

**ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ
ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΤΟΥ ΑΓΝΟΥ ΠΑΡΘΕΝΟΥ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΗΤΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΑΚΑ-13 (¹³C NMR)**

**Θ. Μαυρομούστακος¹, Γ. Μπόννας¹, Μ. Ζερβού¹, Ε. Θεοδοροπούλου¹,
Δ. Παναγιωτόπουλος¹ και Α. Χέλμης²**

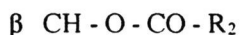
**¹Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών
²ΕΛΛΑΙΣ Α.Ε., Πειραιώς 71, Αθήνα, Ελλάδα**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ελαιόλαδο αποτελείται κατά κύριο λόγο από μίγμα τριγλυκεριδίων λιπαρών οξέων της μορφής:



I



I



όπου με R συμβολίζεται η αλκυλική αλυσίδα των παρακάτω λιπαρών οξέων που ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο στο αγνό παρθένο ελαιόλαδο (εντός παρενθέσεως η μέση αναλογία τους):

Παλμτικό (10%) C16:0 (μόνο στη θέση α)

Ελαιϊκό	(78%)	C18:1	<i>cis</i> -9
Λινολεϊκό	(6%)	C18:2	<i>cis</i> -9,12
Λινολενικό	(2%)	C18:3	<i>cis</i> -9,12,15
Άλλα	(2%)		

Η καθιερωμένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στα τριγλυκερίδια του ελαιόλαδου περιλαμβάνει την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες για την ανάλυση τους με αέριο χρωματογραφία.

Πρώτος στόχος της ερευνητικής μας εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθόδου για τον απευθείας ποσοτικό προσδιορισμό των κυριότερων λιπαρών οξέων στα τριγλυκερίδια αγνού παρθένου ελαιόλαδου με χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του άνθρακα-13, χωρίς προηγούμενη προετοιμασία του δείγματος. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου σε σχέση με τη κλασική μέθοδο είναι τα ακόλουθα:

- απλοποίηση της διαδικασίας: τα στάδια της υδρόλυσης και εστεροποίησης, που αν και έχουν “αυτοματοποιηθεί” σε μεγάλο βαθμό εξακολουθούν και είναι χρονοβόρα, καταργούνται. Δεν απαιτείται πλέον καμμία προηγούμενη επεξεργασία του δείγματος ελαιόλαδου.

- ποσοτικός προσδιορισμός ενός επιπλέον μεγέθους: με την προτεινόμενη μέθοδο επιτυγχάνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων λιπαρών οξέων σε κάθε θέση του μορίου της γλυκερόλης, δηλαδή στις θέσεις α (ή 1, 3) και β (ή 2). Η πληροφορία αυτή χάνεται στο στάδιο της εστεροποίησης στην κλασική μέθοδο προσδιορισμού των λιπαρών οξέων (1-18).

Δεύτερος στόχος της ερευνητικής μας εργασίας είναι η μελέτη νοθείας του ελαιόλαδου. Η νοθεία αποτελεί παλαιότατη εφεύρεση “εύκολου κέρδους” από τους παραγωγούς τροφίμων και ποτών. Αυτή έχει δυσμενείς συνέπειες τόσο στο βάλαντιο του καταναλωτή όσο και στην υγεία του σε αρκετές περιπτώσεις. Η εξέλιξη της τεχνολογίας οδήγησε στην εφεύρεση νέων μεθόδων νοθείας που ανιχνεύονται δύσκολα με τις γνωστές φυσικοχημικές μεθόδους. Γι’ αυτό ο ερευνητής προσπαθεί να προστατεύσει τον καταναλωτή αναπτύσσοντας νέους τρόπους ανίχνευσης της

δύσκολα με τις γνωστές φυσικοχημικές μεθόδους. Γι'αυτό ο ερευνητής προσπαθεί να προστατεύσει τον καταναλωτή αναπτύσσοντας νέους τρόπους ανίχνευσης της “μεθοδευμένης” ή “επιστημονικής” νοθείας. Τελικός στόχος είναι οι νέες αυτές μέθοδοι να βελτιωθούν σε τέτοιο βαθμό ώστε να ανιχνεύουν τουλάχιστον τις αρκετά επικερδείς μορφές νοθείας. Μέ τον τρόπο αυτό θα καταστεί ασύμφορο στους εμπόρους να προβαίνουν σε νοθείες με μηδαμινό σχεδόν κέρδος.

