{1}{3}}]^2} \quad (9)$$

- $P$ : συνολική πίεση
- $M_{air}$ : μοριακό βάρος για αέρα
- $M_c$ : μοριακό βάρος για αναλύτη
- $V_{air}$ : γραμμομοριακός όγκος για αέρα
- $V_c$ : γραμμομοριακός όγκος για αναλύτη

Θεωρώντας ότι η απόλυτη θερμοκρασία παραμένει σταθερή και η μέθοδος πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού, υπάρχει χαμηλή ολική πίεση και σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση, αυξάνεται ο συντελεστής μοριακής διάχυσης ( $D_g$ ). Έτσι, θα γίνει αύξηση του συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση ( $k_g$ ) και θα αυξηθεί η συνολική ποσότητα της εξεταζόμενης ουσίας, όσον αφορά τις πτητικές ενώσεις. Ακόμα,



παρατηρείται αύξηση της ποσότητας των ημι-πτητικών ενώσεων, στην περίπτωση των συστημάτων που δεν έχει επέλθει ισορροπία.

Επομένως, συνοψίζοντας, συγκρίνοντας την, προ ισορροπίας Regular-HSSPME και Vac – HSSPME, η δεύτερη, για ενώσεις με μικρή σταθερά Henry (ημι-πτητικές ενώσεις), εμφανίζει υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης και καλή ευαισθησία για συντομότερο χρόνο δειγματοληψίας. Επιπρόσθετα, οι χαμηλότερες θερμοκρασίες που απαιτούνται για την τεχνική υπό συνθήκες κενού διασφαλίζουν την διατήρηση του δείγματος και αποτρέπουν την αποδόμηση του ή τον μετασχηματισμό του [37].

## 1.9 Μικροεκχύλιση με λεπτό φιλμ (Thin Film MicroExtraction, TFME)

### 1.9.1 Ανάλυση μεθόδου

Το 2001 παρουσιάστηκε μια νέα μέθοδος, η **μικροεκχύλιση λεπτού φιλμ** (Thin Film MicroExtraction, TFME), η οποία αποτελεί την εξέλιξη της SPME και συνιστά μία σύγχρονη, συνδυαστική τεχνική δειγματοληψίας και προετοιμασίας του δείγματος [13]. Η ειδοποιός διαφορά της, σε σχέση με την SPME, είναι ότι διαθέτει μεγαλύτερη επιφάνεια και επομένως μεγαλύτερο όγκο της φάσης της εκχύλισης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη βελτίωση της ευαισθησίας, χωρίς να αυξήσουμε το χρόνο δειγματοληψίας και τη διευκόλυνση γρήγορων κινητικών εκχύλισης. Η βελτιωμένη ευαισθησία της τεχνικής με λεπτό φιλμ μπορεί να αποδειχθεί εφαρμόζοντας τη βασική ισορροπία μάζας στην SPME, σε συνθήκες ισορροπίας, όπως διαφαίνεται και στην παρακάτω εξίσωση [25, 26]:

$$n_e^{eq} = \frac{K_{es}V_sV_e}{K_{es}V_e+V_s}C_s^0 \quad (10)$$

- $n_e^{eq}$ : ποσότητα του αναλύτη (αριθμός των moles) που έχει εκχυλιστεί στην φάση εκχύλισης στην ισορροπία
- $K_{es}$ : συντελεστής κατανομής του αναλύτη για τη φάση της εκχύλισης
- $V_s$ : όγκος του δείγματος
- $V_e$ : όγκος της φάσης εκχύλισης
- $C_s^0$ : αρχική συγκέντρωση στο δείγμα

Όπως παρατηρείται το  $n_e^{eq}$  είναι ανάλογο του  $K_{es}$ ,  $V_e$ ,  $C_s^0$  και για μικρής συγκέντρωσης δείγμα, συνιστάται υψηλός συντελεστής κατανομής, με σκοπό να αυξηθεί η αναλυτική ευαισθησία.

Από την στιγμή που η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται, στην SPME, είναι ανάλογη του όγκου της εκχυλιστικής φάσης, η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να βελτιωθεί, αυξάνοντας τον όγκο της εκχυλιστικής φάσης. Η αύξηση του πάχους της επίστρωσης μπορεί να αυξήσει τον συγκεκριμένο όγκο και μετέπειτα, την ευαισθησία της τεχνικής.

Ωστόσο, απαιτείται περισσότερος χρόνος για να επέλθει η ισορροπία, επειδή ο ρυθμός εκχύλισης εξαρτάται από τη διάχυση από τη μήτρα του δείγματος, μέσω μιας περιοριστικής στρώσης, στην εκχυλιστική φάση και παρουσιάζεται στην παρακάτω εξίσωση [13, 25, 26] :

$$t_{95\%}=3*\frac{\delta*Kes*(b-a)}{D} \quad (11)$$

- **$t_{95\%}$** : χρόνος για να επέλθει ισορροπία
- **$(b - a)$** : πάχος της φάσης εκχύλισης
- **$Kes$** : συντελεστής κατανομής
- **$\delta$** : πάχος του περιοριστικού στρώματος
- **$D$** : συντελεστής διάχυσης

Στην απευθείας μικροεκχύλιση βρέθηκε μία γραμμική σχέση μεταξύ του αρχικού ρυθμού εκχύλισης και της επιφάνειας της εκχυλιστικής φάσης. Εντούτοις, για τη μικροεκχύλιση, στον υπερκείμενο χώρο, οι ρυθμοί ήταν χαμηλότεροι, εξαιτίας της αντίστασης της μεταφοράς του αναλύτη στο όριο μήτρας/υπερκείμενου χώρου. Αποδείχθηκε όμως ότι, αυτή η επίδραση του ορίου μπορεί να μειωθεί αυξάνοντας, είτε την ανάδευση, είτε τη θερμοκρασία ή την επιφάνεια της διεπιφάνειας μήτρας/υπερκείμενου χώρου.

Επιπρόσθετα, μία φάση εκχύλισης με μεγαλύτερη επιφάνεια επιταχύνει το ρυθμό εκχύλισης, όπως περιγράφεται και στην παρακάτω εξίσωση και παρουσιάζει ότι ο αρχικός ρυθμός εκχύλισης  $(\frac{dn}{dt})$  είναι ανάλογος με την επιφάνεια της φάσης εκχύλισης (A). Η συγκεκριμένη εξίσωση εφαρμόστηκε στην μικροεκχύλιση λεπτού φιλμ και συζητήθηκε από τον Bruheim. Τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσίασαν ότι στην απευθείας μικροεκχύλιση και με μεμβράνη, ο αρχικός ρυθμός εκχύλισης ήταν γραμμικά ανάλογος με την επιφάνεια της μεμβράνης. Επομένως, ο ιδανικός τρόπος για να αυξηθεί ο όγκος της εκχυλιστικής φάσης και μετέπειτα η ευαισθησία της μεθόδου, θα ήταν να χρησιμοποιηθεί λεπτή εκχυλιστική φάση με μεγαλύτερη επιφάνεια, γεγονός που αποδεικνύεται και από την παρακάτω εξίσωση [13, 25, 26]:

$$\frac{dn}{dt} = \left(\frac{DA}{\delta}\right) * C_s \quad (12)$$

- $\delta$ : πάχος του περιοριστικού στρώματος
- $D$ : συντελεστής διάχυσης
- $C_s$ : αρχική συγκέντρωση δείγματος στην μήτρα

### 1.9.2 Πλεονεκτήματα TFME σε σύγκριση με κλασσικές μεθόδους

Η TFME κατάφερε να διορθώσει, σε αισθητό βαθμό, τα μειονεκτήματα προηγούμενων τεχνικών. Πιο συγκεκριμένα, αν και οι στερεές επικαλύψεις της SPME χαρακτηρίζονται από υψηλή απόδοση εκχύλισης, κάποια εγγενή μειονεκτήματα τους, περιορίζουν την καταλληλότητα τους, σε κάποιες εφαρμογές. Για παράδειγμα, κάποιοι προσροφητές αλληλεπιδρούν ισχυρά με παγιδευμένους αναλύτες. Επιπροσθέτως, για απόλυτη εκρόφιση και εκκαθάριση της ίνας, απαιτείται υψηλή θερμοκρασία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση των προσροφητικών ενώσεων, ειδικά των πολικών.

Σε αντίθεση με την στερεή επικάλυψη, η υγρή είναι πιο σταθερή και έχει τη δυνατότητα να ξεπεράσει τους παραπάνω περιορισμούς. Εντούτοις, το πρωταρχικό της πρόβλημα της υγρής επικάλυψης, θεωρείται ο σχετικά χαμηλός συντελεστής κατανομής, σε σύγκριση με τη μικροεκχύλιση στερεής επικάλυψης [26].

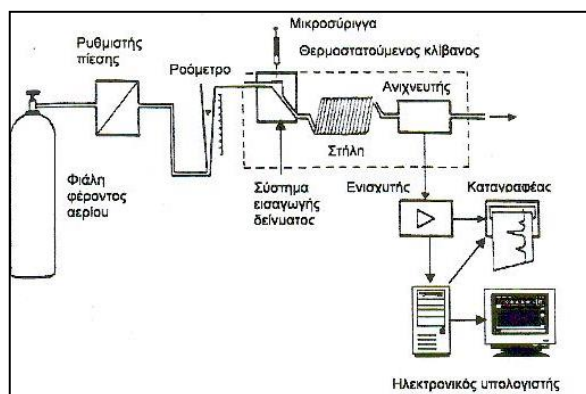
Αυτή την ανεπάρκεια είχε την ικανότητα να διορθώσει η **TFME**, με ένα πιο περιεκτικό τρόπο. Στη μικροεκχύλιση στερεής φάσης, ο όγκος της φάσης της εκχύλισης περιορίζεται αισθητά από το μέγεθος της εξωτερικής βελόνας. Πιο πυκνή επικάλυψη όμως, απαιτεί και βελόνα μεγαλύτερης διαμέτρου και έναν υποδοχέα βελόνας χωρίς septum [26]. Επιπλέον, σύμφωνα με βάση τη θεωρία της κινητικότητας, αυξάνοντας το πάχος της επίστρωσης έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερης διάρκειας χρόνο ισορροπίας.

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μικροεκχύλισης με λεπτό φιλμ μπορεί να θεωρηθεί, η δυνατότητα αποθήκευσης των φιλμ σε ειδικά tubes και η ανάλυση των δειγμάτων σε μετέπειτα χρόνο, χωρίς να έχουμε απώλεια των εξεταζόμενων πτητικών ενώσεων. Ακόμα, το γεγονός ότι απουσιάζει ο διαλύτης, όχι μόνο καθιστά αυτή την τεχνική πιο οικονομική, αλλά και πιο οικολογική, κάνοντας το διαχωρισμό γρηγορότερα. Τέλος, είναι εύκολο σε χρήση και όχι τόσο εύθραυστο, όσο η ίνα του SPME, με αποτέλεσμα να μειώνονται αισθητά τα πειραματικά σφάλματα.

### 1.10 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Τόσο η μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο, όσο και η μικροεκχύλιση λεπτού φιλμ, συνδέονται με την αέρια χρωματογραφία και τη φασματομετρία μάζας, όπου πραγματοποιείται η εκρόφηση των εξεταζόμενων συστατικών και μετέπειτα, η ταυτοποίησή τους.

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα και προϊόντα πετρελαίου.



**Εικόνα 5:** Απεικόνιση διάταξης αέριας χρωματογραφίας [14]

Το **φέρων αέριο** (συνήθως  $N_2$ ,  $He$ ,  $H_2$ ,  $Ar$ ) οδηγείται από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, στη στήλη. Όσον αφορά τη μικροεκχύλιση στερεής φάσης, η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με την είσοδο της εκάστοτε ίνας στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος, στην κορυφή της στήλης. Αντιθέτως, στη μικροεκχύλιση λεπτού φιλμ, τα φιλμ τοποθετούνται πρώτα σε μηχανήμα αυτόματης θερμικής εκρόφησης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο, κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Στη συνέχεια, τα κλάσματα ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό σύστημα. Έπειτα, υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου [10, 11, 14, 15, 16].

Ως **φέρων αέριο** μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Ακόμα, δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό

οδηγεί στην καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Επιπροσθέτως, θα ήταν συνετό να είναι απαλλαγμένο από υγρασία, καθώς η υγρασία απενεργοποιεί τη στατική φάση. Η επιλογή του εξαρτάται κυρίως, από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

Με τη χρήση του  $H_2$ , επιτυγχάνονται ταχύτεροι διαχωρισμοί, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ταχύτητα ροής μεγαλύτερη από τη βέλτιστη, με μικρή μείωση της διαχωριστικής ικανότητας. Εντούτοις, το  $H_2$  μπορεί να αντιδράσει καταλυτικά σε μεταλλικές επιφάνειες με ακόρεστες ενώσεις και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με φασματομετρικό ανιχνευτή μάζας, διότι καταστρέφει το λάδι της αντλίας κενού του ανιχνευτή. Για αυτό το λόγο, το ήλιο θεωρείται το πιο συνηθισμένο **φέρων αέριο**, καθώς είναι συμβατό με τους περισσότερους ανιχνευτές [17].

Η **στήλη** αποτελεί την καρδιά του χρωματογράφου. Ρυθμίζει ουσιαστικά την επιτυχία ή την αποτυχία ενός πειράματος. Η βασική αρχή διαχωρισμού των συστατικών του εξεταζόμενου μίγματος βασίζεται στην προσρόφιση ή την κατανομή αυτών ανάμεσα σε δύο μη αναμιγνύμενες φάσεις, η μία από τις οποίες είναι η κινητή (φέρων αέριο) και η άλλη η στατική (υλικό πλήρωσης της στήλης). Τα χαρακτηριστικά με βάση τα οποία πραγματοποιείται η αξιολόγηση μιας στήλης είναι τα εξής [17]:

- Διαχωριστική ικανότητα (αριθμός θεωρητικών πλακών), δηλαδή μέτρο του διαχωρισμού ο οποίος μπορεί να επιτευχθεί
- Διαφυγή υπόβαθρου, μέτρο της σταθερότητας αλλά και του χρόνου ζωής της στήλης
- Αδράνεια, μέτρο της επίδρασης στην ανάκτηση των ενώσεων
- Μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας, μέτρο σταθερότητας και χρόνου ζωής της στήλης
- Πολικότητα στατικής φάσης, επιλέγεται με γνώμονα τις υπό εξέταση ενώσεις
- Γεωμετρικά χαρακτηριστικά στήλης

Οι χρωματογραφικές στήλες είναι κατασκευασμένες, κατά κανόνα, από ανοξείδωτο χάλυβα, ύαλο, τηγμένο πυρίτιο, τεφλόν οι οποίες μπορεί να είναι είτε στήλες πλήρωσης με διάφορες στατικές φάσεις (packed), είτε τριχοειδείς με εσωτερική επικάλυψη από διάφορα συστατικά (capillary ή open tubular). Ακόμα, η πλήρωση των στηλών μπορεί να πραγματοποιηθεί με κάποιο υπόστρωμα, μια υγρή φάση, πορώδη πολυμερή ή και προσροφητικά υλικά [17].

