

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Π.Μ.Σ. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

Ανάπτυξη και εφαρμογή άμεσης μεθόδου μεθυλίωσης λιπιδίων σε διάφορα τρόφιμα για τον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Αθανάσιος Μαλλούχος

ΚΥΡΙΑΖΗ ΙΩΑΝΝΑ
ΑΘΗΝΑ 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

Ανάπτυξη και εφαρμογή άμεσης μεθόδου μεθυλίωσης λιπιδίων σε διάφορα τρόφιμα για τον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων
ΚΥΡΙΑΖΗ Α. ΙΩΑΝΝΑ

Development and application of a direct method of lipid methylation in various food matrices to determine the fatty acids composition
KYRIAZI A. IOANNA

Επιβλέπων καθηγητής: Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαντάλα Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Παπάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων και της λιποπεριεκτικότητας διαφόρων προϊόντων της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. με έμφαση τις βρεφικές τροφές. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (GC) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας. Αρχικά, εφαρμόστηκε η επίσημη μέθοδος AOAC μέθοδος 996.06, η οποία περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια υδρόλυσης του τροφίμου και απομόνωσης των λιπιδίων. Κατόπιν, τα λιπίδια μετεστεροποιούνται και προσδιορίζονται με GC. Δεδομένου ότι η μέθοδος AOAC είναι χρονοβόρος και απαιτεί πληθώρα αντιδραστηρίων, αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι άμεσης μεθυλίωσης λιπιδίων στη μήτρα του τροφίμου. Η μία μέθοδος βασιζόταν στην μέθοδο Christie, η οποία περιλαμβάνει όξινη κατάλυση ενός σταδίου, ενώ η άλλη μέθοδος αποτελούσε τροποποίηση της μεθόδου ISO 12966-2 και περιλαμβάνει όξινη και βασική κατάλυση σε διαδοχικά στάδια. Οι τρεις μέθοδοι ελέγχθηκαν ως προς την επαναληψιμότητα και την ορθότητα αναλύοντας πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM) καθώς και σκόνη βρεφικού γάλακτος (Sanilac) για την οποία υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα από την εταιρεία. Έπειτα, η επίσημη μέθοδος και η μέθοδος Christie εφαρμόστηκαν και σε άλλα προϊόντα της εταιρείας, όπως σοκολάτα γάλακτος, απομίμηση σοκολάτας, τρούφα σοκολάτας, κ.α. Όσον αφορά την λιποπεριεκτικότητα του υλικού αναφοράς, οι τρεις μέθοδοι διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$). Η μέθοδος AOAC έδωσε την χαμηλότερη τιμή ενώ η μέθοδος ISO την μεγαλύτερη. Ωστόσο, οι τιμές λιποπεριεκτικότητας και των τριών μεθόδων βρίσκονταν μέσα στο αποδεκτό εύρος τιμών της πιστοποιημένης τιμής (30.43 g/100g). Όσον αφορά τις επιμέρους κατηγορίες λιπαρών οξέων, η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα ήταν παρόμοια ($p > 0.05$) μεταξύ των τριών μεθόδων και δεν διέφερε σημαντικά από την πιστοποιημένη τιμή (11.10 g/100g). Όμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ωστόσο, οι τιμές και των τριών μεθόδων διέφεραν σημαντικά ($p < 0.05$) από τις αντίστοιχες πιστοποιημένες τιμές. Η μέθοδος Christie χαρακτηριζόταν από καλύτερη επαναληψιμότητα, σύμφωνα με την μέγιστη τιμή της % σχετικής τυπικής απόκλισης που παρατηρήθηκε (RSD: 3,92%). Η % ανάκτηση των επιμέρους λιπαρών οξέων κυμάνθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα (80-120%) στις περισσότερες περιπτώσεις.

Στις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε σκόνη βρεφικού γάλακτος, παρατηρήθηκε πως η λιποπεριεκτικότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ISO βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ($p < 0.05$) από την αντίστοιχη των δύο άλλων μεθόδων (AOAC, Christie), οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους ($p > 0.05$). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ωστόσο, η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα διέφερε σημαντικά μεταξύ των τριών μεθόδων. Όπως και στην περίπτωση του υλικού αναφοράς, η μέθοδος Christie χαρακτηριζόταν από πολύ καλή επαναληψιμότητα. Οι τιμές περιεκτικότητας των επιμέρους λιπαρών οξέων ήταν παρόμοιες ($p > 0.05$) μεταξύ των μεθόδων AOAC και Christie, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της μεθόδου ISO βρέθηκαν υπερεκτιμημένες ($p < 0.05$). Αξίζει να αναφερθεί πως παρόμοιες δοκιμές εφαρμόστηκαν και σε άλλα προϊόντα της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης έκτασης των δοκιμών δεν κατέστη δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Συμπερασματικά, η μέθοδος άμεσης μεθυλίωσης με όξινη κατάλυση ενός σταδίου (τροποποιημένη μέθοδος Christie) φαίνεται να αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη εναλλακτική της επίσημης μεθόδου AOAC για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των λιπαρών οξέων και της ολικής λιποπεριεκτικότητας σε σκόνη βρεφικού γάλακτος.

