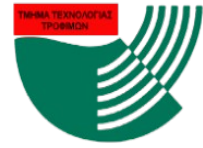




ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ
ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΣΤΕΒΙΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)**

ΜΠΑΛΛΑΣ ΑΓΑΜΕΜΝΩΝ – ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΦΑΣΝΑΚΗ ΑΝΘΟΥΛΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019

ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΤΩΝ ΣΕ ΦΥΛΛΑ ΣΤΕΒΙΑ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ
ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

ΜΠΑΛΛΑΣ ΑΓΑΜΕΜΝΩΝ – ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΦΑΣΝΑΚΗ ΑΝΘΟΥΛΑ

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για
την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας
Τροφίμων του ΔΙΠΑΕ.

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2019

ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ

ΠΑΝΤΕΛΗΣ ΡΗΓΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στον καθηγητή της σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων, κ. Παντελή Ρήγα για τις χρήσιμες συμβουλές και την καθοδήγηση που μας προσέφερε, καθώς και τον Νικόλαο Αναγνώστου για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους. Τέλος ευχαριστούμε τον Ευάγγελο Ευαγγέλου, ο οποίος μας παρείχε τα δείγματα στέβια.

Περίληψη

Η *Stevia Rebaudiana* Bertoni είναι ένα φυτό μεγάλου ενδιαφέροντος, λόγω των φυσικών γλυκαντικών ουσιών που περιέχει. Οι ουσίες αυτές είναι οι διτερπνοειδής γλυκοζίτες της στεβιόλης. Οι εν λόγω γλυκοζίτες είναι περίπου σαράντα με κυριότερους τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α. Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μία μέθοδος ανάλυσης και προσδιορισμού της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης Α με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC), με σκοπό την ανάλυση δειγμάτων από φύλλα στέβια. Τα φύλλα στέβια που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την ίδια ποικιλία και από ίδιες συνθήκες ανάπτυξης. Εξάιρεση αποτελεί το λίπασμα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε φυτό, το οποίο ήταν διαφορετικό. Ο τύπος της χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση, ήταν Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Κανονικής Φάσης (Normal Phase HPLC). Η ανίχνευση έγινε στο υπεριώδες φάσμα στα 210nm με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array).

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	i
Περιεχόμενα.....	ii

Ακρωνύμια.....	1
1. Εισαγωγή.....	3
2.1. Γενικά περί γλυκοζιτών.....	4
2.2. Στέβια – Προέλευση.....	5
2.3. Γλυκοζίτες Στεβιόλης – Δομή και άλλα συστατικά.....	7
2.4. Μέθοδοι Ανάλυσης των Γλυκοζιτών.....	12
2.5. Μέθοδοι Εκχύλισης των Γλυκοζιτών.....	16
2.6. Χρήση της στέβια ως Γλυκαντικό.....	18
2.6.1. Τοξικότητα των προϊόντων στέβια.....	20
2.6.2. Ασφάλεια και Κανονισμοί.....	21
2.7. Χρωματογραφία – Βασικές αρχές διαχωρισμού.....	22
2.7.1. Χρωματογραφία Στήλης.....	24
2.7.2. Χρωματογραφία Προσρόφησης.....	25
2.7.3. Χρωματογραφία Κατανομής.....	26
2.7.4. Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής.....	27
2.7.5. Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού.....	28
2.7.6. Χρωματογραφία Συγγένειας.....	28
2.8. Χρωματογραφία HPLC.....	28
2.8.1. HPLC Κανονικής Φάσης.....	29
2.8.2. HPLC Αντίστροφης Φάσης.....	31
2.8.3. Οργανολογία HPLC.....	33
2.8.4. Βασικές έννοιες που περιγράφουν μία χρωματογραφική ανάλυση.....	37
2.8.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με Χρωματογραφία HPLC.....	43
3. Σκοπός της εργασίας.....	47
4.1. Υλικά και Μέθοδοι.....	47
4.1.1. Πρώτη Ύλη.....	47
4.1.2. Αντιδραστήρια.....	47
4.1.3. Όργανα.....	48
4.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	48
5. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού γλυκοζιτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	50

5.1. Μεθοδολογία.....	50
5.2. Μελέτη διάφορων παραμέτρων της μεθόδου ανάλυσης.....	51
5.2.1. Μελέτη για την επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος ανίχνευσης στο υπεριώδες (UV).....	51
5.2.2. Μελέτη θερμοκρασίας στήλης.....	51
5.2.3. Μελέτη ροής κινητής φάσης συστήματος.....	52
5.2.4. Μελέτη ποσοστού οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο:νερό v/v) στην κινητή φάση.....	52
5.2.5. Μελέτη όγκου βρόγχου δείγματος.....	55
5.3. Προετοιμασία πρότυπου διαλύματος γλυκοζιτών.....	56
5.4. Γραμμικότητα.....	56
5.5 Επαναληψιμότητα - Αναπαραγωγικότητα (%RSD).....	58
5.6. Κατώτερο όριο ανίχνευσης και κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.....	62
5.7. Χρωματογραφήματα δειγμάτων φύλλων στέβια.....	63
6. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	75
7. Συμπεράσματα.....	77
8. Μελλοντικές Προτάσεις.....	78
9. Βιβλιογραφία.....	79

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

CAD	Charged Aerosol Detector	Ανιχνευτής Φορτισμένου Αερολύματος
CD	Conductivity Detector	Αγωγιμομετρικός Ανιχνευτής
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων
ECD	Electrochemical Detector	Ηλεκτροχημικός Ανιχνευτής
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού
FDA	United States Food and Drug Administration	Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
FLD	Fluorescence Detector	Φθορισμομετρικός Ανιχνευτής
GRAS	Generally Recognized As Safe	Προσδιορισμός ουσίας ως ασφαλή για τα τρόφιμα
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υδροφιλικών Αντιδράσεων
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
HPTLC	High Performance Thin-layer Chromatography	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Πίεσης
IR	Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία υπερύθρου
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives	Κοινή Επιστημονική Επιτροπή του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τα Πρόσθετα των Τροφίμων
LOD	Limit Of Detection	Κατώτατο Όριο Ανίχνευσης

LOQ	Limit Of Quantification	Κατώτατο Όριο Ποσοτικοποίησης
MS	Mass Spectroscopy	Φασματοσκοπία Μάζας
MSD	Mass Spectroscopy Detector	Ανιχνευτής Φασματοσκοπίας Μάζας
NMR Detector	Nuclear Magnetic Resonance Detector	Ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
NP HPLC	Normal Phase HPLC	HPLC κακονικής φάσης
PAD	Pulse Amperometric Detector	Αμπερομετρικός Ανιχνευτής
PCD	Post Column Derivatization	Παραγωγή του δείγματος μετά τη στήλη
RI Detector	Refractive Index Detector	Ανιχνευτής δείκτη Διάθλασης
RP HPLC	Reversed Phase HPLC	HPLC αντίστροφης φάσης
RSD%	Relative Standard Deviation Percent	Σχετική τυπική απόκλιση επί τοις εκατό
SD	Standard Deviation	τυπική απόκλιση
SPE	Solid Phase Extraction	Εκχύλιση Στερεής Φάσης
TOFMS	Time of flight Mass Spectrometry	Φασματόμετρο Μάζας Χρόνου Πτήσης
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υπερ-υψηλής Απόδοσης
UV / Vis	Ultraviolet/visible Spectroscopy	Ορατό – Υπεριώδες Φάσμα

1. Εισαγωγή

Η αντικατάσταση της ζάχαρης με άλλες γλυκαντικές ουσίες σε τρόφιμα και ποτά είναι ένας βασικός στόχος στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή προϊόντων, τα οποία περιέχουν λιγότερες θερμίδες και επιπλέον είναι κατάλληλα για άτομα με διαβήτη.

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει μία φυσική γλυκαντική ουσία χωρίς θερμίδες, γνωστή ως στέβια.

Η Στέβια (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) είναι σήμερα ένα πολυσυζητημένο φυτό παγκοσμίως, που απασχολεί το διεθνή έντυπο και ηλεκτρονικό τύπο. Προκαλεί ραγδαίες ανακατατάξεις στην αγορά γλυκαντικών και ζάχαρης. Χαρακτηρίζεται από πολλούς ως “το φυτό της νέας χιλιετίας” και οι γλυκοζίτες του ως “η ζάχαρη του μέλλοντος”.

Η αξία του φυτού αυτού είναι σημαντική καθώς μπορεί να γίνει και βιομηχανική εκμετάλλευσή του αλλά και οικιακή παραγωγή (π.χ. σε γλάστρες για τις καθημερινές ανάγκες του σπιτιού).

Η στέβια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ωμή αλλά και αποξηραμένη στο φαγητό, σε σαλάτες, σε γλυκά ακόμα και σε ποτά. Η ποσότητα που απαιτείται είναι ελάχιστη λόγω της μεγάλης γλυκαντικής της δύναμη, με αποτέλεσμα τα προϊόντα να έχουν χαμηλή θερμιδική αξία.

Οι γλυκαντικές ιδιότητες της στέβια οφείλονται στους γλυκοζίτες της στεβιόλης που βρίσκονται στα φύλλα της. Οι δύο κυριότεροι, καθώς και αυτοί που θα μας απασχολήσει ο προσδιορισμός τους, είναι η Στεβιοσίδα και η Ρεμπαουδιοσίδα Α.

Το αντικείμενο της εργασίας αυτής είναι η ανάλυση της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης Α σε φύλλα στέβια. Η ανάλυση αυτή περιλαμβάνει την παραλαβή των γλυκοζιτών από τα φύλλα του φυτού με εκχύλιση και έπειτα την ανίχνευση, το διαχωρισμό τους και την ποσοτικοποίηση τους με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

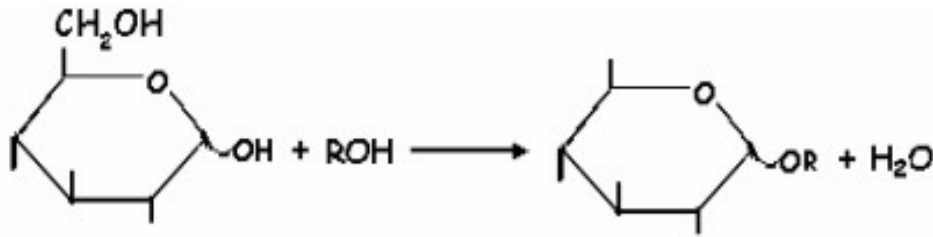
Η Υγρή Χρωματογραφία χρησιμοποιείται τόσο για τον ποιοτικό αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών. Η HPLC είναι μία διαχωριστική τεχνική, η οποία βρίσκει πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια και θεωρείται η πλέον κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους ενώσεων.

2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

2.1. Γενικά περί γλυκοζιτών

Οι γλυκοζίτες είναι οργανικές ενώσεις, φυσικές αλλά και συνθετικές που προκύπτουν από παράγωγα σακχάρων και αποτελούνται από δύο τμήματα. Το ένα τμήμα είναι υδατάνθρακας, ο οποίος όταν ο γλυκοζίτης είναι φυσικό προϊόν, ονομάζεται γλυκόνη (glycone). Το τμήμα αυτό συνδέεται μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού (γλυκοσιδικού δεσμού) με ένα άλλο τμήμα που δεν ανήκει στην κατηγορία των σακχάρων και ονομάζεται άγλυκον ή γενίνη, (aglycone ή genin).

Στην κυκλική ημιακεταλική μορφή ενός σακχάρου, στην αλδεϋδική ή κετονική ομάδα, υπάρχει υδροξυλομάδα, η οποία ονομάζεται ακεταλικό ή γλυκοζιτικό υδροξύλιο. Η ομάδα αυτή αποτελεί το σημείο σύνδεσης των δύο τμημάτων για τον σχηματισμό των γλυκοζιτών.



Σάκχαρο

Γλυκοζίτης

Οι γλυκοζίτες είναι ουσίες κυρίως φυτικής προέλευσης και η ταξινόμησή τους γίνεται ανάλογα με τη φύση του άγλυκου τμήματός τους. Η διάκριση τους γίνεται με βάση το είδος του γλυκοζιτικού δεσμού, το άτομο συναρμογής του γλυκοζιτικού δεσμού, το είδος του σακχάρου και το άγλυκο τμήμα του μορίου.

Σύμφωνα με το είδος του γλυκοζιτικού δεσμού διακρίνονται στους α- και β-γλυκοζίτες. Στους α-γλυκοζίτες, ο γλυκοζιτικός δεσμός βρίσκεται στο επάνω μέρος του κυκλικού μορίου του σακχάρου ενώ στους β-βρίσκεται στο κάτω μέρος. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι η πλειοψηφία των φυσικών γλυκοζιτών είναι β-γλυκοζίτες.

Σύμφωνα με το άτομο συναρμογής του γλυκοζιτικού δεσμού διακρίνονται σε:

- C-γλυκοζίτες
- O-γλυκοζίτες (φαινόλες, φλαβόνες, ανθοκυάνες, στεροειδή, τερπενοειδή)
- N-γλυκοζίτες (νουκλεοτίδια)
- S-γλυκοζίτες (σινιγρίνη → AITC)

Οι γλυκοζίτες είναι ευαίσθητοι σε τιμές υψηλού pH και μπορούν να υδρολυθούν πολύ εύκολα. Αυτό οφείλεται στο σάκχαρο ή στα σάκχαρα που περιέχει το μόριο τους. Κατά την υδρόλυση τους διασπώνται στο άγλυκο τμήμα και στο σάκχαρο. Η υδρόλυση τους μπορεί να είναι και ενζυμική (υδρολάσες). Για παράδειγμα η φυσική χρωστική ανθοκυανίνη, η οποία είναι O-γλυκοζίτης και η σινιγρίνη, η οποία είναι S-γλυκοζίτης, με ενζυμική υδρόλυση δίνουν ως άγλυκο το ισοθειοκυανικό αλλύλιο ή σιναπέλαιο με χαρακτηριστική οσμή της μουστάρδας.

2.2. Στέβια – Προέλευση

Η στέβια (*Stevia rebaudiana*) είναι ένα θαμνώδες φυτό, ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και συγγενεύει με διάφορα βότανα και άνθη, όπως το χαμομήλι, το εστραγκόν, το αντίδι, το μαρούλι, την μαργαρίτα, τον ηλίανθο και τα χρυσάνθεμα.

Στα φύλλα της, παράγονται διτερπενοειδείς ουσίες σαν δευτερεύοντες μεταβολίτες, οι οποίες είναι φυσικές και έχουν γλυκιά γεύση. Οι Ινδιάνοι της φυλής των Γκουαράνι (Guarani), αυτόχθονες των περιοχών της Παραγουάης και Βραζιλίας, χρησιμοποιούσαν για αιώνες τα φύλλα της στέβια και τα εκχυλίσματά τους ως γλυκαντική και φαρμακευτική ουσία. Την αποκαλούσαν "καα-χε-έ" (kaa-he-é), που σημαίνει "φύλλο - μέλι".

Το γένος στέβια αποτελείται από 240 είδη φυτών που ενδημούν στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική και το Μεξικό μέχρι την Αριζόνα, το Νέο Μεξικό και το Τέξας. Οι γλυκιές ιδιότητες των φύλλων στέβια ήταν γνωστές για αιώνες στους αυτόχθονες της Ν. Αμερικής, όπως στη φυλή Γκουαράνι της Παραγουάης, που φαίνεται να χρησιμοποίησε πρώτη τα φύλλα του φυτού για να προσθέσει γλυκύτητα στα ροφήματα βοτάνων. Από το 1800 η κατανάλωση της στέβια εδραιώθηκε σε όλη τη Νότια Αμερική, όπως τη Βραζιλία και την Αργεντινή. Τα φύλλα του φυτού είναι 30 με 45 φορές πιο γλυκά από τη ζάχαρη[3] και μπορούν να καταναλωθούν αυτούσια ή να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή ροφημάτων και τροφίμων.

Ένα αποξηραμένο φύλλο *Stevia* είναι 10 έως 15 φορές πιο γλυκό από ίση ποσότητα ζάχαρης, ενώ κονιοποιημένα ξηρά παρασκευάσματα από εκχυλίσματα φύλλων στέβια είναι μέχρι και 300 φορές γλυκύτερα.

Προς τα τέλη του 19ου αιώνα, ο Παραγουανός βοτανολόγος Moises Santiago Bertoni (1857-1929), Διευθυντής της Γεωργικής Σχολής της Ασουσιόν, ενημερώθηκε για ένα εξαιρετικά γλυκό φυτό. Το αναζήτησε και μετά από έρευνες το ανακάλυψε στα δάση της βορειοανατολικής Παραγουάης.

Ο Bertoni περιέγραψε και ταξινόμησε επιστημονικά τη στέβια το 1899, και ονόμασε τη νέα αυτή ποικιλία της στέβια *Rebaudiana*, προς τιμήν του Παραγουανού χημικού Ovidio Rebaudi, ο οποίος πρώτος απομόνωσε με εκχύλιση τα γλυκά συστατικά του φυτού *Stevia*.

Λόγω των γλυκοζιτών της στεβιόλης με την έντονη γλυκύτητα, η καλλιέργεια του φυτού έχει διαδοθεί σε μεγάλη κλίμακα σε διάφορες χώρες της Ευρώπης, της Ασίας και της Αμερικής με σκοπό την αξιοποίησή τους. Συγκεκριμένες ποικιλίες της *S. Rebaudiana* επιλέγονται λόγω της αυξημένης παραγωγής τους σε συγκεκριμένους γλυκοζίτες.



(Bundle et al. , 2016)

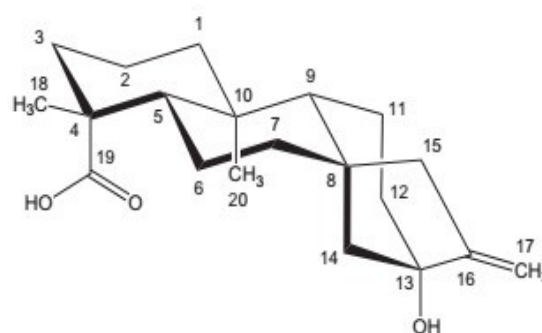
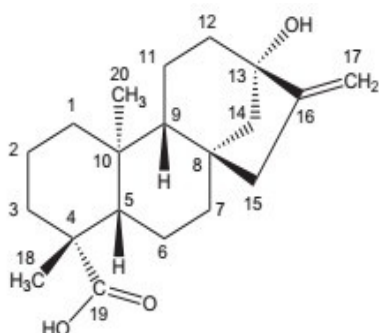
Σχήμα 1. Το φυτό *Stevia Rebaudiana* Bertoni.

2.3. Γλυκοζίτες Στεβιόλης – Δομή και άλλα συστατικά

Τα σημαντικότερα συστατικά των φύλλων της *Stevia Rebaudiana* Bertoni είναι οι γλυκοζίτες της στεβιόλης, από τους οποίους οι κυριότεροι είναι η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη Α (σχήμα 3). Έχει διαπιστωθεί ότι η στεβιοσίδη σε αποξηραμένα φύλλα κυμαίνεται σε 5-20% (w/w) ενώ η ρεμπαουδιοσίδη Α μόλις 2-5% (w/w)[ii]. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις έχουν βρεθεί οι: ρεμπαουδιοσίδη Β, ρεμπαουδιοσίδη C, ρεμπαουδιοσίδη D, ρεμπαουδιοσίδη E, ρεμπαουδιοσίδη F, η στεβιολβιοσίδη, η ρουμπουσοσίδη, η δουλκοσίδη Α.

Η σχετική συγκέντρωση των γλυκοζιτών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον γενότυπο, τη φαινολογική κατάσταση (περιοδικά βιολογικά φαινόμενα), την καλλιέργεια, τις κλιματικές συνθήκες ακόμη και κατά τη διάρκεια της συγκομιδής του φυτού.

Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι μεγάλες συγκεντρώσεις στεβιολβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης Β μπορεί να σχετίζονται με τη μερική υδρόλυση κατά την διαδικασία εκχύλισης των φύλλων της *S. Rebaudiana*.



Σχήμα 2. Δομή στεβιόλης.

Μελέτες για χημικό χαρακτηρισμό των κύριων γλυκών συστατικών που εμπεριέχονται στα φύλλα του φυτού, διεξάγονται από το 1908. Ο πρώτος γλυκοζίτης της στεβιόλης που αναλύθηκε ήταν η στεβιοσίδη το 1955. Από το 1980 και έπειτα ακολούθησαν πολλές μελέτες πάνω στην δομή και την οργανική σύνθεση της στεβιόλης.

Η δομή της στεβιοσίδης είναι ένας τετρακυκλικός διτερπενοειδής γλυκοζίτης και σχηματίζεται όταν η στεβιόλη, εντ-13-υδροξυκαουρ-16-ενο-19-ικό οξύ (άγλυκον) εστεροποιηθεί στην C-19 ομάδα καρβοξυλικού οξέος (R1) με μία β-D-γλυκοπυρανοζόλη και υποκαθίσταται στην τριτοταγή υδροξυλική ομάδα στη θέση C-13 (R2) με τον δισακχαρίτη β-σοφοροζόλη, με χημικό τύπο 13-[(2-O-β-D-γλυκοπυρανοζόλη-β-D γλυκοπυρανοζόλη)οξι]εντ-καουρ-16-ενο-19-ικό οξύ β-D γλυκοπυρανοζολικός εστέρας.

Το γλυκόν τμήμα που δεσμεύεται στην θέση C-19 γενικά υποδηλώνεται με τον συμβολισμό R1 και αυτό που δεσμεύεται στην θέση C-13 συμβολίζεται με R2.

Μέχρι στιγμή έχουν ταυτοποιηθεί 43 διαφορετικοί φυσικά απαντώμενοι γλυκοζίτες στεβιόλης στην *S. Rebaudiana* Bertoni, οι οποίοι εμφανίζονται στον πίνακα 1. Στις περισσότερες περιπτώσεις η στεβιόλη υποκαθίσταται στην θέση C-19 (R1) και C-13 (R2) με μία β-D-γλυκοπυρανόζη ή σχετικά με μικρούς ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από μόρια D-γλυκοπυρανόζης, ανεξαρτήτως εάν περιέχονται και ομάδες D-φρουκτανόζης, L-ραμνοπυρανόζης, D-κινοβοπυρανόζης (6-δυσόξυ-D-γλυκοπυρανόζη) ή D-ξυλοπυρανόζη. Γι' αυτό τον λόγο έχει προταθεί οι γλυκοζίτες της στεβιόλης να κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον υπολειμματικό σακχαρίτη, που βρίσκεται στο μόριο του γλυκοζίτη στις πέντε ακόλουθες ομάδες:

- σε αυτούς που έχουν γλυκόζη
- σε αυτούς που έχουν φρουκτόζη
- σε αυτούς που έχουν ραμνόζη
- σε αυτούς που έχουν ξυλόζη
- σε αυτούς που έχουν κουινοβόζη (6-δεσοξυ-D-γλυκόζη)

Τα φύλλα της *S. Rebaudiana* περιέχουν βέβαια και άλλους γλυκοζίτες στεβιόλης σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις.

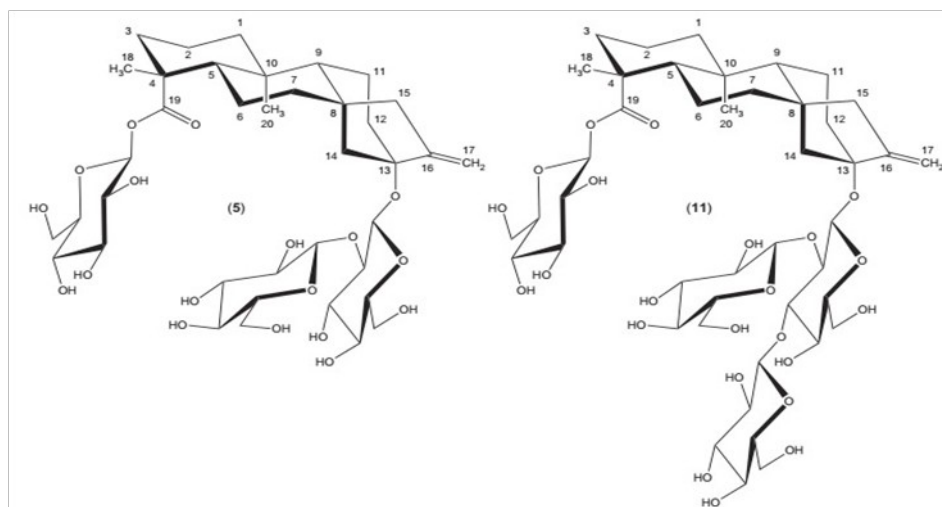
Πέρα όμως από τις γλυκαντικές ουσίες για τις οποίες έγινε γνωστή, τα φύλλα της περιέχουν και άλλες χρήσιμες ουσίες, όπως ιχνοστοιχεία (χρώμιο, μαγνήσιο, μαγγάνιο, κάλιο, σελήνιο, ψευδάργυρο) και βιταμίνες του συμπλέγματος Β (κυρίως νιασίνη).[ii]

Πίνακας 1. Δομές φυσικών γλυκοζιτών στεβιόλης σε φύλλα στέβια.

A/A	Γλυκοζίτης Στεβιόλης	R ¹ (C-19/ Καρβοξυλικό οξύ)	R ² (C-13/ Υδροξύλιο)
Ομάδα γλυκοζιτών που έχουν γλυκόζη			
1	Στεβιολμονοσίδη	H-	Glc(β1-
2	Στεβιολ-19-O-γλυκοσίδη	Glc(β1-	H-
3	Ρουμπουσοσίδη	Glc(β1-	Glc(β1-
4	Στεβιολβιοσίδη	H-	Glc(β1-2)Glc(β1-
5	Στεβιοσίδη	Glc(β1-	Glc(β1-2)Glc(β1-
6	Ρεμπαουδιοσίδη KA/Στεβιοσίδη A	Glc(β1-2)Glc(β1-	Glc(β1-
7	Ρεμπαουδιοσίδη B	H-	Glc(β1-2)[Glc(β1- 3)]Glc(β1-
8	Ρεμπαουδιοσίδη G	Glc(β1-	Glc(β1-3)Glc(β1-
9	Στεβιοσίδη B	Glc(β1-3)Glc(β1-	Glc(β1-
10	Ρεμπαουδιοσίδη E	Glc(β1-2)Glc(β1-	Glc(β1-2)Glc(β1-
11	Ρεμπαουδιοσίδη A	Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1- 3)]Glc(β1-
12	Ρεμπαουδιοσίδη A2	Glc(β1-	Glc(β1-6)Glc(β1- 2)Glc(β1-
13	Ρεμπαουδιοσίδη D	Glc(β1-2)Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1- 3)]Glc(β1-
14	Ρεμπαουδιοσίδη I	Glc(β1-3)Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1- 3)]Glc(β1-
15	Ρεμπαουδιοσίδη L	Glc(β1-	Glc(β1-6)Glc(β1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-

16	Ρεμπαουδιοσίδη Q2	Glc(α1-2)Glc(α1-4)Glc(β1-	Glc(β1-2)Glc(β1-
17	Ρεμπαουδιοσίδη Q	Glc(β1-	Glc(α1-4)Glc(β1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-
18	Ρεμπαουδιοσίδη I2	Glc(β1-	Glc(α1-3)Glc(β1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-
19	Ρεμπαουδιοσίδη Q3	Glc(β1-	Glc(α1-4)Glc(β1-3) [Glc(β1-2)]Glc(β1-
20	Ρεμπαουδιοσίδη I3		Glc(β1-2)Glc(β1-
21	Ρεμπαουδιοσίδη M/ Ρεμπαουδιοσίδη X	Glc(β1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
Ομάδα γλυκοζιτών που έχουν φρουκτόζη			
22	Ρεμπαουδιοσίδη A3	Glc(β1-	Glc(β1-2)[Fru(β2-3)]Glc(β1-
Ομάδα γλυκοζιτών που έχουν ραμνόζη			
23	Δουλκοσίδη A	Glc(β1-	Rha(α1-2)Glc(β1-
24	Δουλκοσίδη B	H-	Rha(α1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
25	Ρεμπαουδιοσίδη C	Glc(β1-	Rha(α1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
26	Ρεμπαουδιοσίδη C (ισομερές)	Rha(α1-2)Glc(β1-	Glc(β1-3)Glc(β1-
27	Ρεμπαουδιοσίδη H	Glc(β1-	Glc(β1-3)Rha(α1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-
28	Ρεμπαουδιοσίδη K	Glc(β1-2)Glc(β1-	
29	Ρεμπαουδιοσίδη J	Rha(α1-2)Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
30	Ρεμπαουδιοσίδη N	Rha(α1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
31	Ρεμπαουδιοσίδη O	Glc(β1-3)Rha(α1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
Ομάδα γλυκοζιτών που έχουν κουινοβόζη (6-δεσοξυ-D-γλυκόζη)			
32	Στεβιοσίδη D	Glc(β1-	Qui(β1-2)Glc(β1-

33	Στεβιοσίδη Ε	Glc(β1-	Qui(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
34	Στεβιοσίδη Ε2	Qui(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
35		Glc(β1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-	Qui(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
36		Qui(β1-2)Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
Ομάδα γλυκοζιτών που έχουν ξυλόζη			
37	Στεβιοσίδη F	Glc(β1-	Xyl(β1-2)Glc(β1-
38	Ρεμπαουδιοσίδη F	Glc(β1-	Xyl(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-
39	Ρεμπαουδιοσίδη F2	Glc(β1-	Glc(β1-2)[Xyl(β1-3)]Glc(β1-
40	Ρεμπαουδιοσίδη F3	Xyl(β1-6)Glc(β1-	Glc(β1-2)Glc(β1-
41		Xyl(β1-2) [Glc(β1-3)]Glc(β1-	Glc(β1-2)[Glc(β1-3)]Glc(β1-



Σχήμα 3. Δομή στεβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης Α.