Το δεύτερο σκέλος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον **ανιχνευτή**, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Ο σκοπός του είναι να δίνει μια απόκριση, η οποία είναι ανάλογη με την συγκέντρωση ή την ποσότητα ενός συστατικού που περνά

μέσα από αυτόν και η απόκριση αυτή να έχει τη μορφή ενός σήματος, το οποίο μπορεί να μετρηθεί. Τα κύρια χαρακτηριστικά λειτουργίας ενός ανιχνευτή αέριας χρωματογραφίας παραθέτονται παρακάτω [17]:

- ❖ **Ευαισθησία:** Υποδηλώνει τη μικρότερη ποσότητα που μπορούμε να ανιχνεύσουμε, αυτή την ορίζει το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)
- ❖ **Γραμμικότητα:** Αν το σήμα που παράγεται από το σύστημα ανίχνευσης είναι ανάλογο με την ποσότητα του συστατικού που περνά μέσα από αυτό, τότε ο ανιχνευτής έχει γραμμική απόκριση
- ❖ **Εκλεκτικότητα:** Ιδανικός ανιχνευτής αποκαλείται αυτός που ανιχνεύει μόνο το συστατικό που μας ενδιαφέρει και όχι όλα τα συστατικά του δείγματος

Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο **καταγραφικό σύστημα** [14, 15, 16, 17].

### 1.11 Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Πολλές φορές οι αέριοι χρωματογράφοι συνδέονται με **φασματόμετρα μάζας (Mass Spectrometer, MS)**. Η φασματομετρία μάζας συνιστά τη βέλτιστη επιλογή ανιχνευτή στην χρωματογραφία, ωστόσο αποτελεί την τεχνική με το μεγαλύτερο κόστος. Το φάσμα μάζας είναι ευαίσθητο και παρέχει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες. Με την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος μπορεί να προσδιοριστεί κάποιο συστατικό σε ένα πολύπλοκο χρωματογράφημα ενώσεων που δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά. Γενικά, η βασική λειτουργία της φασματομετρίας μάζας στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους, με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο ( $m/z$ ) και την καταγραφή τους. Τα **φασματόμετρα μαζών** αποτελούνται από [16,17]:

- ✓ Το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου
- ✓ Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο  $m/z$
- ✓ Τον ανιχνευτή

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο, μεγάλης έντασης και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές, μεταβλητής ακτίνας

στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα, ένα μέρος από τα ιόντα που δεν εστιάζονται, στο κέντρο των διαφραγμάτων, απορρίπτεται.

Ο βομβαρδισμός των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων, αποτελεί το συνηθέστερο τρόπο ιοντισμού και δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά, με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια, κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το  $m/z$ . Υπάρχουν οι εξής αναλυτές [10, 11, 14, 15]:

- αναλυτής τομέα
- τετραπολικός αναλυτής
- παγίδα ιόντων
- αναλυτής χρόνου πτήσης



**Εικόνα 6:** Διάταξη αέριου χρωματογράφου-φασματομέτρου μάζας GC-MS

### 1.12 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Η δοθείσα διπλωματική εργασία είχε ως γενικό σκοπό τη βελτιστοποίηση των συνθηκών (πίεση, θερμοκρασία και χρόνος εκχύλισης) για την ανάλυση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας, με τη χρήση δύο μεθόδων μικροεκχύλισης (TFME και HSSPME), καθώς και τη μεταξύ τους σύγκριση.

Ο βασικός στόχος της συγκεκριμένης έρευνας, ήταν η μελέτη ενός γαλακτοκομικού προϊόντος, σε χαμηλές θερμοκρασίες, με χρήση της τεχνικής, μικροεκχύλισης λεπτού φιλμ. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται, για πρώτη φορά, για την εκχύλιση των πτητικών ενώσεων σε τυρί και μάλιστα, σε χαμηλή θερμοκρασία.

Ειδικότερα, θα μελετηθεί το πτητικό προφίλ της παρμεζάνας στους 4 °C. Η επιλεγθείσα θερμοκρασία ψύξης αποσκοπεί στην αποφυγή της αποσύνθεσης υπαρχόντων ενώσεων και παραγωγής παραπροϊόντων που μπορεί να δημιουργηθούν, λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας.



## 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1 Μικροεκχύλιση λεπτού φιλμ

#### 2.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

##### 2.1.1.1 Αντιδραστήρια

- Ακετόνη της εταιρείας Honeywell (product of France), Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich και καθαρότητας  $\geq 99,5\%$
- Εξάνιο της εταιρείας Fluka, Riedel-de Haën
- Μίγμα αλκανίων σε εξάνιο (C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>) της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Δεκάνιο της εταιρείας Fluka, Riedel-de Haën

##### 2.1.1.2 Όργανα και συσκευές

- ✓ Γυάλινο, διαφανές φιαλίδιο με στρογγυλεμένο κάτω μέρος (SPME vial) των 20 mL με διαστάσεις 75,5×22,5 mm και πυκνωτό λαιμό (Supelco, Bellefonte USA)
- ✓ Τα καπάκια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ιδιοκατασκευές από ανοξείδωτο ατσάλι που φέρουν οπή, ώστε να εφαρμόζεται half hole thermogreen septa LB-1 και O-ring για την τοποθέτηση του λεπτού φιλμ
- ✓ Thin film: PDMS/HLB
- ✓ Διάταξη αυτόματης θερμικής εκρόφησης, TD100- xr Automated thermal desorber (MARKES international)
- ✓ Αέριος χρωματογράφος, Varian 450-GC Gas Chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan)
- ✓ Φασματόμετρο μάζας, Varian 240-MS IT Mass Spectrometer (Shimadzu Corporation, Japan)
- ✓ Πιπέτες των 10 mL και pipetus junior (hirschmann, laborgerate)
- ✓ Incubator (Elven, Athens, Greece)
- ✓ HiSorb Agitator (MARKES international)
- ✓ Αντλία κενού, 4C diaphragm vacuum pump (Vacuum brand, Germany)
- ✓ Εργαστηριακός ζυγός
- ✓ Εργαστηριακή λαβίδα
- ✓ Syringe των 10  $\mu$ L (Agilent Technologies)

### 2.1.2 Παράμετροι λειτουργίας μεθόδου στο GC-MS

Η μέθοδος με την οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των πειραμάτων, στον αέριο χρωματογράφο και στο φασματόμετρο μάζας είχε τις εξής παραμέτρους:

- ✚ Φέρον αέριο: Ήλιο (He)
- ✚ Είδος στήλης: Μερικώς άπολη, τριχοειδής DB-5
- ✚ Μήκος στήλης: 30 m
- ✚ Διάρκεια ανάλυσης: 36.50 min
- ✚ Ροή στήλης: 1.0 mL/min
- ✚ Ενεργός ο φούρνος της στήλης
- ✚ Ενεργή η ψύξη του φούρνου της στήλης
- ✚ Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου:

Temperature (°C)	Rate (°C/min)	Hold (min)	Total (min)
40.0	-	3.00	3.00
185.0	5.0	0.00	32.00
290.0	30.0	1.00	36.50

- ✚ Στην φασματομετρία μάζας το εύρος κυμαίνεται από 50 m/z έως 500 m/z
- ✚ Η θερμοκρασία του εισαγωγέα (injector) είναι 150.0 °C
- ✚ Ο χρόνος κατακράτησης (hold) είναι 10.00 min
- ✚ Ο αέριος χρωματογράφος λειτουργεί με αναλογία διαχωρισμού (Split ratio), ο οποίος υπολογίζεται διαιρώντας την ροή του φέροντος αερίου με την ροή του διαχωρισμένου αεραγωγού
- ✚ Ενεργοποιημένος ο φούρνος του εισαγωγέα

### 2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, σε φιαλίδιο των 20 mL, γινόταν προσθήκη 0,500 gr δείγματος της **παρμεζάνας Grana Padano Leone**. Η συγκεκριμένη παρμεζάνα προμηθεύτηκε από το τμήμα γαλακτοκομικών προϊόντων του “Χαλκιαδάκη ΑΕ” και η χώρα παραγωγής της είναι η Ιταλία. Ύστερα, το φιαλίδιο, σφραγιζόταν με ειδικό καπάκι, πάνω στο οποίο ήταν στερεωμένο το thin film.

Στα συγκεκριμένα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκε ανάδευση, καθώς τα δείγματα ήταν στερεά και δόθηκε περισσότερη έμφαση στην επίδραση της πίεσης. Για

την εκκένωση του αέρα από το φιαλίδιο, χρησιμοποιήθηκε η αντλία κενού, για ένα λεπτό.

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας, το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στον incubator στους 4 °C, ενώ για τους 50 °C, στον agitator, ο οποίος είχε ανενεργή την επιλογή της ανάδευσης και επομένως, λειτουργούσε μόνο ως μηχανήμα θέρμανσης του δείγματος.

Η τελευταία παράμετρος που αξιολογήθηκε ήταν ο χρόνος εκχύλισης, επακόλουθα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για 20, 30 και 40 λεπτά.

Μετά το πέρας της δειγματοληψίας, τα thin films μεταφέρονταν στη διάταξη αυτόματης θερμικής εκρόφησης, όπου ξεκινούσε η ανάλυση και η ταυτοποίηση των προσροφημένων ενώσεων με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας, συζευγμένης με φασματομετρίας μάζας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.



**Εικόνα 7:** Μηχάνημα θέρμανσης για τη διεξαγωγή πειραμάτων στους 50 °C



**Εικόνα 8:** Μικροεκχύλιση παρμεζάνας με λεπτό φιλμ

## 2.2 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης, στον υπερκείμενο χώρο

### 2.2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

#### 2.2.1.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι ίδια με την μέθοδο της TFME.

#### 2.2.1.2 Όργανα και συσκευές

- ✓ Γυάλινο διαφανές φιαλίδιο με στρογγυλεμένο κάτω μέρος (SPME vial) των 20 mL με διαστάσεις 75,5×22,5 mm και πτυχωτό λαιμό (Supelco, Bellefonte USA)
- ✓ Καπάκια: Magnetic Screw-Thread Caps, 18 mm (Restek, Bellefonte, USA)
- ✓ SPME holder (Supelco, Bellefonte, PA)
- ✓ SPME fiber: DVB/CAR/PDMS d<sub>f</sub> 50/30 μm/1 cm length fiber (Millipore Sigma, Bellefonte, PA, USA)
- ✓ Αέριος χρωματογράφος, Varian 450-GC Gas Chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan)
- ✓ Φασματοόμετρο μάζας, Varian 240-MS IT Mass Spectrometer (Shimadzu Corporation, Japan)
- ✓ Incubator (Elven, Athens, Greece)
- ✓ HiSorb Agitator (MARKES international)
- ✓ Αντλία κενού, 4C diaphragm vacuum pump (Vacuum brand, Germany)
- ✓ Εργαστηριακός ζυγός
- ✓ Εργαστηριακή λαβίδα
- ✓ Syringe των 10 μL (Agilent Technologies)

### 2.2.2 Παράμετροι λειτουργίας μεθόδου στο GC-MS

Η μέθοδος με την οποία πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των πειραμάτων, στον αέριο χρωματογράφο και στην φασματομετρία μάζας είχε τις εξής παραμέτρους:

- ✚ Φέρον αέριο: Ήλιο (He)
- ✚ Είδος στήλης: Μερικώς άπολη, τριχοειδής DB-5
- ✚ Μήκος στήλης: 30 m
- ✚ Διάρκεια ανάλυσης: 36.50 min
- ✚ Ροή στήλης: 1.0 mL/min
- ✚ Ενεργός ο φούρνος της στήλης
- ✚ Ενεργή η ψύξη του φούρνου της στήλης
- ✚ Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου:

Temperature (°C)	Rate (°C/min)	Hold (min)	Total (min)
40.0	-	3.00	3.00
185.0	5.0	0.00	32.00
290.0	30.0	1.00	36.50

- ✚ Στην φασματομετρία μάζας το εύρος κυμαίνεται από 50 m/z έως 500 m/z
- ✚ Η θερμοκρασία του εισαγωγέα (injector) είναι 250.0 °C
- ✚ Ο χρόνος κατακράτησης (hold) είναι 10.00 min
- ✚ Ο αέριος χρωματογράφος λειτουργεί με αναλογία διαχωρισμού (Split ratio), ο οποίος υπολογίζεται διαιρώντας την ροή του φέροντος αερίου με την ροή του διαχωρισμένου αεραγωγού
- ✚ Ενεργοποιημένος ο φούρνος του εισαγωγέα
- ✚ Ανιχνευτής (detector) 240-4000 mass spectrum

### 2.2.3 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη των πειραμάτων, προηγήθηκε conditioning της ίνας DVB/CAR/PDMS στους 270 °C για μισή ώρα.

Αρχικά, προστέθηκαν 0,500 gr **παρμεζάνας Grana Padano Leone**, σε φιαλίδιο headspace των 20 mL.

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας, τα δείγματα αφέθηκαν για 15 λεπτά στους 4 °C, και για 10 λεπτά στους 50 °C (**equilibrium time**) και έπειτα, πραγματοποιήθηκε η έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο και η εκχύλιση των πτητικών ενώσεων για 20, 30 και 40 λεπτά (**extraction time**).

Με το πέρας του χρόνου δειγματοληψίας, η ίνα εισήχθη μέσα στο SPME holder και αυτό με την σειρά του, αφαιρέθηκε από το septum. Τέλος, τοποθετήθηκε στην υποδοχή του GC και παρέμεινε εκεί για 10 λεπτά (**desorption time**), μετά από τα οποία, το SPME holder απομακρύνθηκε και ήταν έτοιμο για την επόμενη επανάληψη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, στα συγκεκριμένα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκε ανάδευση, ενώ για την ύπαρξη κενού χρησιμοποιήθηκε αντλία κενού, για ένα λεπτό και κάθε μέτρηση διεκπεραιώθηκε εις τριπλούν.