Το αγνό παρθένο ελαιόλαδο είναι ένας από τους στόχους των ασχολούμενων με τη “νόσο του εύκολου κέρδους”. Μια γνωστή νοθεία του είναι η μίξη του με ελαιόλαδα χαμηλότερης ποιότητας. Στόχος λοιπόν της ερευνητικής μας εργασίας είναι η μελέτη της νοθείας του αγνού παρθένου ελαιόλαδου με άλλα ελαιόλαδα ή σπορέλαια μικρότερης θρεπτικής και εμπορικής αξίας για να διαπιστωθεί αν αυτή μπορεί να ανιχνευθεί με την μέθοδο άνθρακα-13 πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

Η προτεινόμενη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των λιπαρών οξέων σε τριγλυκερίδια αγνού παρθένου ελαιόλαδου εντάσσεται σε ένα ευρύτερο ερευνητικό πρόγραμμα με απότερους στόχους την εξεύρεση αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης της νοθείας του ακριβού αυτού Ευρωπαϊκού προϊόντος καθώς και του προσδιορισμού της γεωγραφικής του προέλευσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Προετοιμασία δείγματος - ουσία αναφοράς

Το δείγμα του ελαιόλαδου διαλύεται σε αναλογία 40% κατά μάζα σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο. Στο διάλυμα προστίθεται γνωστή ποσότητα ουσίας αναφοράς ώστε να υπάρχει δυνατότητα σύνδεσης των αποτελεσμάτων με μονάδες μάζας αντί για αναλογίες μεταξύ των λιπαρών οξέων (traceability notion).

Ουσίας αναφοράς εκλέχτηκε η 1,4 διαζίνη ή πυραζίνη γιατί (α) διαλύεται στο μίγμα ελαιόλαδου - χλωροφόρμιου, (β) δίνει μία μόνο κορυφή στο φάσμα άνθρακα-13 και μάλιστα στην περιοχή του φάσματος 110 - 190 ppm που ενδιαφέρει αυτή τη μελέτη, χωρίς να συμπίπτει με κάποια από τις κορυφές του ελαιόλαδου, (γ) έχει χρόνο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η τεχνική του Άνθρακα-13 NMR είναι ικανή να δώσει ποσοτικό προσδιορισμό των κυριότερων λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα έλαια. Ένα παράδειγμα δείχνεται στο Σχήμα 1 όπου καταγράφονται οι μέσες τιμές ποσοτικού προσδιορισμού των κύριων λιπαρών οξέων αγνού παρθένου ελαιολάδου 24 δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος σε τρεις διαδοχικές ετήσιες σοδειές (1993-1996). Οι τιμές αυτές είναι σε πολύ καλή συμφωνία με αυτές που προσδιορίστηκαν με αέριο χρωματογραφία στα ίδια δείγματα (Ελαϊκό 73.5%, Λινολαϊκό 7.0% και Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα 14.8%).



Σχήμα 1: Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων λιπαρών οξέων αγνού παρθένου ελαιολάδου

Ο υπολογισμός της επιφάνειας κάθε κορυφής με ολοκλήρωση δεν είναι εφικτός δεδομένου ότι υπάρχει σημαντική αλληλεπικάλυψη τους, ειδικά στη περιοχή των καρβοξυλικών ανθράκων (το σύνολο των καρβοξυλικών ανθράκων στη θέση α της γλυκερόλης εμφανίζεται σε περιοχή εύρους 0.07 ppm περίπου). Για τον λόγο αυτό προσφεύγουμε υποχρεωτικά σε προσομοίωση των κορυφών η οποία μας δίνει την ακριβή επιφάνεια της κάθε κορυφής.