2.4. Μέθοδοι Ανάλυσης των Γλυκοζιτών

Η HPLC είναι μία μέθοδος που επιλέγεται για τον προσδιορισμό των γλυκοζιτών της στέβια. Οι πρώτες μέθοδοι για την ανάλυση των γλυκοζιτών έγιναν σε άμινοστήλες και στήλες αντίστροφης φάσης C18. Αργότερα άρχισαν να χρησιμοποιούνται και στήλες υδροφιλικών αλληλοεπιδράσεων (HILIC).

Οι άμινο-στήλες έχουν δείξει υψηλή εκλεκτικότητα για τους γλυκοζίτες και καλό διαχωρισμό ακόμα και για τα ομόλογα τους (π.χ. ρεμπαουδιοσίδη Β/στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α/ρεμπαουδιοσίδη Ε). Ο διαχωρισμός κατά κύριο λόγο εξαρτάται από την πολικότητα του μορίου, όσα περισσότερα μόρια γλυκόζης είναι συνδεδεμένα στη στεβιόλη (άγλυκο τμήμα) τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος κατακράτησης στη στήλη. Το μειονέκτημα των άμινο-στηλών είναι ότι δεν έχουν καλή επαναληψιμότητα και χρειάζονται μεγάλο χρόνο ισορρόπησης σε συνθήκες χρωματογραφίας κανονικής φάσης (NP).

Η σειρά έκλουσης των γλυκοζιτών στις στήλες C18 είναι αντίστροφη σε σχέση με τις άμινο-στήλες (NP). Οι στήλες υδροφιλικών αλληλοεπιδράσεων παρουσιάζουν παρόμοια σειρά έκλουσης των γλυκοζιτών με τις άμινο-στήλες. Οι στήλες αυτές είναι αξιόπιστες και έχουν μικρό χρόνο ισορρόπησης.

Ο ανιχνευτής που συνήθως χρησιμοποιείται είναι υπεριώδους – ορατού φάσματος. Όμως στο μόριο της στεβιόλης υπάρχουν ουσίες όπως καρβοξυλικά οξέα και ολεφίνες, οι οποίες έχουν μικρή απορρόφηση στο υπεριώδες με αποτέλεσμα ο ανιχνευτής να μην είναι τόσο ευαίσθητος. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί 3 με 5 φορές με τη χρήση ανιχνευτή CAD (Charged Aerosol Detector).

Ο ανιχνευτής φορτισμένου αερούματος (CAD) είναι ένας ανιχνευτής που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και υγρή χρωματογραφία υπέρ-υψηλής απόδοσης (UHPLC) για τη μέτρηση της ποσότητας χημικών ουσιών σε ένα δείγμα. Δημιουργεί ένα αερόλυμα φορτισμένων σωματιδίων, τα οποία ανιχνεύονται με τη βοήθεια ενός ηλεκτρομετρητή (ανιχνευτής ηλεκτρικού φορτίου ή διαφοράς δυναμικού). Χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση ενώσεων που δεν μπορούν να ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας UV / Vis ανιχνευτές λόγω έλλειψης χρωμοφόρου. Ο CAD χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενώσεων με ποικιλία στη δομή τους, οι οποίες χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων και διαφόρων καταναλωτικών προϊόντων, σε φαρμακευτικές και χημικές βιομηχανίες και τέλος στις βιοεπιστήμες. Στις ενώσεις αυτές περιλαμβάνονται μη πτητικές και ημι-πτητικές όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφιτεριοντικές ενώσεις, πολικές και μη πολικές (πχ. λιπίδια, πρωτεΐνες, στεροειδή, πολυμερή, υδρογονάνθρακες, πεπτίδια)

Ένας άλλος ανιχνευτής που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση γλυκοζιτών είναι ο αμπερομετρικός ανιχνευτής (Pulse Amperometric Detector). Είναι πολύ πιο ευαίσθητος ανιχνευτής σε σχέση με τον UV/Vis. Για τη χρήση του αμπερομετρικού ανιχνευτή απαιτείται παραγωγή του δείγματος μετά τη στήλη.

Η μέθοδος ανίχνευσης των γλυκοζιτών με τη μεγαλύτερη ευαισθησία είναι η φασματοσκοπία μαζών. Συνήθως οι ανιχνευτές λειτουργούν έτσι ώστε να προκαλούν αρνητικό ιονισμό με ηλεκτροψεκάσμο (ESI negative mode) και είναι συνδεδεμένοι σε συστήματα HPLC. Η ανίχνευση με τον αρνητικό ιονισμό είναι 10 φορές πιο ευαίσθητη σε σχέση με τον θετικό ιονισμό [14].

Η υψηλή ευαισθησία των μεθόδων αυτών οφείλεται στην μεγάλη διακριτική ικανότητα των ανιχνευτών φασματομετρίας μαζών (Mass Spectrometry). Επειδή όμως η διάκριση των ουσιών γίνεται σε μοριακό επίπεδο η ανίχνευση και ο διαχωρισμός ομόλογων γλυκοζιτών (π.χ. στεβιοσίδη/ρεμπαουδιοσίδη Β) δεν έχουν καλά αποτελέσματα. Το μειονέκτημα αυτό γίνεται περισσότερο εμφανές όταν το σύστημα υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται δεν έχει καλή διαχωριστική ικανότητα. Αυτό βέβαια μπορεί να αντιμετωπιστεί με την εφαρμογή χαμηλών, ενδιάμεσων και υψηλών ενεργειών σύγκρουσης.

Η ανάλυση των κύριων γλυκοζιτών της στέβια, στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α, ρεμπαουδιοσίδη Β και ρεμπαουδιοσίδη C, έχει επιτευχθεί με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance) με ικανοποιητικό διαχωρισμό. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται σαν διαλύτης μίγμα πυριδίνη- d_5 -Διμεθυλοσουλφοξείδιο- d_6 (6:1) [14]. Το πλεονέκτημα της NMR μεθόδου είναι ότι είναι σημαντικά ταχύτερη ανάλυση από την HPLC και δεν απαιτεί δεδομένα αναφοράς. Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί εσωτερικό πρότυπο ανθρακενίου.

Ακόμη για την ταυτοποίηση και την εκτίμηση της συγκέντρωσης των γλυκοζιτών της στέβια, έχει αναφερθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής πίεσης (HPTLC). Συγκριτικά με τις μεθόδους που προαναφέρθηκαν είναι ταχύτερη και πιο οικονομική, υστερεί όμως αναλυτικά.

Ο Bergs το 2012 ανέπτυξε μία ταχεία μέθοδο ανάλυσης για τους γλυκοζίτες στεβιόλης σε φύλλα στέβια με τη χρήση HPLC αντίστροφης φάσης (RP). Χρησιμοποίησε μία C18 στήλη αντίστροφης φάσης και ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας. Το συμπέρασμα της μελέτης αυτής ήταν πως πρόκειται για μία οικονομικά αποδοτική έρευνα χάρη στη χαμηλή κατανάλωση διαλυτών και τη μικρή χρονική διάρκεια ανάλυσης (15 min). Επίσης είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την ποσοτικοποίηση των κύριων γλυκοζιτών της στέβια με ικανοποιητική ακρίβεια (100.99 ± 2.99 %), αξιοπιστία (0.02 – 1.89 % RSD), εκλεκτικότητα, γραμμικότητα και απόδοση.

Το 2014 ο Lorenzo C. ανέπτυξε μία μέθοδο ανάλυσης των γλυκοζιτών σε φύλλα στέβια παρόμοια με αυτήν του Bergs, με τη διαφορά ότι χρησιμοποίησε μία στήλη υγρής χρωματογραφίας υδροφιλικών αλληλοεπιδράσεων (HILIC). Ο διαχωρισμός στηρίχθηκε σε υδροφιλικές αλληλοεπιδράσεις. Η μέθοδος ήταν ικανοποιητικά αξιόπιστη, με $R^2 > 0.999$ για τη γραμμικότητα.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται συγκεντρωτικά οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί και αναλυτικά τα αποτελέσματά τους (Πίνακες 2 & 3 αντίστοιχα).

Πίνακας 2. Μέθοδοι διαχωρισμού και ανίχνευσης γλυκοζιτών στεβιόλης με HPLC.

Μέθοδος Διαχωρισμού	Στήλη	Τρόπος Ανίχνευσης	
HPLC	amino	UV	
HPLC	amino	PAD	
HPLC	C18	UV	
HPLC	C18 + C18	UV	
HPLC	HILIC	UV	
HPLC	Hydro-RP	UV	
HPLC	Hydro-RP	CAD	
HPLC	carbohydrate	MS	
UHPLC	C18	MS	
UHPLC	RP amide C16	UV + MS	
UHPLC	HILIC	MS	
UHPLC	PA + C18	UV	
UHPLC	C18 + amino	TOF-MS	
UHPLC	C18 + C 18	UV	(Ursula Woelwer – Rieck, 2012)

Πίνακας 3. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των 2 κύριων γλυκοζιτών.

Μέθοδος	Ρεμπαουδιοσίδη A		Στεβιοσίδη		Ref.
	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	
HPLC Purospher STAR RP-18ec column UV Detector	0.4	3.8	-	-	[2]
HPLTC pre-coated silica gel 60 F254	-	-	50	-	[12]

plate under white light and UV at 366					
UHPLC-MS UHPLC HSS C18 column ESI mode	0.050	-	0.015	-	[6]
HPLC Luna HILIC column Diode Array Detector	1.07	3.56	1.07	3.55	[8]
HPLC Acclaim Trinity P1 column UV	2.3	7	1.2	4.5	[5]
HPLC Acclaim Trinity P1 Column CAD	0.7	2.3	0.4	1.4	[5]

2.5. Μέθοδοι Εκχύλισης των Γλυκοζιτών

Η προετοιμασία του δείγματος είναι μία πολύ σημαντική προεργασία που απαιτείται για τον προσδιορισμό των γλυκοζιτών της στεβιόλης. Η παραλαβή των γλυκοζιτών από τα φύλλα της στέβια γίνεται με τη μέθοδο της εκχύλισης.

Οι Betancur-Ancona D. et al. το 2015 στη μελέτη τους ακολούθησαν μία πολύ απλοϊκή διαδικασία, η οποία είχε τα εξής βήματα: ξήραναν τα φύλλα της στέβια, τα εμβάπτισαν σε νερό και ακολούθησε παραμονή τους σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 100°C. Έπειτα, μετά την ψύξη και τη φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος, η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε ξεχωριστό σκεύος για διήθηση πριν την ανάλυση του.

Οι Dominik Bergs et al. το 2012 σε μία ανάλυση γλυκοζιτών για την παρασκευή δειγμάτων από τα φύλλα της *S. Rebaudiana* χρησιμοποίησαν τη μέθοδο της εκχύλισης σε διάταξη σταυρωτής ροής. Τα φύλλα της στέβια κονιοροποιήθηκαν και διαλύθηκαν σε νερό. Η εκχύλιση έγινε σε πέντε στάδια υπό δόνηση στους 30°C. Το

κάθε στάδιο διήρκησε 3 ώρες. Έπειτα ακολούθησε διήθηση και εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) με μικροστήλες πληρωμένες με C18 προσροφητικό υλικό. Με τη χρήση της SPE τα χρωματογραφήματα βελτιώθηκαν σημαντικά καθώς απομακρύνθηκαν πολλές ουσίες (π.χ. χρωστικές) που προκαλούσαν «θόρυβο» ή παρεμποδίσεις. Η ανάκτηση στεβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης Α ήταν ικανοποιητική με ποσοστά $99,36\% \pm 2,36$ και $100,6\% \pm 5,6$ αντίστοιχα.

Οι Ursula Woelwer-Rieck et al. το 2010 με σκοπό την παραλαβή των γλυκοζιτών από φύλλα στέβια ακολούθησαν την εξής διαδικασία: Αρχικά τα δείγματα λυοφιλήθηκαν στους -25°C κι έπειτα αλέστηκαν και κονιορτοποιήθηκαν ώστε να σχηματιστούν σωματίδια μεγέθους 0.12 mm. Για την εκχύλιση των γλυκοζιτών διέλυσαν το δείγμα σε νερό και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 102°C για 30 λεπτά, έπειτα όταν το δείγμα απέκτησε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήθηκε και η υδατική φάση χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση στερεής φάσης. Η εκχύλιση έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους α) με την χρήση C18 μικροστηλών και β) με τη χρήση δίσκων με C18 προσροφητικό μέσο. Με τη χρήση των μικροστηλών το ποσοστό ανάκτησης για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α πλησίαζε το 100 % και για τους δύο γλυκοζίτες. Τα ποσοστά ανάκτησης με τη χρήση των δίσκων είχαν πολύ μεγάλο εύρος 39-129% και για τους δύο γλυκοζίτες. Το μόνο μειονέκτημα των μικροστηλών είναι ότι απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος. Επίσης χρησιμοποίησαν την ίδια μέθοδο με δύο παραλλαγές. Χρησιμοποίησαν σαν διαλύτη εκχύλισης μείγμα νερού:ακετονιτριλίου 8:2 (v/v) και δεν ακολούθησε εκχύλιση στερεής φάσης. Αυτή η παραλλαγή της μεθόδου έδειξε ότι χωρίς την χρήση της SPE η ανίχνευση γλυκοζιτών με χρόνο κατακράτησης μικρότερο από αυτόν της στεβιοσίδης είναι δύσκολη έως αδύνατη, καθώς υπάρχει συνέκλυση αρκετών ουσιών.

Το 2009 οι Kaul V.K et al. διεξήγαγαν μία μελέτη πάνω στην εκχύλιση των γλυκοζιτών της *S. Rebaudiana*. Αρχικά αποξήραναν τα φύλλα της στέβια κι έπειτα τα άλεσαν έως ότου να δημιουργηθεί σκόνη. Ακολούθησαν τρεις διαφορετικές διαδικασίες εκχύλισης: μία συμβατική, μία υποβοηθούμενη από υπερήχους και μία υποβοηθούμενη από μικροκύματα.

Η συμβατική εκχύλιση (ΣΕ) έγινε σε θερμοκρασία δωματίου με διαλύτη εκχύλισης α) μεθανόλη:νερό 80:20 (v/v) και β) αιθανόλη:νερό 80:20 (v/v) για 12 ώρες. Η υποβοηθούμενη από υπέρηχους εκχύλιση (ΥΥΕ) πραγματοποιήθηκε πάλι εις διπλούν με τους δύο διαφορετικούς διαλύτες, μόνο που σε αυτή την περίπτωση

τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ με υπερήχους για 30 λεπτά. Στην υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκχύλιση (ΥΜΕ), σκόνη από το δείγμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες χαλαζία, καλυμμένους με έναν συμπυκνωτή ατμών και το δείγμα διαλύθηκε πάλι στα δύο μείγματα διαλυτών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση και ξήρανση. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε διάφορα επίπεδα ισχύος, διήρκησε από 30 δευτερόλεπτα έως 5 λεπτά και οι θερμοκρασίες κυμάνθηκαν από $10-90^{\circ}\text{C}$.

Και στις τρεις διαδικασίες εκχύλισης μετά το πέρας τους συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό το οποίο φιλτραρίστηκε και ξηράνθηκε στους 50°C . Από τα αποξηραμένα πλέον εκχυλίσματα απομακρύνθηκε το λίπος με εξάνιο και το υπερκείμενο υγρό που προέκυψε. Τέλος, το υπόλειμα που έμεινε ήταν το δείγμα που μελετήθηκε αφού πρώτα ξηράνθηκε, διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο:νερό (80:20 v/v) και φιλτραρίστηκε με φίλτρο $0.45 \mu\text{m}$.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των τριών μεθόδων εκχύλισης.

Πίνακας 4. Ποσοστά απόδοσης στεβιοσίδης και ρεμπαουδιοσίδης Α χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης (μάζα γλυκοζίτη στο εκχυλισθέν διάλυμα/ μάζα δείγματος των φύλλων της στέβια $\times 100$).

Μέθοδος	Χρόνος (min)	Στεβιοσίδη (%)	Ρεμπαουδιοσίδη Α (%)	Σύνολο (%)
Συμβατική Εκχύλιση	720	6.54	1.20	7.74
Υποβοηθούμενη από Υπέρηχους Εκχύλιση	30	4.20	1.98	6.18
Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα Εκχύλιση	1	8.64	2.34	10.98

➤ Η αποτελεσματικότερη μέθοδος εκχύλισης είναι η ΥΜΕ καθώς έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης.

Η ΣΕ και η ΥΥΕ δεν έχουν μεγάλη απόκλιση στα αποτελέσματα τους, η ΥΥΕ υπερτερεί όμως ως προς το χρόνο που απαιτείται.

2.6. Χρήση της στέβια ως Γλυκαντικό

Οι αρμόδιοι φορείς, όπως η Κοινή Επιστημονική Επιτροπή για τα Πρόσθετα των Τροφίμων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και του Οργανισμού Γεωργίας (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA WHO/FAO) και η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) διερεύνησαν την ασφάλεια των γλυκοζιτών στεβιόλης, στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α και κατέληξαν ότι είναι ασφαλή για κατανάλωση από όλες τις ομάδες του πληθυσμού. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε τους γλυκοζίτες στεβιόλης για χρήση ως γλυκαντικού σε τρόφιμα και ροφήματα.

Η Ρεμπιάννα (Rebiana) είναι ένα εκχύλισμα υψηλής καθαρότητας από τα φύλλα του φυτού στέβια, με κύριο συστατικό τη ρεμπαουδιοσίδη Α. Η Ρεμπιάννα είναι το πρώτο εγκεκριμένο γλυκαντικό φυτικής προέλευσης με μηδενική θερμιδική αξία που έχει διατεθεί στο εμπόριο και είναι 200 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη. [iii]

Τα φύλλα της χρησιμοποιούνται από πολλούς είτε ωμά είτε αποξηραμένα, τριμμένα ή αλεσμένα σε γλυκά και φαγητά. Ακόμη, γίνεται χρήση του εκχυλίσματός τους. Τα στελέχη και τα υπολείμματα των φύλλων, μετά την εξαγωγή των γλυκαντικών ουσιών χρησιμοποιούνται σαν ζωοτροφή. [iv]

Οι κύριοι καταναλωτές αυτών των γλυκαντικών είναι οι βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και ζαχαροπλαστικής καθώς υποκαθιστά τη ζάχαρη. Έτσι παράγονται τρόφιμα μεγαλύτερης διατροφικής αξίας αφού έχουν μειωμένο θερμιδικό φορτίο. Επίσης αξιοποιείται και για ιατρικούς σκοπούς επειδή μπορεί να καταναλωθεί άφοβα από άτομα με διαβήτη τύπου 2. [iv]

Πίνακας 5. Σύγκριση στεβιοσίδης με άλλα τεχνητά γλυκαντικά.

Ιδιότητα	Ασπαρτάμη	Ακεσουλφάμη Κ	Κυκλαμικά	Σακχαρίνη	Στεβιοσίδη
Τρόπος παρασκευής	Συνθετική	Συνθετική	Συνθετική	Συνθετική	Φυσική
Γλυκαντική ισχύς	200	150	30	250	200
Σταθερότητα στη θέρμανση	Μέτρια	Σταθερή	Σταθερή	Σταθερή	Σταθερή
Σταθερότητα σε διάφορα pH	Μέτρια	Σταθερή	Σταθερή	Σταθερή	Σταθερή
Διαλυτότητα	Όχι	Μέτρια	Όχι	Όχι	Ναι

στην αλκοόλη					
Χρησιμοποιείται από	1981	1988	1938	1879	Αιώνες

2.6.1. Τοξικότητα των προϊόντων στέβια

Οι γλυκοζίτες της στεβιόλης εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα και δεν παρουσιάζουν αλλεργιογόνο δράση.

Ο Pezzuto το 1985 σε έρευνα όπου διεξήγαγε γενετικές τοξικολογικές δοκιμασίες κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η στεβιοσίδη και οι γλυκοζίτες παρόμοιας χημικής δομής δεν παρουσιάζουν μεταλλαξιογόνο δράση. Ωστόσο η στεβιόλη παρουσίασε μεταλλαξιογόνο δράση. [11]

Όταν καταναλώνονται οι γλυκοζίτες της στέβια σε μορφή γλυκαντικών δεν περιέχουν ελεύθερα μόρια στεβιόλης καθώς αυτά βρίσκονται δεσμευμένα στο μόριο του γλυκοζίτη. Οι γλυκοζίτες όμως έχουν τη δυνατότητα να υδρολυθούν δίνοντας σαν προϊόν στεβιόλη. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί σύμφωνα με τον Catharino R. R. ότι η στεβιοσίδη μπορεί να υδρολυθεί ταχύτατα σε υδατικά διαλύματα με όξινο pH (π.χ. φρουτοχυμοί), θέτοντας το ερώτημα εάν αυτό θα μπορούσε να συμβεί και στο ανθρώπινο στομάχι στο οποίο επικρατεί χαμηλό pH.

Σε έρευνα που έγινε το 1996 από τους Matsui et al. εξετάστηκαν η γενετική τοξικότητα της στεβιοσίδης και του άγλυκου τμήματος της στεβιόλης με δοκιμές μετάλλαξης. Οι δοκιμές έγιναν σε βακτήρια, κύτταρα θηλαστικών και σε ποντίκια. Η στεβιοσίδη δεν παρουσίασε μεταλλαξιογόνο δράση σε καμία από τις δοκιμές, σε αντίθεση με τη στεβιόλη, η οποία ήταν θετική σε ορισμένες. Τα θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές είχαν σχέση με τη δόση της στεβιόλης. [9].

Το 2007 οι Nunes et al. σε μία εργασία τους μελέτησαν την πιθανή γενετοξική δράση της στεβιοσίδης σε ευκαριωτικά κύτταρα. Οι δοκιμές έγιναν σε ποντίκια Wistar. Τα αποτελέσματα της δουλειάς τους έδειξαν ότι μετά από τη χορήγηση διαλύματος στεβιοσίδης, παρουσιάστηκαν αλλοιώσεις στο περιφερειακό αίμα, στον εγκέφαλο και στον σπλήνα σε διάφορα επίπεδα. Ο μεγαλύτερος βαθμός αλλοίωσης παρουσιάστηκε στο συκώτι. [10].

Χάρη σε μία βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε από τον Brusick το 2008 προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα: Η στεβιοσίδη και η στεβιόλη δεν αντιδρούν άμεσα με το DNA ούτε προκαλούν γενετοξικές αλλοιώσεις. Σύμφωνα με τα αποδεικτικά στοιχεία από έρευνες για τη γενετική τοξικολογία κατέληξε στο συμπέρασμα πως οι ουσίες αυτές δεν παρουσιάζουν γενετικό κίνδυνο στον άνθρωπο. [3].

2.6.2. Ασφάλεια και Κανονισμοί

Τα φύλλα της στέβια χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες από αυτόχθονες της Ν. Αμερικής. Η Ιαπωνία ήταν από τις πρώτες χώρες που από τις αρχές του 1970 αξιολόγησε την ασφάλεια της στέβια και των γλυκαντικών της και που ενέκρινε τη χρήση τους σε τρόφιμα και ροφήματα, όπως σε αναψυκτικά. Από τότε ένας σημαντικός αριθμός μελετών διερεύνησε την ασφάλεια των γλυκοζιτών στεβιόλης και οι αρμόδιοι φορείς υγείας ανά τον κόσμο έχουν εγκρίνει τη χρήση τους:

- Το 2008, ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration – FDA) αναγνώρισε τη στέβια ως Generally Recognized As Safe – GRAS, ο χαρακτηρισμός ισχύει όμως μόνο για σκευάσματα υψηλής καθαρότητας που προέρχονται από εκχύλιση.

- Το 2008, η Κοινή Επιστημονική Επιτροπή του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για τα Πρόσθετα των Τροφίμων (JECFA, διεθνής επιστημονική επιτροπή) έκρινε ότι τα εκχυλίσματα της στέβια είναι ασφαλή για κατανάλωση από όλες τις ομάδες του πληθυσμού.

- Το 2010, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, European Food Safety Authority) αξιολόγησε με τη σειρά της το σύνολο των δεδομένων από επιστημονικές μελέτες που διερεύνησαν την ασφάλεια των γλυκοζιτών στεβιόλης και σε συμφωνία με την JECFA τους θεώρησε ασφαλή για κατανάλωση.

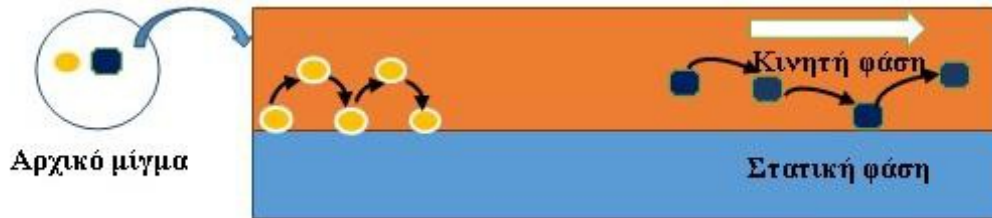
- Το 2011, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε τη χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό σε τρόφιμα και ροφήματα [4].

2.7. Χρωματογραφία – Βασικές αρχές διαχωρισμού

Ο όρος **χρωματογραφία** (chromatography) περιλαμβάνει πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται για το διαχωρισμό των συστατικών σε μίγματα ουσιών. Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρύτατα για τη διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων, γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των συστατικών του μίγματος προαπαιτεί το χρωματογραφικό διαχωρισμό αυτών με σκοπό την απομόνωσή τους. Ακολουθεί ανάλυση των συστατικών που έχουν απομονωθεί με χημικές ή φασματοσκοπικές τεχνικές.

Πέραν των εφαρμογών της στην κλινική ανάλυση, η χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φαρμακευτική ανάλυση, την ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων, στη βιοχημική έρευνα, όπως και στην καθημερινή πρακτική ενός συνθετικού χημικού εργαστηρίου κ.α. Σε συνδυασμό με επακόλουθη συζευγμένη τεχνική ανίχνευσης (tandem chromatography), κυρίως με φασματοσκοπικές τεχνικές όπως UV/Vis, MS ή IR, η χρωματογραφία αποτελεί το αναγκαίο προκαταρκτικό στάδιο όχι μόνο για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό, αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζόμενων ουσιών μεταβολιτών φαρμάκων κ.α. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος απομόνωσης των συστατικών ενός μίγματος στη φυτοχημεία, χημεία φυσικών προϊόντων κ.α.

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία **κινητή φάση** (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος, μέσω μίας **στατικής φάσης** (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την αγχιστεία (φυσικοχημική συγγένεια) του συστατικού με την κάθε φάση. Κάθε μόριο μίας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται λόγω αγχιστείας κ.τ.λ.) και αντίστροφα.



(Ηλεκτρονικά Συγγράμματα Κάλλιπος, www.kallipos.gr)

Σχήμα 4. Αρχή διαχωρισμού συστατικών μίγματος με την τεχνική της χρωματογραφίας. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής αγκιστείας των συστατικών με την κινητή και στατική φάση. Αναπαρίσταται η πορεία μορίων δύο διαφορετικών ουσιών διαμέσου μίας στήλης. Το μπλε μόριο κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και συνεπώς παρασύρεται από αυτήν ταχύτερα, διότι δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση. Αντίθετα το κίτρινο μόριο αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται. Κατά συνέπεια το κίτρινο συστατικό θα κινείται βραδύτερα από το μπλε, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους.

Η διαφορετική αυτή αγκιστεία οφείλεται στις διαφορές των συστατικών του μίγματος σε ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως π.χ. διαφορές στο μέγεθος του μορίου, το φορτίο, την πτητικότητα και τη διαλυτότητα. Η αγκιστεία αυτή περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής K (partition coefficient) ο οποίος ορίζεται ως:

$$K = C_s / C_m$$

όπου:

C_s : η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στη στατική φάση και

C_m η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στην κινητή φάση.

Ο συντελεστής κατανομής εκφράζεται δηλαδή από το λόγο της συγκέντρωσης της ουσίας στη στατική φάση προς τη συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση. Η κατανομή αυτή καθορίζεται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας, αλλά και από τη φύση της κινητής, όπως και της στατικής φάσης.

Η παράμετρος K είναι μία χαρακτηριστική σταθερά για τη δεδομένη χημική ένωση και το ζεύγος στατικής/κινητής φάσης, σε μια δεδομένη θερμοκρασία. Έτσι, μία ουσία που αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση, επιβραδύνεται σε σχέση με μία ουσία που κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και παρασύρεται ταχύτερα από αυτή. Ως αποτέλεσμα, οι δύο ουσίες διαχωρίζονται.

Πρέπει να τονισθεί ότι ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι το αποτέλεσμα επαναλαμβανομένων ισορροπιών των συστατικών μεταξύ των δύο φάσεων κατά τη

μετακίνησή τους. Είναι προφανές, ότι προκειμένου να διαχωριστούν δύο ουσίες θα πρέπει να διαφέρουν οι συντελεστές κατανομής αυτών.

➤ Σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό και συνεπώς να καθυστερούν περισσότερο ή λιγότερο και να διαχωρίζονται.