### 3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

#### 3.1 Προκαταρτικές μελέτες για TFME

##### 3.1.1 Λόγοι επιλογής και ιδιότητες συγκεκριμένου λεπτού φιλμ

Το λεπτό φιλμ που επιλέχθηκε για την εξεταζόμενη διπλωματική εργασία είναι το **PDMS/HLB**, δηλαδή Polydimethylsiloxane/Hydrophilic Lipophilic Balanced. Γενικά, τα υλικά με βάση το PDMS έχουν εξελιχθεί τα τελευταία 15 χρόνια και έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικά όσον αφορά την εκχύλιση, χάρη στην υψηλή θερμική τους σταθερότητα, την ευκολία τους στο καθαρίσμα και την απλή τους κατασκευή. Ειδικά, τα συνδυαστικά λεπτά φιλμ θεωρούνται κατάλληλα για τη δειγματοληψία ενώσεων, με διαφορετική πτητικότητα και πολικότητα [13, 36].

Επομένως, μετά από ενδελεχή αναζήτηση σε διάφορες ερευνητικές εργασίες παρατηρήθηκε ότι σε συνδυασμό με τις υδρόφιλες και λιπόφιλες ιδιότητες, το συγκεκριμένο λεπτό φιλμ έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα εκχύλισης και αποτελεί την καλύτερη επιλογή λεπτού φιλμ για ποιοτικό έλεγχο γαλακτοκομικών προϊόντων [13, 26].

##### 3.1.2 Ταυτοποίηση ενώσεων με την χρήση των χρόνων συγκράτησης αλκανίων

Η ανίχνευση των ουσιών, όταν χρησιμοποιείται αέριος χρωματογράφος, βασίζεται στους χρόνους συγκράτησης τους. Ωστόσο, οι χρόνοι αυτοί επηρεάζονται από τις συνθήκες του διαχωρισμού (κυρίως από τη ροή του φέροντος αερίου και τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται ο διαχωρισμός στη δεδομένη στήλη). Οι δείκτες συγκράτησης Kovats υποδηλώνουν τη σχετική θέση μιας κορυφής στο αεριοχρωματογράφημα, ως προς τις κορυφές, που αντιστοιχούν σε δύο αλκάνια, των οποίων τα μόρια διαφέρουν κατά ένα άτομο άνθρακα.

Έτσι, πριν την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε πείραμα στους 50 °C, για 30 λεπτά, με δείγμα αυτή τη φορά, 10 mL υπερκάθαρου νερού και 1 μL αλκανίων (C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>), διαλυμένα σε εξάνιο. Η αρχική συγκέντρωση των αλκανίων ήταν 1000 ppm και η τελική συγκέντρωσή τους 100 ppb. Ακόμα, για τη βέλτιστη εύρεση των αλκανίων, πραγματοποιήθηκε πείραμα στις ίδιες συνθήκες με 2 μL δεκανίου.

Μετά την ταυτοποίηση τους, υπολογίστηκαν οι χρόνοι κατακράτησης (**Retention Index**) των ουσιών που μας ενδιαφέρουν, με σκοπό τον αποτελεσματικό εντοπισμό τους. Ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο εξής:

$$RI_{\text{target}} = RI_{\text{alk}(n)} + (RI_{\text{alk}(n+1)} - RI_{\text{alk}(n)}) \frac{RT_{\text{target}} - RT_{\text{alk}(n)}}{RT_{\text{alk}(n+1)} - RT_{\text{alk}(n)}} \quad (13)$$

**Πίνακας 4:** Αλκάνια που ανιχνεύθηκαν με TFME

Αλκάνιο	Molecular formula	Retention Index (min)
Επτάνιο	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	1.532
Οκτάνιο	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	2.362
Εννεάνιο	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	4.244
Δεκάνιο	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	6.988
Ενδεκάνιο	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	10.012
Δωδεκάνιο	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	13.004
Δεκατριάνιο	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	15.844
Δεκατετράνιο	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	18.540
Δεκαπεντάνιο	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	21.067
Δεκαεξάνιο	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	23.483
Δεκαεπτάνιο	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	25.778

### 3.2 Ταυτοποίηση ενώσεων στην παρμεζάνα με TFME

Το άρωμα και η γεύση της παρμεζάνας αντικατοπτρίζεται από τον σύνθετο συνδυασμό των πτητικών και ημι-πτητικών συστατικών που εμπεριέχονται σε αυτή.

Με τη χρήση της μεθόδου TFME ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 15 ενώσεις, εκ των οποίων 4 ήταν αρωματικοί/αλειφατικοί υδρογονάνθρακες, 2 κετόνες, 2 εστέρες, 4 οξέα, 1 αλκοόλη, 1 αλκίνη και 1 πυραζίνη.

Ο πίνακας 5 παρουσιάζει την σειρά με την οποία ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις, σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης τους.



**Πίνακας 5:** Παρουσίαση των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν με χρήση της μεθόδου TFME, βάση του χρόνου κατακράτησης τους (retention time), καθώς και των πειραματικών και θεωρητικών τιμών Kovats (experimental, literature retention index) [33, 34, 35]

Compounds	Molecular formula	CAS	Retention time (min)	Retention Index (experimental)	Retention Index (literature)
<u>Toluene</u>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	108-88-3	2.016	758	763
<u>o-Xylene</u>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	95-47-6	3.986	860	876
<u>2-heptanone</u>	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	110-43-0	4.060	890	891
<u>Ethyl hexanoate</u>	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	123-66-0	7.056	977	1002
<u>Limonene</u>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	138-86-3	7.659	1022	1020
<u>Hexanoic acid</u>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	142-62-1	7.938	1031	1026
<u>Heptanoic acid</u>	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	111-14-8	8.600	1053	1076
<u>1-Octanol</u>	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	111-87-5	9.278	1075	1070
<u>Tetramethyl pyrazine</u>	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	1124-11-4	9.640	1087	1087
<u>2-nonanone</u>	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	821-55-6	9.789	1092	1093
<u>1-Undecyne</u>	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub>	2243-98-3	10.121	1103	1109
<u>Octanoic acid, ethyl ester</u>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	106-32-1	13.007	1199	1198
<u>Octanoic acid</u>	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	124-07-2	13.266	1209	1191
<u>n-decanoic acid</u>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	334-48-5	18.265	1389	1387
<u>1,3-diisopropylnaphthalene</u>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub>	57122-16-4	25.096	1668	1662

Μολονότι, η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με προσοχή, ειδικά στην περίπτωση πειραμάτων με μεγαλύτερο αριθμό αποτελεσμάτων, κάποιες επαναλήψεις ενώσεων, παρουσίασαν υψηλά νούμερα σχετικής τυπικής απόκλισης ( $RSD \geq 15\%$ ). Γεγονός που οφείλεται στη μερική έκλυση, που προέκυψε μεταξύ κάποιων συστατικών, καθώς και στην πολυπλοκότητα της μήτρας του δείγματος [30].

Οι **κετόνες** και πιο συγκεκριμένα οι **2-αλκανόνες**, όπως η 2-επτανόνη (2-heptanone) και η 2-νονανόνη (2-nonanone), συναντώνται συχνά στα γαλακτοκομικά προϊόντα και η παραγωγή τους είναι αποτέλεσμα δύο χημικών αντιδράσεων. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται οξείδωση των λιπαρών οξέων σε β-οξο οξέα και σε δεύτερο στάδιο, αποκαρβοξυλίωση των β-οξο-οξέων σε 2-αλκανόνες, με ένα λιγότερο ανθρακικό άτομο. Η ύπαρξη των 2-αλκανονών προσδίδει μια ήπια γεύση μούχλας. Το άρωμα αυτό είναι χαρακτηριστικό στα ώριμα τυριά [2, 3].

Το ποσοστό των **αλκοολών** είναι μικρό και δικαιολογείται από το γεγονός ότι και στο φρέσκο γάλα, από το οποίο παρασκευάζεται η παρμεζάνα, βρίσκεται σε χαμηλό ποσοστό [2].

Το μεγάλο ποσοστό των **οξέων**, πιθανώς συνδέεται με τη διαδικασία ωρίμανσης του τυριού και τους μικροοργανισμούς που προστίθενται σε αυτό [3].

Επίσης, η παρουσία **πυραζίνης** συμβάλει κυρίως, στο άρωμα της παρμεζάνας, προσδίδοντας ένα άρωμα που παραπέμπει σε ξηρούς καρπούς και κακάο [2].

Επιπρόσθετα, το **limonene**, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των αρωματικών υδρογονανθράκων, έχει εντοπιστεί στον εξωτερικό φλοιό του μαύρου πιπεριού, συστατικό το οποίο περιέχεται στην παρμεζάνα, ενώ το **ethyl-hexanoate** προσδίδει στην παρμεζάνα μια φρουτώδης γεύση [2, 3].

Οι παραπάνω ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, ταυτίζονται, σε μεγάλο βαθμό, με άλλες έρευνες που σχετίζονται με τα πτητικά και ημι-πτητικά συστατικά της παρμεζάνας, τα οποία συνθέτουν το ξεχωριστό άρωμα της.

Ειδικότερα, οι ενώσεις toluene, o-xylene, limonene, hexanoic acid, 2-nonanone και octanoic acid, έχουν ταυτοποιηθεί από τους Pérès C., Viallon C. και Berdagué J.-L., σε επιστημονική δημοσίευση που αφορά την ανάλυση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας, με την χρήση της μεθόδου SPME [41]. Ακόμα, οι ενώσεις 2-heptanone, ethyl hexanoate, hexanoic acid, heptanoic acid, tetramethyl pyrazine και 2-nonanone έχουν εντοπιστεί, με την ίδια μέθοδο, από τους Frank D. C., Owen C. M., και Patterson J. [12].

Τέλος, οι ενώσεις 2-heptanone, ethyl hexanoate, hexanoic acid, heptanoic acid, 2-nonanone, octanoic acid και n-decanoic acid, έχουν ταυτοποιηθεί από τους Moio L., και Addeo F., με τη χρήση της απευθείας απόσταξης, υπό συνθήκες κενού, για την ανάλυση πτητικού προφίλ παρμεζάνας [2].

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται οι εξεταζόμενες ενώσεις, κατηγοριοποιημένες, ανάλογα με τη χημική κατηγορία στην οποία ανήκουν, καθώς και κάποια χημικά και αρωματικά χαρακτηριστικά τους.

**Πίνακας 6:** Κατάταξη πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο TFME, βάση της χημικής κατηγορίας τους και παρουσίαση μερικών χαρακτηριστικών τους (σημείο βρασμού, είδος αρωματικότητας κλπ.)

<b>Αρωματικοί-αλειφατικοί υδρογονάνθρακες</b>				
<b>Compounds</b>	<b>Molecular weight (g/mol)</b>	<b>Boiling point (°C)</b>	<b>Volatility</b>	<b>Odor description</b>
<u>Toluene</u>	92.138	110.6	Πτητική	Καυστική και γλυκιά
<u>o-Xylene</u>	106.165	144	Πτητική	Γλυκιά
<u>Limonene</u>	136.23	176	Πτητική	Λεμόνι
<u>1,3-diisopropylnaphthalene</u>	212.330	273	Ημι-πτητική	Καυστική και γλυκιά
<b>Οξέα</b>				
<u>Hexanoic acid</u>	116.158	205	Πτητική	Δυσάρεστη, ταγγή

<u>Heptanoic acid</u>	130.185	223	Πτητική	Δυσάρεστη, ταγγή
<u>Octanoic/ Caprylic acid</u>	144.21	208	Ημι-πτητική	Όξινη, φρουτώδης
<u>n-decanoic acid</u>	172.264	268	Ημι-πτητική	Ταγγή
<b>Κετόνες</b>				
<u>2-heptanone</u>	114.185	151	Πτητική	Φρουτώδης, πικάντικη (μπανάνα, κανέλα)
<u>2-nonanone</u>	142.24	195	Πτητική	Φρουτώδης (ροδάκινο)
<b>Εστέρες</b>				
<u>Ethyl hexanoate</u>	114.21	168	Πτητική	Ευχάριστη μυρωδιά (ανανά, πεπονιού)

<u>Octanoic acid, ethyl ester</u>	172.26	208	Πτητική	Χρησιμοποιείται σε τρόφιμα, ως συμπλήρωμα αρώματος
<b>Αλκοόλες</b>				
<u>1-Octanol</u>	130.2279	195	Πτητική	Φρέσκια (πορτοκάλι, τριαντάφυλλο)
<b>Αλκίνια</b>				
<u>1-Undecyne</u>	152.28	196	Πτητική	
<b>Πυραζίνες</b>				
<u>Tetramethyl pyrazine</u>	136.19	190	Πτητική	Έντονη γεύση σοκολάτας και ξηρού καρπού

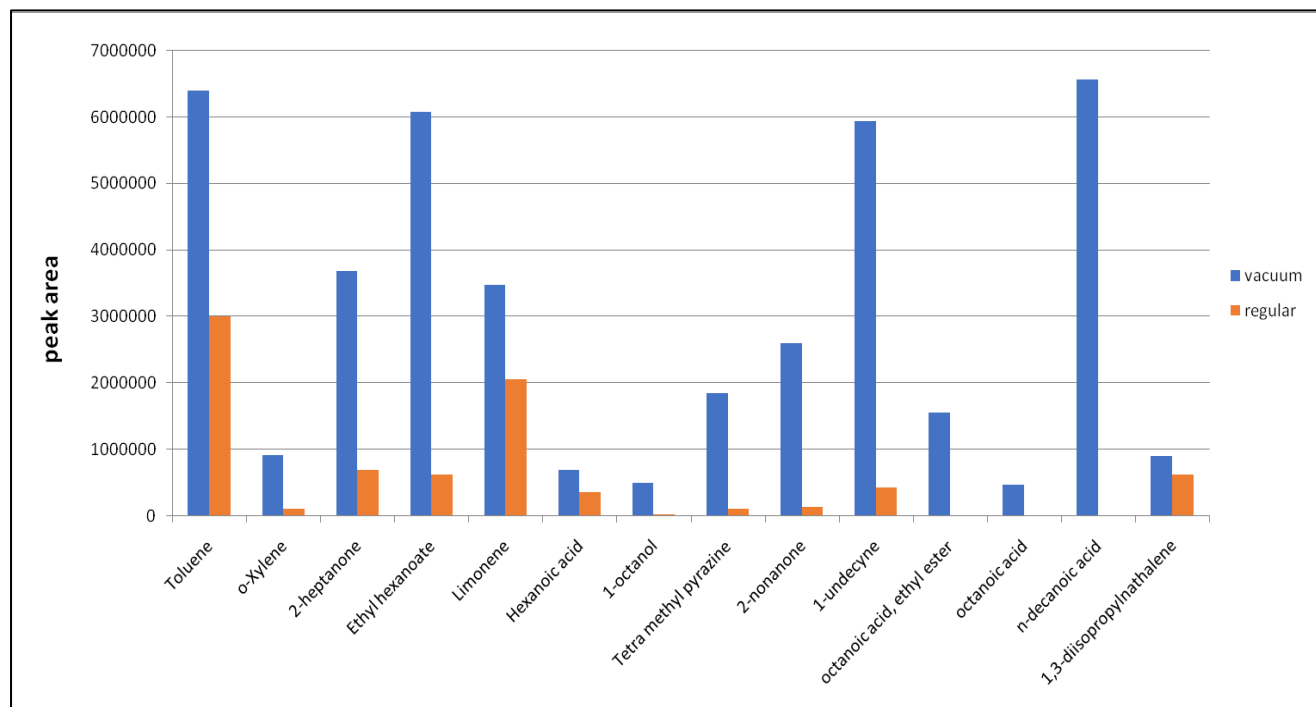
### 3.3 Βελτιστοποίηση της TFME

#### 3.3.1 Επίδραση πίεσης

Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε, υπό συνθήκες **μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (vacuum/vac)** και **ατμοσφαιρικής πίεσης (regular/no vac)**.