Η ποσότητα ενός λιπαρού οξέως X δίνεται σε mmole από τη παρακάτω σχέση:

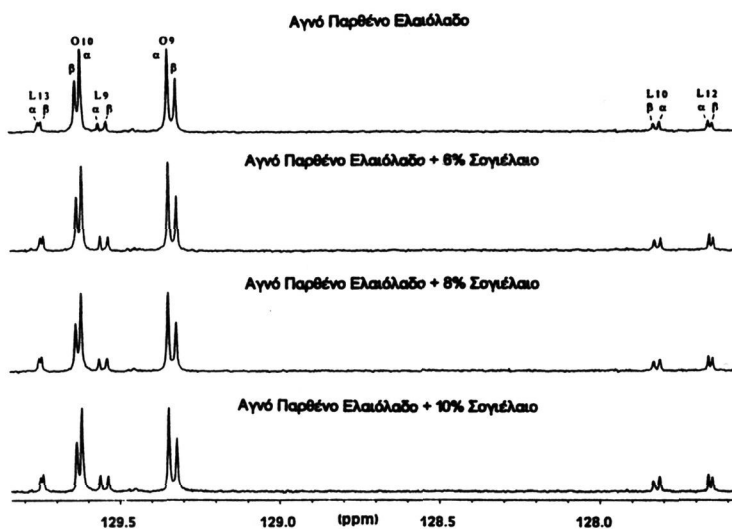
καρβοξυλικών ανθράκων (το σύνολο των καρβοξυλικών ανθράκων στη θέση α της γλυκερόλης εμφανίζεται σε περιοχή εύρους 0.07 ppm περίπου). Για τον λόγο αυτό προσφεύγουμε υποχρεωτικά σε προσομοίωση των κορυφών η οποία μας δίνει την ακριβή επιφάνεια της κάθε κορυφής.

Η ποσότητα ενός λιπαρού οξέως X δίνεται σε mmole από τη παρακάτω σχέση:

$$\text{Λιπ. Οξύ X} = (\text{mg Py} / \text{MW Py}) * [(S X_{\alpha} + S X_{\beta}) / S \text{Py}]$$

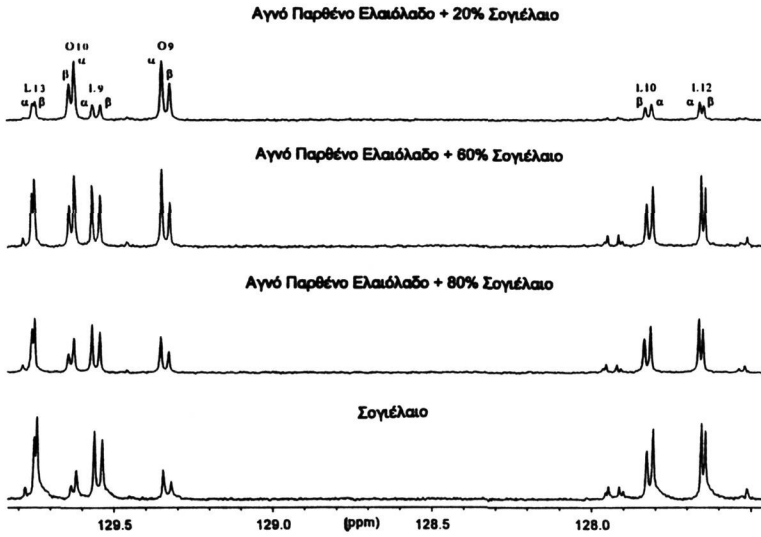
όπου Py συμβολίζει την ουσία αναφοράς και S X την επιφάνεια της κορυφής του άνθρακα του λιπαρού οξέως X στη θέση α ή β της γλυκερόλης και S Py την επιφάνεια της κορυφής της πυραζίνης.