Διάκριση Χρωματογραφικών τεχνικών

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ομαδοποιηθούν, με διάφορα κριτήρια. Έτσι, με βάση το μέσο στο οποίο τοποθετείται η στατική φάση, μία βασική διάκριση γίνεται με κριτήριο τη χρωματογραφία στήλης (θα αναλυθεί πιο κάτω) και την επίπεδη χρωματογραφία, ενώ με βάση το είδος της κινητής και στατικής φάσης, διακρίνουμε την υγρή χρωματογραφία και την αέρια χρωματογραφία. Τέλος, ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και τη στατική φάση, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιονανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και χημικής συγγένειας.

2.7.1. Χρωματογραφία Στήλης

Στη χρωματογραφία στήλης (column chromatography) η στατική φάση βρίσκεται ως πληρωτικό υλικό ακινητοποιημένη στο εσωτερικό στήλης κατασκευασμένης από αδρανές υλικό (π.χ. από ύαλο ή ανοξείδωτο χάλυβα). Η κινητή φάση διέρχεται υπό συνεχή ροή διαμέσου της στήλης. Η διέλευση της κινητής φάσης γίνεται είτε λόγω βαρύτητας, είτε υπό υψηλή πίεση, που επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας. Από τη στιγμή που θα εισαχθεί το δείγμα στην κορυφή της στήλης, τα επιμέρους συστατικά του δείγματος υφίστανται διαδοχικές κατανομές μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Το κλάσμα κάθε συστατικού, που βρίσκεται κάθε στιγμή στην κινητή φάση, μετακινείται υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης. Για το κάθε μόριο κάθε στιγμή επέρχεται νέος καταμερισμός μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων κάθε συστατικού εξαρτάται από το κλάσμα του χρόνου παραμονής τους στη στατική φάση, ως προς το χρόνο παραμονής τους στην κινητή φάση και είναι ανάλογη του συντελεστή κατανομής του συστατικού στις δύο φάσεις. Είναι ευνόητο ότι ο διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών είναι εφικτός

με την προϋπόθεση, ότι αυτά έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής. Κατά την πρόοδο της ανάλυσης, ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται αποτελεσματικότερος. Με την ολοκλήρωση της πορείας τους στη στήλη, τα συστατικά θα έχουν διαχωρισθεί, οπότε θα εξέλθουν σε διαφορετικούς χρόνους από τη στήλη.

➤ Στη χρωματογραφία στήλης ορισμένη ποσότητα δείγματος προστίθεται στην κινητή φάση στην αρχή της στήλης. Το δείγμα μετακινείται στη στήλη υπό τη συνεχή ροή της κινητής φάσης. Τα επιμέρους συστατικά του δείγματος, με την προϋπόθεση, ότι έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, μετακινούνται με διαφορετική μέση ταχύτητα μέσα στη στήλη, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες.

2.7.2. Χρωματογραφία Προσρόφησης

Η χρωματογραφία προσρόφησης σε στήλη αποτελεί την παλαιότερη χρωματογραφική μέθοδο. Στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών ενός διαλύματος στην επιφάνεια λεπτά διαμερισμένου υλικού. Τέτοια προσροφητικά υλικά είναι κατά σειρά μειούμενης προσροφητικής ικανότητας: ο ενεργός άνθρακας, το οξειδίο του αργιλίου (alumina), το πυριτικό μαγνήσιο (florisil), η ξηροπηκτή οξειδίου του πυριτίου (silica gel), το άμυλο, η ζάχαρη κ.α.

Το προσροφητικό υλικό έχει συνήθως μορφή στήλης, μπορεί όμως να είναι απλωμένο πάνω σε πλάκα υπό μορφή στοιβάδας. Το δείγμα, που περιέχει το μίγμα των ουσιών που πρέπει να διαχωριστούν, τοποθετείται στο πάνω μέρος της στήλης. Έπειτα, με συνεχή ροή του κατάλληλου διαλύτη, το δείγμα αναγκάζεται να προχωρήσει μέσα στη στήλη όπου το κάθε συστατικό συγκρατείται περισσότερο ή λιγότερο από τη στατική φάση. Συστατικά πλήρως διαλυτά στην κινητή φάση προχωρούν γρήγορα μαζί με το μέτωπο του διαλύτη. Συστατικά που προσροφώνται πλήρως δεν μετακινούνται από το σημείο τοποθέτησης του δείγματος.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι εφικτός όταν τα συστατικά προσροφώνται μεν από το υλικό της στατικής φάσης αλλά όχι τόσο ισχυρά, ώστε να μπορούν να μετακινηθούν με το διαλύτη και να προχωρήσουν με διαφορετική μεταξύ τους ταχύτητα.

Όσο πιο ισχυρά προσροφάται ένα συστατικό, τόσο λιγότερο μετακινείται και επομένως παραμένει στο πάνω μέρος της στήλης. Προϋπόθεση για έναν πλήρη διαχωρισμό των συστατικών του μίγματος είναι η επαρκής διαφορά στη δύναμη συγκράτησης του καθενός από αυτά από τη στατική φάση.

Ο διαλύτης (κινητή φάση) που θα χρησιμοποιηθεί επιλέγεται ανάλογα με την ικανότητα του να διαλύει τα συστατικά του δείγματος και με την πολικότητα του. Γενικά η προσροφητική ικανότητα της στερεάς φάσης μειώνεται όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες με μεγάλη πολικότητα. Επομένως πολικοί διαλύτες μετακινούν περισσότερο τα συστατικά ενός μίγματος από ότι οι άπολοι.

Η επιτυχία του διαχωρισμού εξαρτάται λοιπόν από το μέγεθος του δείγματος, το είδος του προσροφητικού, το μήκος της στήλης, το είδος του διαλύτη, την ταχύτητα ροής του κ.α., τα οποία πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά. [16]

2.7.3. Χρωματογραφία Κατανομής

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, στην τεχνική της χαρτοχρωματογραφίας, ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος με την υγρή χρωματογραφία κατανομής, εξαρτάται από τους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής που έχει κάθε συστατικό μεταξύ των δύο διαλυτών, Το πιο πολικό σύστημα διαλυτών, παρακρατείται ως ένα στατικό λεπτό στρώμα πάνω σε κατάλληλο υλικό ως υποστήριγμα και το λιγότερο πολικό σύστημα δρα ως κινούμενη υγρή φάση. Στην χρωματογραφία κατανομής αντιστρόφου φάσεως (Reversed phase partition chromatography) ο λιγότερο πολικός διαλύτης δρα ως στατική φάση και ο πιο πολικός ως κινούμενη φάση. Σ' αυτή την περίπτωση το υλικό που χρησιμοποιείται ως υποστήριγμα, κατεργάζεται με διχλωροδιμεθυλοπυρίτιο, το οποίο αντιδρά με τις υδροξυλομάδες της επιφάνειας του υποστηρίγματος, του οποίου κατ' αυτό τον τρόπο μειώνεται η ικανότητα να συγκρατεί νερό. Τα πιο συνηθισμένα υλικά υποστηρίγματα είναι το silica gel, ο σελίτης και η κυτταρίνη. Η στατική φάση είναι συχνά νερό ή υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, αραιό θειικό ή υδροχλωρικό οξύ ή μεθανόλη. Η κινούμενη φάση μπορεί να είναι μίγματα βουτανόλης – χλωροφορμίου, μίγματα βουτανόλης – βενζολίου, τετραχλωράνθρακας, οξικός αιθυλεστέρας, εξάνιο ή 2,2,4-τριμεθυλοπεντάνιο. [vi]

2.7.4. Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής

Η μέθοδος της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια και εφαρμόζεται για ιόντα ή ενώσεις που μπορούν να ιονίζονται, όπως οξέα, βάσεις κ.λπ. και για ενώσεις που αντιδρούν με ιοντικές ομάδες όπως π.χ. χημικές ενώσεις, λιπίδια, πρωτεΐνες κλπ. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων

και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο φορτίο του ιόντος της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία. Οι διαχωρισμοί που βασίζονται στην ανταλλαγή ιόντων λαμβάνουν χώρα, κυρίως, σε στήλες οι οποίες αποτελούνται από έναν ιοντοανταλλάκτη (π.χ. ρητίνη). Υπάρχουν δυο τύποι ιοντοανταλλάκτη: ο κατιοντοανταλλάκτης, ο οποίος φέρει αρνητικά φορτισμένες ομάδες, οι οποίες έλκουν θετικά φορτισμένα ιόντα και ο ανιοντοανταλλάκτης, ο οποίος φέρει θετικά φορτισμένες ομάδες που θα έλξουν αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Είναι φανερό ότι, τα μόρια ουσιών που κάτω από ορισμένες συνθήκες χρωματογραφίας, είτε δεν έχουν φορτίο ή έχουν ομώνυμο φορτίο με τη ρητίνη, εκκλύονται πρώτα, ενώ ουσίες τα μόρια των οποίων έχουν φορτία αντίθετα μ' αυτά του ανταλλάκτη (ρητίνης) εκκλύονται αργότερα. Οι ενώσεις που συγκρατήθηκαν στη στήλη θα εκλουσθούν με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος. Όσες ενώσεις συγκρατούνται ασθενώς θα εκλουσθούν πρώτα, ενώ όσες συγκρατούνται ισχυρά θα εκλουσθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος. [vii]

2.7.5. Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography) εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000 Da. Εφαρμόζεται συνεπώς στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος και το σχήμα των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων: ενώ τα μικρά μόρια καθυστερούν εισερχόμενα στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης. Έτσι, τα τελευταία εξέρχονται πρώτα από τη στήλη.

2.7.6. Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία αποτελεί μια ετερογενή ομάδα μεθόδων διαχωρισμού ανόργανων, οργανικών ή οργανομεταλλικών ενώσεων, με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες. Βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των ουσιών ενός δείγματος μεταξύ μιας κινητής και μιας στατικής φάσης, ενώ ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών συγγένειας των ουσιών ως προς τις δύο φάσεις. Η στατική φάση (ή ακίνητη) μπορεί να είναι στερεή (στρώμα στερεού) ή υγρή (στρώμα υγρού), ακινη-

τοποιομένη επάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και κινείται διαμέσου και κατά μήκος της στατικής φάσης. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ κινητής και στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό και η επιλογή τους συσχετίζεται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών του δείγματος. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική αλληλεπίδραση της στατικής φάσης με την υπό προσδιορισμό ουσία. [viii]

2.8. Χρωματογραφία HPLC

Η **χρωματογραφία HPLC** (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό.

Στη συνέχεια θα επικεντρωθούμε στην εφαρμογή της HPLC στη χρωματογραφία προσρόφησης, που είναι και η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη. Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης υψηλής πίεσης: HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης.

2.8.1. HPLC Κανονικής Φάσης

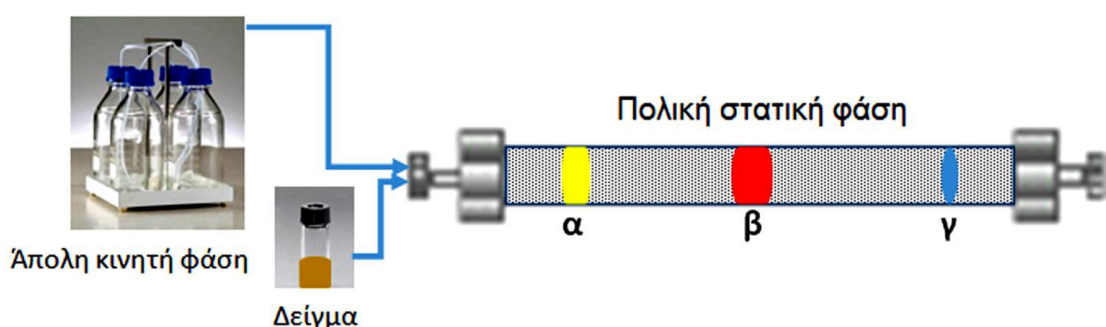
Στην **HPLC κανονικής φάσης (NP HPLC)** ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό, όπως οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3). Η πολικότητα των υλικών αυτών οφείλεται στις υδροξυλομάδες που περιέχουν. Αντίθετα, η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας. Κοινώς χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες, όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο, ενώ δεν περιέχεται στην κινητή φάση νερό. Έτσι, οι πολικές ενώσεις στο διαχωριζόμενο μίγμα αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, σε σύγκριση με τις άπολες ενώσεις (Σχήμα 5). Συνεπώς, οι λιγότερο πολικές ενώσεις διασχίζουν τη

στήλη ταχύτερα και εκλύονται από αυτήν νωρίτερα. Η κατακράτηση ενός πολικού μορίου από τη στατική φάση οφείλεται στη προσρόφηση αυτού. Η έκλυση των πολικών μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με την αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την πορεία της ανάλυσης. Με την αύξηση της πολικότητας της, περισσότερα μόρια διαλύτη αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση ανταγωνιζόμενα τις προσροφημένες ουσίες για θέσεις πρόσδεσης. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική (με προγραμματισμένη μεταβολή της πολικότητας της κινητής φάσης) έκλυση των προσροφημένων πολικών μορίων.

Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό χημικών ενώσεων που δεν διαλύονται στο νερό ή που υδρολύονται (και συνεπώς δε συνιστάται η παραμονή τους σε υδατικό περιβάλλον). Επίσης, βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στο διαχωρισμό ισομερών ουσιών.

Στο σχήμα 5 φαίνεται ο χρωματογραφικός διαχωρισμός με HPLC κανονικής φάσης, μίγματος αποτελούμενου από τριών τύπων μόρια, που εδώ παρουσιάζονται ως κίτρινες κόκκινες και μπλε ζώνες. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε. Εφόσον η στατική φάση είναι πολική, η κατακράτηση των κίτρινων μορίων θα είναι ισχυρότερη. Αντίθετα, η μπλε ουσία θα κατακρατείται λιγότερο ισχυρά από τη στατική φάση. Μέτριας ισχύος θα είναι η κατακράτηση των μορίων της κόκκινης ουσίας. Η μπλε ουσία επίσης θα συναγωνίζεται εντονότερα με τα μόρια της επίσης άπολης κινητής φάσης για θέσεις πρόσδεσης στη στατική φάση. Έτσι τα μόρια της μπλε ουσίας θα προπορεύονται στο διαχωρισμό. Προκειμένου να επιτευχθεί η έκλυση της κόκκινης και στη συνέχεια και της κίτρινης ουσίας σε εύλογο χρονικό διάστημα, αυξάνεται η πολικότητα της κινητής φάσης, αμέσως μετά την έκλυση της μπλε ουσίας.

Ένας απλός κανόνας που ισχύει είναι: Σε οποιοδήποτε διαχωρισμό προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχης της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχης της στατικής φάσης.



(Ηλεκτρονικά Συγγράμματα Κάλλιπος, www.kallipos.gr)

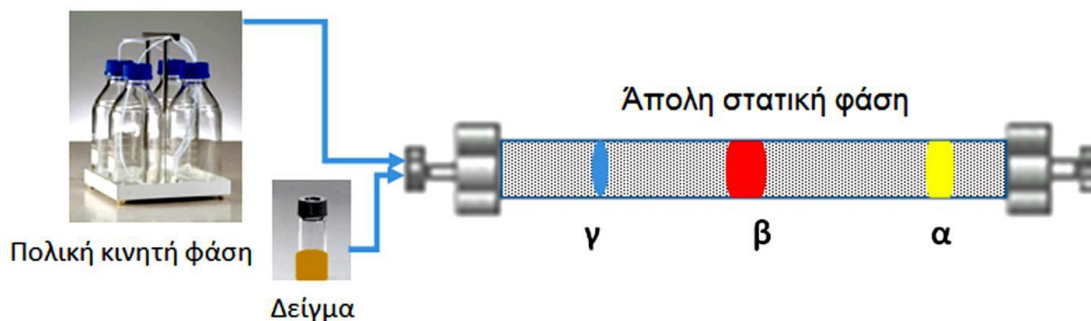
Σχήμα 5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός, με HPLC κανονικής φάσης, μίγματος αποτελούμενου από τριών τύπων μόρια που εδώ παρουσιάζονται ως κίτρινες, κόκκινες και μπλε ζώνες. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε.

➤ Στην HPLC κανονικής φάσης η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου και είναι πολική, ενώ η κινητή φάση είναι μη πολική. Οι πολικές ενώσεις θα προσροφώνται ισχυρότερα στη στατική φάση και συνεπώς οι άπολες ενώσεις θα εκκλύονται πρώτες από τη στήλη.

➤ Σε οποιοδήποτε διαχωρισμό προπορεύονται τα μόρια ουσιών με πολικότητα αντίστοιχης της κινητής φάσης, ενώ καθυστερούν αυτά με πολικότητα αντίστοιχης της στατικής φάσης. Στη χρωματογραφία ισχύει η αρχή «τα όμοια διαχωρίζουν τα όμοια», που εφαρμόζεται εδώ με την έννοια ότι πολικές στήλες απαιτούνται για το διαχωρισμό πολικών ενώσεων και το αντίστροφο.

2.8.2. HPLC Αντίστροφης Φάσης

Το αντίστροφο της HPLC κανονικής φάσης, είναι η **HPLC αντίστροφης φάσης (RP HPLC)**. Εδώ ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η έκλυση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την αύξηση του περιεχόμενου σε αυτή ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ελαττώνει την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης: είναι προφανές ότι όσο πιο άπολο είναι ένα διαχωριζόμενο μόριο, τόσο περισσότερο χρόνο θα αλληλοεπιδράσει με την άπολη στατική φάση και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση που θα απαιτείται για να επιτευχθεί η αποδέσμευσή του. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική έκλυση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη (Σχήμα 6). Είναι προφανές ότι με αντιστροφή της πολικότητας της κινητής και της στατικής φάσης, αντιστρέφεται και η σειρά έκλυσης των τριών συστατικών του μίγματος (Σχήματα 5 και 6).



(Ηλεκτρονικά Συγγράμματα Κάλλιπος, www.kallipos.gr)

Σχήμα 6. Χρωματογραφικός διαχωρισμός, με HPLC αντίστροφης φάσης, μίγματος αποτελούμενου από μόρια τριών τύπων που εδώ παρουσιάζονται ως κίτρινες, κόκκινες και μπλε ζώνες. Τα μόρια αυτά ακολουθούν την παρακάτω σειρά αυξανόμενης πολικότητας: κίτρινο > κόκκινο > μπλε.

Η επιλογή της Στατικής Φάσης

Στην επιλογή της στατικής φάσης (συνεπώς της αναλυτικής στήλης) λαμβάνονται υπ' όψη τα παρακάτω χαρακτηριστικά/προδιαγραφές της στήλης σε συνδυασμό με τη μοριακή δομή (δηλ. την ομόλογη σειρά, την πολικότητα, το μέγεθος μορίου κ.α.) της προσδιοριζόμενης ουσίας αλλά και των προσμίξεων που αναμένονται στο αναλυόμενο δείγμα:

- το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως,
- τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης,
- η φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης,
- η διάμετρος των πόρων του υλικού πληρώσεως,
- η σταθερότητα της στήλης στη μεταβολή του pH,
- η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους τόσο πιο πολική είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

Όλοι οι εμπορικοί οίκοι χρωματογραφικών στηλών παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις παραπάνω προδιαγραφές της στήλης, αλλά και αναλυτικές μελέτες της απόδοσης της στήλης σε σχέση με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αναλυόμενου μορίου και των αναμενόμενων προσμίξεων.

Ένας γενικός κανόνας που πρέπει να ακολουθείται από τον αναλυτή είναι ότι **«η στατική φάση πρέπει να έχει παρόμοια πολικότητα με την/ις προσδιοριζόμενη/ες ένωση/εις»**.

Η επιλογή της Κινητής Φάσης

Όπως αναφέρθηκε, η διαχωριστική ικανότητα R_s εξαρτάται από τον αριθμό των θεωρητικών πλακών N της στήλης και τον παράγοντα συγκράτησης k' . Μετά την επιλογή της στατικής φάσης (συνεπώς και την επιλογή του αριθμού θεωρητικών πλακών N), επιλέγεται η κινητή φάση, έτσι ώστε ο παράγοντας k' να είναι μεταξύ 5 και 20. Η βελτιστοποίηση της παραμέτρου k' επιτυγχάνεται κυρίως με αλλαγές στη σύσταση και ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και δευτερευόντως με αλλαγές στη θερμοκρασία της ανάλυσης.

Σε μία χρωματογραφική ανάλυση εφαρμόζονται κυρίως δύο διαφορετικές τεχνικές έκλουσης: η **ισοκρατική έκλουση** (isocratic elution) και η **βαθμιδωτή έκλουση** (gradient elution). Στην ισοκρατική έκλουση η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση καθ'όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ στη βαθμιδωτή έκλουση η σύσταση της κινητής φάσης έχει προγραμματιστεί να μεταβάλλεται κατά την ανάλυση είτε γραμμικά (linear gradient), είτε σε διακριτά βήματα (step gradient).

Η μεταβολή του πρωτοκόλλου έκλουσης από ισοκρατική σε βαθμιδωτή έχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του εύρους των κορυφών, αλλά και τη σημαντική μείωση του χρόνου της ανάλυσης. Το τελευταίο έχει ιδιαίτερη σημασία, επειδή οι διαλύτες υψηλής καθαρότητας που απαιτούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα υψηλού κόστους.

2.8.3. Οργανολογία HPLC

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη:

- **Περιέκτες διαλυτών:** Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- **Απαερωτής κενού (Degasser):** Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- **Αντλία (Pump):** Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (Injection System/Injector Valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη (Column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
- Ανιχνευτής (Detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του φωτός.

Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι υψηλής πίεσης. Ο ρόλος τους είναι η άντληση της κινητής φάσης από το δοχείο της και η διαβίβαση της κάτω από μεγάλη πίεση στη στήλη. Οι αντλίες αυτές πρέπει να είναι ικανές να λαμβάνουν ακριβή όγκο διαλύτη, χωρίς δονήσεις και με επαναλαμβανόμενη σταθερή ταχύτητα ροής και πίεση. Οι ταχύτητες ροής που μπορούν να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας τέτοιου είδους αντλίες είναι 0.05-5 ml/min, ενώ μπορούν να λειτουργήσουν σε πιέσεις 5-40 MPa.

Οι αντλίες που διατίθενται στο εμπόριο είναι συνήθως δύο τύπων:

- 1) Αντλίες σταθερής ροής (constant flow pumps), οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλες τις εφαρμογές HPLC και
- 2) Αντλίες σταθερής πίεσης (constant pressure pumps), οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την πλήρωση των χρωματογραφικών στηλών με τη στατική φάση.

Οι στήλες της HPLC ανάλογα με τις διαστάσεις τους κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Προστήλες
- Αναλυτικές στήλες
- Ημι – παρασκευαστικές
- Παρασκευαστικές

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται συγκριτικά χαρακτηριστικές διάφορες λειτουργίες των διαφόρων στηλών της HPLC.

Στήλες HPLC	Εσωτερική διάμετρος (mm)	Μήκος στήλης (mm)	Ροή (ml/min)	Εισαγόμενη ποσότητα (mg)	Εισαγόμενος Όγκος (μl)
Προστήλες	2.0-4.6	5-30	0.5-2.0	0.1-2.5	10-200
Αναλυτικές	2.0-4.6	125-250	0.5-2.0	0.1-2.5	10-200
Ημι-παρασκευαστικές	10-25	125-250	5.0-20.0	1.0-25.0	50-1000
Παρασκευαστικές	20-100	250-500	10.0-2000.0	5.0-500	200-5000

(Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001)

Οι ανιχνευτές που κυρίως χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι οι παρακάτω:

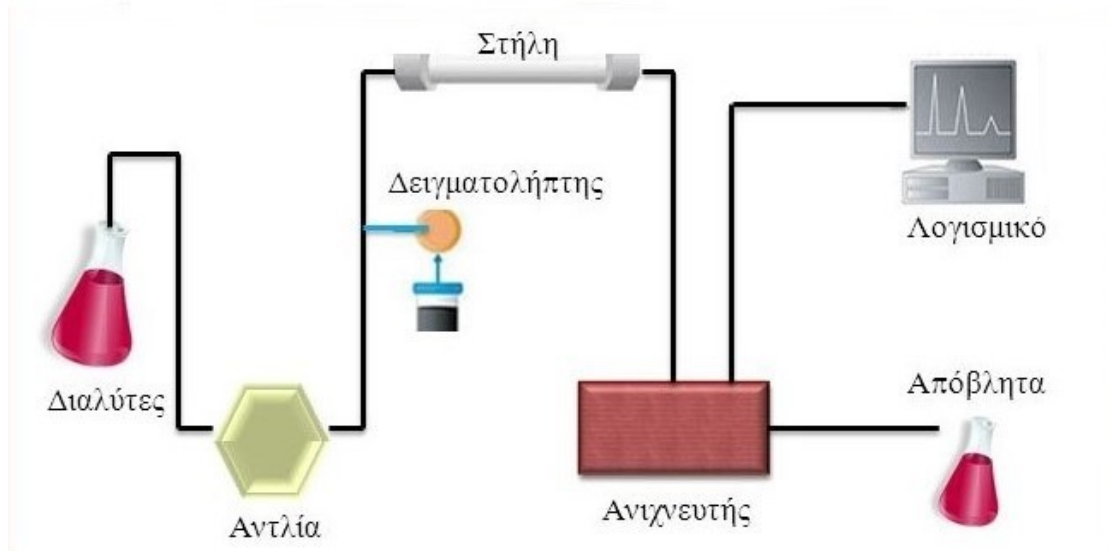
- ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector),
- ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD),
- αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector, CD),
 - ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector, RI Detector)
- φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector)
- ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR) (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector),
- ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector, ECD),
- φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector, FLD).

Οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και οι ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων, είναι και οι πιο συχνά απαντούμενοι. Επίσης, αρκετά συχνά χρησιμοποιούνται και φασματογράφοι μάζας.

Ένας ιδανικός ανιχνευτής θα πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Ικανοποιητική ευαισθησία.
- Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων.
- Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους.
- Περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας από τη θερμοκρασία δωματίου μέχρι τουλάχιστον τους 80 βαθμούς Κελσίου για την υγρή χρωματογραφία.
- Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής.
- Εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
- Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες ή εκλεκτική απόκριση για μία ή περισσότερες ομάδες ενώσεων.
- Να μην καταστρέφει το δείγμα.
- Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση.

- Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης, στην περιοχή των ng – μg.
- Τέλος, θα πρέπει να έχει τον ελάχιστο δυνατό όγκο για να περιορίζεται η διεύρυνση των κορυφών.



(Ηλεκτρονικά Συγγράμματα Κάλλιπος, www.kallipos.gr)

Σχήμα 7. Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC.

- Η διέλευση των εκλούμενων ουσιών ανιχνεύεται με τη βοήθεια ανιχνευτή που βρίσκεται αμέσως μετά τη χρωματογραφική στήλη. Συνηθέστερα πρόκειται για ανιχνευτή UV/Vis, που σε μία κυψελίδα συνεχούς ροής, η ποσότητα του απορροφούμενου φωτός θα εξαρτάται από την ουσία που διέρχεται διαμέσου της ακτίνας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας κάθε στιγμή. Οι διαλύτες της κινητής φάσης δε θα πρέπει να απορροφούν στο μήκος κύματος, όπου παρακολουθείται η έκλυση της ουσίας που μας ενδιαφέρει.

2.8.4. Βασικές έννοιες που περιγράφουν μία χρωματογραφική ανάλυση

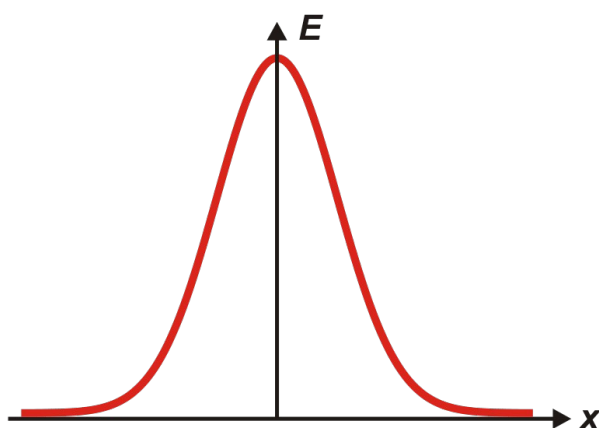
Παρακάτω παρουσιάζονται σύντομα οι σημαντικότερες έννοιες, που περιγράφουν μία χρωματογραφική ανάλυση:

Χρωματογράφημα

Όπως ήδη αναπτύχθηκε, σε κάθε χρωματογραφικό διαχωρισμό μια διαχωριζόμενη ουσία κατανέμεται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, κινούμενη ταυτόχρονα προς την έξοδο της στήλης (ή γενικότερα προς το άκρο της

στατικής φάσης) υπό την ροή της κινητής φάσης. Έτσι, κατά τον διαχωρισμό δημιουργούνται μετακινούμενες ζώνες μέσα στη στήλη, οι οποίες τελικά ανιχνεύονται κατά τη δίοδο τους από τον ανιχνευτή και καταγράφονται ως διακριτές κορυφές. Η γραφική παράσταση του μετρούμενου από τον ανιχνευτή μεγέθους προς το χρόνο μετά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, καλείται χρωματογράφημα.