Είναι γνωστό ότι πριν επέλθει η ισορροπία, η πίεση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται και επομένως, όταν η πίεση είναι χαμηλή, εκχυλίζεται μεγαλύτερη ποσότητα. Ειδικότερα, μειώνοντας τη πίεση, αυξάνεται η κινητική των ημι-πτητικών ενώσεων και έπειτα, μειώνεται η αντίσταση μεταφοράς της μάζας τους, από τη μήτρα στην αέρια φάση, οδηγώντας έτσι σε βελτίωση της εκχύλισης των συγκεκριμένων ενώσεων. Από την άλλη, οι πτητικές ενώσεις έχουν τη δυνατότητα να εκχυλίζονται γρήγορα, για αυτό το λόγο η μείωση της πίεσης δεν τις επηρεάζει αισθητά [24].

Ωστόσο, όταν επέλθει η ισορροπία, η ποσότητα που εκχυλίζεται παραμένει ίδια, ανεξάρτητα από την πίεση που επικρατεί, καθώς σύμφωνα με τη θεωρία της θερμοδυναμικής, στην ισορροπία, οι μερικές πιέσεις και συγκεντρώσεις, είναι ανεξάρτητες της ολικής πίεσης [25].



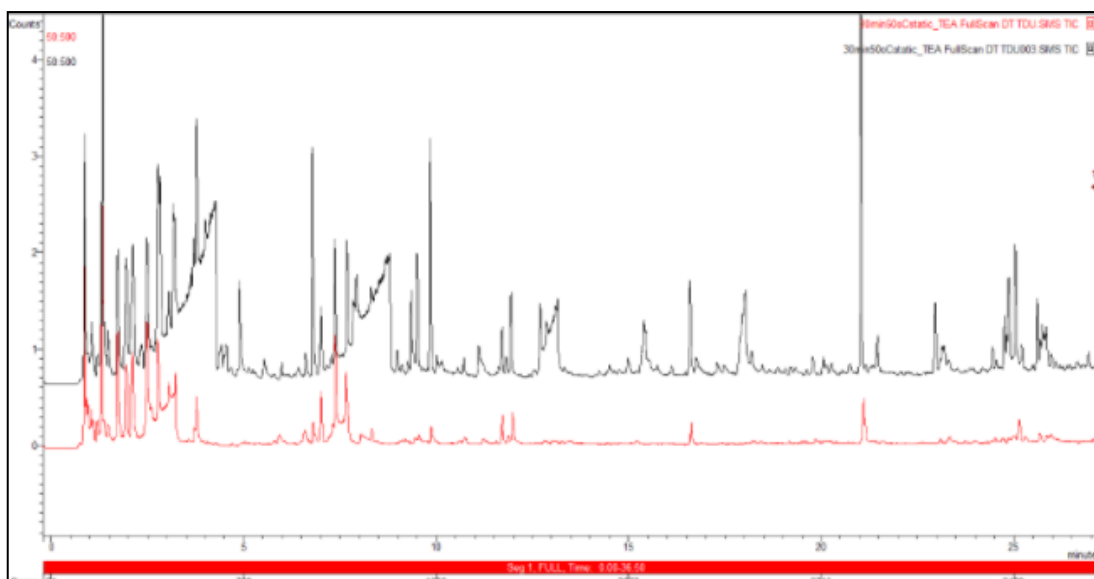
**Διάγραμμα 1:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και ατμοσφαιρικής πίεσης (πορτοκαλί), κατά την εφαρμογή της TFME, σε θερμοκρασία 50 °C και χρόνο εκχύλισης 30 min

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι ενώσεις που εκχυλίστηκαν από την παρμεζάνα, με τη χρήση TFME, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης και ατμοσφαιρικής πίεσης. Οι εξεταζόμενες ενώσεις εκχυλίστηκαν σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών και στους 50 °C. Με βάση αυτό διαφαίνεται ότι, η πλειοψηφία των ημι-πτητικών ενώσεων δεν ανιχνεύθηκε, υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Αντιθέτως η Vac-TFME παρουσιάζει αισθητή βελτίωση και οδηγεί σε υψηλότερη αποδοτικότητα σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σύγκριση με την regular-TFME. Ακόμα, παρατηρείται ότι ο συνδυασμός vac και υψηλής θερμοκρασίας έχει θετικό αντίκτυπο κυρίως στις ημι-πτητικές ενώσεις.

Η διαφορά στα αποτελέσματα, όσον αφορά το vacuum και το regular, βρίσκεται στην ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται η εκχύλιση. Για αυτό το λόγο, οι ενώσεις **octanoic acid**, **n-decanoic acid** και **1,3- diisopropylnaphthalene**, οι οποίες ανήκουν στις ημιπτητικές ενώσεις και καθυστερούν να εκχυλιστούν από το δείγμα, παρουσιάζουν βελτίωση στο vac, σε σύγκριση με το regular [26, 32].

Από την άλλη, ενώσεις όπως είναι το **toluene** και το **limonene**, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη πτητικότητα, ανιχνεύονται και στα πειράματα, υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και δεν παρουσιάζουν τόσο μεγάλη βελτίωση, αφού εκχυλίζονται γρήγορα από την αέρια φάση.

Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα και το σχήμα 1 που παρατίθεται παρακάτω, υποδεικνύεται ότι η μειωμένη πίεση οδηγεί σε μεγαλύτερη απόκριση των πτητικών ενώσεων στο GC, αλλά και βελτίωση ανίχνευσης ημι-πτητικών ενώσεων, μειώνοντας έτσι την απώλεια των εξεταζόμενων αναλυτών.



**Σχήμα 1:** Χρωματογράφημα που απεικονίζει το πείραμα που διεξήχθη υπό συνθήκες μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (**μαύρο**) και υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (**κόκκινο**), στους 50°C και για χρόνο εκχύλισης 40 min

### 3.3.2 Επίδραση θερμοκρασίας

Μία ακόμη παράμετρος που εξετάστηκε στη δοθείσα διπλωματική εργασία ήταν η θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία ψύξης (**4 °C**) και σε υψηλή θερμοκρασία (**50 °C**).

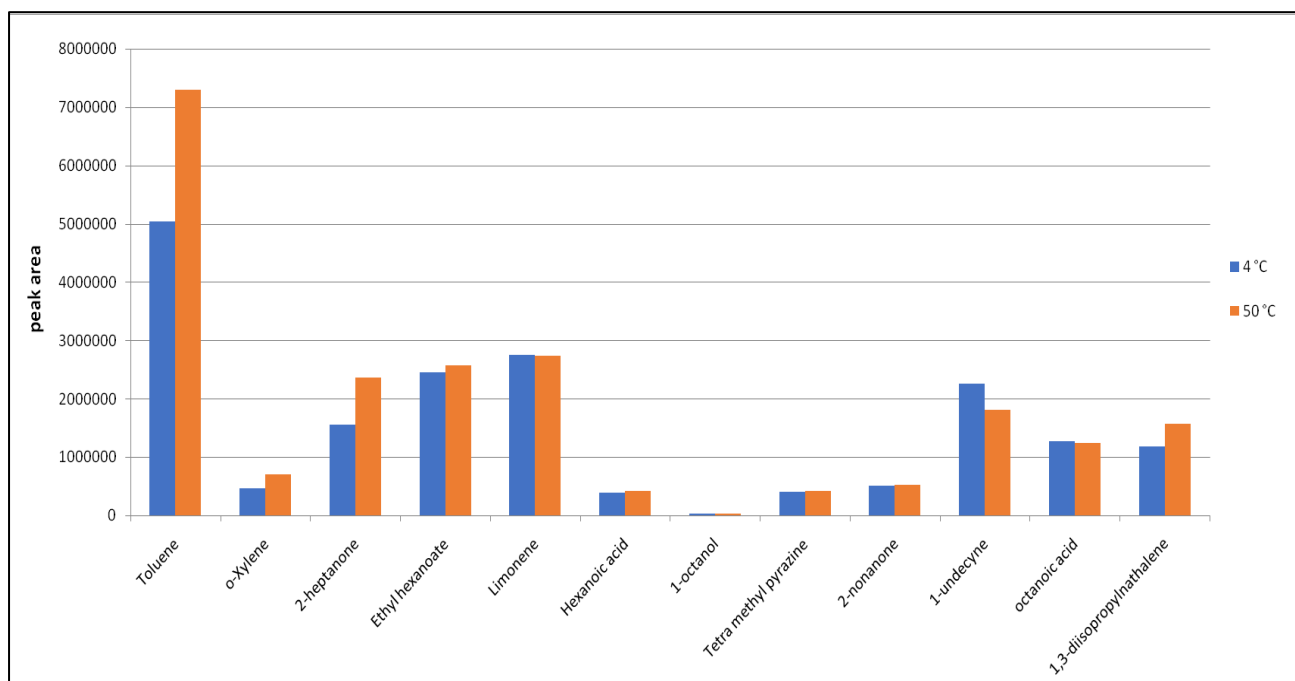
Μολονότι, θεωρητικά ο συνδυασμός αύξησης θερμοκρασίας και μειωμένης πίεσης έχει θετικό αντίκτυπο στα αποτελέσματα, δεν επαληθεύεται πάντα πειραματικά. Μάλιστα, πρόσφατες έρευνες, οι οποίες σχετίζονται με την ανάλυση τροφίμων, με τη χρήση TFME και SPME παρουσίασαν ότι, η απόδοση της Vac-TFME, σε υψηλότερες θερμοκρασίες δειγματοληψίας, εξαρτάται από την παρουσία μορίων σε στερεή και αέρια φάση, τον βαθμό αλληλεπίδρασης τους με το λεπτό φιλμ και τη συγγένεια της επίστρωσης του λεπτού φιλμ με τις εξεταζόμενες ενώσεις [24].

Ειδικότερα, όσον αφορά τις ημι-πτητικές ενώσεις, η συγκέντρωσή τους στην αέρια φάση και σε θερμοκρασία δωματίου, όπως και οι ρυθμοί εκχύλισης τους, στον υπερκείμενο χώρο, είναι μικροί. Με την αύξηση της θερμοκρασίας όμως, αυξάνεται ο συντελεστής διάχυσης και επακόλουθα, η ταχύτητα εκχύλισης των προαναφερθέντων ενώσεων.

Ωστόσο, τα μειονεκτήματα όταν εφαρμόζονται σχετικά υψηλές θερμοκρασίες δειγματοληψίας είναι ότι, ενδέχεται να μειωθεί ο συντελεστής κατανομής μεταξύ του λεπτού φιλμ-υπερκείμενης φάσης,  $K_f$  και ως εκ τούτου, να μειωθεί το τελικό ποσό του



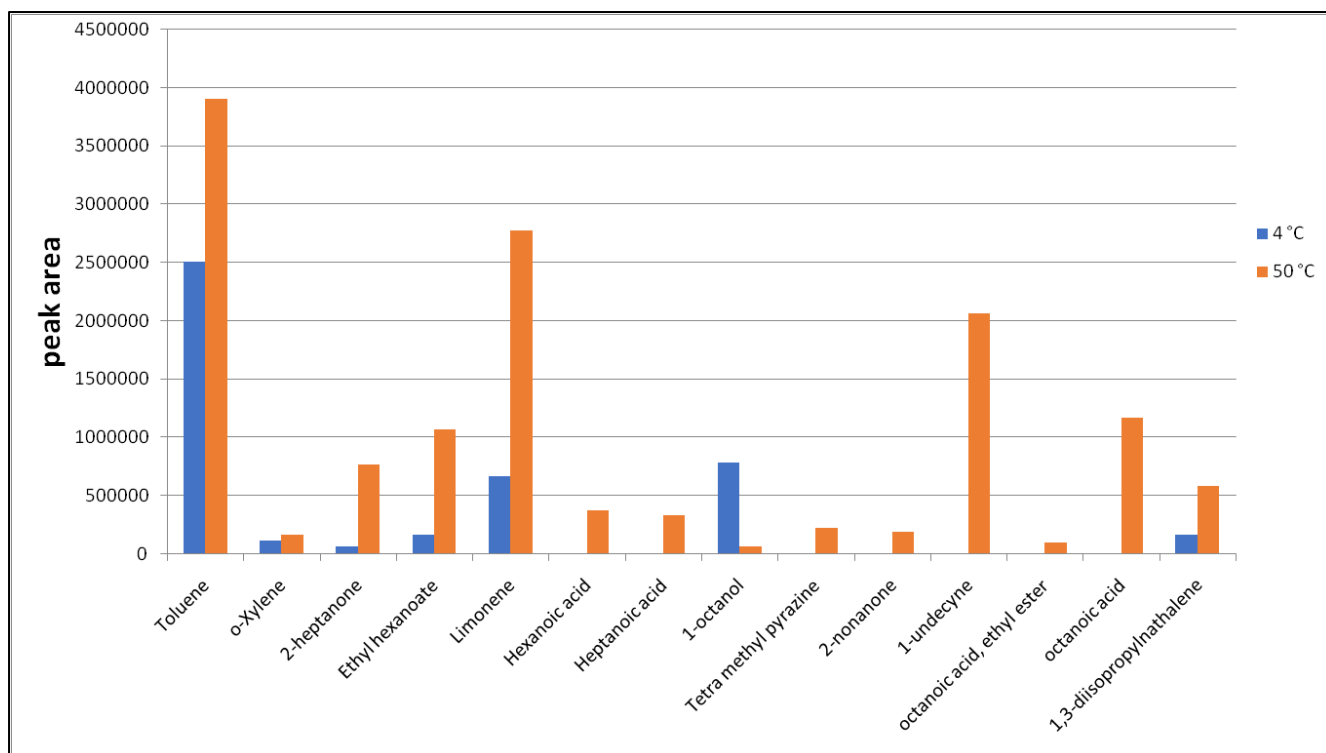
αναλύτη που μπορεί να εκχυλιστεί από το λεπτό φιλμ, αλλά και η ευαισθησία της τεχνικής [26]. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι, ειδικά για την ανάλυση τροφίμων, η αύξηση της θερμοκρασίας πρέπει να πραγματοποιείται μέσα σε επιτρεπτά πλαίσια, καθώς μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή παραπροϊόντων, αλλά και τη διάσπαση των θερμοευαίσθητων ενώσεων, οδηγώντας έτσι σε πειραματικά σφάλματα [32].