Λέξεις-Κλειδιά: Λιπαρά οξέα, Μεθυλίωση, Άμεση μεθυλίωση, *In situ*, Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, Κορεσμένα λιπαρά οξέα, Σκόνη βρεφικού γάλακτος, Αεριοχρωματογραφία, Προσδιορισμός λιποπεριεκτικότητας, Μετεστεροποίηση

SUMMARY

The purpose of this thesis is to determine the fatty acids and the fat content of various products of JOTIS SA. with emphasis on infant formulas. For this purpose gas chromatography (GC) with flame ionization detector was selected. Initially, the official method AOAC 996.06 was applied, which comprises sequential hydrolysis and lipid isolation steps. The lipids are then transesterified and determined by GC. Since the AOAC method is time consuming and requires large quantities of solvents, two methods of direct lipid methylation in the food matrix were developed. One of them was based on the method reported by Christie, which involves acidic catalysis in one step, while the other method was a modification of ISO 12966-2 and involves acidic and basic catalysis in successive steps. The three methods were tested for repeatability and accuracy by analyzing certified reference material (CRM) as well as infant formula (Sanilac) for which company data were available. Then, the method of AOAC and Christie's were applied to other products of the company, such as milk chocolate, chocolate imitation, chocolate truffle, and more.

Regarding the fat content of the certified reference material, the three methods differed statistically significantly ($p < 0.05$). The AOAC method gave the lowest value while the ISO method gave the highest value. However, the fat content values of all three methods were within the acceptable range of the certified value (30.43 g / 100g). The content of saturated fatty acids was found similar ($p > 0.05$) between the three methods and did not differ significantly from the certified value (11.10 g / 100g). Similar results were obtained for monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. However, the three methods differed significantly ($p < 0.05$) from the corresponding certified values. Christie's method was characterized by better repeatability, according to the maximum value of relative standard deviation observed (RSD: 3.92%). The recovery of individual fatty acids was ranged in satisfactory levels (80-120%), in most cases.

In the infant milk powder tests, the fat content determined by the ISO method was found significantly higher ($p < 0.05$) than the corresponding one of the other two methods (AOAC, Christie), which did not differ significantly ($p > 0.05$). Similar results were obtained for the content of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. On the contrary, the content of saturated fatty acids differed significantly between the three methods. As with the CRM, the Christie method was characterized by very good repeatability. The content of individual fatty acids was similar ($p > 0.05$) between the AOAC and Christie methods, while the corresponding values of the ISO method were found to be overestimated ($p < 0.05$). It is worth mentioning that similar tests were applied to other products of JOTIS S.A. However, due to time limitation, it was not possible to draw safe conclusions.

In conclusion, the direct one-step methylation method (modified Christie's) appears to be a quick and reliable alternative to the official AOAC method for the simultaneous determination of individual fatty acid content as well as total fat content of infant formula.

Key words: Fatty acids, Methylation, Direct Methylation, *In situ*, Monounsaturated fatty acids, Polyunsaturated fatty acids, Saturated fatty acids, Infant formula, Gas Chromatography, Total fat content