Κάθε μόριο μίας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης μετακινείται «ανταλλασσόμενο» πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται λόγω αγκιστείας κ.λπ.) και αντίστροφα. Μερικά μόρια της ίδιας ουσίας κινούνται με λίγο διαφορετική ταχύτητα, επειδή τυχαία περνούν στην κινητή φάση λίγο περισσότερο χρόνο από τον μέσο χρόνο παραμονής, αλλά και λόγω της πολλαπλότητας των διαδρομών, που μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο μέσα στη στήλη. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται μια συμμετρική διασπορά της κατανομής των μορίων γύρω από μια μέση τιμή, που αποδίδει τη μέση συμπεριφορά των μορίων της ουσίας. Η κατανομή αυτή προσεγγίζει μία κατανομή κατά Gauss δίνοντας το γνωστό κωδωνοειδές σχήμα των κορυφών σε ένα χρωματογράφημα.



(Ηλεκτρονικά Συγγράμματα Κάλλιπος, www.kallipos.gr)

Σχήμα 8. Κορυφή με κανονική κατανομή (**κατανομή κατά Gauss**). [ix]

Χρόνος κατακράτησης ή χρόνος ανάσχεσης, t_R

Ο **χρόνος κατακράτησης** (retention time) t_R , είναι ο χρόνος που απαιτείται, ώστε μία συγκεκριμένη ουσία να «ταξιδέψει» διαμέσου της στήλης από την είσοδο αυτής μέχρι τον ανιχνευτή. Η εκκίνηση μέτρησης του χρόνου κατακράτησης γίνεται την στιγμή που το δείγμα εισάγεται με ένεση στη στήλη. Το χρονικό διάστημα μετά την

ένεση και μέχρι το μέγιστο της κορυφής έκλουσης μίας ουσίας ονομάζεται χρόνος κατακράτησης.

Ο χρόνος κατακράτησης αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά μιας ουσίας, υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Έτσι, για μία συγκεκριμένη ουσία ο χρόνος κατακράτησης καθορίζεται από:

- την πίεση που ασκείται στη στήλη (η οποία με τη σειρά της καθορίζει την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης),
- τη φύση της στατικής φάσης (υλικό πληρώσεως και μέγεθος σωματιδίων αυτού),
- την ακριβή σύσταση της κινητής φάσης (διότι η σύσταση καθορίζει το συντελεστή κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης),
- τη θερμοκρασία της στήλης (καθότι ο συντελεστής κατανομής εξαρτάται από τη θερμοκρασία του διαχωρισμού).

➤ Σε μία χρωματογραφική ανάλυση οι παράμετροι ταχύτητα ροής κινητής φάσης, υλικό πληρώσεως και μέγεθος σωματιδίων στήλης, διαστάσεις στήλης, θερμοκρασία στήλης πρέπει να ορίζονται επακριβώς, προκειμένου μία χρωματογραφική ανάλυση να είναι επαναλήψιμη.

Ο χρόνος παραμονής των μορίων του δείγματος στην κινητή φάση είναι ο ίδιος για όλα τα συστατικά του δείγματος και ονομάζεται **νεκρός χρόνος**, t_0 . Ο νεκρός χρόνος είναι ο χρόνος που απαιτείται για ένα μη κατακρατούμενο από τη στατική φάση συστατικό να διέλθει από τη στήλη, δηλαδή με άλλα λόγια είναι ο χρόνος κατακράτησης ενός συστατικού που δεν αλληλοεπιδρά καθόλου με τη στατική φάση της στήλης. Προφανώς η ταχύτητα μετανάστευσης της μη κατακρατούμενης ουσίας είναι ίση προς τη μέση ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης.

Είναι προφανές ότι ο καθαρός χρόνος παραμονής ενός συστατικού στη στατική φάση για ένα συστατικό που αλληλοεπιδρά σε κάποιο βαθμό με αυτήν (ανηγμένος χρόνος κατακράτησης [t_R']) ισούται με τη διαφορά του χρόνου κατακράτησης και του νεκρού χρόνου, δηλαδή:

$$t_R' = t_R - t_0$$

➤ Υπό καθορισμένες χρωματογραφικές συνθήκες ο χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά της ουσίας και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της.

Συντελεστής κατακράτησης ή παράγοντας κατακράτησης ή παράγοντας χωρητικότητας

Ο συντελεστής κατακράτησης k' (retention factor ή capacity factor) επίσης, περιγράφει τη μετανάστευση των διαλυμένων ουσιών στη στήλη και αποτελεί ποσοτικό μέτρο της τάσης ενός συγκεκριμένου είδους μορίων να προσροφάται στη στατική φάση. Χρησιμοποιείται πολλές φορές αντί του χρόνου ανάσχεσης, διότι εξαρτάται λιγότερο από τις πειραματικές συνθήκες της ανάλυσης. Ο παράγοντας κατακράτησης ισούται με τον λόγο του χρόνου που παραμένει η ουσία Α στη στατική φάση προς τον χρόνο που αυτή παραμένει στην κινητή φάση:

$$k' = tR' / t_0 = t_R - t_0 / t_0$$

Όπου t_R ο χρόνος κατακράτησης της προσδιοριζόμενης ουσίας, tR' ο ανηγμένος χρόνος κατακράτησης και t_0 είναι ο νεκρός χρόνος της ανάλυσης.

Ο παράγοντας κατακράτησης μπορεί να μεταβληθεί κυρίως με μεταβολή της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, της θερμοκρασίας της στήλης και του συστήματος των διαλυτών. Έτσι, μεταβάλλοντας τις χρωματογραφικές συνθήκες μπορούμε να επιτύχουμε εξίσου ικανοποιητικό διαχωρισμό με μικρότερους όμως παράγοντες κατακράτησης, κυρίως για τους ισχυρά κατακρατούμενους αναλύτες, δηλ. με μεγαλύτερη οικονομία χρόνου και διαλυτών.

Εύρος κορυφής (peak width), W

Κατά το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος μέσω μίας στήλης συμβαίνει αραίωση του δείγματος που ενέθηκε. Ως αποτέλεσμα, η ζώνη που περιέχει το καθένα από τα διαχωρισμένα συστατικά διευρύνεται διαρκώς κατά την εξέλιξη του διαχωρισμού. Έτσι η κάθε κορυφή που καταγράφεται από τον ανιχνευτή έχει ένα συγκεκριμένο εύρος, που καλείται **εύρος κορυφής**, W . Το εύρος της κορυφής υπολογίζεται γραφικά, όταν οι κορυφές αποδοθούν κατά προσέγγιση ως τρίγωνα.

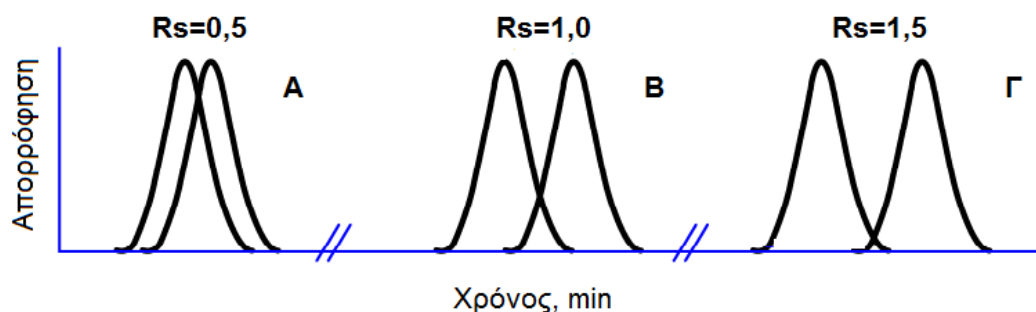
Διαχωριστική ικανότητα στήλης (Resolution), R_s

Η διαχωριστική ικανότητα (resolution), R_s , αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητας μίας στήλης να διαχωρίσει δύο προσδιοριζόμενες ουσίες (που αναλύονται υπό ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο). Δύο ουσίες θεωρείται ότι διαχωρίζονται πλήρως, όταν το R_s είναι ίσο τουλάχιστον με 1,5. Υπολογίζεται από τη σχέση:

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / 0,5 (W_2 + W_1)$$

Όπου t_{R2} είναι ο χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας και t_{R1} ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας που εκλούεται αμέσως πριν στο χρωματογράφημα. W_2 και W_1 είναι το

εύρος της αντίστοιχης κορυφής (προπορευόμενη και επακόλουθη) στη βάση της κορυφής.



(Ηλεκτρονικά Συγγράμματα Κάλλιπος, www.kallipos.gr)

Σχήμα 9. Μεταβολή της επικάλυψης των κορυφών δύο αναλυτών σε χρωματογράφημα μίγματός τους, με μεταβολή της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης από $R_s=0.5$ (A) σε $R_s=1.0$ (B) και $R_s=1.5$ (Γ), κατά την αλλαγή των χρωματογραφικών συνθηκών.

- Η διαχωριστική ικανότητα R_s μιας στήλης αποτελεί ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Πρακτικά ο διαχωρισμός δύο ουσιών θεωρείται πλήρης όταν $R_s \geq 1.5$.

Αριθμός θεωρητικών πλακών και ύψος θεωρητικής πλάκας

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (plate number), N , και το ύψος της θεωρητικής πλάκας (plate height), H , είναι καθαρά θεωρητικά μεγέθη. Χρησιμοποιούνται προκειμένου να συγκριθεί η αποδοτικότητα χρωματογραφικών στηλών.

Το μοντέλο των θεωρητικών πλακών κάνει την υπόθεση ότι μία χρωματογραφική στήλη αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό ξεχωριστών πλακών (μικρών τμημάτων στήλης). H είναι το μήκος της στήλης που αντιστοιχεί σε μία θεωρητική πλάκα, το οποίο καλείται ύψος της θεωρητικής πλάκας. N είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών που υπάρχουν σε μία στήλη. Όσο περισσότερο πακτωμένο είναι το πληρωτικό υλικό στη στήλη και όσο μικρότερη είναι η διάμετρος των σωματιδίων του, τόσο μικρότερο είναι το ύψος μίας θεωρητικής πλάκας. Κάθε μόριο μιας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης, μετακινείται όντας σε ισορροπία μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης της κάθε θεωρητικής πλάκας με την οποία αλληλοεπιδρά. Είναι προφανές ότι όσο μικρότερη είναι η τιμή του μεγέθους H , τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N που εμπεριέχονται σε μία στήλη και συνεπώς τόσο αποτελεσματικότερος είναι ο διαχωρισμός. Είναι σημαντικό να έχει κανείς κατά νου

ότι οι θεωρητικές πλάκες δεν υπάρχουν στην πραγματικότητα μέσα σε μία στήλη, απλώς βοηθούν στην κατανόηση των διεργασιών σε αυτή.

Τα μεγέθη N και H σχετίζονται επίσης με τη διεύρυνση των κορυφών (δηλαδή με το εύρος W) και συνδέονται με τις σχέσεις:

$$H = L/N = L/16 * W^2/t_R^2$$

$$N = L/H = 16 t_R^2/W^2$$

όπου L το μήκος της στατικής φάσης και W το εύρος της κορυφής.

Με βάση τις παραπάνω εξισώσεις, τα μεγέθη N και H μπορούν να υπολογισθούν για το κάθε συστατικό από το χρωματογράφημα της ανάλυσης.

Από τις παραπάνω σχέσεις διαπιστώνεται ότι όσο μεγαλύτερο είναι το ύψος μίας θεωρητικής πλάκας, τόσο πιο διευρυμένες εμφανίζονται οι κορυφές κατά το διαχωρισμό. Εφόσον η αποδοτικότητα μίας στήλης είναι ανάλογη του N και αντιστρόφως ανάλογη του H, αλλά και η διεύρυνση των κορυφών είναι ανάλογη του H, τότε, είναι επιθυμητή η χρήση στηλών με μικρό H και μεγάλο N.

Οι χρωματογραφικές στήλες έχουν διαφορετικό αριθμό θεωρητικών πλακών για διαφορετικούς αναλύτες σε ένα μείγμα.

Τα μεγέθη N και H είναι αυτά που κατεξοχήν αναφέρονται από τους οίκους χρωματογραφικού εξοπλισμού, ως μέτρα αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας μίας στήλης να διαχωρίζει συγκεκριμένη ομόλογη σειρά αναλυτών. Ως παράδειγμα, μια αναλυτική χρωματογραφική στήλη με N = 40.000 πλάκες/m προτιμάται σε σχέση με αυτή με N = 30.000 πλάκες/m. Η πρώτη παράγει επίσης στενότερες κορυφές για το ίδιο συστατικό, υπό τις ακριβώς ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι, εάν μία στήλη διαχωρίζει αποτελεσματικά μία συγκεκριμένη ομόλογη σειρά χημικών ενώσεων (π.χ. τα αμινοξέα), δεν σημαίνει ότι είναι εξίσου καλή στο διαχωρισμό άλλης ομόλογης σειράς χημικών ενώσεων, όπως π.χ. τις αλκοόλες.

2.8.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με Χρωματογραφία HPLC

Ποιοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός προσδιορισμός έχει ως σκοπό να διερευνήσει και πιστοποιήσει την ταυτότητα μίας ουσίας που διαχωρίζεται με HPLC από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος.

Υπάρχουν δύο διακριτές περιπτώσεις:

1. Όταν είναι γνωστή η ταυτότητα του συστατικού του δείγματος που θέλουμε να διακρίνουμε, οπότε η κορυφή του συστατικού που μας ενδιαφέρει πρέπει να ταυτοποιηθεί. Στην περίπτωση αυτή η ταυτοποίηση γίνεται με βάση το χρόνο ανάλυσης της κορυφής (ή καλύτερα τον συντελεστή κατακράτησης) που λαμβάνεται κατά την ανάλυση δείγματος και προτύπου της καθαρής ουσίας. Είναι απαραίτητο, προκειμένου η αντιστοίχιση να είναι έγκυρη, η ανάλυση δείγματος και προτύπου να διεξαχθεί υπό τις ακριβώς ίδιες πειραματικές συνθήκες. Αυτό σημαίνει χρησιμοποιώντας την ίδια στήλη (σε ό, τι αφορά στα τεχνικά χαρακτηριστικά της, συμπεριλαμβανομένου και του πληρωτικού υλικού), ίδια σύσταση και ροή κινητής φάσης, καθώς και ίδια θερμοκρασία ανάλυσης. Επίσης, τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των δύο κορυφών θα πρέπει να είναι όμοια, προκειμένου η αντιστοίχιση να είναι ασφαλής, και γι' αυτό το λόγο το συστατικό που μας ενδιαφέρει, στο πρότυπο και στο δείγμα θα πρέπει να βρίσκεται σε παρόμοια συγκέντρωση. Εάν το χρωματογραφικό σύστημα έχει έναν επιλεκτικό ανιχνευτή, όπως ανιχνευτή συστοιχίας διόδων ή ανιχνευτή φθορισμού, το λαμβανόμενο φάσμα της κορυφής ενδιαφέροντος ή το μετρούμενο σήμα επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση, σε συνδυασμό με τον συντελεστή κατακράτησης. Για μεγαλύτερη ασφάλεια στην αντιστοίχιση, ιδίως όταν το χρωματογραφικό σύστημα δεν συνδυάζεται με κάποιον επιλεκτικό ανιχνευτή, θα πρέπει το δείγμα και το πρότυπο να αναλυθούν σε μία παράλληλη ανάλυση υπό διαφορετικές χρωματογραφικές συνθήκες, σε σχέση με την πρώτη ανάλυση. Και στη δεύτερη ανάλυση ο χρόνος ανάλυσης προτύπου και κορυφής ενδιαφέροντος θα πρέπει να συμπίπτουν απόλυτα. Τέλος, μια άλλη μεθοδολογία που εφαρμόζεται κοινώς για την ταυτοποίηση κορυφής, όταν είναι γνωστή η ταυτότητα του συστατικού που μας ενδιαφέρει, είναι ο εμβολιασμός του δείγματος με το γνωστό πρότυπο. Σ' αυτή τη μεθοδολογία η απουσία εμφάνισης νέας κορυφής, και παράλληλα η ενίσχυση της υπάρχουσας κορυφής του συστατικού με διατήρηση της συμμετρίας της, επιβεβαιώνει την ταυτότητα της κορυφής.

2. Όταν δεν είναι γνωστή η ταυτότητα των συστατικών του δείγματος. Στην περίπτωση αυτή ενδείξεις για την ταυτότητα της κορυφής λαμβάνονται με σύζευξη του διαχωρισμού με HPLC με κάποιον ανιχνευτή που βοηθάει στην ταυτοποίηση,

όπως ανιχνευτή NMR ή MS. Θα πρέπει να τονισθεί ότι επιβεβαίωση της ταυτότητας με τουλάχιστον δύο ή συνήθως περισσότερες χημικές τεχνικές είναι απαραίτητη.

Ποσοτικός προσδιορισμός

Αναφέρθηκε ήδη ότι ο χρόνος ανάσχεσης αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά μίας ουσίας, υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Προκειμένου, λοιπόν, να ταυτοποιηθούν οι αναλύτες στους οποίους οφείλονται οι κορυφές ενός χρωματογραφήματος, είναι απαραίτητο να συγκριθεί το χρωματογράφημα που προκύπτει κατά την ανάλυση ενός δείγματος με αυτό που λαμβάνεται κατά την ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων, τα οποία περιέχουν γνωστούς αναλύτες. Είναι απαραίτητο να αναλυθεί το δείγμα και τα πρότυπα υπό τις ακριβείς ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Είναι επίσης σημαντικό να έχουμε μία γενική γνώση των αναμενόμενων αναλυτών στο δείγμα μας ήδη πριν την ανάλυση, προκειμένου να επιλεγούν τα κατάλληλα πρότυπα.

Οι μετρήσεις σε μια οποιαδήποτε χρωματογραφική τεχνική ανάλυσης είναι σχετικές και απαιτούν τη βαθμονόμηση των χρωματογράφων με διαλύματα προτύπων παραπλήσιας συστάσεως με τα δείγματα. Είναι προφανές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το εμβαδό της προκύπτουσας κορυφής (εφόσον περισσότερα μόρια της ουσίας θα ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή). Μάλιστα η σχέση αυτή είναι ανάλογη. Η ποσοτικοποίηση, λοιπόν, σε μια χρωματογραφική ανάλυση γίνεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της κορυφής, το οποίο είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας, μετά την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η υπέρθεση δύο χρωματογραφημάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων μιας ουσίας. Και στις δύο περιπτώσεις η ουσία αναλύθηκε υπό τις ακριβώς όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες. Το εμβαδόν της κάθε κορυφής, υπολογίζεται αυτόματα από το λογισμικό που υποστηρίζει το σύστημα της χρωματογραφίας. Εκεί, φαίνεται και η συγκέντρωση της ουσίας που έδωσε την κάθε κορυφή. Από τα δεδομένα του ένθετου είναι φανερό ότι το εμβαδόν αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Είναι επίσης λογικό και εμφανές από το γράφημα, ότι ο χρόνος έκλουσης δεν μεταβάλλεται με τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας.

Σχήμα 10. Υπέρθεση δύο χρωματογραφημάτων συγκεντρώσεων C_A και C_B μίας ουσίας. Και στις δύο περιπτώσεις η ουσία αναλύθηκε υπό τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Το εμβαδόν της κάθε κορυφής σημειώνεται στο ένθετο.

Επίσης, ισχύει και η αναλογία του ύψους της κορυφής με την ποσότητα του αναλύτη. Θα πρέπει να γίνει κατανοητό ότι κατά την ποσοτικοποίηση δύο ουσιών που περιέχονται σε ένα μίγμα, είναι απαραίτητο να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς για καθένα από τα συστατικά του μίγματος, χρησιμοποιώντας για κάθε καμπύλη αναφοράς την αντίστοιχη πρότυπη ουσία. Αυτό θα πρέπει να γίνει, διότι δεν υπάρχει αναλογία μεταξύ του εμβαδού της κορυφής της μίας ουσίας και της συγκέντρωσης της δεύτερης ουσίας. Αυτό οφείλεται στο ότι η κάθε ουσία απορροφάει στο συγκεκριμένο μήκος κύματος στο UV/Vis (όπου ελέγχεται η απορρόφηση) έχοντας διαφορετικό συντελεστή μοριακής απόσβεσης.

- *Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης μιας αναλυόμενης ουσίας σε μία χρωματογραφική ανάλυση, γίνεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής της ουσίας. Αυτό είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ουσίας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι δυνατός μετά την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας πρότυπα της ουσίας διαφορετικής συγκέντρωσης.*

3. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας ήταν:

1. Ανάπτυξη μεθόδου ανάλυσης των δύο κύριων γλυκοζιτών της στεβιόλης.
2. Προσδιορισμός των δύο κύριων γλυκοζιτών στεβιόλης από αποξηραμένα φύλλα στέβια, τα οποία προέρχονται από φυτά που αναπτύχθηκαν με την βοήθεια διαφορετικών λιπασμάτων.

4. Πειραματική Διαδικασία

4.1. Υλικά και Μέθοδοι

4.1.1. Πρώτη Ύλη

Τα φύλλα της στέβια αποξηράθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε σκιερό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου. Διαφορετικό λίπασμα χρησιμοποιήθηκε για το κάθε δείγμα για την ανάπτυξη του φυτού. Η σύσταση διαφορετικών λιπασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άγνωστη. Τα φυτά που καλλιεργήθηκαν ανήκαν στην ίδια ποικιλία και οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν οι ίδιες.

4.1.2. Αντιδραστήρια

Κατά την διεξαγωγή των αναλυτικών μεθόδων τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και περιγράφονται παρακάτω:

- Υπερκάθαρο νερό (PureLab flex, ELGA)
- Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, HPLC gradient grade 99.9+%, Chem-Lab)
- Μεθανόλη (Methanol CHROMASOLV, for HPLC, ≥99.9%, Sigma-Aldrich)
- Στεβιοσίδη (ChromaDex)
- Ρεμπαουδιοσίδη A (CromaDex)
- Prevail C18 για SPE (φυσίγγια εκχύλισης στερεάς φάσης C18) (Alltech)

4.1.3. Όργανα

Παρακάτω αναγράφονται τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος.

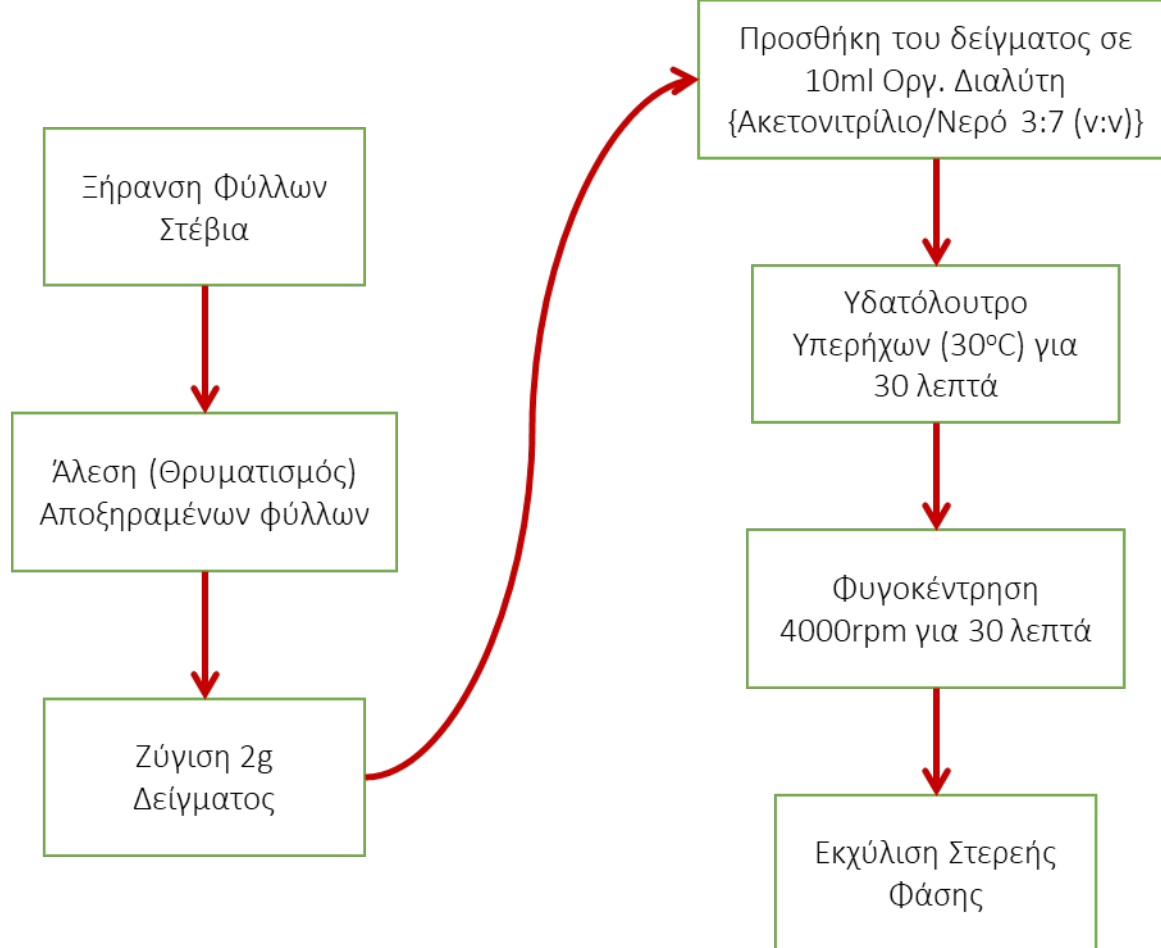
- Ζυγός ακριβείας (Kern ABJ 220-4M, KERN & Son GmbH)

- Υδατόλουτρο / Sonicator (Elmasonic S 30 (H), Elma)
- Φυγοκεντρητής (Gallenkamp Laboratory Centrifuge)
- Συσκευή Solid Phase Extraction (SPE)
- Αντλία κενού (TRMX 257/1-C/RX, pompetravaini S.p.A.)
- Διάταξη HPLC (αντλία LC-10ADvp, απαερωτής DGU-14A, αυτόματος δειγματολήπτης SIL 10ADvp, Rheodyne 7125 Valve με 20 µL Loop, φούρνος στήλης CTO-10ACvp, σύστημα ελέγχου SCL-10Avp, ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Photo Diode Array Detector –PDA) SPD-M10AVP και στήλη Separon SGX NH2 5µ, 250mm x 4.6mm)

4.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Η ανάλυση των γλυκοζιτών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία εκχύλισης:

- Αρχικά θρυμματίστηκαν και ζυγίστηκαν 2g (βάρος κάθε δείγματος) αποξηραμένων φύλλων στέβια.
- Στη συνέχεια όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 10ml ακετονιτριλίου-νερού σε αναλογία 3:7 (v:v).
- Παραμονή σε υδατόλουτρο υπερήχων στους 30 °C για 30 λεπτά.
- Στη συνέχεια κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά για να κατακρημιθούν τα στερεά υπολείμματα στις 4000 στροφές ανά λεπτό (rpm).
- Λόγω της παρουσίας χρωστικών ουσιών έγινε κατεργασία των δειγμάτων με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Η διαδικασία SPE έγινε σε ειδική συσκευή υπό κενό: Στην αρχή έγινε έγχυση 5 ml υπερκάθαρου νερού και έπειτα μεθανόλης για την ενεργοποίηση των SPE στηλών. Στη συνέχεια ξεπλύθηκε με 5 ml υπερκάθαρο νερό από τυχόν υπολείμματα μεθανόλης. Έπειτα έγινε «επίθεση» των δειγμάτων και έκλουση με διαλύτη ακετονιτρίλιο:νερό 3:7.
- Τα δείγματα καταψύχθηκαν.
- Πριν την εισαγωγή στο σύστημα HPLC, προηγήθηκε διήθηση με φίλτρο 0,45 µm και αραιώθηκαν σε αναλογία 1:2 με διαλύτη ακετονιτρίλιο:νερό 3:7.



Σχήμα 11. Στάδια προετοιμασίας δειγμάτων.

Η χρήση της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) είναι μια τεχνική προκατεργασίας του δείγματος, η οποία χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση ενώσεων από τη μήτρα ενός δείγματος γλυκοζιτών της στέβια πριν από την ανάλυση με HPLC.

Είναι γνωστό ότι οι χρωστικές είναι λιγότερο πολικές από τα άλλα συστατικά που περιέχονται στα φύλλα της στέβια και με την χρήση cartridge C18 προσκολλώνται στο υλικό πλήρωσης που περιέχουν, με αποτέλεσμα ενώσεις όπως οι γλυκοζίτες, τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα, να μην συγκρατούνται στην στήλη ενώ οι χρωστικές να κατακρατώνται. Η χρήση της τεχνικής SPE με μικροστήλες C18 έγινε για να απομακρυνθούν οι χρωστικές που περιέχονται στο-δείγμα φύλλων στέβια.

5. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού γλυκοζιτών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) η κινητή φάση διέρχεται από την HPLC στήλη που περιέχει τη στατική φάση. Μια τυπική διάταξη HPLC περιλαμβάνει μια φιάλη διαλύτη που είναι η κινητή φάση, έναν απαερωτή, μια αντλία για να διοχετεύσει την κινητή φάση, ένα σύστημα έγχυσης για την εισαγωγή δείγματος, μια στήλη που περιέχει τη στατική φάση, έναν ανιχνευτή για την ανίχνευση των συστατικών στην έξοδο τους από τη στήλη και τέλος έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή για τον έλεγχο του HPLC συστήματος και την καταγραφή του σήματος του ανιχνευτή.