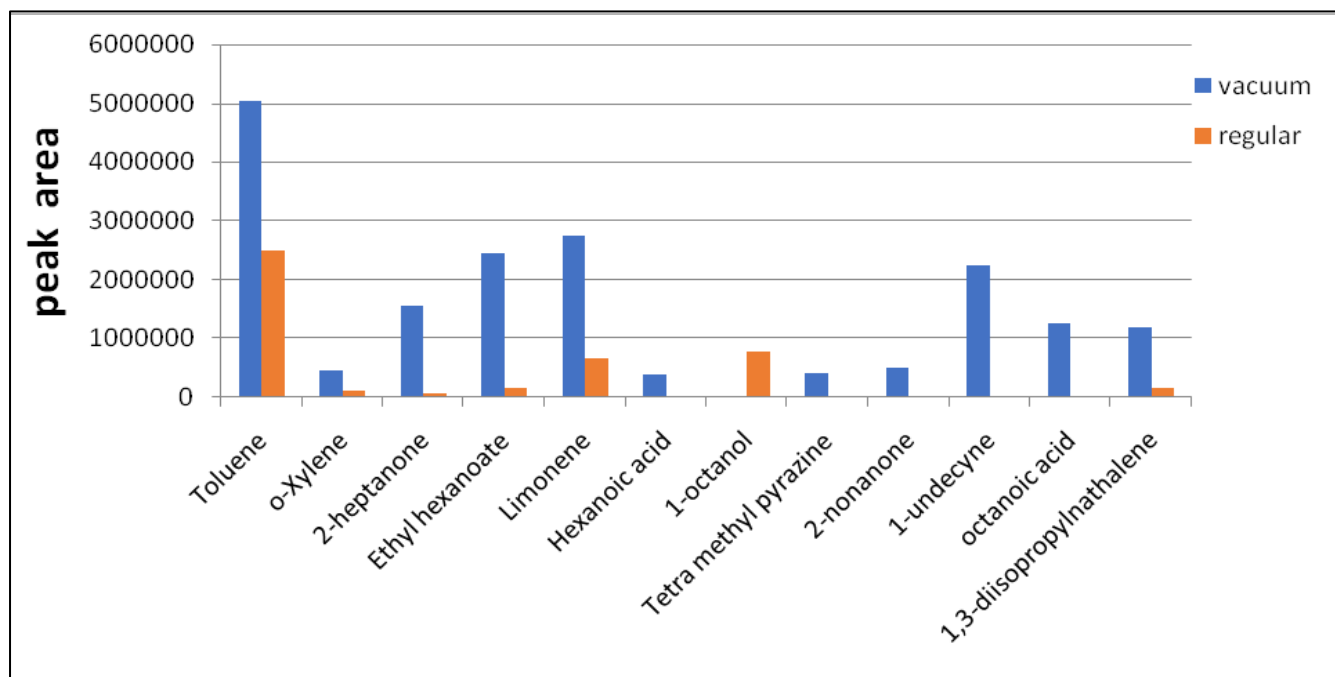
**Διάγραμμα 2:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, στους 4 °C (μπλε) και στους 50 °C (πορτοκαλί), κατά την εφαρμογή της vac-TFME και για χρόνο εκχύλισης 40 min

Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζονται οι ενώσεις που εκχυλίστηκαν από την παρμεζάνα, στα πειράματα που διεκπεραιώθηκαν στους 4 °C και 50 °C, με τη χρήση της μεθόδου vac-TFME και στο διάγραμμα 3 με τη μέθοδο της regular-TFME και οι δύο μέθοδοι, για χρόνο εκχύλισης 40 λεπτά. Από την άλλη, το διάγραμμα 4 απεικονίζει το πτητικό προφίλ της παρμεζάνας, υπό συνθήκες μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης στους 4 °C.

Όπως αποτυπώνεται στα διαγράμματα 2 και 3, και στις δύο μεθόδους, η αύξηση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της εκάστοτε μεθόδου. Εξάιρεση αποτελεί η **1-undecyne** στο διάγραμμα 2 και η **1-octanol** στο διάγραμμα 3, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη απόκριση στη χαμηλότερη θερμοκρασία.



**Διάγραμμα 3:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, στους 4 °C (μπλε) και στους 50 °C (πορτοκαλί), κατά την εφαρμογή της regular-TFME και χρόνο εκχύλισης 40 min



**Διάγραμμα 4:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και ατμοσφαιρικής πίεσης (πορτοκαλί), κατά την εφαρμογή της TFME, σε θερμοκρασία 4 °C και για χρόνο εκχύλισης 40 min

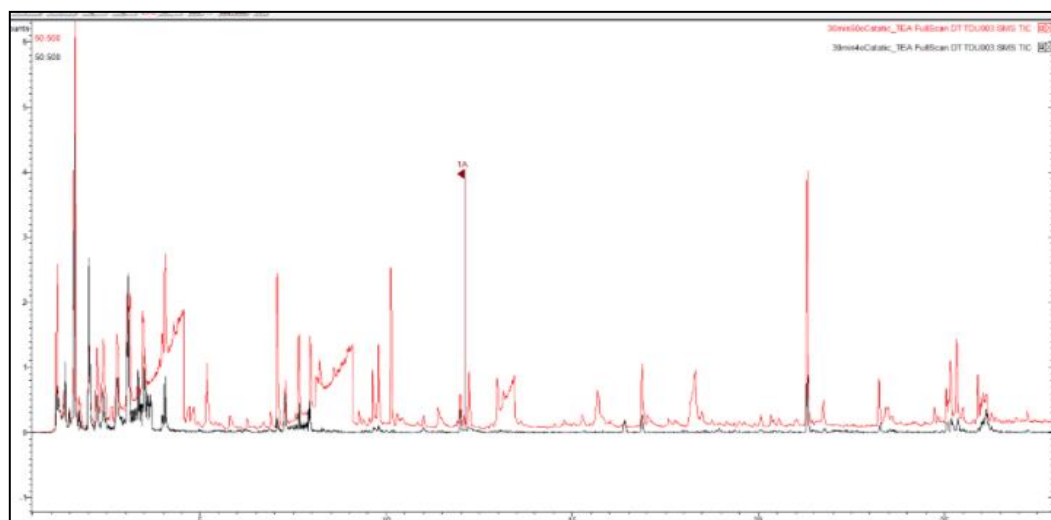
Όσον αφορά, τη vac-TFME, θεωρείται εντυπωσιακό ότι ακόμα και στους 4 °C, η απόκριση των πτητικών ενώσεων (**toluene, o-xylene, 2-heptanone, ethyl hexanoate** κλπ.) που είχαν ταυτοποιηθεί και υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, αυξήθηκε ραγδαία. Μάλιστα, με τη μείωση της πίεσης επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση μίας ακόμα ημι-πτητικής ένωσης (**octanoic acid**), αλλά και η αύξηση απόκρισης μίας άλλης ημι-πτητικής ένωσης (**1,3-diisopropylnaphthalene**).

Σχετικά με τη μέθοδο regular-TFME, η αύξηση θερμοκρασίας είχε θετικό αντίκτυπο κυρίως στις ημι-πτητικές ενώσεις, όπως είναι το **octanoic acid, n-decanoic acid** και η **1,3-diisopropylnaphthalene**, καθώς μόνο στους 50 °C ανιχνεύονται οι ημιπτητικές. Στους 4 °C ανιχνεύονται μόνο οι πτητικές ενώσεις. Εξάιρεση βέβαια, αποτελεί η **1,3-diisopropylnaphthalene**, η οποία αν και ανήκει στις ημι-πτητικές ενώσεις, εντοπίζεται και στη χαμηλότερη θερμοκρασία, με χαμηλότερη, βέβαια απόκριση.

Σε γενικές γραμμές, η δυσκολία ταυτοποίησης ενώσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες, υπόκειται στο γεγονός ότι ειδικά, οι λιγότερο πτητικές ουσίες, δυσκολεύονται να εκχυλιστούν και να μεταφερθούν στον υπερκείμενο χώρο [24].

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η Vac-TFME έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει κυρίως πτητικές ουσίες, ακόμα και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, πράγμα αδύνατο με τη χρήση προηγούμενων τεχνικών.

Στο σχήμα 2 που παρατίθεται παρακάτω, είναι εμφανές ότι στη μεγαλύτερη θερμοκρασία, η ανίχνευση κυρίως των ημιπτητικών συστατικών παρουσιάζει βελτίωση σε σχέση με τη χαμηλότερη θερμοκρασία.



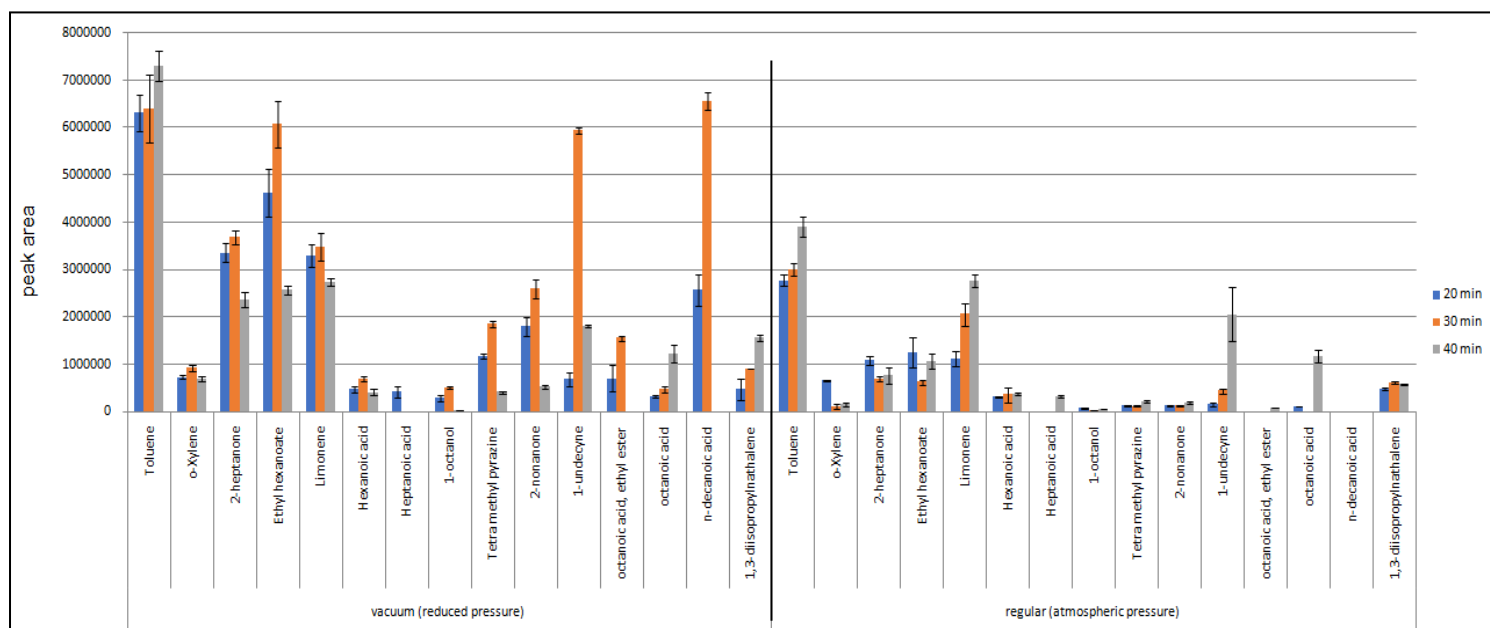
**Σχήμα 2:** Χρωματογράφημα που απεικονίζει το πείραμα που διεξήχθη στους 4°C (μαύρο) και στους 50°C (κόκκινο), για χρόνο εκχύλισης 30 min και απουσία κενού

### 3.3.3 Επίδραση χρόνου εκχύλισης

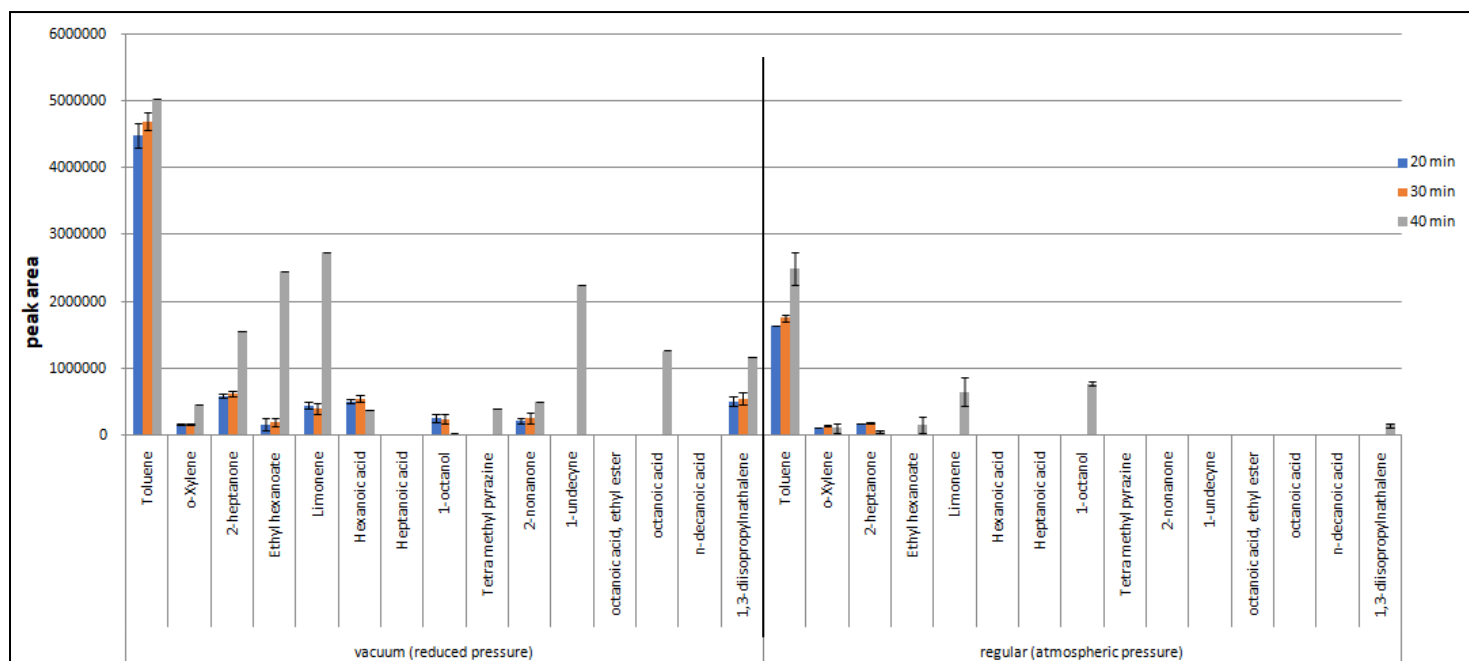
Η τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο χρόνος εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για **20, 30 και 40 λεπτά** δειγματοληψίας.