Στο Σχήμα 2 δείχνονται οι κορυφές συντονισμού της αιθυλενικής περιοχής σε ένα φάσμα άνθρακα-13 δείγματος αγνού παρθένου ελαιολάδου και φάσματα μίξης του με 6-10% κ.β σογιέλαιο σε διάφορες αναλογίες. Τα πείραματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες υπό τις οποίες οι άνθρακες ήταν απαλλαγμένοι από τη σύζευξη με τα πρωτόνια και από το φαινόμενο Overhauser που θα καθιστούσε τους ποσοτικούς προσδιορισμούς αδύνατους. Οι περιοχές αυτές εκλέχθησαν προς μελέτη γιατί αποτελούν τις πιο χρήσιμες για την ανίχνευση της νοθείας. Η ταυτοποίηση των οξέων δείχνεται πάνω από τις κορυφές (O=ελαϊκό, L=Λινολεϊκό, Sat=Κορεσμένα). Τα εμβάδα τους συγκρίνονται με ένα πρότυπο αναφοράς την 1,4 διαζίνη ή πυραζίνη και αυτά δίνουν ποσοτική εκατοστιαία αναλογία των κυριότερων λιπαρών του οξέων. Περισσότερες λεπτομέρειες για τη μέθοδο αυτή παραπέμπουμε στα πρακτικά του τελευταίου συνεδρίου της Χημείας όπου η μέθοδος αναπτύχθηκε εκτενώς (19)



Σχήμα 2: Φάσματα ^{13}C NMR αγνού παρθένου ελαιόλαδου και μιγμάτων του με σογιέλαιο σε αναλογίες 6-10% κ.β.

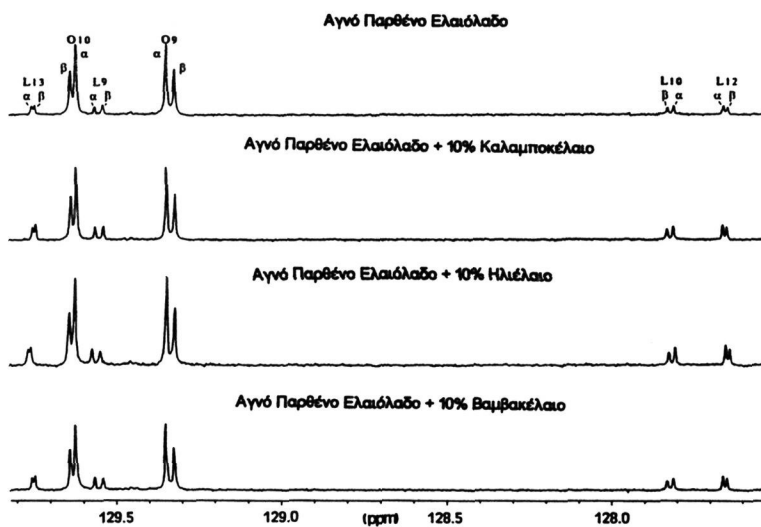
Στο Σχήμα 2 δείχνονται οι κορυφές συντονισμού της αιθυλενικής περιοχής σε φάσμα άνθρακα-13 δείγματος αγνού παρθένου ελαιόλαδου που περιέχει 6-10% κ.β. σογιέλαιο. Αυτό αποτελεί έλαιο φθηνότερης αξίας και η εκατοστιαία σύσταση του στα σε περισσότερη αφθονία λιπαρά οξέα ποικίλλει συγκριτικά με αυτή του ελαιόλαδου (Ελαϊκό 23.1%, Λινολεϊκό 56.2%, Κορεσμένα 16.9%). Αυτό είναι επίσης έκδηλο στα φάσματα μιγμάτων αγνού παρθένου ελαιόλαδου με σογιέλαιο όπου οι εντάσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στο λινολεϊκό είναι υψηλότερες και αυτές του ελαϊκού χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές του αγνού παρθένου ελαιόλαδου.



Σχήμα 3: Φάσματα ^{13}C NMR αγνού παρθένου ελαιολάδου και μιγμάτων του σε σογιέλαιο με αναλογίες 20-80% κ.β.