5.1. Μεθοδολογία

Τα πειραματικά δεδομένα της αναλυτικής μεθόδου είναι τα παρακάτω:

- Στήλη: SEPARON SGX NH₂ 5μ, 250mm x 4.6mm ID
- Ροή: 2 ml/min
- Ανιχνευτής: UV-Vis Diode Array Detector (Η ανίχνευση έγινε στα 210 nm)
- Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο (CH₃CN) : Νερό (H₂O) 84.7 : 15.3
- Θερμοκρασία φούρνου στήλης: 30°C
- Χωρητικότητα βρόγχου (Loop) βαλβίδας εισαγωγής δείγματος: 20 μL
- Διάρκεια ανάλυσης: 30 min
- Έκλυση: Ισοκρατική

5.2. Μελέτη διάφορων παραμέτρων της μεθόδου ανάλυσης

5.2.1. Μελέτη για την επιλογή κατάλληλου μήκους κύματος ανίχνευσης στο υπεριώδες (UV).

Η επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος έγινε με την χρήση του ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Photo Diode Array Detector – PDA) που επιτρέπει την παρακολούθηση όλων των μηκών κύματος εντός του φάσματος που επιλέγεται. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η ανίχνευση των γλυκοζιτών γίνεται εντός του εύρους 200-210nm. Η μεγαλύτερη τιμή του σήματος των κορυφών παρατηρήθηκε στα 205nm, σε αυτή την τιμή όμως ο διαχωρισμός όμως δεν ήταν ικανοποιητικός λόγω και άλλων ουσιών στο δείγμα που απορροφούσαν υπεριώδη ακτινοβολία στο

συγκεκριμένο μήκος κύματος. Στα 210nm η ανίχνευση των γλυκοζιτών είναι εφικτή χωρίς παρεμποδίσεις.

5.2.2. Μελέτη θερμοκρασίας στήλης

Στην μελέτη της θερμοκρασίας αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα γλυκοζιτών στις εξής θερμοκρασίες: 25°C, 30°C, 40°C και 60°C. Με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25°C στους 30°C παρατηρήθηκε ταχύτερη έκλυση των γλυκοζιτών με ελάχιστη μείωση στην ένταση του σήματος των κορυφών. Από τους 30°C στους 40°C παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου με σημαντική διαπλάτυνση των κορυφών και μεγάλη μείωση στην ένταση του σήματος των κορυφών. Στους 60°C η ανίχνευση των γλυκοζιτών δεν ήταν δυνατή. Σε μία έρευνα προσδιορισμού των γλυκοζιτών σε C18 RP στήλη, παρατηρήθηκε επίσης μείωση της έντασης του σήματος των κορυφών. Η μείωση της έντασης του σήματος των κορυφών στην έρευνα από τους 20°C στους 40°C ήταν κοντά στο 30%, και από τους 40°C στους 60°C πάνω από 50%. [15]

5.2.3. Μελέτη ροής κινητής φάσης συστήματος

Με την αύξηση της ροής παρατηρήθηκε μείωση του εύρους των κορυφών και ταχύτερη έκλυση των ουσιών. Οι ροές που δοκιμάστηκαν ήταν 0.5, 1.0, 1.5, και 2.0 ml/min. Η ροή της κινητής φάσης μελετήθηκε παράλληλα με το ποσοστό του οργανικού διαλύτη με στόχο την ταχύτερη έκλυση των γλυκοζιτών χωρίς να μειωθεί η διαχωριστικότητα. Από τις δοκιμές με διαφορετική ροή που πραγματοποιήθηκαν, καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με ροή 2 ml/min.

5.2.4. Μελέτη ποσοστού οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο:νερό v/v) στην κινητή φάση

Αρχικά η μελέτη του ποσοστού του οργανικού διαλύτη έγινε με τη χρήση πρότυπου διαλύματος μίγματος των δύο γλυκοζιτών (στεβιοσίδη, ρεμπαουδιοσίδη Α) σε ποσοστά οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο:νερό, v/v) 70:30, 80:20 και 90:10 και ροή κινητής φάσης 1.5 ml/min. Με τη μείωση του οργανικού διαλύτη παρατηρήθηκε ταχύτερη έκλυση των γλυκοζιτών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του εύρους και την αύξηση της έντασης των κορυφών, δίνοντας έτσι μεγαλύτερη διακριτή ικανότητα στην μέθοδο.

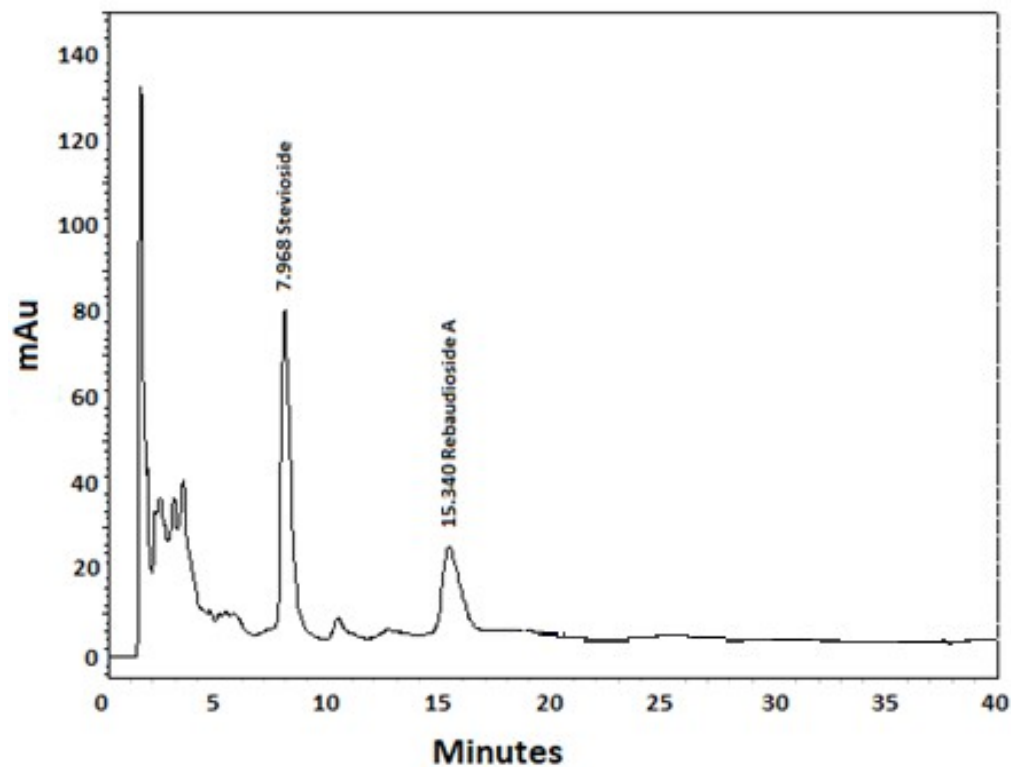
Με ποσοστό οργανικού διαλύτη 70% υπήρχε συνέκλυση των γλυκοζιτών στα 3.05 λεπτά, με ποσοστό 80% η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη Α εκλούστηκαν στα

4.95 και 6.91 λεπτά αντίστοιχα. Ένω σε ποσοστό 90% δεν εκλούστηκαν οι γλυκοζίτες.

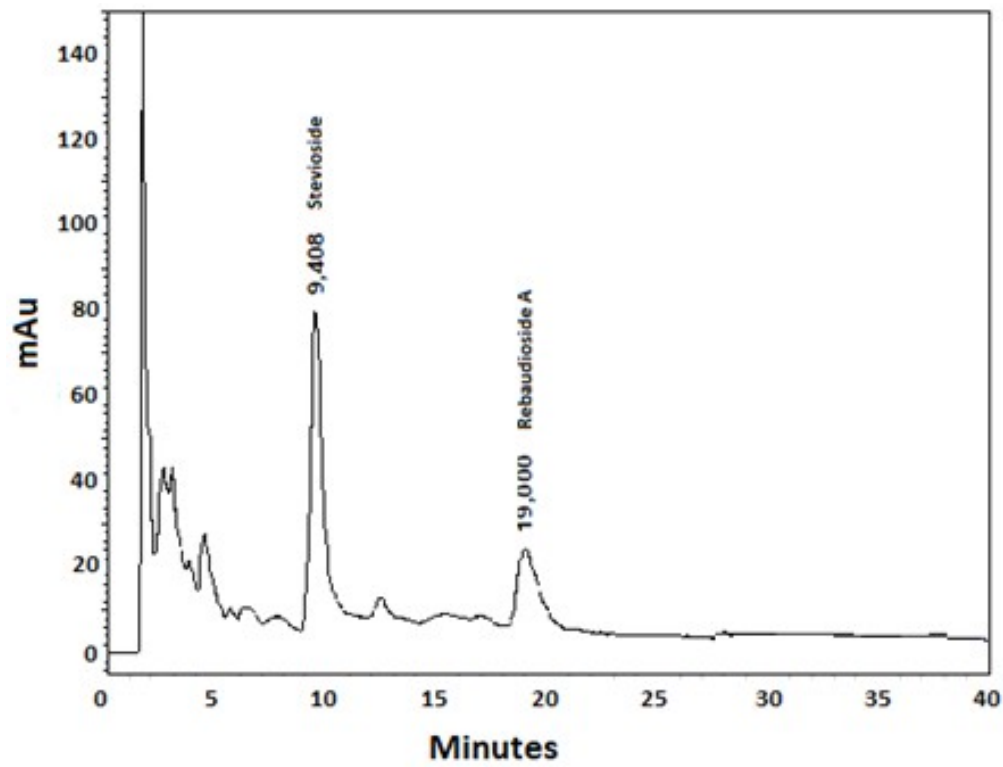
Στο τελικό στάδιο όμως λόγω παρεμποδίσεων του δείγματος δοκιμάστηκαν νέες τιμές σε συνδυασμό με αλλαγή της ροής της κινητής φάσης στα 2 ml/min.

Για την τελική επιλογή του κατάλληλου ποσοστού οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση ακολούθησε μία σειρά δοκιμαστικών αναλύσεων. Για το σύνολο των δοκιμών αυτών επιλέχθηκε τυχαία ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. Στις δοκιμές αυτές μεταβλήθηκε το ποσοστό του ακετονιτρίλιου και του νερού.

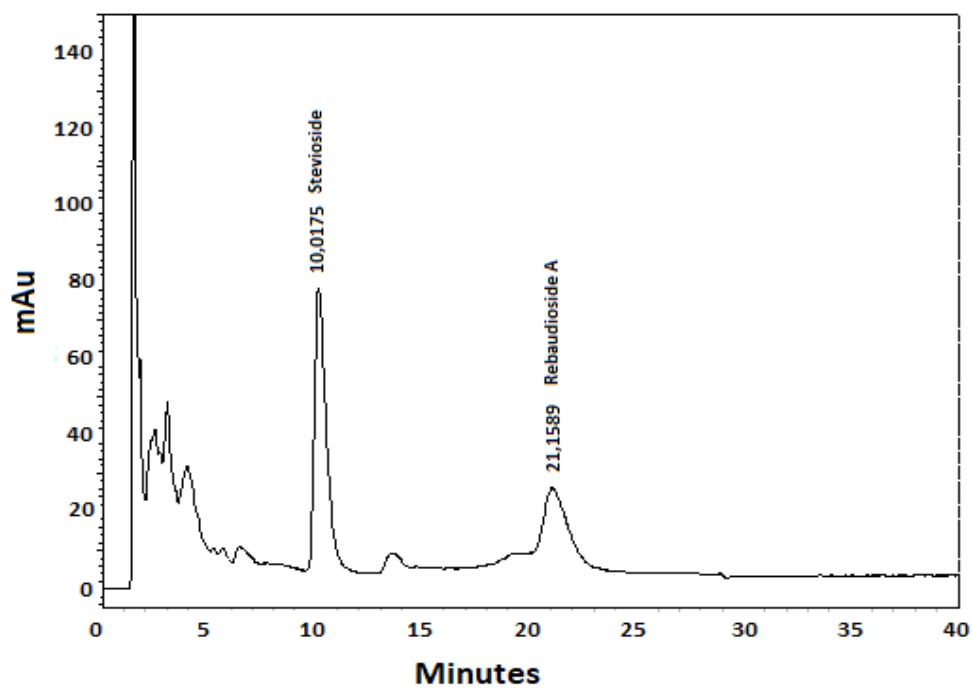
- Ακετονιτρίλιο : Νερό (84:16) Σχήμα 12.
- Ακετονιτρίλιο : Νερό (84,7:15,3) Σχήμα 13.
- Ακετονιτρίλιο : Νερό (85:15) Σχήμα 14.
- Ακετονιτρίλιο : Νερό (86:14) Σχήμα 15.



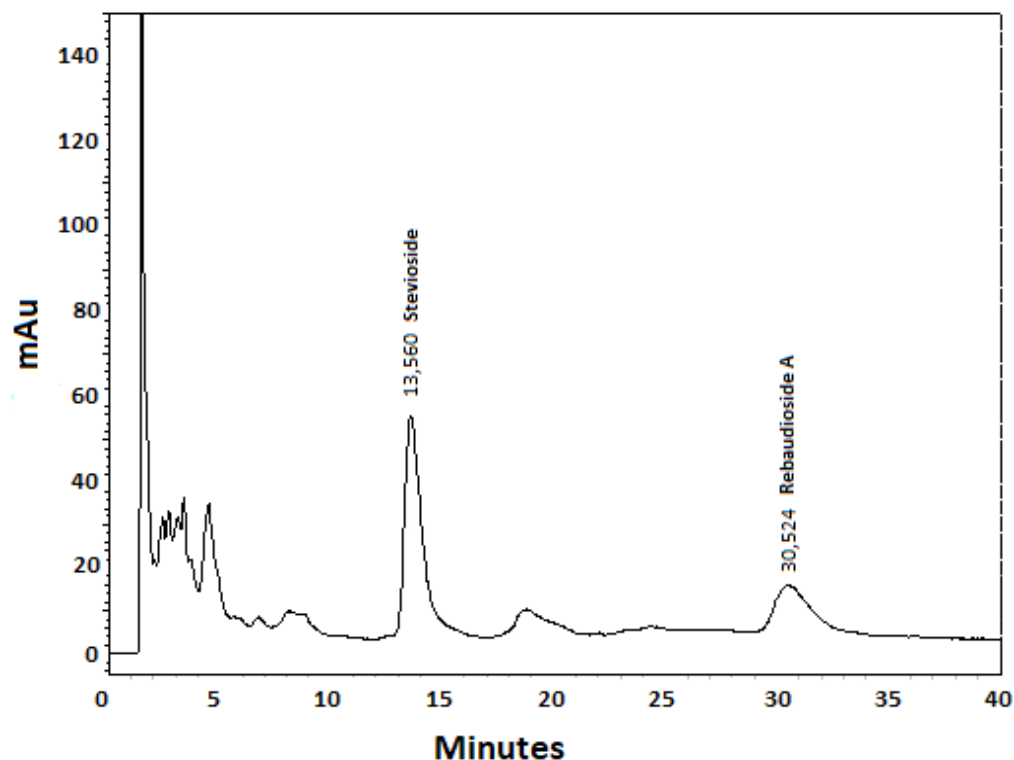
Σχήμα 12. Χρωματογράφημα δείγματος στέβια με κινητή φάση Ακετονιτρίλιο : Νερό (84:16).



Σχήμα 13. Χρωματογράφημα δείγματος στέβια με κινητή φάση Ακετονιτρίλιο : Νερό (84.7:15.3).



Σχήμα 14. Χρωματογράφημα δείγματος στέβια με κινητή φάση Ακετονιτρίλιο : Νερό (85:15).



Σχήμα 15. Χρωματογράφημα δείγματος στέβια με κινητή φάση Ακετονιτρίλιο : Νερό (86:14).

- Η κινητή φάση που επιλέχθηκε ήταν ακετονιτρίλιο : νερό (84.7 : 85.3) καθώς έδωσε χρωματογραφικά τα καλύτερα αποτελέσματα (καλύτερη διακριτική ικανότητα και μικρότερο εύρος κορυφών).

5.2.5. Μελέτη όγκου βρόγχου δείγματος

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις βρόγχοι δείγματος διαφορετικής χωρητικότητας, 100, 50, 20 και 10 μl. Με τη χρήση βρόγχου μικρότερης χωρητικότητας παρατηρείται σημαντική μείωση του εύρους των κορυφών και μερική μείωση στην ένταση του σήματος των κορυφών. Ο καλύτερος συνδυασμός των δύο παραμέτρων παρατηρήθηκε με τη χρήση βρόγχου 20 μl. Με το βρόγχο 10 μl, η ένταση του σήματος των κορυφών μειώθηκε σημαντικά ενώ με το βρόγχο 50 μl, το πλάτος των κορυφών ήταν πολύ μεγάλο.

5.3. Προετοιμασία πρότυπου διαλύματος γλυκοζιτών

Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος γλυκοζιτών ζυγιστήκαν με ακρίβεια 1mg κάθε γλυκοζίτη (στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α) και διαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος ακετονιτριλίου:νερού (3:7 v:v) δημιουργώντας ένα διάλυμα με συγκέντρωση 1000 ppm (1 mg/ml) για κάθε γλυκοζίτη. Έπειτα ακολούθησαν αντίστοιχες αραιώσεις συγκεντρώσεων 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppm.

5.4. Γραμμικότητα

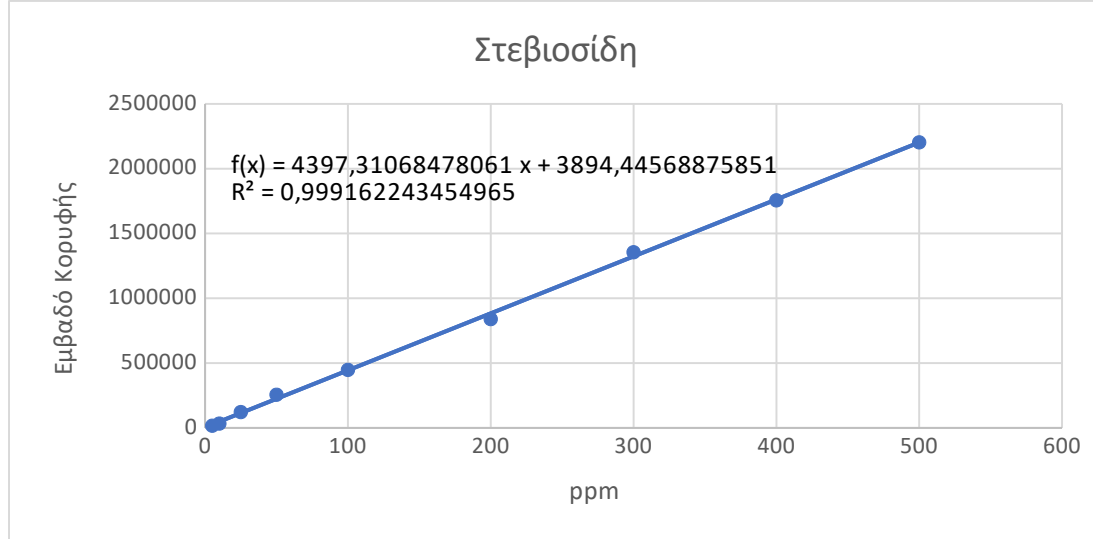
Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 500 ppm. Τα δεδομένα εμφανίζονται στον πίνακα 7, και στον πίνακα 8 εμφανίζονται οι εξισώσεις παλινδρόμησης των γραμμών αναφοράς για κάθε γλυκοζίτη. Στα Σχήματα 16 και 17 παρουσιάζονται τα γραφήματα των γραμμών αναφοράς για κάθε γλυκοζίτη, της στεβιοσίδης και της ρεμπαουδιοσίδης αντίστοιχα.

Πίνακας 7. Εμβαδόν κορυφών των γλυκοζιτών (στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη A) για εύρος συγκεντρώσεων από 5 έως 500 ppm.

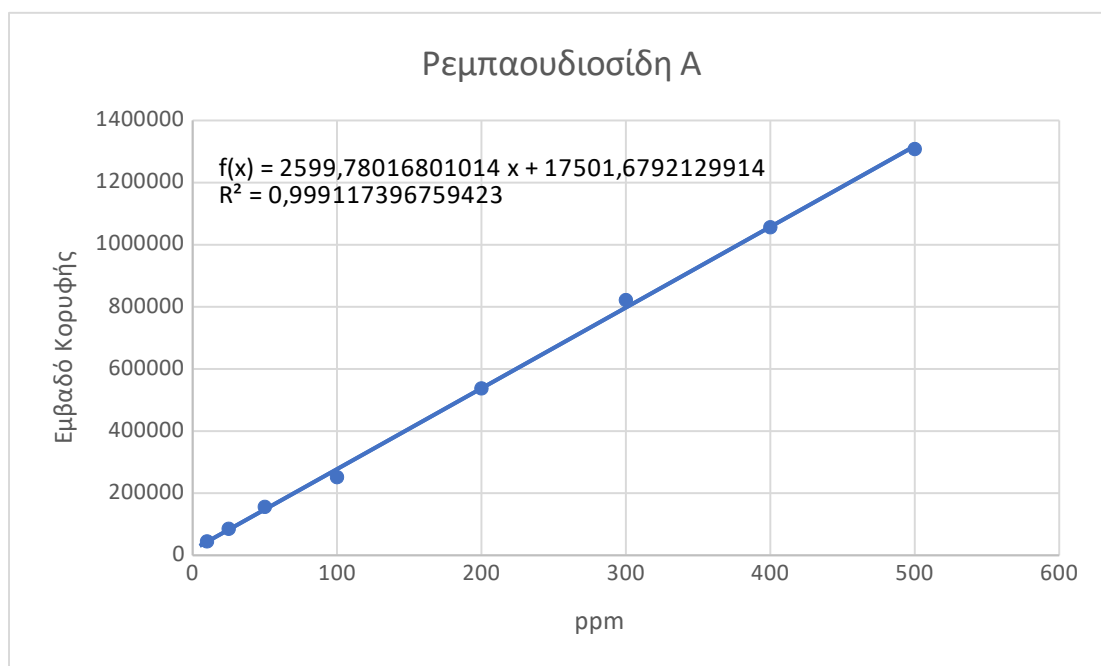
Συγκέντρωση Γλυκοζίτη (ppm)	Εμβαδό Κορυφής Στεβιοσίδης	Εμβαδό Κορυφής Ρεμπαουδιοσίδης A
5	16509	ND
10	33111	44697
25	121614	85261
50	255560	155879
100	447211	251564
200	839217	537333
300	1355080	821690
400	1755522	1056194
500	2202950	1308047

Πίνακας 8. Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς για κάθε γλυκοζίτη.

Γλυκοζίτες	Εξίσωση	R ²
Στεβιοσίδη	$y = 4397.3x + 3894.4$	0.9992
Ρεμπαουδιοσίδη A	$y = 2599.8x + 17502$	0.9991



Σχήμα 16: Καμπύλη αναφοράς Στεβιοσίδης



Σχήμα 17: Καμπύλη αναφοράς Ρεμπαουδιοσίδης Α

5.5. Επαναληψιμότητα - Αναπαραγωγιμότητα (%RSD)

Ο όρος επαναληψιμότητα (Precision) αναφέρεται στο πόσο προσεγγίζουν μεταξύ τους οι τιμές από μια σειρά μετρήσεων που έγιναν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο σε μια συγκεκριμένη ποσότητα.

Επαναληψιμότητα Πρότυπου Διαλύματος

Για να υπολογιστεί η επαναληψιμότητα παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 200 ppm για τους γλυκοζίτες στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α. Στη συνέχεια έγινε έγχυση στη βαλβίδα εισαγωγής και χρήση βρόγχου δείγματος χωρητικότητας 20μl. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε οχτώ φορές. Το %RSD για το χρόνο έκλουσης και το εμβαδόν κορυφής όλων των επαναλήψεων εμφανίζεται στον Πίνακα 9. Για να είναι αποδεκτό το %RSD των εμβαδών από τις επαναλήψεις δεν πρέπει να ξεπερνά το 2.0%. Παρατηρήθηκε στον πίνακα 9. ότι το %RSD είναι μικρότερο του 1.5.

Για τον υπολογισμό του %RSD στην αρχή έπρεπε να υπολογιστεί ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

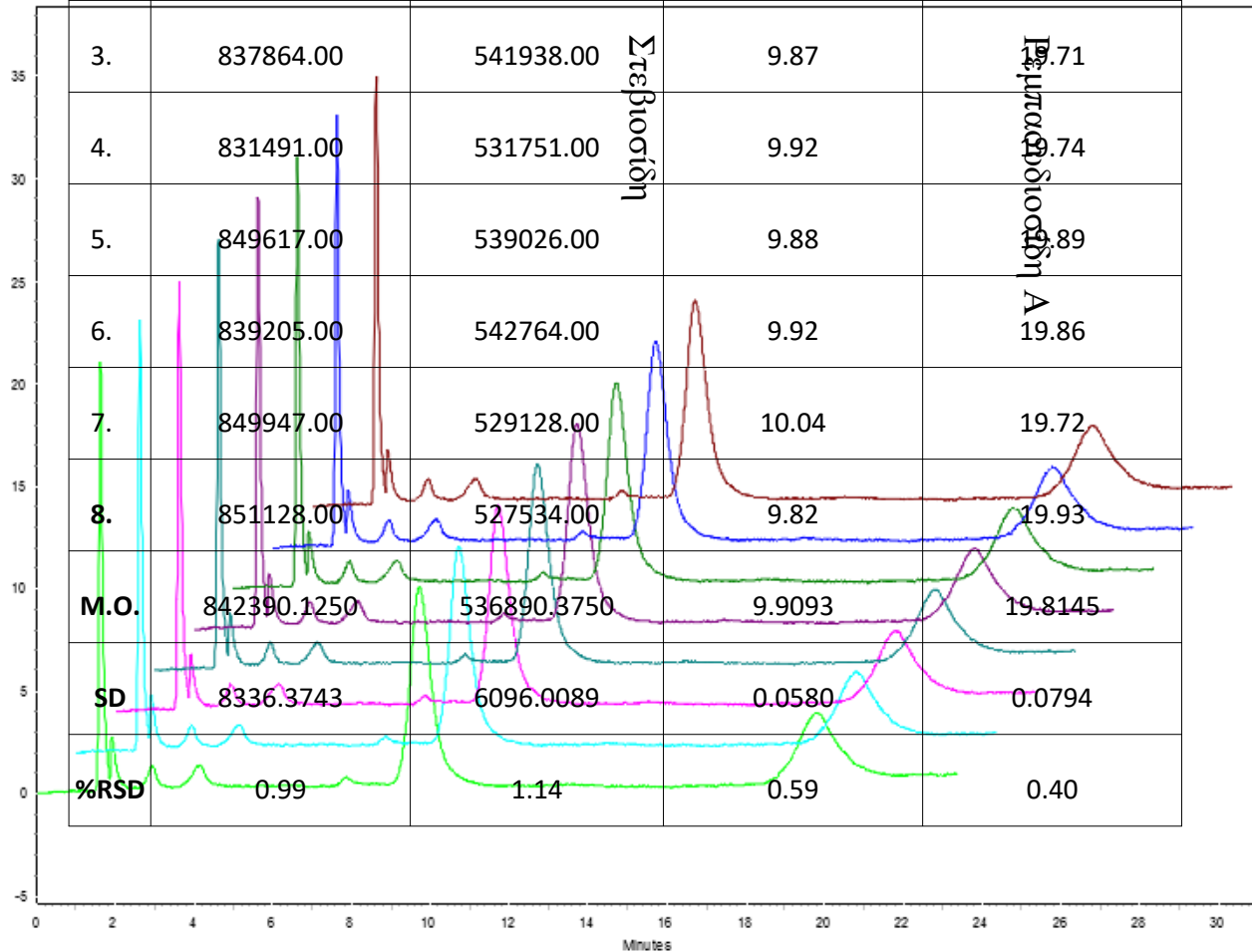
Ο τύπος υπολογισμού του %RSD είναι ο εξής:

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{x}} SD$$

Όπου \bar{x} = μέσος όρος και SD = τυπική απόκλιση.

Πίνακας 9. Εμβαδόν κορυφών των γλυκοζιτών (στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α) και ο αντίστοιχος χρόνος έκλουσης του κάθε γλυκοζίτη για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας της μεθόδου (%RSD). Το %RSD των εμβαδών των οχτώ επαναλήψεων (n=8) δεν ξεπερνά το 1.5%.

	Εμβαδόν Κορυφών		Χρόνοι Κατακράτησης	
	Στεβιοσίδη	Ρεμπαουδιοσίδη Α	Στεβιοσίδη	Ρεμπαουδιοσίδη Α
1.	829717.00	544338.00	9.92	19.78
2.	850152.00	538644.00	9.92	19.88



Σχήμα 18. Χρωματογραφήματα επαναληψιμότητας προτύπου διαλύματος γλυκοζιτών.

Αναπαραγωγιμότητα Δείγματος

Για να υπολογιστεί η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου με το δείγμα επαναλήφθηκε οχτώ φορές χρησιμοποιώντας το δείγμα #2. Το %RSD για το χρόνο έκλουσης και το εμβαδόν κορυφής όλων των επαναλήψεων εμφανίζονται στον Πίνακα 10. Για να είναι αποδεκτό το %RSD των εμβαδών από τις οχτώ επαναλήψεις δεν πρέπει να ξεπερνά το 2.0%. Παρατηρήθηκε στον πίνακα 10 ότι το %RSD είναι μικρότερο του 1.5%.