Σε γενικές γραμμές, τα πειράματα που πραγματοποιούνται με τη μέθοδο της Vac-TFME, οδηγούν σε βελτίωση της κινητικής της εκχύλισης και έχουν αξιοθαύμαστη επίδραση σε αυτή, με αποτέλεσμα να έχουμε μικρότερους χρόνους εκχύλισης, σε σύγκριση με την προσέγγιση της Regular-TFME [26].

Το μέγεθος του θετικού αντίκτυπου στους ρυθμούς εκχύλισης διαφέρει ανάλογα με την ουσία και σχετίζεται με την ικανότητα της να καταναμηθεί στον υπερκείμενο χώρο, για αυτό και ευνοεί τις ημι-πητικές ενώσεις σε μεγαλύτερο βαθμό. Στον αντίποδα, οι πτητικές ουσίες έχουν ήδη πολύ μικρό εκχύλισης και δεν παρατηρείται ιδιαίτερη επίδραση κατά τη διαδικασία εκχύλισης των ουσιών αυτών [32]. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι, αυτή η βελτίωση μειώνεται, όσο αυξάνεται ο χρόνος δειγματοληψίας, καθώς πλησιάζει προς την ισορροπία και εκεί, η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται παραμένει σταθερή, όσος χρόνος και να περάσει [25].



**Διάγραμμα 5:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (αριστερά) και ατμοσφαιρικής πίεσης (δεξιά), κατά την εφαρμογή της TFME, σε θερμοκρασία 50 °C και χρόνο εκχύλισης 20 (μπλε), 30 (πορτοκαλί) και 40 (γκρι) min



**Διάγραμμα 6:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (αριστερά) και ατμοσφαιρικής πίεσης (δεξιά), κατά την εφαρμογή της TFME, σε θερμοκρασία 4 °C και χρόνο εκχύλισης 20 (μπλε), 30 (πορτοκαλί) και 40 (γκρι) min

Στο διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στους 50 °C, υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης και ατμοσφαιρικής πίεσης, ενώ στο διάγραμμα 6, τα αντίστοιχα αποτελέσματα, στους 4 °C. Με βάση αυτά παρατηρείται ότι, όσο περνάει ο χρόνος εκχύλισης, βελτιώνεται η ταυτοποίηση των περισσότερων πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων. Επομένως, διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης σε όλα τα πειράματα είναι τα 40 λεπτά, εφόσον πριν από αυτόν το χρόνο, οι περισσότερες ενώσεις δεν έχουν έρθει σε ισορροπία.

Όπως παρατηρείται, στη μέθοδο Vac-TFME χρειάζεται λιγότερος χρόνος εκχύλισης για να επέλθει ισορροπία, σε σχέση με τη Regular-TFME, άρα σε μικρότερο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται το ίδιο αποτέλεσμα. Ειδικά, οι ενώσεις **o-xylene** και **hexanoic acid** έχουν φτάσει σε ισορροπία ήδη από τα 20 λεπτά, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 5.

Αξιοσημείωτο θεωρείται ότι, με το πέρας των 40 λεπτών εκχύλισης, έχουν ταυτοποιηθεί κυρίως πολλές πτητικές ενώσεις (**toluene**, **ethyl hexanoate**, **1-octanol**) καθώς και μία ημι-πτητική (**1,3-diisopropylnaphthalene**), ακόμα και σε θερμοκρασία 4 °C και σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Υποδεικνύοντας έτσι, τον καταλυτικό ρόλο που παίζει ο χρόνος εκχύλισης στη διάχυση και εκχύλιση των ημι-πτητικών συστατικών.

### 3.4 Προκαταρκτικές μελέτες για HSSPME

#### 3.4.1 Λόγοι επιλογής και ιδιότητες συγκεκριμένης ίνας

Η ίνα που επιλέχθηκε, ύστερα από έρευνα σε προηγούμενες επιστημονικές δημοσιεύσεις, ήταν η τριπλή Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (**DVB/CAR/PDMS**). Έχει πάχος επικάλυψης 50/30  $\mu\text{m}$  και είναι κατάλληλη για την ανάλυση αρωματικών ενώσεων σε τρόφιμα [12, 28].

Οι ίνες CAR/PDMS συγκεντρώνουν αναλύτες, κατά κύριο λόγο, μέσω τη διαδικασία της προσρόφησης των μορίων σε μικρο-πόρους, το οποίο είναι ευκρινώς διαφορετικό από τις απορροφητικές διαδικασίες άλλων φάσεων, και ιδιαίτερα αποτελεσματικό για τη συγκέντρωση αρωματικών ενώσεων, με χαμηλό μοριακό βάρος [28].

#### 3.4.2 Ταυτοποίηση ενώσεων με την χρήση των χρόνων συγκράτησης αλκανίων

Παρόμοια διαδικασία ταυτοποίησης αλκανίων, ακολουθείται και για την μέθοδο της HSSPME. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 7:** Αλκάνια που ανιχνεύθηκαν με HSSPME

Αλκάνιο	Molecular formula	Retention Index (min)
Δεκάνιο	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}$	8.744
Ενδεκάνιο	$\text{C}_{11}\text{H}_{24}$	11.739
Δωδεκάνιο	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}$	14.656
Δεκατριάνιο	$\text{C}_{13}\text{H}_{28}$	17.413
Δεκατετράνιο	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}$	20.004
Δεκαπεντάνιο	$\text{C}_{15}\text{H}_{32}$	22.478
Δεκαεξάνιο	$\text{C}_{16}\text{H}_{34}$	24.754
Δεκαεπτάνιο	$\text{C}_{17}\text{H}_{36}$	26.941
Δεκαοκτάνιο	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}$	29.002

Δεκαεννέαίο	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	30.996
Εικοσάίο	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	32.640

### 3.5 Ταυτοποίηση ενώσεων στην παρμεζάνα με HSSPME

Με τη χρήση της μεθόδου HSSPME ταυτοποιήθηκαν συνολικά **6** πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύτηκαν 2 αλκοόλες, 1 αρωματικός υδρογονάνθρακας, 1 κετόνη και 2 οξέα.

Ο πίνακας **8** παρουσιάζει την σειρά, με την οποία ανιχνεύτηκαν οι ενώσεις, σύμφωνα με το χρόνο κατακράτησης τους.

**Πίνακας 8:** Παρουσίαση των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν με χρήση της μεθόδου HSSPME, βάση του χρόνου κατακράτησης τους (retention time), καθώς και των πειραματικών και θεωρητικών τιμών Kovats (experimental, literature retention index) [33, 34, 35]

Compounds	Molecular formula	CAS	Retention time (min)	Retention Index (experimental)	Retention Index (literature)
<u>1-Octanol</u>	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	111-87-5	11.083	1078	1070
<u>2-nonanone</u>	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	821-55-6	11.548	1093	1093
<u>Octanoic acid</u>	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	124-07-2	14.594	1198	1191
<u>n-Decanoic acid</u>	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	334-48-5	19.939	1397	1387
<u>2-hexyl-1-octanol</u>	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O	19780-79-1	22.406	1497	1494
<u>1,3-diisopropylnaphthalene</u>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub>	57122-16-4	26.292	1670	1662

Οι **μεθυλοκετόνες**, όπως η 2-νονανόνη (2-nonanone), συναντώνται συχνά στα τυριά και η παραγωγή τους προκύπτει έπειτα από οξείδωση και αποκαρβοξυλίωση. Οι προαναφερθείσες μεθυλοκετόνες ευθύνονται μάλιστα, για τη χαρακτηριστική, ήπια οσμή μούχλας που αναβλύζουν τα ώριμα τυριά, καθώς αποτελούν προϊόντα μεταβολισμού της *Penicillium mold* [2, 3].

Το ποσοστό των **αλκοολών** είναι μικρό και δικαιολογείται από το γεγονός ότι και στο φρέσκο γάλα βρίσκεται σε χαμηλό ποσοστό [2].

Το ποσοστό των **οξέων** πιθανώς, συνδέεται με τους μικροοργανισμούς που προστίθενται στο τυρί, κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης [3].

Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι 5 από τις 6 ενώσεις (**1-octanol**, **2-nonanone**, **octanoic acid**, **n-decanoic acid** και **1,3-diisopropylnaphthalene**) που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της HSSPME, ταυτίζονται με τα αποτελέσματα της TFME, που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική, αλλά και με προγενέστερες μεθόδους, οι οποίες έχουν αναλυθεί ενδελεχώς, σε προηγούμενη παράγραφο [2, 12, 41]. Επιβεβαιώνοντας έτσι, την ύπαρξη των προαναφερθέντων συστατικών στα τυριά, σε μεγαλύτερο βαθμό, καθώς και την εγκυρότητα των μεθόδων που εφαρμόστηκαν.

Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι εξεταζόμενες ενώσεις κατηγοριοποιημένες, ανάλογα με τη χημική κατηγορία στην οποία ανήκουν, καθώς και κάποια χημικά και αρωματικά χαρακτηριστικά τους.

**Πίνακας 9:** Κατάταξη πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο HSSPME, βάση της χημικής κατηγορίας τους και παρουσίαση μερικών χαρακτηριστικών τους (σημείο βρασμού, είδος αρωματικότητας κλπ.)

Αλκοόλες				
Compounds	Molecular weight (g/mol)	Boiling point (°C)	Volatility	Odor description
<u>1-Octanol</u>	130.2279	195	Πτητική	Φρέσκια οσμή (πορτοκάλι, τριαντάφυλλο)
<u>2-hexyl-1-octanol</u>	214.38	162	Πτητική	



<b>Αρωματικοί υδρογονάνθρακες</b>				
<u>1,3-diisopropylnaphthalene</u>	212.330	273	Ημι-πτητική	
<b>Κετόνες</b>				
<u>2-nonanone</u>	142.24	195	Πτητική	Φρουτώδης οσμή (ροδάκινο)
<b>Οξέα</b>				
<u>Octanoic acid</u>	144.21	239.7	Ημι-πτητική	Όξινη, φρουτώδης
<u>n-Decanoic acid</u>	172.24	268	Ημι-πτητική	Ταγγή οσμή

## 3.6 Βελτιστοποίηση της HSSPME

### 3.6.1 Επίδραση τρόπου δειγματοληψίας

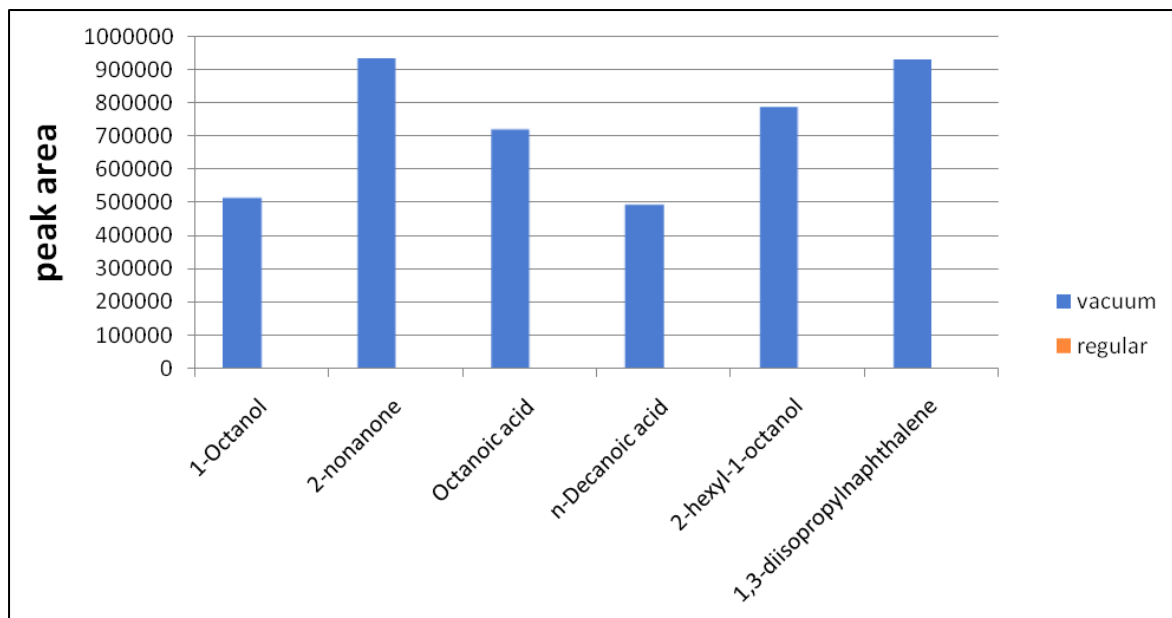
Η σύνθεση του υπερκείμενου χώρου επηρεάζεται ισχυρά από την κατανομή των πτητικών ενώσεων μεταξύ της στερεής και αέριας φάσης. Το λίπος και το pH μίας σχετικά σύνθετης μήτρας, όπως του τυριού, έχει χαρακτηριστική επίδραση στο βαθμό απελευθέρωσης κάποιων ενώσεων [30].

Η ανάλυση με HSSPME θεωρείται έγκυρη και αποτελεσματική για ενώσεις με υψηλή-μεσαία πτητικότητα, καθώς και για πολύπλοκες, στερεές μήτρες, όπως είναι η παρμεζάνα. Ακόμα, η δειγματοληψία από τον υπερκείμενο χώρο οδηγεί στην προστασία της ίνας από φθορές, αλλά και στην ακριβή σύγκριση της μεθόδου με τη TFME, η οποία πραγματοποιήθηκε επίσης, στον υπερκείμενο χώρο [6, 10].