Στο Σχήμα 3 φαίνονται φάσματα άνθρακα-13 δειγμάτων μίξης αγνού παρθένου ελαιολάδου με υψηλές αναλογίες σογιελαίου καθώς και δείγμα που περιέχει μόνο σογιέλαιο. Όπως αναμενόταν υψηλές αναλογίες μίξης παρθένου ελαιολάδου με σογιέλαιο προσεγγίζουν τα φάσματα του καθαρού σογιελαίου.

Αποτελέσματα μίξης ελαιολάδου με 10% κ.β. καλαμποκέλαιο, βαμβακέλαιο και ηλιέλαιο (Σχήμα 4) έδειξαν ότι η μέθοδος αυτή είναι ικανή να ανιχνεύσει τη νοθεία με τα προαναφερθέντα φθηνότερα έλαια. Αυτό οφείλεται στο ότι τα έλαια αυτά περιέχουν σε χαμηλότερο ποσοστό ελαϊκό οξύ και μεγαλύτερο ποσοστό λινολεϊκό.



Σχήμα 4: Φάσματα ^{13}C NMR αγνού παρθένου ελαιολάδου και μιγμάτων του με βαμβακέλαιο, ηλιέλαιο και καλαμποκέλαιο 10% κ.β.

Συμπερασματικά επομένως ο ^{13}C - NMR είναι μια αρκετά υποσχόμενη τεχνική που μπορεί να αποτελέσει αναλυτικό εργαλείο για την ανίχνευση διαφόρων μορφών νοθείας ελαιόλαδου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ερευνητική αυτή εργασία επιδοτήθηκε από το πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Κοινότητας AIR2-CT 94 -1224.

Βιβλιογραφικές Παραπομπές

1. Ashworth, D.J., Adams, D.O.; Yunwen, B.G.; Tung-hai, M.; Cheng YuLee R. Anal. Cem. **1985**, 57, 710-715.
2. Gunstone, F.D. Chemistry and Physics of Lipids, **1991**, 58, 159-167.
3. Gunstone, F.D. Chemistry and Physics of Lipids, **1990**, 56, 227-229.
4. Gunstone, F.D. Chemistry and Physics of Lipids, **1991**, 59, 83-89.
5. Knothe, G., Marcel, S.F., Jie K.L., Lam, C.C., Bagby, M.O. Chemistry and Physics of Lipids **1995**, 77, 187-191.
7. Gunstone, F.D. Chemistry and Physics of Lipids **1990**, 56, 201-207.
8. Gunstone, F.D. JAOCS, **1993**, 70(4), 361-366.
9. Gunstone, F.D. Chemistry and Physics of Lipids, **1990**, 56, 195-199.
10. Soon, N.G. Lipids, **1985**, 20(11), 778-782.
11. Soon, N.G. J. Chem. Soc. Chem. Commun **1983**, 1217,179-180.
12. Mallet, J.F., Gaydou, E.M., Archavlis, A. JAOCS, **1990**, 67(10), 607-610.
13. Gunstone, F.D. Chemistry and Physics of Lipids **1991**, 58, 219-224.
14. Wollenberg, K.F. JAOCS **1990**, 67(8), 1990, 487-494.
15. Sacchi, R., Medina, I., Paolillo, L., Addeo, F. Chemistry and Physics of Lipids **1994**, 69, 65-73.
16. Sacchi, R., Medina, I., Santiago, P., Franscesco, A., Paolillo, L. JAOCS, **1993**, 70(3).
17. Bengsch, E., Perly, B., Deleuze, C., Valero, A. Journal of Magnetic Resonance, **1986**, 68, 1-13.
18. Sillerud, L.O., Chung, H.H., Bitensky, M.W., Francendese, A.A. J. Biol. Chem., **1986**, 10, 4380-4388.
19. Γ. Μπόνας, Μ. Day, Α. Μακρυγιάννης. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Β' Τόμος, 1099-1102.