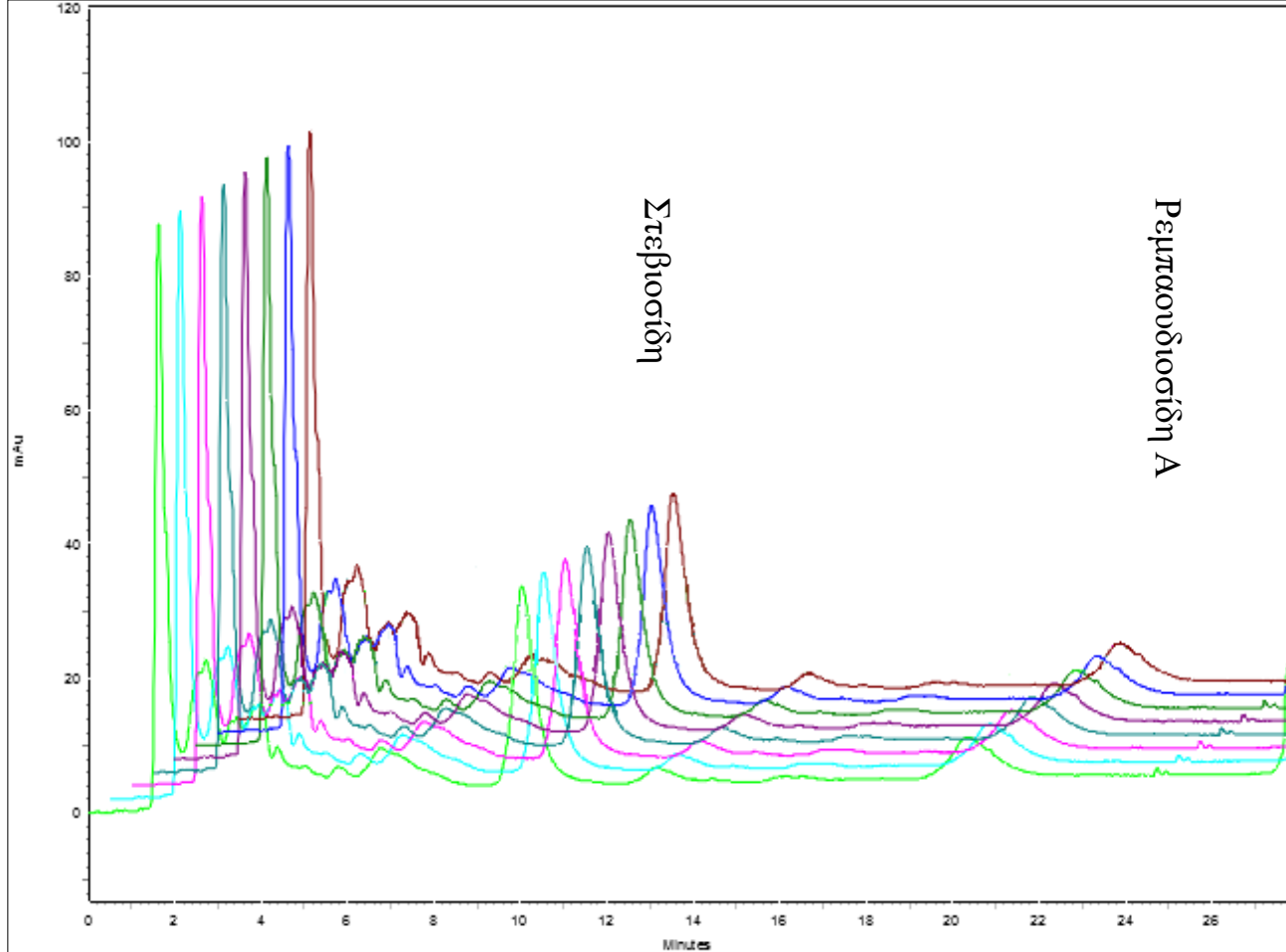
Για τον υπολογισμό του %RSD στην αρχή υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση. Ο τύπος υπολογισμού του %RSD είναι ο εξής:

$$\%RSD = \frac{100}{\bar{x}} SD$$

Όπου \bar{x} , = μέσος όρος και SD = τυπική απόκλιση.

Πίνακας 10. Εμβαδόν κορυφών των γλυκοζιτών (στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη A) και ο αντίστοιχος χρόνος έκλουσης του κάθε γλυκοζίτη για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου (%RSD). Το %RSD των εμβαδών των οχτώ επαναλήψεων (n=8) δεν ξεπερνά το 1.5%.

	<i>Εμβαδόν Κορυφών</i>		<i>Χρόνοι Κατακράτησης</i>	
	Στεβιοσίδη	Ρεμπαουδιοσίδη A	Στεβιοσίδη	Ρεμπαουδιοσίδη A
1	1227239.00	1106155.00	9.56	19.20
2	1235867.00	1122451.00	9.58	19.12
3	1237538.00	1139154.00	9.54	19.13
4	1224864.00	1112587.00	9.60	19.32
5	1247246.00	1121873.00	9.50	19.30
6	1254868.00	1143871.00	9.63	19.29
7	1218673.00	1106155.00	9.56	19.32
8	1218637.00	1136155.00	9.55	19.11
M.O.	1233116.500	1123550.125	9.565	19.221
SD	12353.162	13895.563	0.036	0.088
%RSD	1.00	1.24	0.38	0.46



Σχήμα 19. Χρωματογραφήματα αναπαραγωγιμότητας δείγματος. Για την επανάληψη της μεθόδου επιλέχθηκε το δείγμα #2.

5.6. Κατώτατο όριο ανίχνευσης και κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης

Στις αναλυτικές μεθόδους χρησιμοποιούνται οι όροι κατώτατο όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ). Το LOD είναι η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να ανιχνευθεί, ενώ LOQ είναι η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να αναφερθεί ποσοτικά με ικανοποιητικό βαθμό εμπιστοσύνης. Για τον υπολογισμό των LOD και LOQ απαιτείται η γνώση της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς, όπως και η τυπική απόκλιση πολλαπλών μετρήσεων και ειδικά του «χαμηλότερου προτύπου». Ο υπολογισμός του LOD και LOQ έγινε μέσω της γραμμής αναφοράς του κάθε γλυκοζίτη (πίνακας 11).

Ο τύπος υπολογισμού του LOD και του LOQ είναι ο εξής:

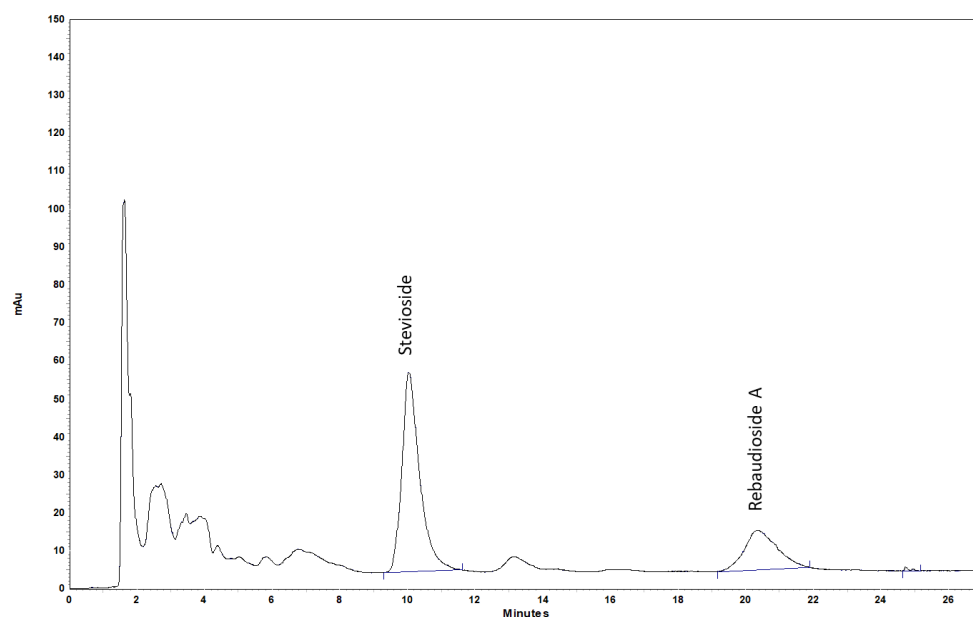
$$LOD=3.3\frac{\sigma}{S}, LOQ=10\frac{\sigma}{S}$$

Πίνακας 11. Κατώτατο όριο Ανίχνευσης και Κατώτατο όριο Ποσοτικοποίησης Στεβιοσίδης και Ρεμπαουδιοσίδης Α.

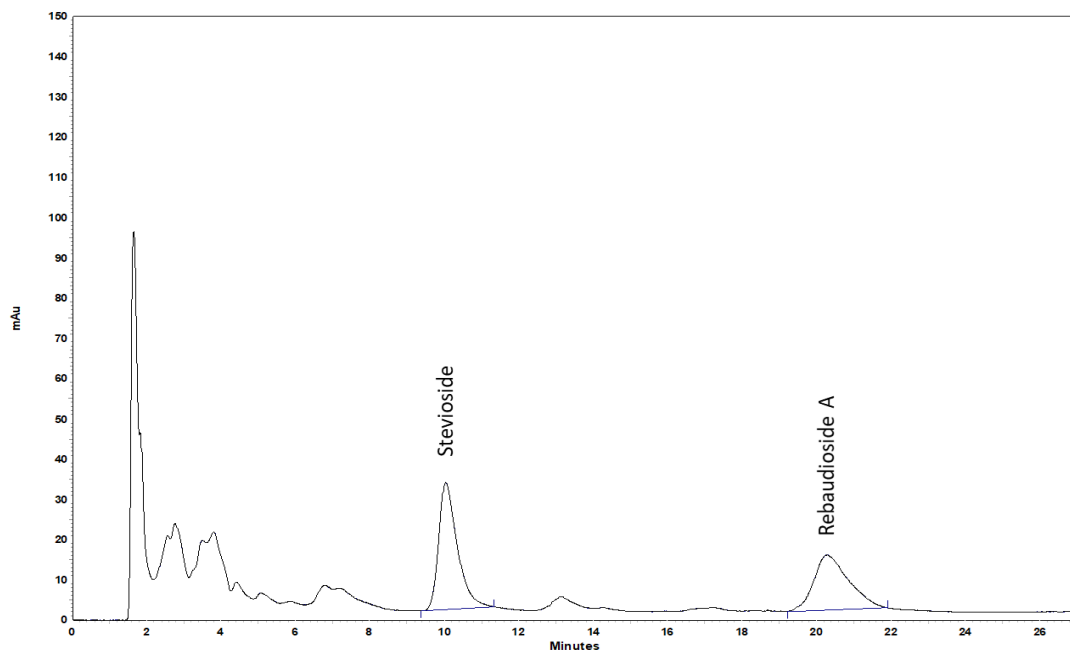
Γλυκοζίτες	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Στεβιοσίδη	9.16	30.54
Ρεμπαουδιοσίδη Α	10.25	34.15

5.7. Χρωματογραφήματα δειγμάτων φύλλων στέβια

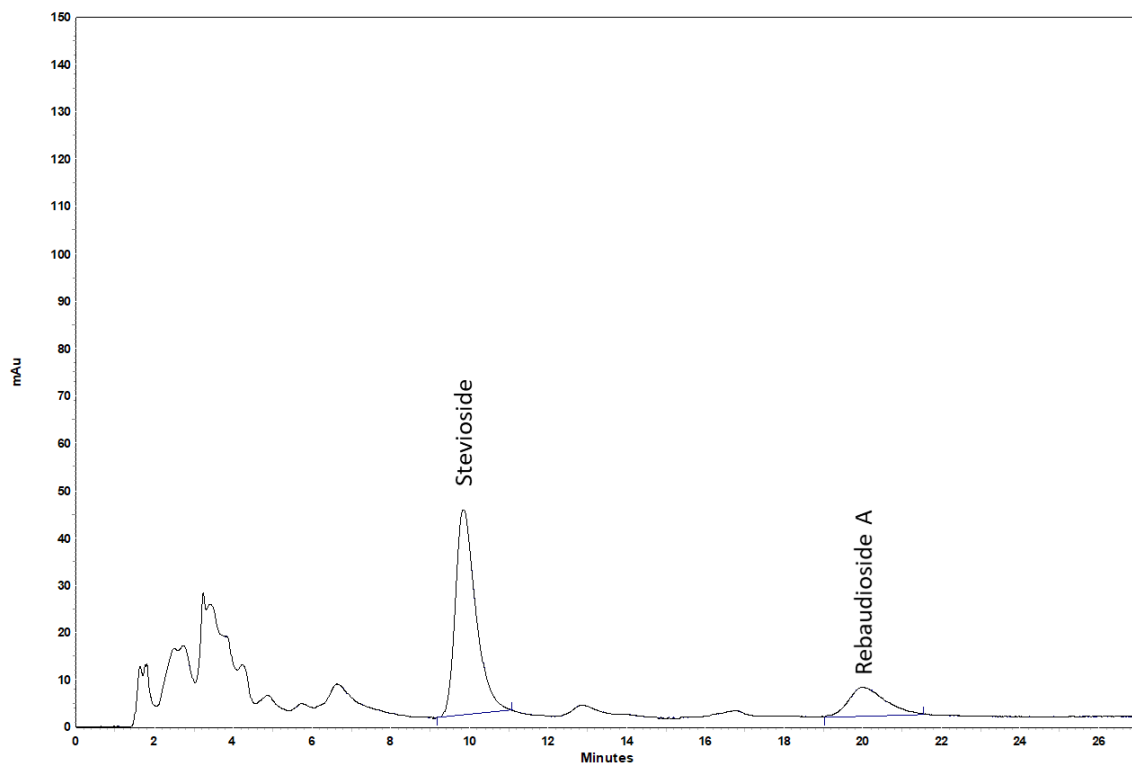
Στα παρακάτω σχήματα (20 έως 44), παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των αναλύσεων που έγιναν στην παρούσα μελέτη. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με ροή 2 ml/min, συγκέντρωση διαλυτών ακετονιτρίλιο:νερό (84.7:85.3), θερμοκρασία φούρνου στήλης 30°C, στήλη: SEPARON SGX NH2 5μ, 250mm x 4.6mm ID και με ανιχνευτή diode array ρυθμισμένο στα 210 nm.



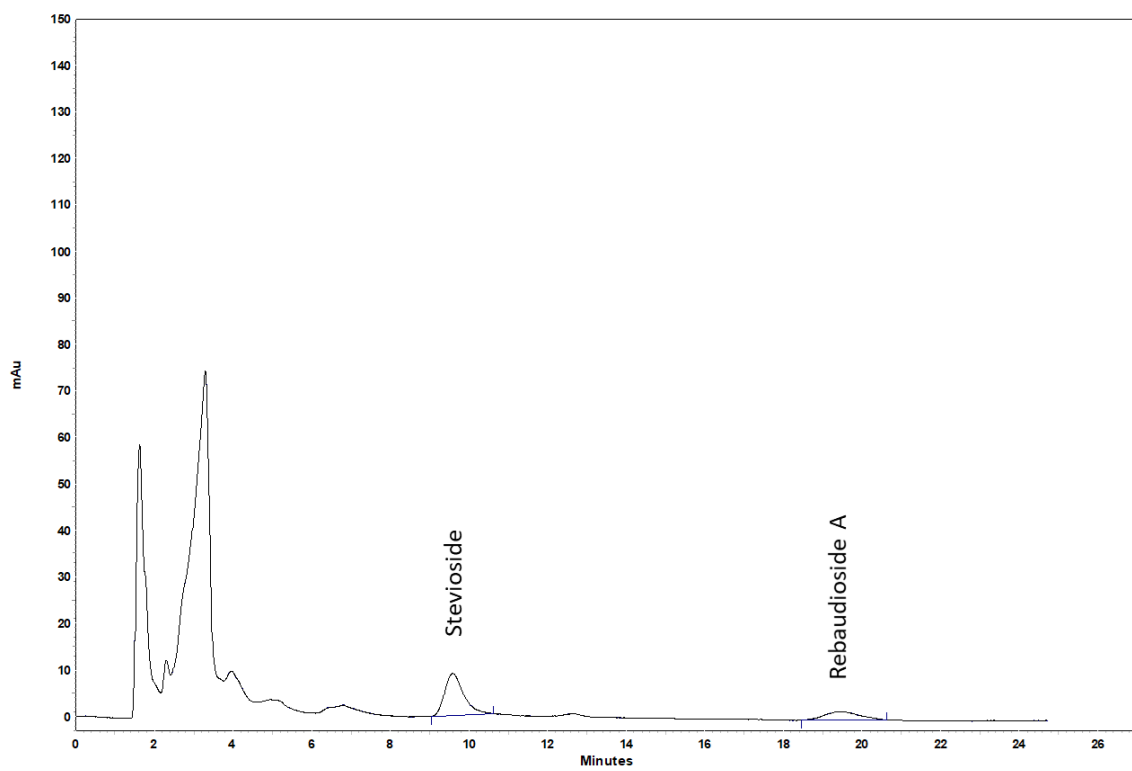
Σχήμα 20. Χρωματογράφημα δείγματος #1, με χρόνους έκλουσης 9.81 και 19.82 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



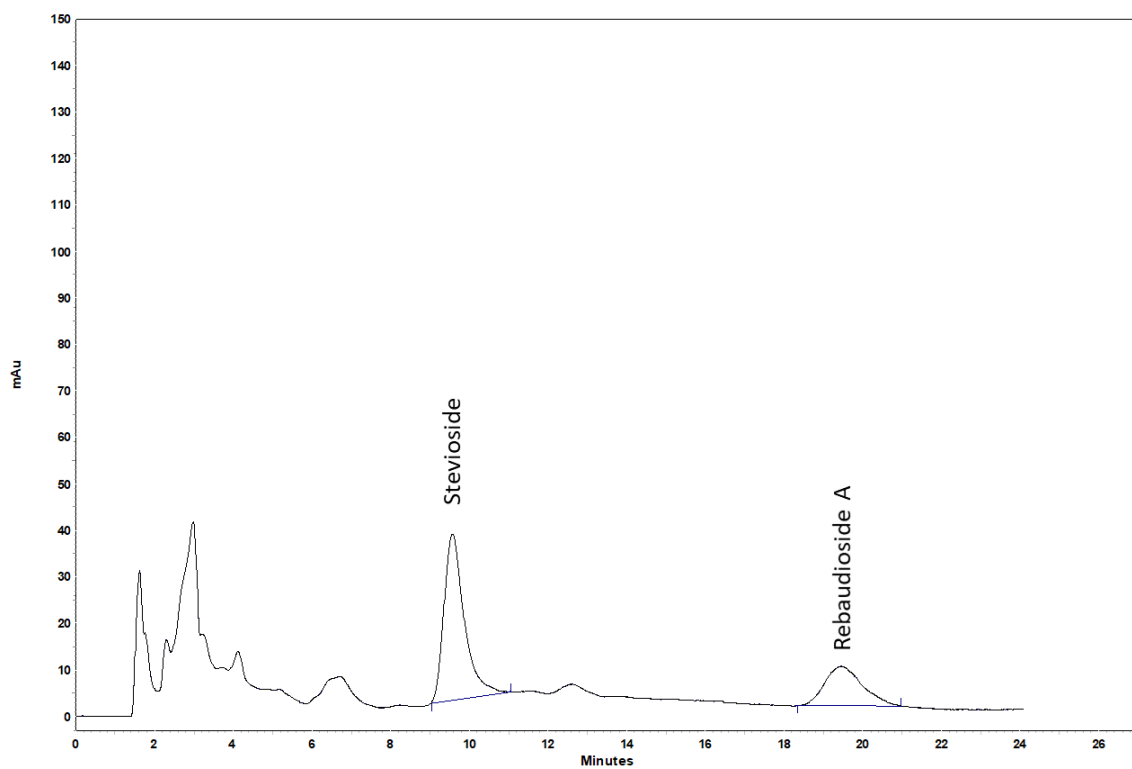
Σχήμα 21. Χρωματογράφημα δείγματος #2, με χρόνους έκλουσης 9.56 και 19.20 λεπτά για την στεβιοσίδη και την ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



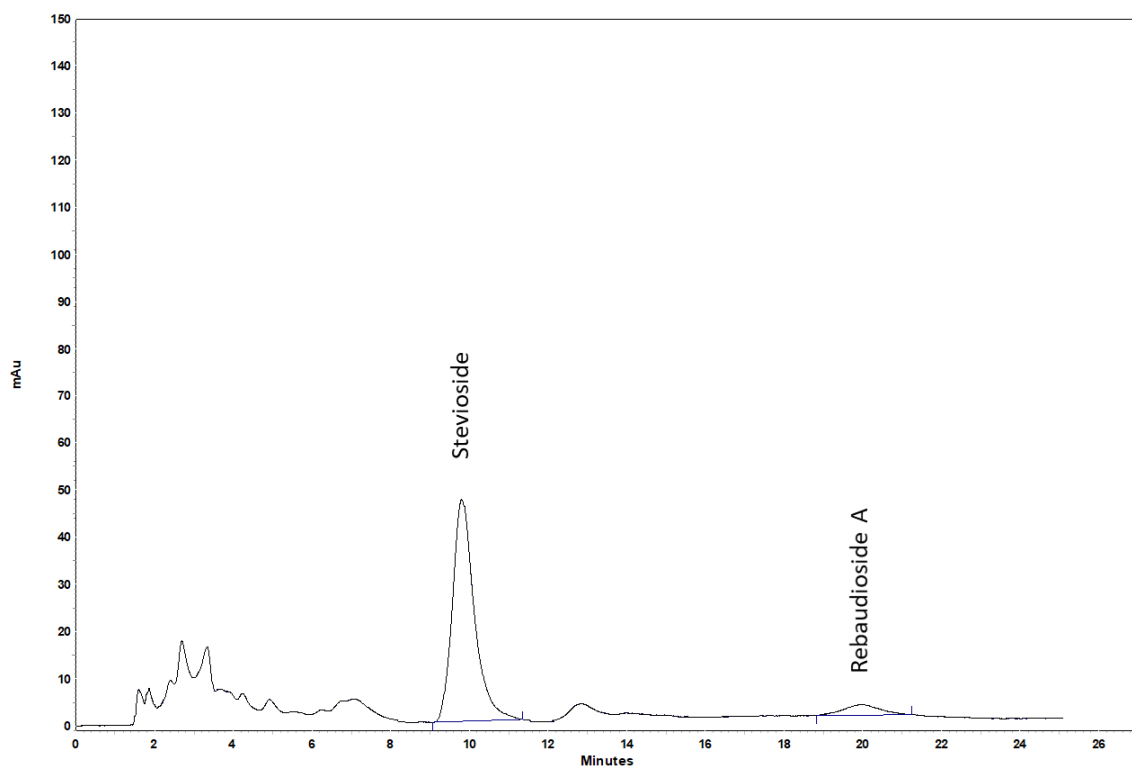
Σχήμα 22. Χρωματογράφημα δείγματος #3, με χρόνους έκλουσης 9.67 και 19.40 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



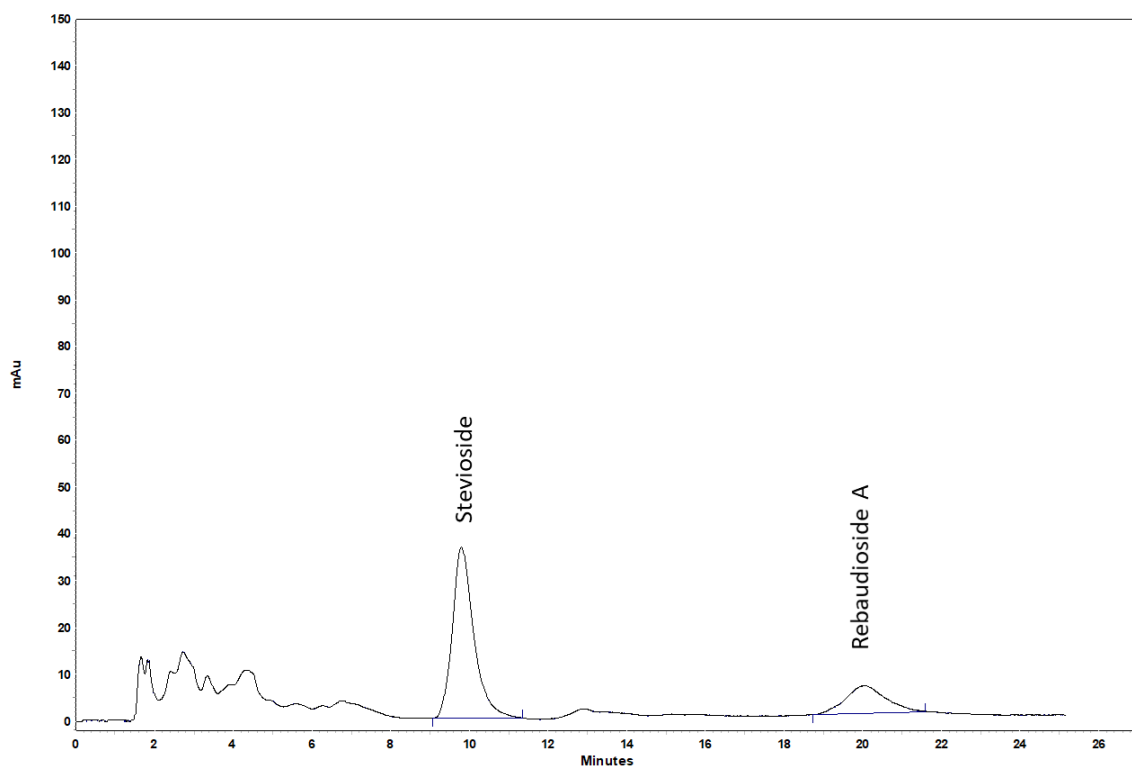
Σχήμα 23. Χρωματογράφημα δείγματος #4, με χρόνους έκλουσης 9.59 και 19.42 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



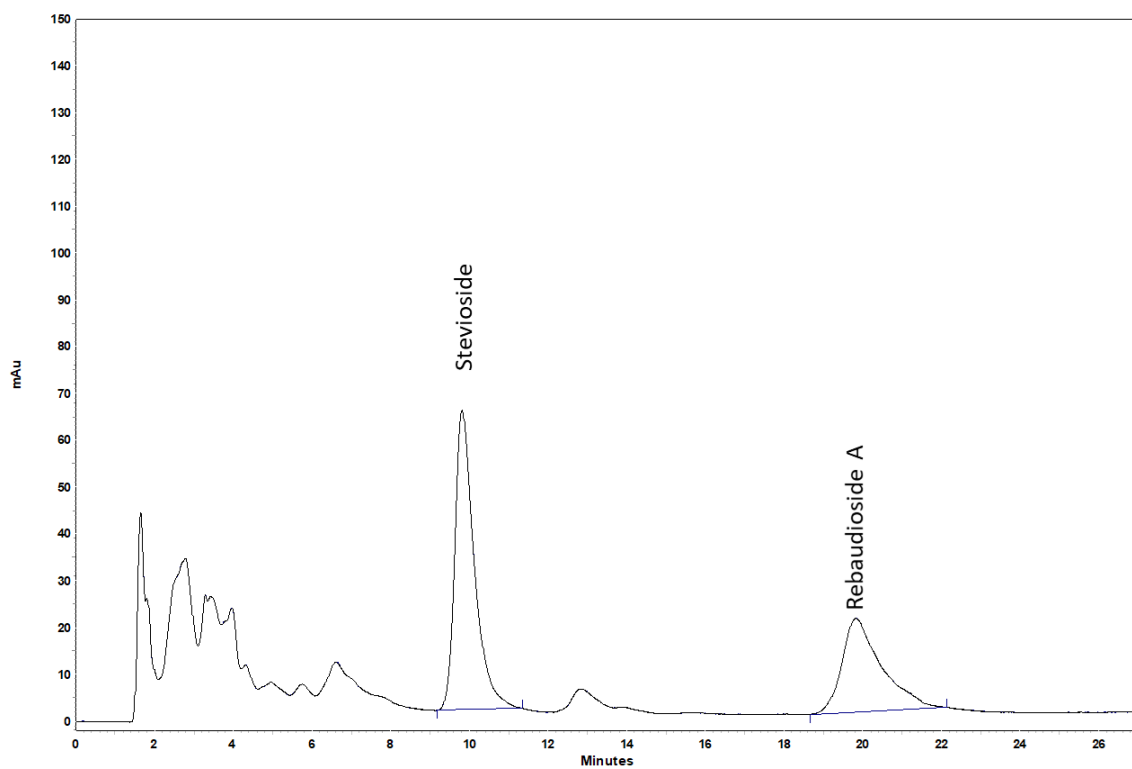
Σχήμα 24. Χρωματογράφημα δείγματος #5, με χρόνους έκλουσης 9.57 και 19.47 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