### 3.6.2 Επίδραση κενού

Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε, υπό συνθήκες **μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (vacuum/vac)** και **ατμοσφαιρικής πίεσης (regular/no vac)**.

Σύμφωνα με επιστημονικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από τους Psillakis E., Purcaro G. και Mascerez, S., οι οποίοι μελετούσαν την επίδραση της πίεσης, στην εκχύλιση ενώσεων που εμπεριέχονται σε ελαιόλαδο, με τη χρήση της HSSPME, βρέθηκε ότι η πτώση της πίεσης, πριν επέλθει ισορροπία, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των κινητικών εκχύλισης των ημι-πτητικών ενώσεων. Ακόμα, οδηγεί στη βελτίωση της ευαισθησίας της τεχνικής σε μικρότερο χρόνο δειγματοληψίας. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ότι η εκχύλιση των πτητικών ενώσεων, δεν βελτιώνεται αισθητά με την επίδραση του κενού, αφού έχουν τη δυνατότητα να εκχυλίζονται γρήγορα και λόγω της φύσης τους, προτιμούν την αέρια φάση [30].



**Διάγραμμα 7:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και ατμοσφαιρικής πίεσης (πορτοκαλί), κατά την εφαρμογή της HSSPME, σε θερμοκρασία 50 °C και χρόνο εκχύλισης 30 min

Στο διάγραμμα 7 παρουσιάζονται οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος που πραγματοποιήθηκε στους 50 °C και για χρόνο εκχύλισης 40 λεπτά, παρουσία και απουσία κενού. Με βάση αυτό, παρατηρείται ότι σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (απουσία κενού) δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία ένωση, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία της δειγματοληψίας. Από την άλλη, σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και κενού (παρουσία κενού), ταυτοποιήθηκαν όλες οι ενώσεις.

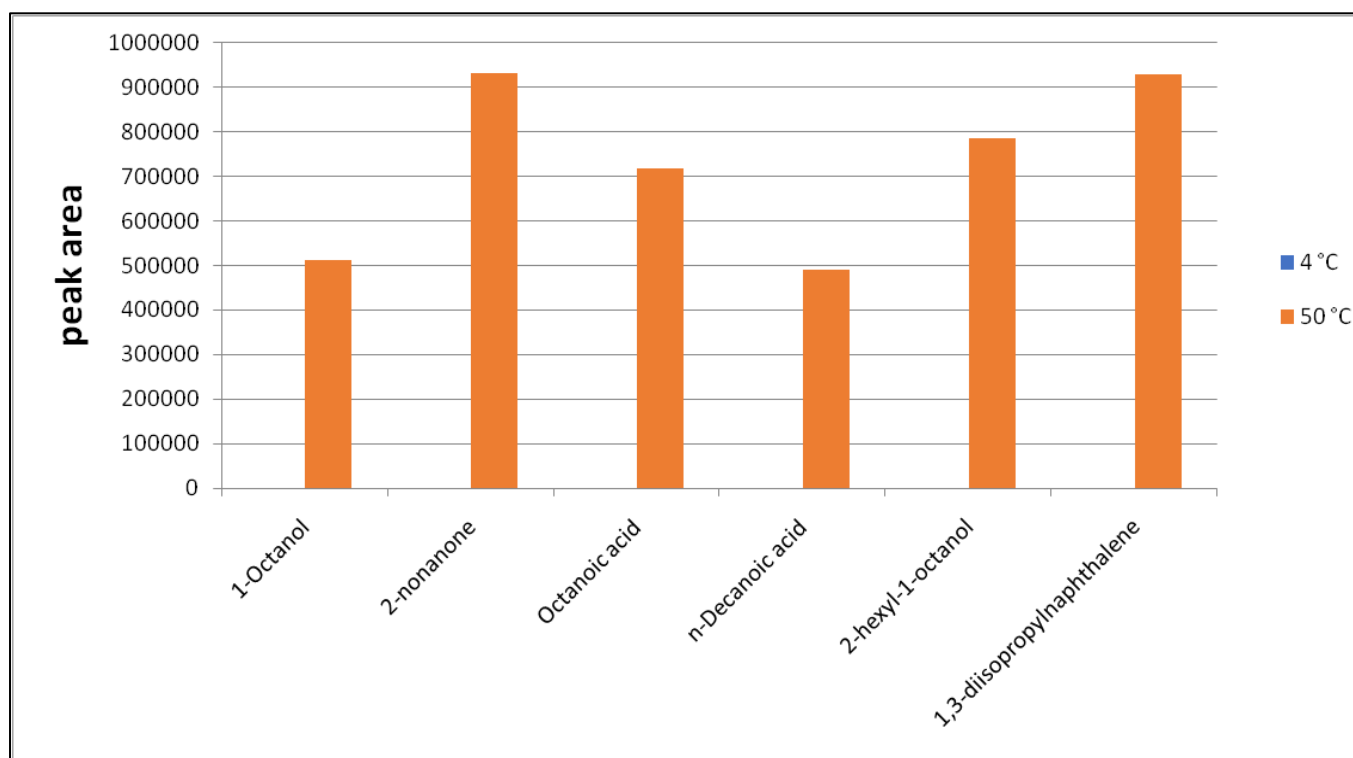
Οι ημι-πτητικές ενώσεις, όπως το **octanoic acid** και το **n-decanoic acid**, είναι λογικό να ενισχύονται από το κενό, καθώς η πτώση της πίεσης, πριν την ισορροπία, αυξάνει την αντίσταση μεταφοράς της μάζας των συγκεκριμένων ενώσεων από το δείγμα στην αέρια φάση, αποφεύγοντας έτσι την απώλεια των εξεταζόμενων συστατικών.

Στον αντίποδα, οι πτητικές ενώσεις όπως **1-octanol** και **2-hexyl-1-octanol**, θα περίμενε κανείς να έχουν εκχυλιστεί και στο regular-HSSPME, καθώς εκχυλίζονται γρήγορα. Ενδέχεται ωστόσο, η πτητικότητα τους να μην είναι τόσο υψηλή και για τόσο μικρό χρόνο εκχύλισης, να μην πρόλαβαν να εκχυλιστούν.

### 3.6.3 Επίδραση θερμοκρασίας

Μία επιπρόσθετη παράμετρος που παίζει καταλυτικό ρόλο στη βελτιστοποίηση της HSSPME θεωρείται η θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία ψύξης (4 °C) και σε υψηλή θερμοκρασία (50 °C).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως επακόλουθο την επιτάχυνση της κινητικής της εκχύλισης του αναλύτη, με αποτέλεσμα να έρχεται γρηγορότερα σε ισορροπία. Ακόμα, λαμβάνοντας υπόψη τη φύση της μήτρας, η αυξημένη θερμοκρασία, οδηγεί περισσότερα μόρια της παρμεζάνας στην υπερκείμενη φάση [28].



**Διάγραμμα 8:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, στους 4 °C (μπλε) και στους 50 °C (πορτοκαλί), κατά την εφαρμογή της vac-HSSPME και χρόνο εκχύλισης 40 min

Στο διάγραμμα 8 παρουσιάζονται οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν, στους 4 °C και 50 °C, με χρήση της μεθόδου vac-HSSPME και για χρόνο εκχύλισης 40 λεπτά. Με τη χρήση της μεθόδου regular-HSSPME, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας, δεν ανιχνεύθηκε καμία ένωση. Ούτε σε κάποιο πείραμα που διεκπεραιώθηκε στην

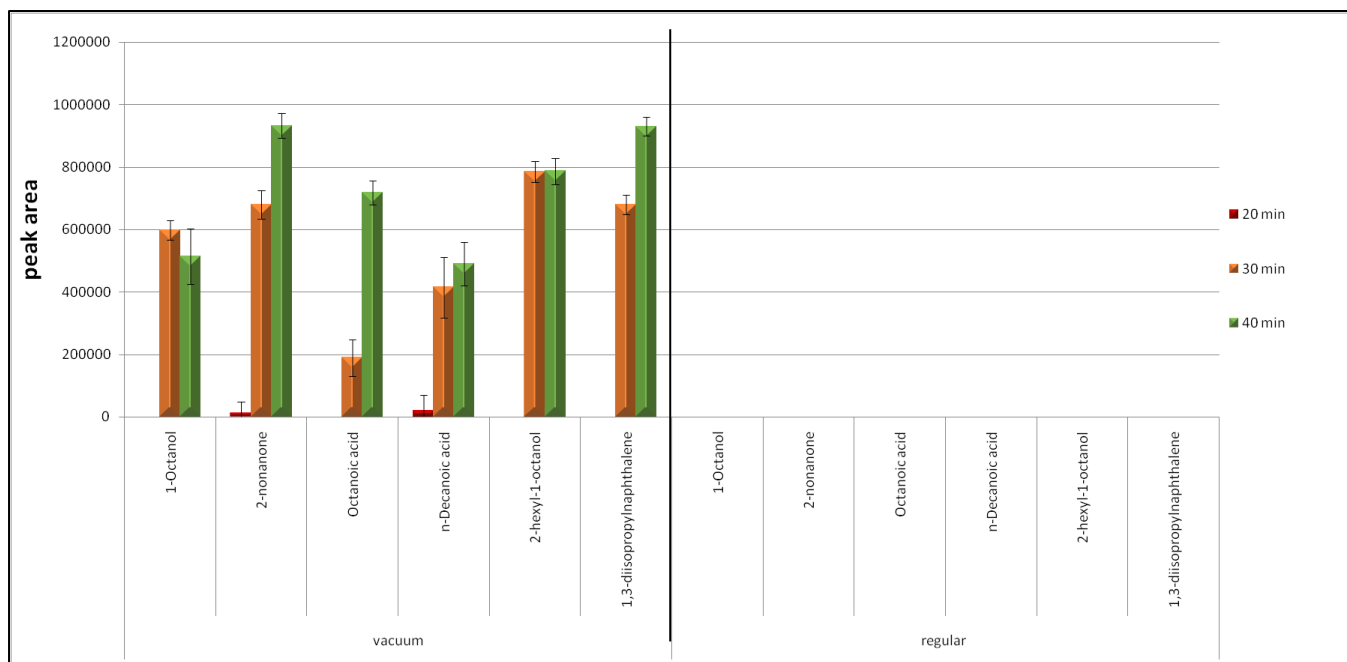
χαμηλότερη θερμοκρασία, ταυτοποιήθηκε κάποια εξεταζόμενη ένωση. Αυτό, οφείλεται λογικά στο γεγονός ότι οι περισσότερες ενώσεις ήταν ημι-πτητικές και αντιμετώπιζαν δυσκολία στη διάχυση τους από τη μήτρα του δείγματος και τη μετέπειτα, εκχύλιση τους στον υπερκείμενο χώρο, σε αυτή τη θερμοκρασία.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός υψηλής θερμοκρασίας και κενού οδηγεί σε βέλτιστα αποτελέσματα, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το συντελεστή διάχυσης του αναλύτη και έπειτα, το ρυθμό μεταφοράς μάζας από το δείγμα προς τον υπερκείμενο χώρο. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός επηρεάζει, λοιπόν, θετικά τις ημι-πτητικές ουσίες, όπως το **octanoic acid**, το **n-decanoic acid** και η **1,3-diisopropylnaphthalene**, καθώς μειώνεται ο χρόνος που χρειάζεται να επέλθει ισορροπία.

#### 3.6.4 Επίδραση χρόνου εκχύλισης

Η τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο χρόνος εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα η διεκπεραίωση των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε για **20, 30 και 40 λεπτά**.

Γενικά, ο χρόνος μετά τον οποίο η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ενώσεων παραμένει σταθερή και ανταποκρίνεται στη ν ποσότητα που εκχυλίζεται σε άπειρο χρόνο, είναι ο χρόνος ισορροπίας. Η μείωση της πίεσης, πριν την ισορροπία, συμβάλλει στην εκχύλιση, κυρίως ημι-πτητικών ενώσεων. Αυτό, συμβαίνει διότι οι πτητικές ουσίες έχουν ήδη πολύ μικρό εκχύλισης και δεν παρατηρείται ιδιαίτερη επίδραση, κατά τη διαδικασία εκχύλισης των ουσιών αυτών [30, 31].



**Διάγραμμα 9:** Παρουσίαση του πτητικού προφίλ της παρμεζάνας Grana Padano Leone, υπό την επίδραση μειωμένης ατμοσφαιρικής πίεσης (αριστερά) και ατμοσφαιρικής πίεσης (δεξιά), κατά την εφαρμογή της HSSPME, σε θερμοκρασία 50 °C και για χρόνο εκχύλισης 20 (κόκκινο), 30 (πορτοκαλί) και 40 (πράσινο) min

Στο διάγραμμα 9 παρουσιάζεται η επίδραση του χρόνου εκχύλισης στους 50 °C, υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης (vacuum) και ατμοσφαιρικής πίεσης (regular), ενώ στους 4 °C δεν ταυτοποιήθηκε καμία εξεταζόμενη ένωση, ανεξάρτητα από τον χρόνο εκχύλισης και την πίεση. Όπως φαίνεται στο συγκεκριμένο διάγραμμα, ούτε στις πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν, υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, ανεξάρτητα από την παράμετρο του χρόνου εκχύλισης, δεν ανιχνεύθηκε κανένα συστατικό.

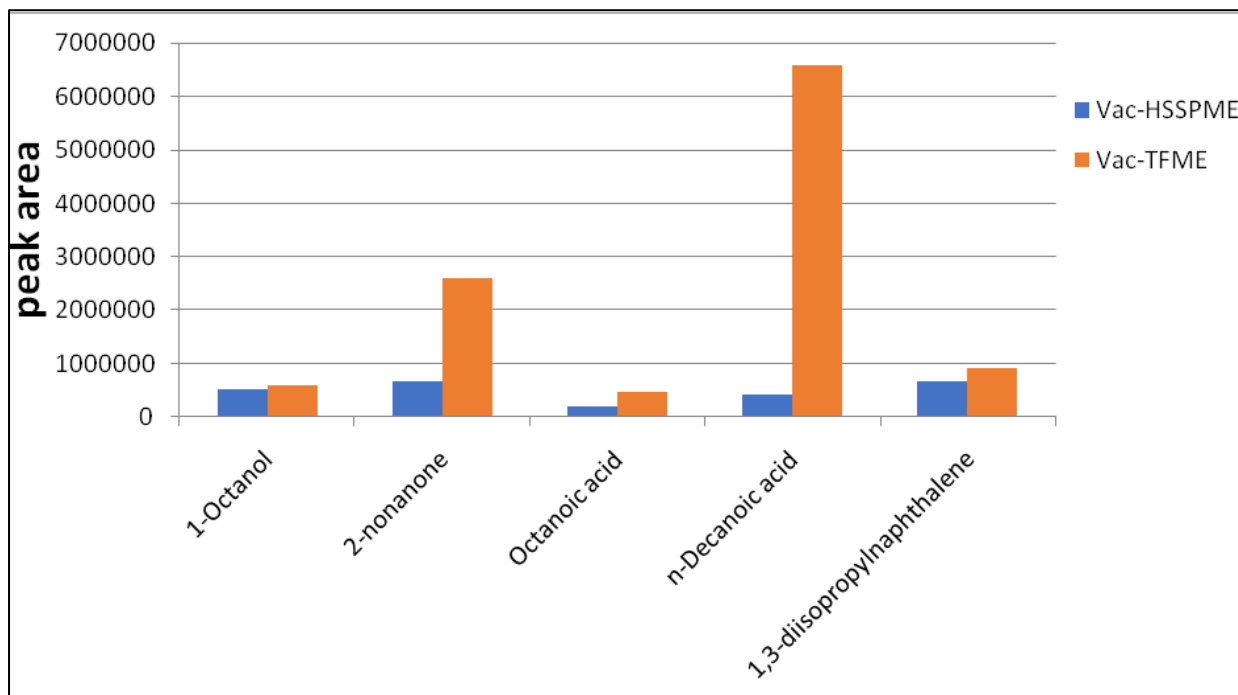
Ακόμα, παρατηρείται ότι στα πειράματα που διεκπεραιώθηκαν, υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης και στην υψηλότερη θερμοκρασία, όσο περνάει ο χρόνος εκχύλισης, βελτιωνόταν η ταυτοποίηση των περισσότερων ενώσεων. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης σε όλα τα πειράματα είναι τα 40 λεπτά, καθώς πριν από αυτόν το χρόνο, δεν είχε επέλθει ισορροπία για την πλειοψηφία των εξεταζόμενων ενώσεων.

Με βάση τα αποτελέσματα η vac-HSSPME, παρουσιάζει αισθητή βελτίωση στους ρυθμούς εκχύλισης, σε σύγκριση με την regular-HSSPME και το μέγεθος του θετικού αντίκτυπου στους ρυθμούς εκχύλισης, διαφέρει ανάλογα με την ουσία και σχετίζεται με την ικανότητα της να κατανεμηθεί στον υπερκείμενο χώρο. Έτσι, στη

μέθοδο vac-HSSPME παρατηρείται ότι, επιτυγχάνεται πιο γρήγορα ισορροπία, σε σχέση με τη regular-HSSPME και ειδικά, οι ενώσεις **1-octanol**, **n-decanoic acid** και **2-hexyl-1-octanol** έχουν φτάσει σε ισορροπία ήδη από τα 30 λεπτά, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9. Ωστόσο, αυτή η βελτίωση μειώνεται, όσο αυξάνεται ο χρόνος δειγματοληψίας, καθώς οι ενώσεις πλησιάζουν προς την ισορροπία.

#### 4. Σύγκριση μεθόδων

Αδιαμφισβήτητα, η πιο αποτελεσματική μέθοδος θεωρείται η vac-TFME. Στο διάγραμμα 10 απεικονίζεται η σύγκριση vac-TFME με τη vac-HSSPME, για το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στους 50 °C και για 30 λεπτά εκχύλιση. Με βάση αυτό, παρατηρείται ότι οι 5 ενώσεις που ταυτίζονται μεταξύ των 2 μεθόδων, ενισχύονται αισθητά από την vac-TFME. Ειδικά οι ημι-πτητικές ενώσεις, όπως το **octanoic acid** και το **n-decanoic acid**, παρουσιάζουν αξιοσημείωτη βελτίωση με τη πρώτη μέθοδο.



**Διάγραμμα 10:** Σύγκριση της απόκρισης των ενώσεων που ταυτίζονται μεταξύ της μεθόδου vac-HSSPME (μπλε) και της vac-TFME (πορτοκαλί), για το πείραμα που διεκπεραιώθηκε στους 50 °C και για 30 min εκχύλιση

Αυτή η διαφορά οφείλεται κυρίως, στη μεγαλύτερη επιφάνεια και το μικρό πάχος επίστρωσης που διαθέτει το λεπτό φιλμ σε σχέση με την ίνα, το οποίο έχει ως επακόλουθο την αύξηση του όγκου της εκχυλιστικής φάσης, αλλά και της αποτελεσματικότητας της μεθόδου.

Ακόμα, ενδέχεται να οφείλεται στη διαφορετική επίστρωση που έχουν το λεπτό φιλμ και η ίνα. Μολονότι, έχουν κοινή επικάλυψη την PDMS, η οποία διαθέτει την καλύτερη απορροφητικότητα και την καλύτερη απόδοση διαχωρισμού για μη πολικές ενώσεις, όπως εξάλλου είναι και τα αρωματικά συστατικά της παρμεζάνας, το λεπτό φιλμ είναι PDMS/HLB. Αντίθετα, η επίστρωση της ίνας είναι PDMS/CAR/DVB.



Επομένως, ο συνδυασμός επικάλυψης του λεπτού φιλμ, ενδέχεται να είναι πιο κατάλληλος για τις πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις που εμπεριέχονται στην παρμεζάνα.

## 5. Συμπεράσματα

Με βάση την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, ήταν εμφανές ότι, η βέλτιστη μέθοδος για την ανάλυση πτητικού προφίλ της παρμεζάνας, θεωρήθηκε η vac-TFME. Το αποτέλεσμα αυτό, δικαιολογείται από το γεγονός ότι, με την προαναφερθείσα τεχνική ανιχνεύθηκαν έως και **15** πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις, ενώ με την vac-HSSPME έως και **6** ενώσεις. Επιπρόσθετα, με τη χρήση της vac-TFME ταυτοποιήθηκε πληθώρα ενώσεων, ακόμα και στους 4 °C.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τις παραμέτρους που μελετήθηκαν, στην TFME παρατηρήθηκε ότι, ο συνδυασμός κενού και αυξημένης θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα, την ανίχνευση και ταυτοποίηση των περισσότερων εξεταζόμενων ενώσεων. Ωστόσο, σχετικά με την ποιοτική ανάλυση τροφίμων, είναι συνετό η αύξηση της θερμοκρασίας να πραγματοποιείται σε όρια, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή παραπροϊόντων και στην αποσύνθεση των υπαρχόντων ενώσεων.

Τα αποτελέσματα στην HSSPME, ήταν παρόμοια με την παραπάνω μέθοδο, σχετικά με τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, η πιο αισθητή ήταν το κενό, αφού απουσία κενού, ανεξαρτήτως των άλλων μεταβλητών, δεν ανιχνεύθηκε καμία ένωση. Ακόμα, σημαντικός παράγοντας θεωρήθηκε η θερμοκρασία, η αύξηση της οποίας, μολονότι οδήγησε σε θετικά αποτελέσματα, δεν κατάφερε να υπερτερήσει της vac-HSSPME, γεγονός που πιθανότατα, οφείλεται στη μήτρα του δείγματος.

Τέλος, και για τις 2 μεθόδους, διαπιστώθηκε ότι ο πιο αποτελεσματικός χρόνος εκχύλισης ήταν τα 40 λεπτά, εφόσον με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης, αυξανόταν και η απόκριση των ενώσεων στον αέριο χρωματογράφο, συμπεραίνοντας έτσι, ότι πριν τα 40 λεπτά, δεν έχει επέλθει η ισορροπία.

Εν κατακλείδι, η **vac-TFME** αποτελεί μια απλή, οικονομική και οικολογική τεχνική και μολονότι βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, ενδέχεται να ξεχωρίσει μελλοντικά στο χώρο της βιομηχανίας τροφίμων, ελέγχοντας την ποιότητα προϊόντων με περιορισμένο χρόνο κατανάλωσης, γρήγορα και εύκολα, χωρίς να προηγηθεί κάποια θερμική επεξεργασία. Ακόμα, μια περαιτέρω έρευνα που θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί είναι η ποσοτικοποίηση των ενώσεων που εμπεριέχονται σε αυτά τα τρόφιμα. Τέλος, σχετικά με την ποιοτική ανάλυση τους, υπό την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελέτη των παραπροϊόντων που δημιουργήθηκαν, εξαιτίας της θέρμανσής τους.

## 6. Βιβλιογραφία

- [1] Μαλά Μ., 2006. «Πτητικά συστατικά στο κυπριακό τυρί, Χαλούμι», Διπλωματική εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- [2] MOIO, L., & ADDEO, F. (1998). Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*, 65(2), 317–333.
- [3] PAPPAS, C. P., KONDYLI, E., VOUTSINAS, L. P., & MALLATOU, H. (1996). Effects of starter level, draining time and aging on the physicochemical, organoleptic and rheological properties of feta cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 49(3), 73–78.
- [4] Wikipedia: Παρμεζάνα
- [5] Chromedia
- [6] Eisert 1997
- [7] Boyd-Boland, A. A., & Pawliszyn, J. B. (1996). Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Water. *Analytical Chemistry*, 68(9), 1521–1529.
- [8] Xu, X.-B., Murtada, K., & Pawliszyn, J. (2020). Determination of selected volatile terpenes in fish samples via solid phase microextraction arrow coupled with GC-MS. *Talanta*, 121446.
- [9] Psillakis, E., Yiantzi, E., Sanchez-Prado, L., & Kalogerakis, N. (2012). Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Improved extraction of semivolatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions. *Analytica Chimica Acta*, 742, 30–36.
- [10] Αντωνία Μουσουράκη, 2012. «Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεής φάσης υπό συνθήκες κενού, ‘‘Vac-HSSPME’’», Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης
- [11] Χαράλαμπος Λαγουδάκης, 2014. «Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, οργανοχλωριωμένων ενώσεων που βρίσκονται σε δείγματα νερού», Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης

- [12] Frank, D. C., Owen, C. M., & Patterson, J. (2004). Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 139–154.
- [13] Jiang, R., & Pawliszyn, J. (2012). Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 39, 245–253.
- [14] Παπαδογιάννης, ΙΝ., Σαμανίδου, Β.Φ., Σημειώσεις Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, Α.Π.Θ.
- [15] Χατζηιωάννου, Θ.Π, Κουπάρης, Μ.Α., Σημειώσεις Ενόργανης Ανάλυσης, Α.Π.Θ.
- [16] Αργυρόπουλος, Ν., Βαρέλλα, Σημειώσεις Πειραματικής Οργανικής Χημείας , Α.Π.Θ.
- [17] Ψυλλάκη Ελευθερία, Σημειώσεις ελέγχου ρύπανσης νερών, Πολυτεχνείο Κρήτης
- [18] Ν.Κ.Ανρικόπουλος, 2015. Σημειώσεις: Γαλακτοκομικά ενζυμικής επεξεργασίας, Α.Π.Θ.
- [19] Zhang, Q.-H., Zhou, L.-D., Chen, H., Wang, C.-Z., Xia, Z.-N., & Yuan, C.-S. (2016). Solid-phase microextraction technology for in vitro and in vivo metabolite analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 57–65.
- [20] Ouyang, G., Vuckovic, D., & Pawliszyn, J. (2011). Nondestructive, Sampling of Living Systems Using in Vivo Solid-Phase Microextraction. *Chemical Reviews*
- [21] Βικτώρια Σαμανίδου, Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων, Εκδόσεις Πήγασος
- [22] Trujillo-Rodríguez, M. J., Pino, V., Psillakis, E., Anderson, J. L., Ayala, J. H., Yiantzi, E., & Afonso, A. M. (2017). Vacuum-assisted headspace-solid phase microextraction for determining volatile free fatty acids and phenols. *Investigations*

on the effect of pressure on competitive adsorption phenomena in a multicomponent system. *Analytica Chimica Acta*, 962, 41–51.

[23] Psillakis, E., Mousouraki, A., Yiantzi, E., & Kalogerakis, N. (2012). Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1244, 55–60.

[24] Laurel Vernarelli, Jackie Whitecavage, John Stuff. (2019). Analysis of Food Samples using Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME) and Thermal Desorption GC/MS, GERSTEL, Inc., 701 Digital Drive, Suite J, Linthicum, MD, 21090. USA.

[25] Olcer, Y. A., Tascon, M., Eroglu, A. E., & Boyaci, E. (2019). Thin film microextraction: towards faster and more sensitive microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*.

[26] Bruheim, I., Liu, X., & Pawliszyn, J. (2003). Thin-Film Microextraction. *Analytical Chemistry*, 75(4), 1002–1010.

[27] Jae-Hwan Lee, Raymond Diono, Gur-Yoo Kim, David B. Min, (2003). Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of parmesan cheese, Department of food science and technology. Ohio, 51, 1136-1140

[28] Μαρία Βακιντή., 2019. «Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού για προσδιορισμό αλογονοανισολών σε δείγματα κρασιού», Μεταπτυχιακή εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης

[29] Lord, H. and Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), pp.153-193

[30] Mascrez, S., Psillakis, E., & Purcaro, G. (2019). A Multifaceted investigation on the effect of vacuum on the headspace solid-phase microextraction of extra-virgin olive oil. *Analytica Chimica Acta*.

[31] E. Yiantzi Ph.D., 2014. « Microextraction under vacuum Conditions». Thesis, Technical University of Crete

- [32] Ai, J. (1997). Headspace Solid Phase Microextraction. Dynamics and Quantitative Analysis before Reaching a Partition Equilibrium. *Analytical Chemistry*, 69(16), pp.3260-3266
- [33] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [34] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.83655.html>
- [35] <https://www.nist.gov>
- [36] Yogesh B. Gianchandani, Osamu Tabata, Hans Zappe. (2008). *Comprehensive Microsystems*
- [37] Psillakis E. (2017). Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 986
- [38] Liss P., Slater P. (1974). Flux of Gases across the Air-Sea Interface. *Nature*
- [39] Mackay D., Leinonen P. (1975). Rate of evaporation of low-solubility contaminants from water bodies to atmosphere. *Environmental Science & Technology*
- [40] <https://www.mydiatrofi.gr/trofi/trofima/galaktokomika/tyria-diatrofiki-kai-threptiki-aksia>
- [41] Pérès, C., Viallon, C., & Berdagué, J.-L. (2001). Solid-Phase Microextraction-Mass Spectrometry: A New Approach to the Rapid Characterization of Cheeses. *Analytical Chemistry*, 73(5), 1030–1036.