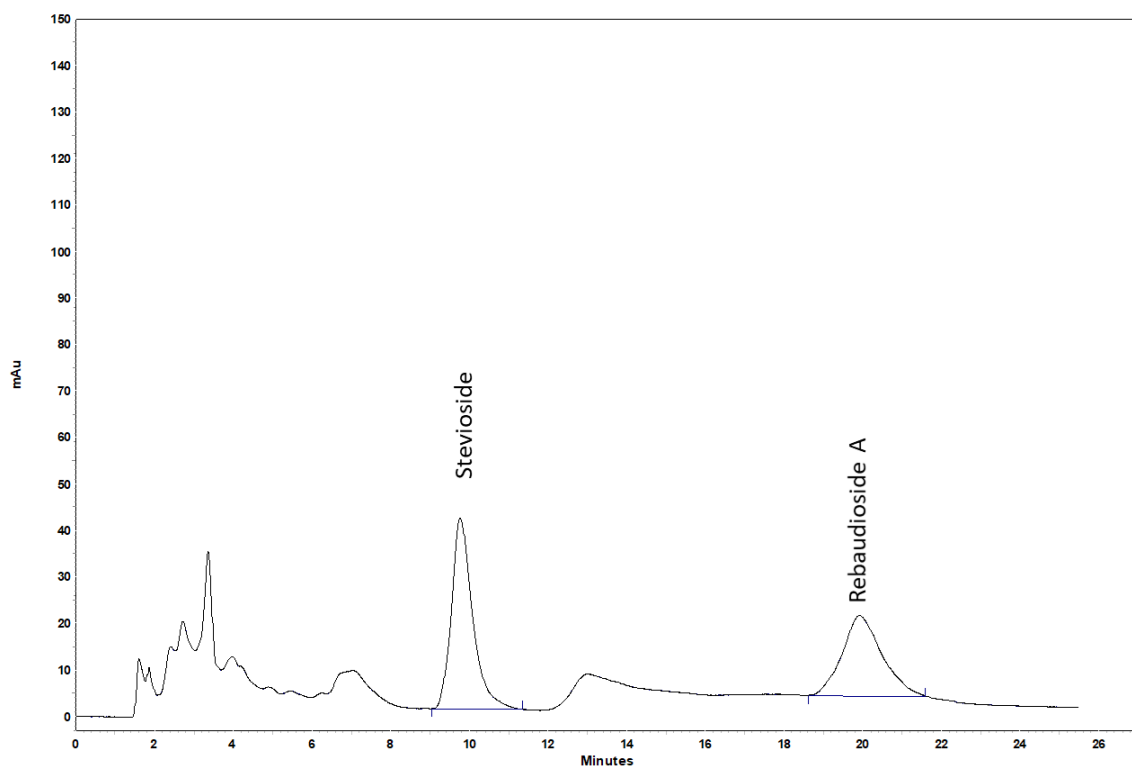
Σχήμα 25. Χρωματογράφημα δείγματος #6, με χρόνους έκλουσης 9.82 και 19.98 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



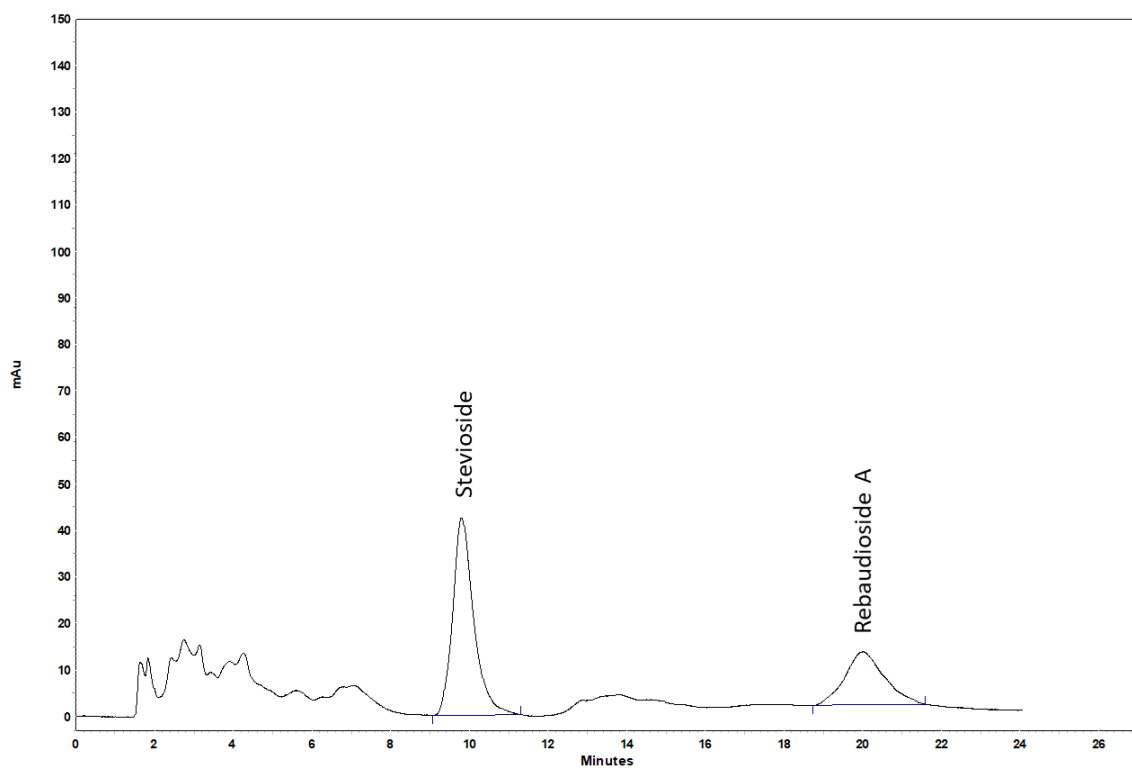
Σχήμα 26. Χρωματογράφημα δείγματος #7, με χρόνους έκλουσης 9.80 και 20.00 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



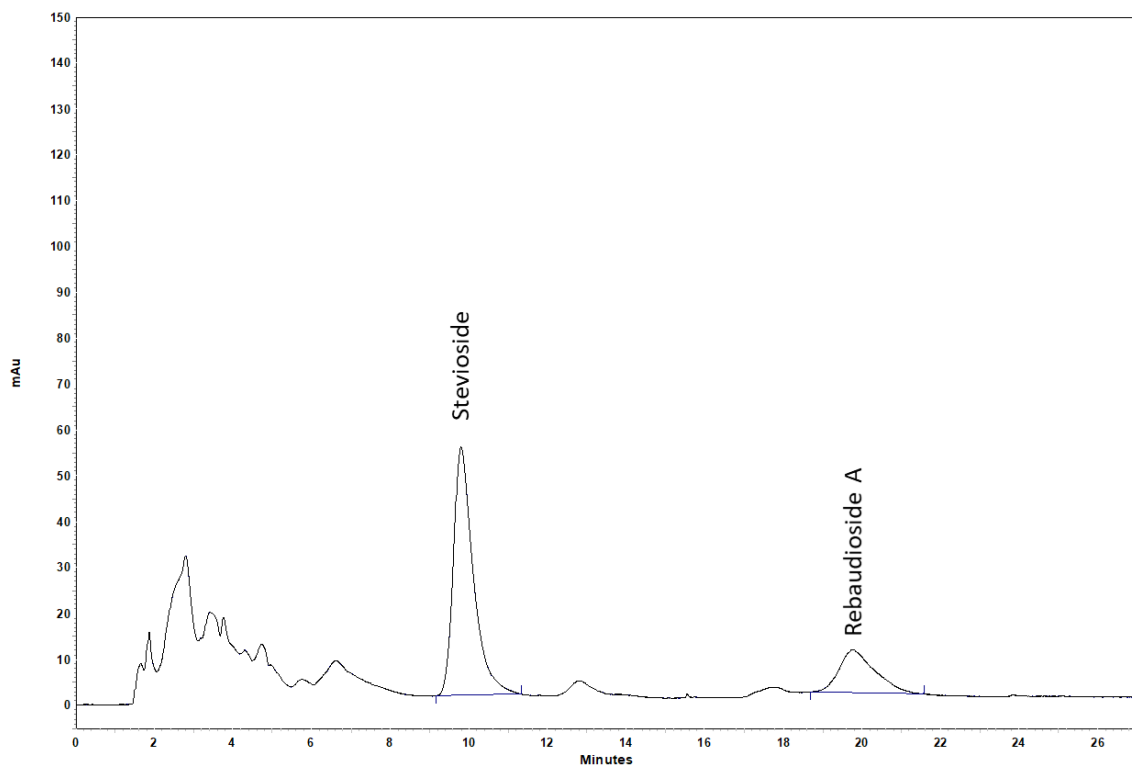
Σχήμα 27. Χρωματογράφημα δείγματος #8, με χρόνους έκλουσης 9.88 και 19.94 λεπτά για τη στεβιόσιδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



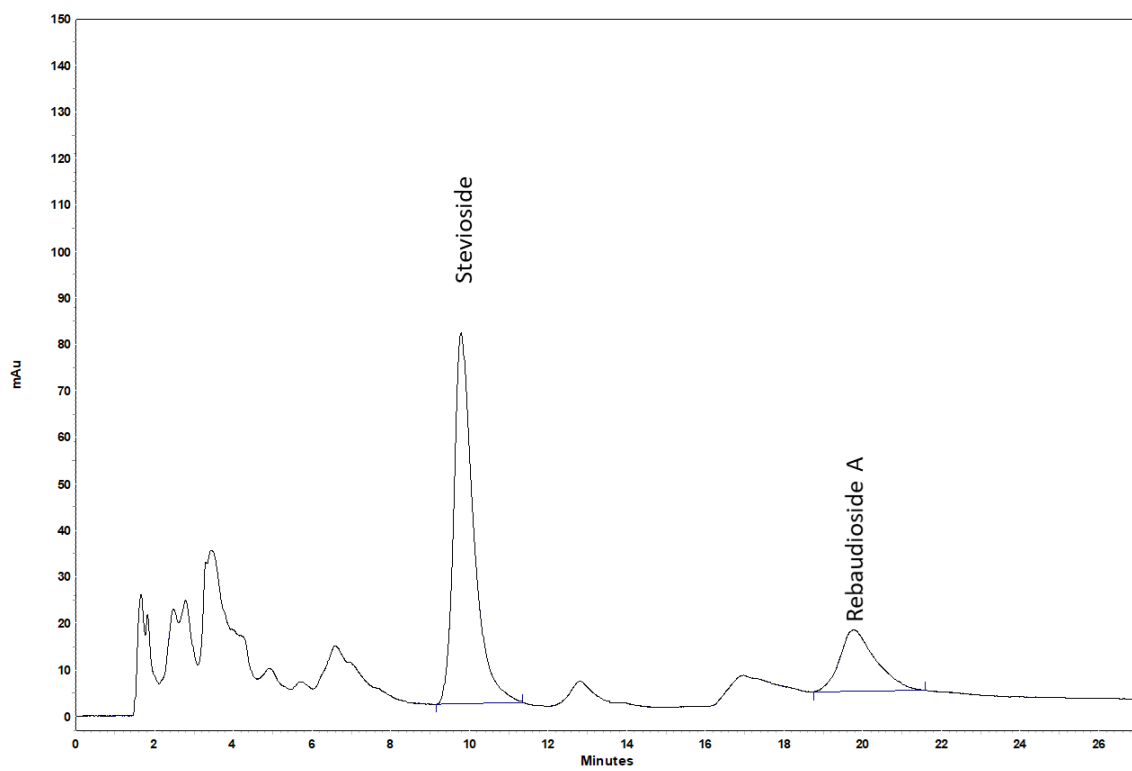
Σχήμα 28. Χρωματογράφημα δείγματος #9, με χρόνους έκλουσης 9.77 και 19.94 λεπτά για τη στεβιόσιδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



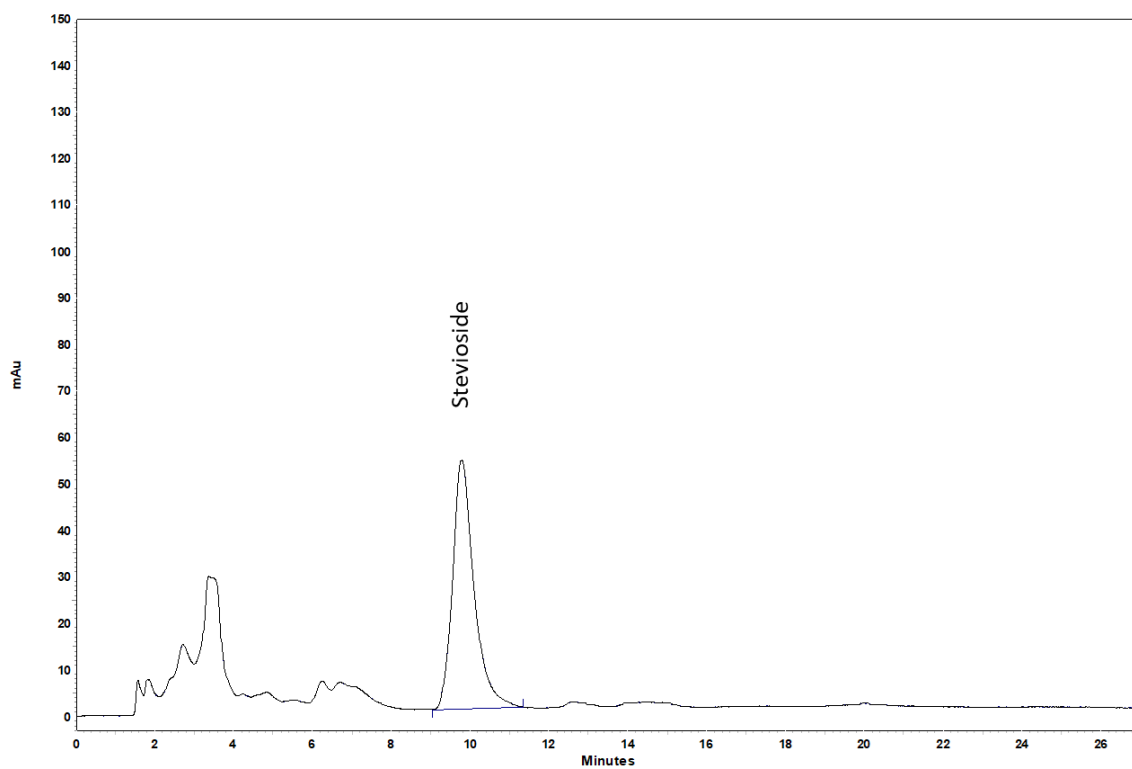
Σχήμα 29. Χρωματογράφημα δείγματος #10, με χρόνους έκλουσης 9.80 και 20.00 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



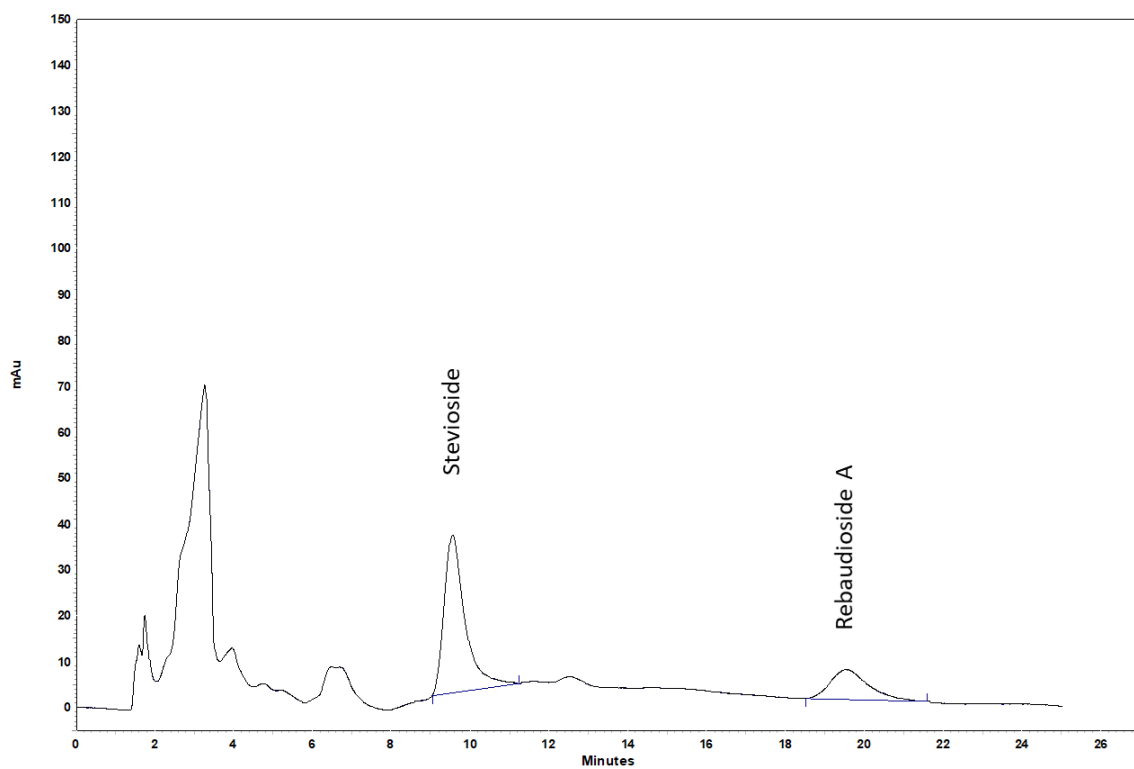
Σχήμα 30. Χρωματογράφημα δείγματος #11, με χρόνους έκλουσης 9.41 και 19.20 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



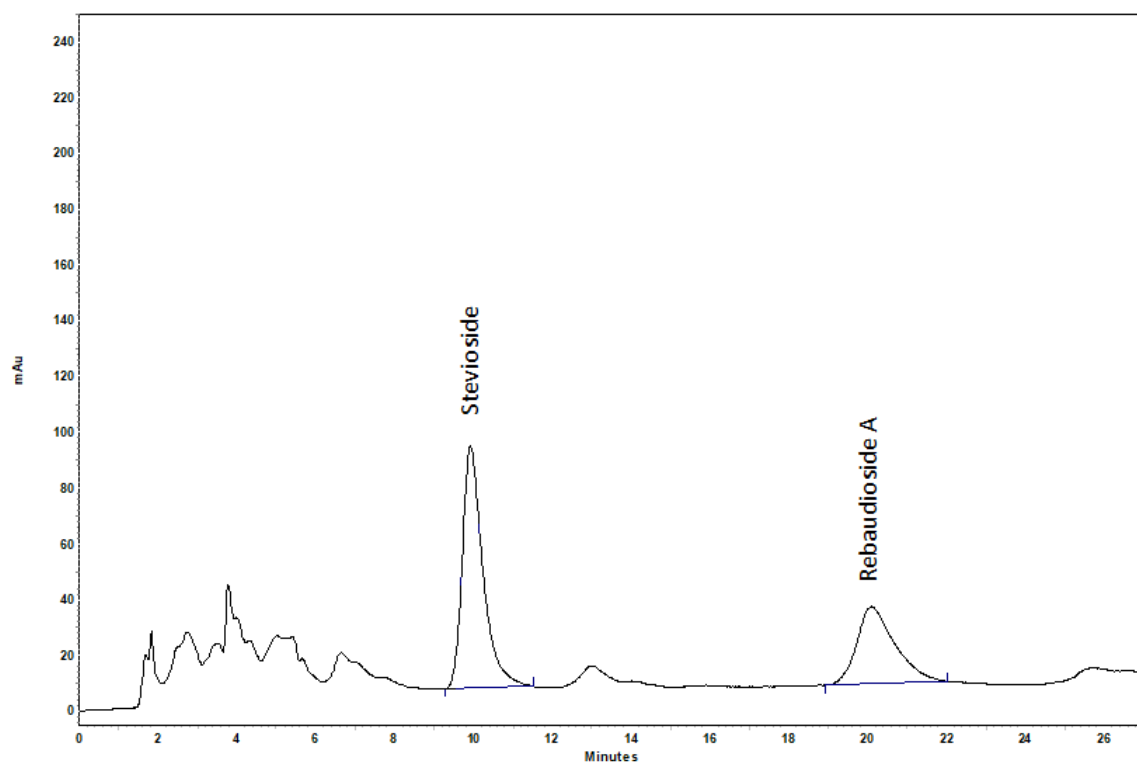
Σχήμα 31. Χρωματογράφημα δείγματος #12, με χρόνους έκλουσης 9.86 και 19.89 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



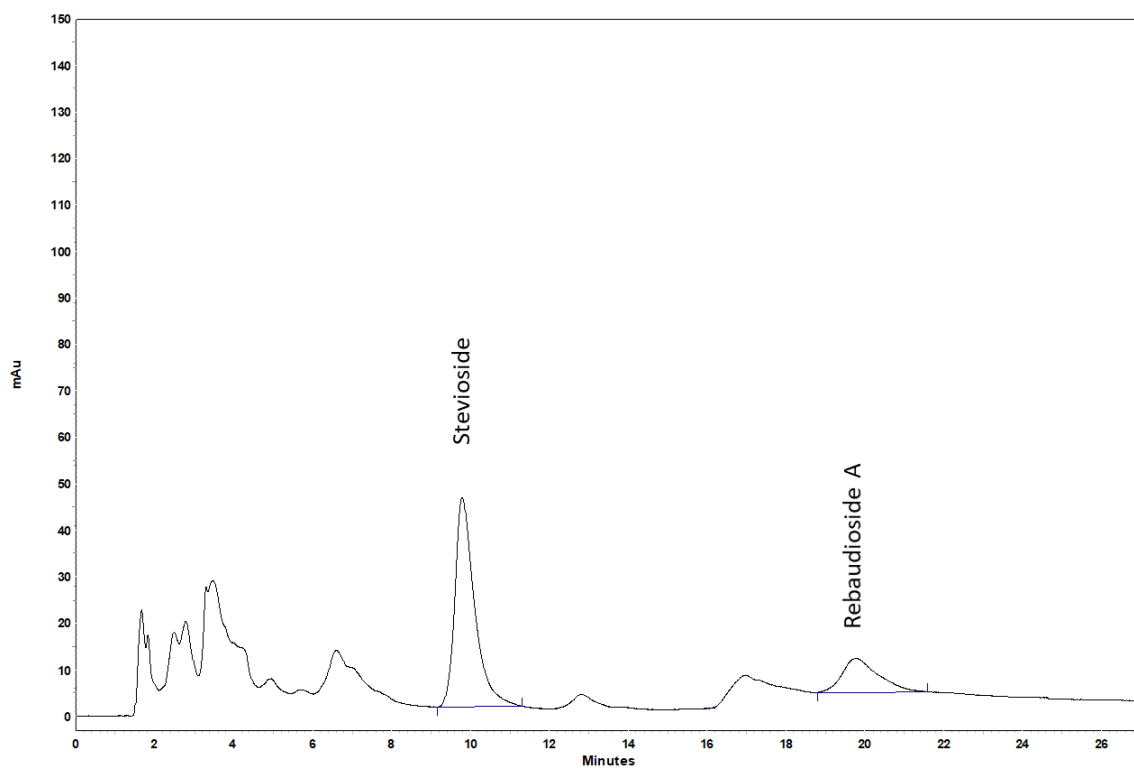
Σχήμα 32. Χρωματογράφημα δείγματος #13, με χρόνο έκλουσης 9.79 λεπτά για τη στεβιοσίδη.



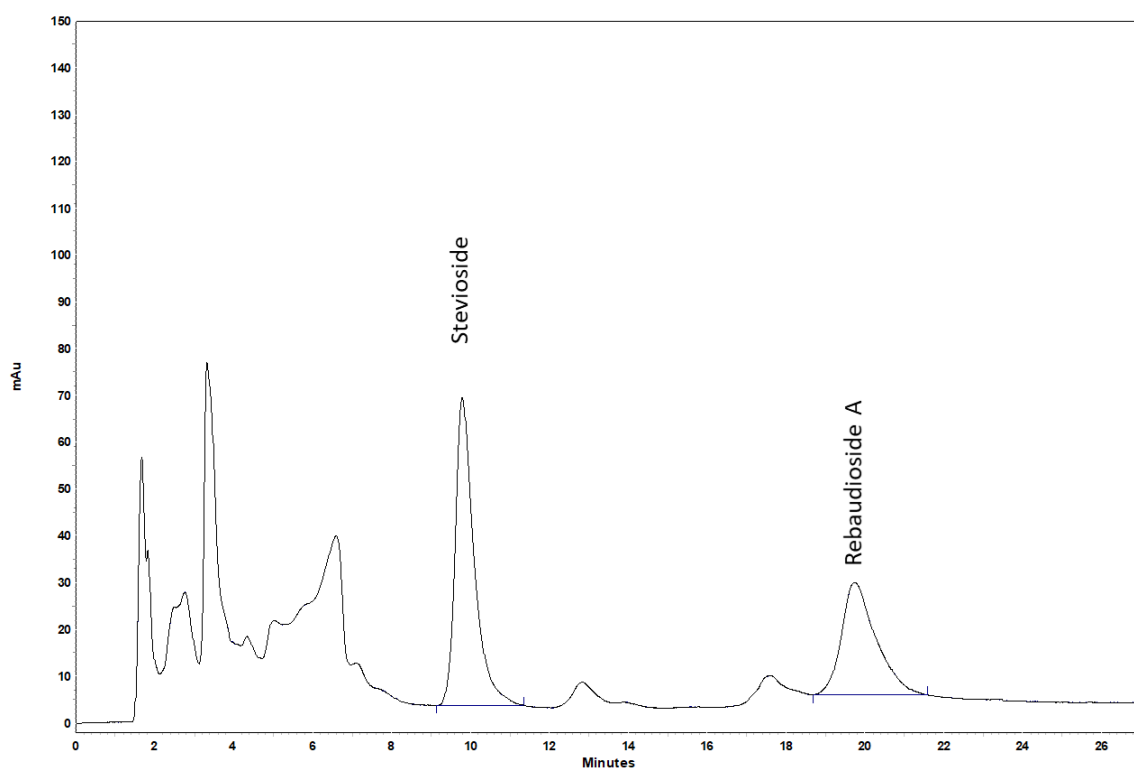
Σχήμα 33. Χρωματογράφημα δείγματος #14, με χρόνους έκλουσης 9.79 και 19.65 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



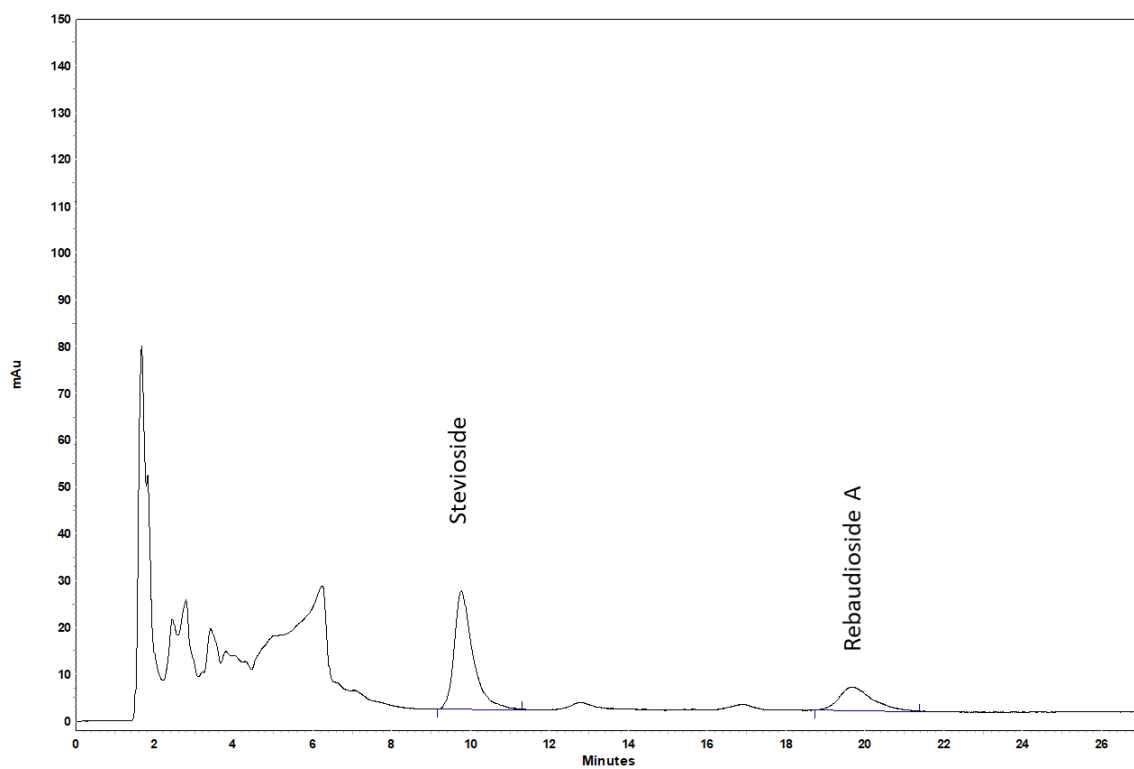
Σχήμα 34. Χρωματογράφημα δείγματος #15, με χρόνους έκλουσης 9.94 και 19.97 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



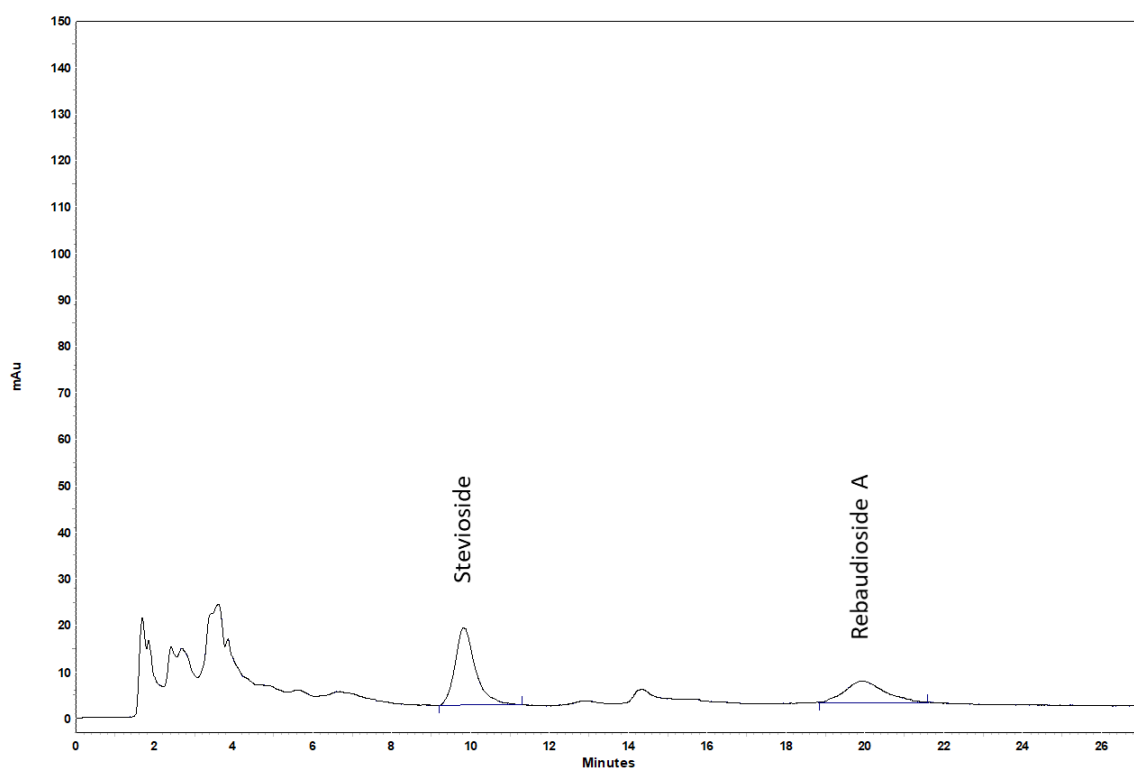
Σχήμα 35. Χρωματογράφημα δείγματος #16, με χρόνους έκλουσης 9.81 και 19.68 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



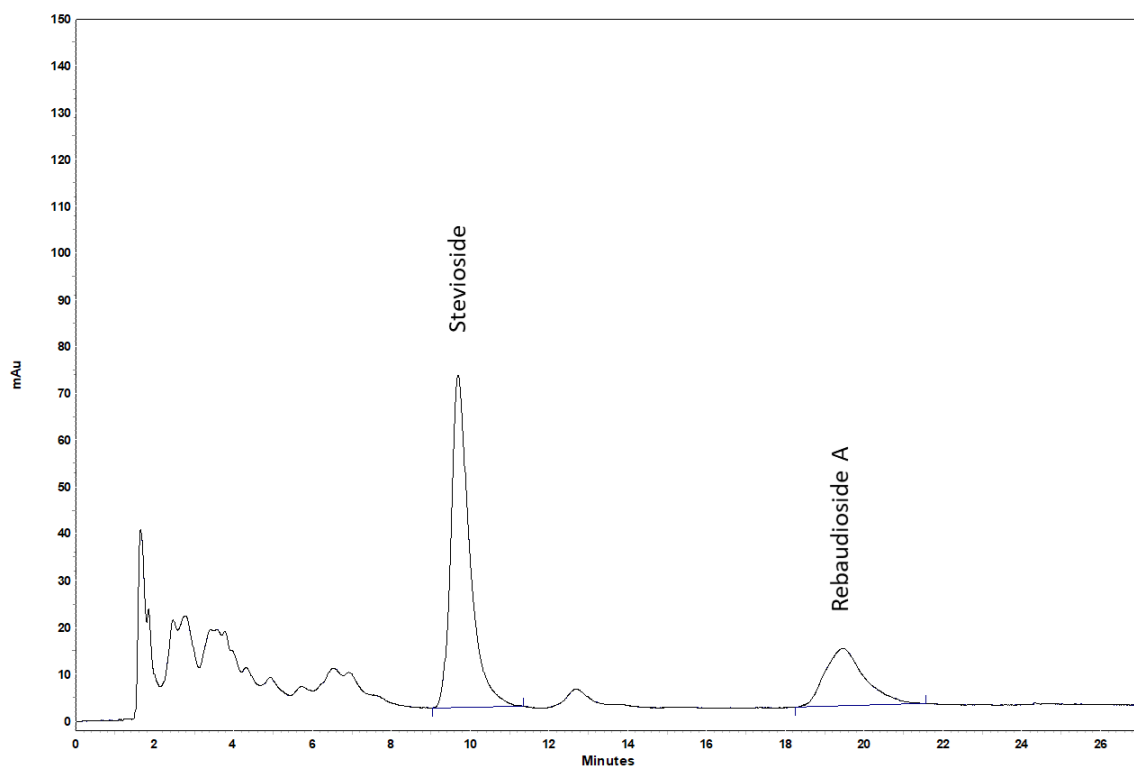
Σχήμα 36. Χρωματογράφημα δείγματος #17, με χρόνους έκλουσης 9.87 και 19.76 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



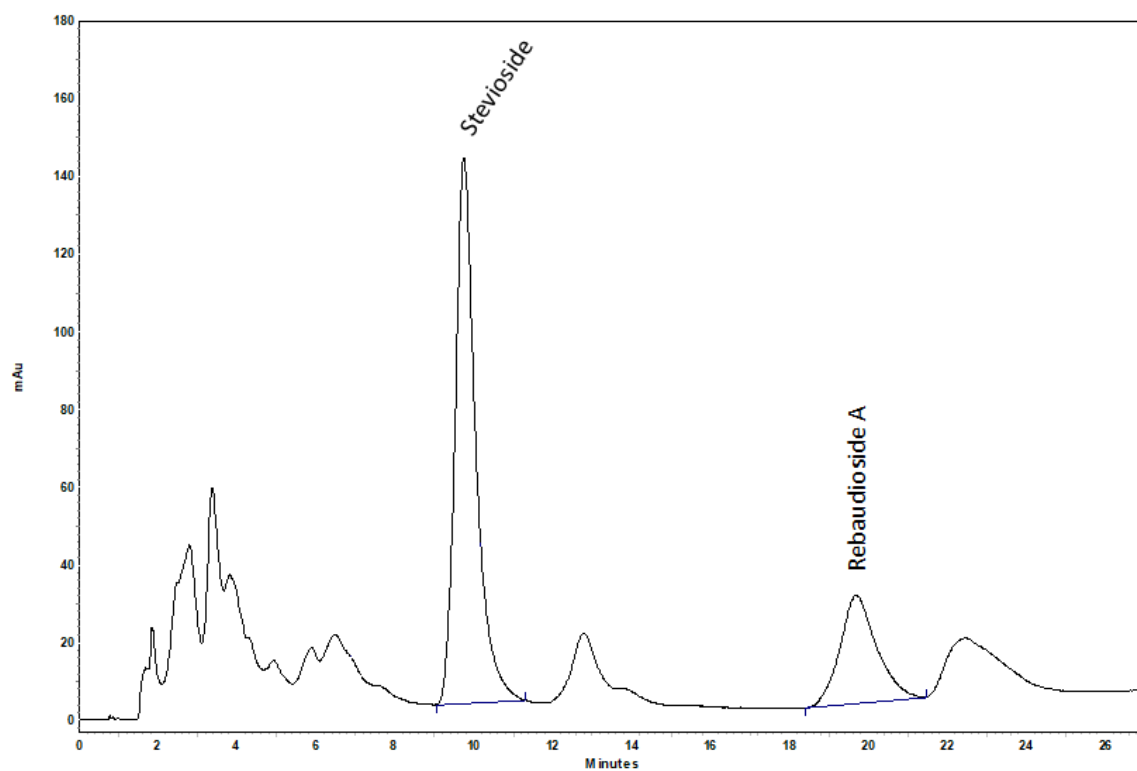
Σχήμα 37. Χρωματογράφημα δείγματος #18, με χρόνους έκλουσης 9.77 και 19.67 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



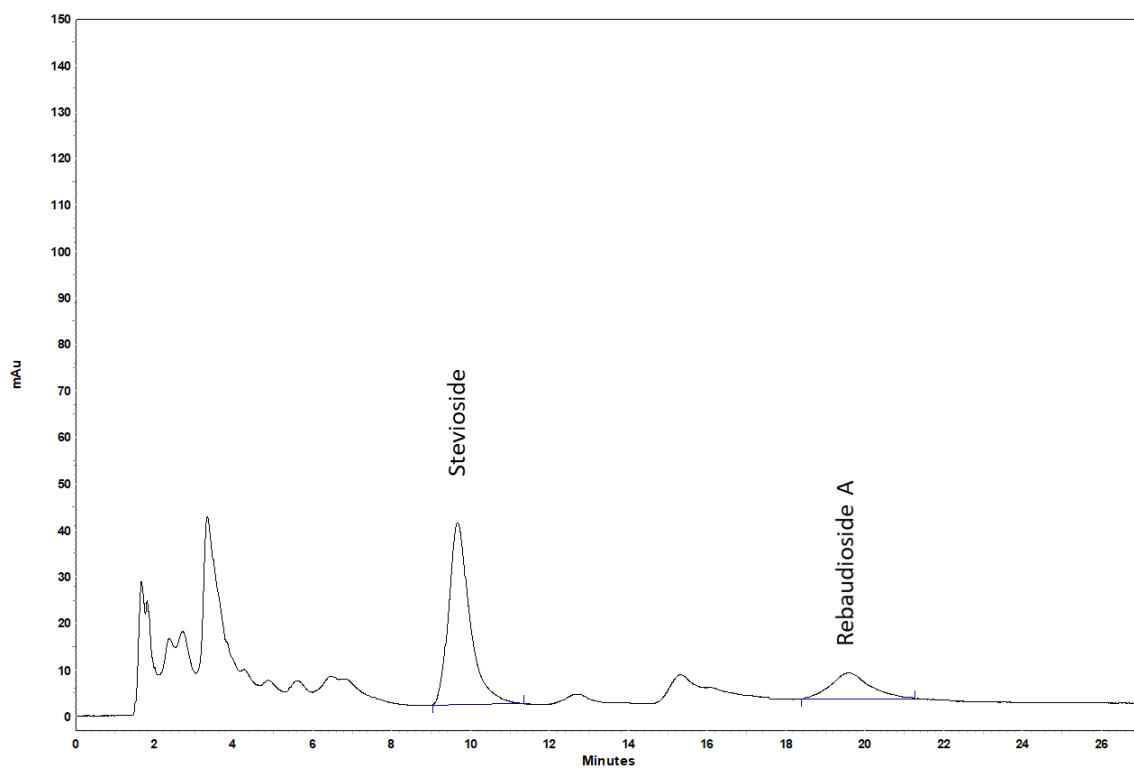
Σχήμα 38. Χρωματογράφημα δείγματος #19, με χρόνους έκλουσης 9.84 και 19.82 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



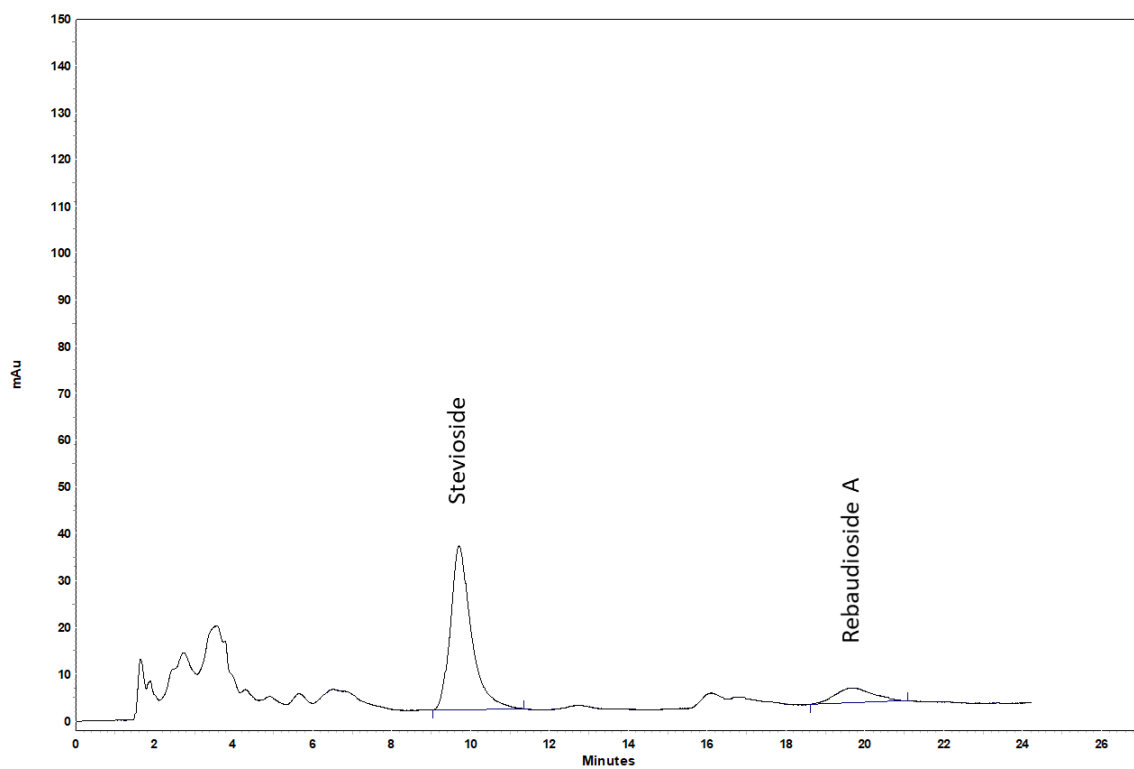
Σχήμα 39. Χρωματογράφημα δείγματος #20, με χρόνους έκλουσης 9.70 και 19.47 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη A αντίστοιχα.



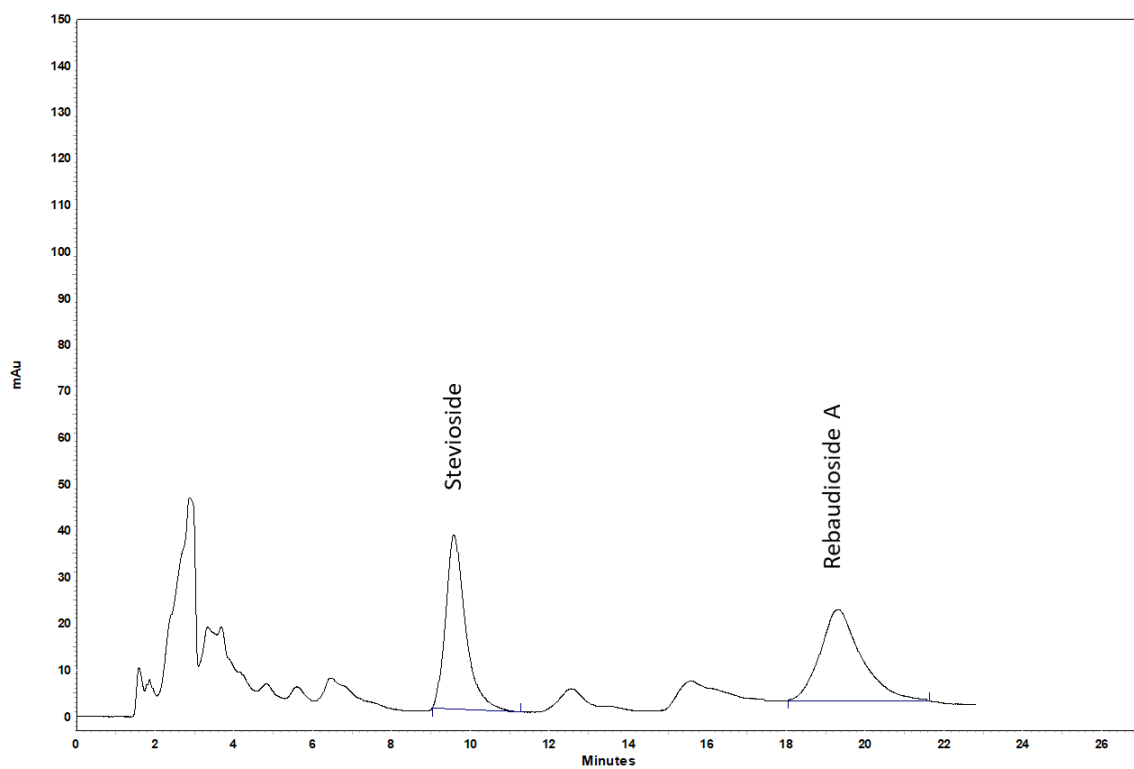
Σχήμα 40. Χρωματογράφημα δείγματος #21, με χρόνους έκλουσης 9.75 και 19.70 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη A αντίστοιχα.



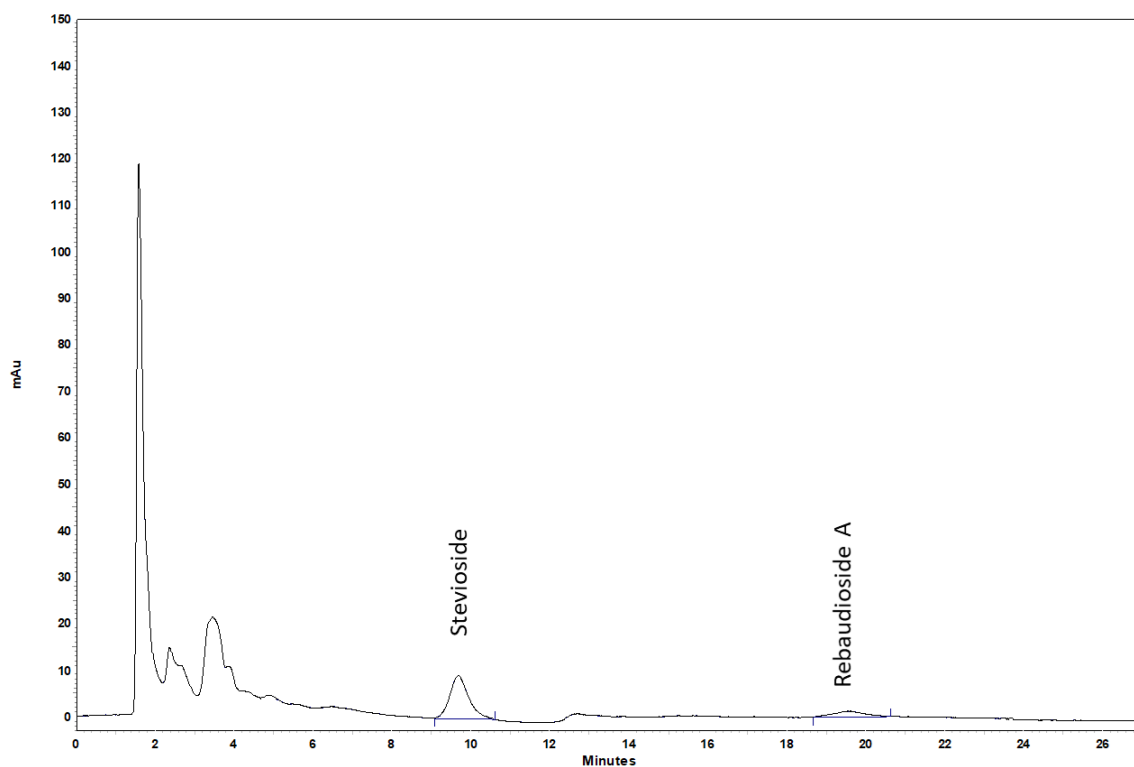
Σχήμα 41. Χρωματογράφημα δείγματος #22, με χρόνους έκλουσης 9.67 και 19.59 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



Σχήμα 42. Χρωματογράφημα δείγματος #23, με χρόνους έκλουσης 9.71 και 19.67 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



Σχήμα 43. Χρωματογράφημα δείγματος #24, με χρόνους έκλουσης 9.58 και 19.30 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.



Σχήμα 44. Χρωματογράφημα δείγματος #25, με χρόνους έκλουσης 9.68 και 19.55 λεπτά για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α αντίστοιχα.

6. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι ποσότητες του κάθε γλυκοζίτη που υπολογίστηκαν. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε γραμμάρια γλυκοζίτη ανά κιλό αποξηραμένων φύλλων.

Πίνακας 12. Ποσότητα γλυκοζίτη (g) ανά ποσότητα αποξηραμένου φύλλου (kg).

A/A	Αριθμός Δείγματος	Στεβιοσίδη (g/kg)	Ρεμπαουδιοσίδη Α (g/kg)
1	Δείγμα 01	50.66	35.60
2	Δείγμα 02	27.82	41.87
3	Δείγμα 03	38.68	16.81
4	Δείγμα 04	9.77	5.16
5	Δείγμα 05	36.70	29.43
6	Δείγμα 06	50.10	7.87
7	Δείγμα 07	38.12	21.74
8	Δείγμα 08	60.08	67.43
9	Δείγμα 09	41.80	61.94
10	Δείγμα 10	42.94	40.77
11	Δείγμα 11	52.10	29.05
12	Δείγμα 12	60.98	33.57
13	Δείγμα 13	55.50	0.00
14	Δείγμα 14	61.09	39.78
15	Δείγμα 15	101.86	94.34
16	Δείγμα 16	42.45	66.19
17	Δείγμα 17	60.18	72.50
18	Δείγμα 18	23.07	14.12
19	Δείγμα 19	16.64	15.52
20	Δείγμα 20	65.39	37.96

21	Δείγμα 21	141.89	86.18
22	Δείγμα 22	41.16	20.06
23	Δείγμα 23	35.98	10.35
24	Δείγμα 24	37.50	69.04
25	Δείγμα 25	9.20	2.41

Όπως προκύπτει και από τα χρωματογραφήματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, υπήρχαν σημαντικές μεταβολές στη συγκέντρωση των γλυκοζιτών της στεβιόλης, στα φύλλα του φυτού. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται κατά κύριο λόγο στα διαφορετικά λιπάσματα (πληροφορίες των οποίων δεν έγιναν γνωστές καθώς ήταν απόρρητες), αφού χρησιμοποιήθηκε μόνο μία ποικιλία της *S. Rebaudiana* και οι συνθήκες ανάπτυξης του φυτού πέραν του λιπάσματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι ίδιες.

7. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τη μελέτη που εκπονήθηκε ο προσδιορισμός των δύο γλυκοζιτών κυμαίνεται στα όρια που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [ii]. Σε μερικά δείγματα το ποσοστό της ρεμπαουδιοσίδης A ξεπερνά το 5%. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη A είναι $LOD_{\sigma\tau\epsilon\beta}=9.16$ ppm, $LOQ_{\sigma\tau\epsilon\beta}=30.54$ ppm και $LOD_{\rho\epsilon\mu\pi A}=10.25$ ppm, $LOQ_{\rho\epsilon\mu\pi A}=34.15$ ppm αντίστοιχα. Το R^2 της γραμμικότητας της μεθόδου ήταν 0,9991 για τη στεβιοσίδη και 0,9992 για τη ρεμπαουδιοσίδη A. Η αναπαραγωγικότητα RSD% της μεθόδου για το εμβαδόν των κορυφών και το χρόνο κατακράτησης της στεβιοσίδης ήταν 0,93% και 0,60% αντίστοιχα και για τη ρεμπαουδιοσίδη A ήταν 1,12% και 0,39% αντίστοιχα. Η ροή που επιλέχθηκε ήταν 2 ml/min, καθώς έδωσε ικανοποιητικούς χρόνους διαχωρισμού και καλή διαχωριστική ικανότητα στη μέθοδο σε συνδυασμό με το ποσοστό του οργανικού διαλύτη {ακετονιτρίλιο : νερό (84,7:85,3)}. Η αύξηση του ποσοστού του νερού είχε σαν αποτέλεσμα την ταχύτερη έκλυση των γλυκοζιτών, μείωνε όμως τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου. Επιλέχθηκε βρόγχος δείγματος με όγκο 20 μl καθώς με μικρότερο όγκο το σήμα ήταν αρκετά ασθενές ενώ με μεγαλύτερο όγκο παρόλο που αυξανόταν το σήμα, οι κορυφές του χρωματογραφήματος διαπλατίζονταν. Τέλος, η θερμοκρασία που επιλέχθηκε ήταν

30°C διότι με την αύξηση της θερμοκρασίας έως αυτό το σημείο, η έκλυση των γλυκοζιτών ήταν ταχύτερη. Σε μεγαλύτερη όμως από τους 30°C οι κορυφές του χρωματογραφήματος είχαν μικρό ύψος και μεγάλο εύρος.

8. Μελλοντικές Προτάσεις

- Επανάληψη της τεχνικής με τη χρήση ανιχνευτή φασματοσκοπίας μάζας (MS) για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των άγνωστων γλυκοζιτών που περιέχονται στα δείγματα.
- Προσδιορισμός των γλυκοζιτών με τη χρήση φθορισμομετρικού ανιχνευτή (HPLC-FLD) με παραγωγή του δείγματος μετά τη στήλη (Post Column Derivatization).
- Μελέτη της υδρόλυσης των γλυκοζιτών σε συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές του ανθρώπινου στομάχου.
- Προσδιορισμός των δύο γλυκοζιτών σε χαμηλότερα επίπεδα καθώς και άλλων γλυκοζιτών που απαντώνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις με τη χρήση χρωματογραφίας ιόντων με αμπερομετρικό ανιχνευτή.

9. Βιβλιογραφία

- [1]. Aranda-González I., Moguel-Ordoñez Y., Betancur-Ancona D.* (2015). Determination of Rebaudioside A and Stevioside in Leaves of *S. rebaudiana* Bertoni Grown in México by a Validated HPLC Method. *American Journal of Analytical Chemistry*, **6**: 878-885

- [2]. Bergs D., Burghoff B., Joehneck M., Martin G., Schembecker G. (2012). Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. **7**: 147-154
- [3]. Brusick DJ (2008). A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*. **46** Suppl 7: S83-91 [13,y]
- [4]. Catharino R. R., Santos L. S. (2012). On-line monitoring of stevioside sweetener hydrolysis to steviol in acidic aqueous solutions. *Food Chemistry*. **133** (4): 1632-1635
- [5]. COMMISSION REGULATION (EU) No 1131/2011, (12.11.2011), *Official Journal of the European Union*. **L 295/205**.
- [6]. Hurum D. and Rohrer J., Steviol Glycoside Determination by HPLC with Charged Aerosol and UV Detections Using the Acclaim Trinity P1 Column. *Thermo Scientific*, Application Note: 293
- [7]. Gardana C*, Scaglianti M, Simonetti P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **1217**(9): 1463-1470
- [8]. Gerwig G. J., te Poele E. M., Dijkhuizen L.,Kamerling J. P. (2016) Stevia Glycosides: Chemical and Enzymatic Modifications of Their Carbohydrate Moieties to Improve the Sweet-Tasting Quality. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **73**: 1-72
- [9]. Jaitak A. V., Banda, Bikram S., Kaul V.K.*, (2009). An Efficient Microwave-assisted Extraction Process of Stevioside and Rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytchemical Analysis*. **20**: 240-245
- [10]. Lorenzo C., Serrano-Díaz J., Plaza M., Quintanilla C., Alonso L. G., (2014). Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*. **157**: 518-523
- [11]. Matsui M*, Matsui K, Kawasaki Y, Oda Y, Noguchi T, Kitagawa Y, Sawada M, Hayashi M, Nohmi T, Yoshihira K, Ishidate M Jr, Sofuni T (1996). Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*. **11**(6): 573-9. [13.α]
- [12]. Nunes AP*, Ferreira-Machado SC, Nunes RM, Dantas FJ, De Mattos JC, Caldeira-de-Araújo A (2006). Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology*. **45**(4): 662-6 [13.β]

- [13]. Pzzuto J. M., Comparde C. M., Swanson S. M., Dhammika Nanayakkara N. P., Kinghorn A. D., (1985). Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Medical Sciences.* **82**: 2478-2482
- [14]. **Shirwaikar A, Parmar V, Bhagat J. and Khan S.* (2011). Identification and estimation of stevioside in the commercial samples of stevia leaf and powder by HPTLC and HPLC *International Journal of Pharmacy and Life Science.* **2(9): 1050-1058****
- [15]. **Venkata Sai Prakash Chaturvedula & Julian Zamora (2014). Reversed-Phase HPLC Analysis of Steviol Glycosides Isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food and Nutrition Sciences.* **2014 (5): 1711-1716****
- [16]. Wölwer-Rieck U., Christa Lankes C., Wawrzun A., Wüst M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology.* **231**: 581-588
- [17]. Wölwer-Rieck U., (2012). The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **60**: 886-895.
- [18]. Παπαδογιάννης Ι. και Σαμανίδου Β. (Θεσσαλονίκη, 2001). Ενόργανη Χημική Ανάλυση. *Πήγασος*.
- [19]. Πολυχρονιάδου-Αληχανίδου Α. (1996). Ανάλυση Τροφίμων. *Γαρταγάνη*.
- [20]. Χαμηλάκης Σ. Ν. (2016) Ειδικά Κεφάλαια Οργανικής Χημείας

Διαδικτυακές Πηγες

- [i]. <http://www.chemeng.ntua.gr/>
- [ii]. <http://www.vita.gr/mindandbody/alternative/article/21963/sto-enallaktiko-mikroskopio-h-stebia/>
- [iii]. <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A3%CF%84%CE%AD%CE%B2%CE%B9%CE%B1>
- [iv]. https://www.antemisarlis.gr/fyta/aromatika-fyta-votana-ypertrofes/stevia-rebaudiana-bertoni_72818/
- [v]. <https://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm194320.htm>
- [vi]. <http://bat.uoi.gr/>
- [vii]. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/2581/1/02_chapter_04.pdf

- [viii]. https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/2583/1/02_chapter_03.pdf
- [ix]. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Gaussian_distribution_thick_lines.svg