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΑ ΕΠΙΣΤΟΛΗ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου μελέτης, κύριο Μαλλούχο Αθανάσιο για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκα τη βοήθειά του, ήταν πάντα εκεί για να με καθοδηγήσει, να μου προσφέρει τις γνώσεις του καθώς και τον πολύτιμο χρόνο του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την εταιρεία ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. για την ευκαιρία που μου πρόσφερε ώστε να πραγματοποιήσω την πειραματική διαδικασία της συγκεκριμένης μελέτης στις εγκαταστάσεις της, παρέχοντας μου όλους τους απαραίτητους πόρους και εργαστηριακό εξοπλισμό. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κωμαΐτη Ευστράτιο και την κυρία Τραχανά Κλαίρη για τις γνώσεις και το χρόνο που μου αφιέρωσαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου η οποία στάθηκε δίπλα μου και με υποστήριξε ανελλιπώς, ψυχολογικά και οικονομικά, ώστε να ολοκληρώσω το εγχείρημά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 3 |
| SUMMARY | 4 |
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 10 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑΣ..... | 10 |
| 2. ΟΡΙΣΜΟΙ..... | 11 |
| 3. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΛΑΤΟΣ..... | 12 |
| 4. ΡΟΛΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ..... | 13 |
| 5. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ | 14 |
| 5.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ | 16 |
| 5.2 ΤΡΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΕΣ | 19 |
| 6. ΒΑΣΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ | 20 |
| 6.1 ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ | 20 |
| 6.3 ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΒΑΣΕΙΣ | 22 |
| 6.4 ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΟΞΕΑ..... | 22 |
| 6.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΥΤΗ | 23 |
| 6.5.2 ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ..... | 24 |
| 7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ..... | 25 |
| 7.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ | 29 |
| 7.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΥΣ | 30 |
| 7.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ (FAMES)..... | 31 |
| 7.4 <i>IN SITU</i> Ή ΑΠ' ΕΥΘΕΙΑΣ ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ..... | 31 |
| 8. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ | 33 |
| 9. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΦΛΟΓΑΣ (FLAME IONIZATION DETECTOR, FID)..... | 36 |
| 10. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ..... | 37 |
| 10.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ | 37 |
| 10.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ | 37 |
| 10.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΙΟΡΘΩΣΗΣ..... | 37 |
| 11. ΣΚΟΠΟΣ..... | 40 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 41 |
| 12. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ..... | 41 |
| 13. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ | 41 |
| 13.1 ΑΟΑC 996.06..... | 41 |
| 13.2 ΜΕΘΟΔΟΙ <i>IN SITU</i> ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 13.2.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ CHRISTIE (ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΕΝΟΣ ΣΤΑΔΙΟΥ)..... | 47 |
| 13.2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ISO 12966-2 (ΟΞΙΝΗ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΗ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ) | 49 |
| 14.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ | 51 |
| 14.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΟΑC 996.06 ΣΕ CRM ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ..... | 58 |
| 14.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΟΑC 996.06 ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ | 64 |
| 14.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ CHRISTIE ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ CRM 1849 ^α ΚΑΙ ΕΜΠΟΡΙΟΥ | 66 |
| 14.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΜΕΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ (ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ISO 12966-2) ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ CRM 1849 ^α ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ | 70 |
| 15. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ..... | 73 |
| 15.1 ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΕΙΓΜΑ CRM 1849 ^α | 73 |
| 15.2 ΔΕΙΓΜΑ ΣΚΟΝΗΣ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ | 74 |
| 15.3 ΣΟΚΟΛΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ | 75 |
| 15.4 ΑΠΟΜΙΜΗΣΗ ΣΟΚΟΛΑΤΑΣ..... | 76 |
| 15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 79 |
| 16. ΣΥΝΤΜΙΣΕΙΣ | 81 |
| 17. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 82 |
| 18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 87 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1 Νομοθετικοί περιορισμοί στη σκόνη βρεφικού γάλακτος..... | 13 |
| Πίνακας 2 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν τα λιπίδια στα τρόφιμα..... | 14 |
| Πίνακας 3 Κατηγορίες απλών λιπιδίων και τα αντίστοιχα δομικά συστατικά..... | 14 |
| Πίνακας 4 Πίνακας σύνθετων λιπιδίων και τα αντίστοιχα δομικά τους συστατικά..... | 15 |
| Πίνακας 5 Κυριότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα τρόφιμα..... | 17 |
| Πίνακας 6 Αριθμός τριακυλογλυκερολών στο λίπος από πιθανούς συνδυασμούς λιπαρών οξέων..... | 27 |
| Πίνακας 7 Σταθμικές μέθοδοι εκχύλισης ανά υπόστρωμα..... | 28 |
| Πίνακας 8 Σταθμικές μέθοδοι προσδιορισμού λίπους που πραγματοποιούνται σε δύο στάδια..... | 28 |
| Πίνακας 9 Μέθοδοι που απαιτούν προετοιμασία πριν τη μεθυσίωση..... | 30 |
| Πίνακας 10 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση εστεροποίησης..... | 32 |
| Πίνακας 11 Ενδεικτικές μέθοδοι προσδιορισμού λιπαρών με αέρια χρωματογραφία..... | 37 |
| Πίνακας 12 Πραγματοποίηση υπολογισμών του F_{CT} για τον μεθυλεστέρα του δεκατριανοϊκού οξέος..... | 38 |
| Πίνακας 13 Υπολογισμός F_{CT} ως προς το $C_{11:0}$ και το $C_{13:0}$ | 39 |
| Πίνακας 14 Συστατικά μίγματος μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (όπως αναφέρονται στα αντίστοιχα πιστοποιητικά)..... | 42 |
| Πίνακας 15 Συνθήκες λειτουργίας GC (AOAC 996.06)..... | 45 |
| Πίνακας 16 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα GC (AOAC 996.06)..... | 45 |
| Πίνακας 17 Συνθήκες λειτουργίας GC (Μέθοδος Christie)..... | 49 |
| Πίνακας 18 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα GC (Μέθοδος Christie)..... | 49 |
| Πίνακας 19 Σειρά έκλυσης μίγματος μεθυλεστέρων και σχετικός χρόνος κατακράτησης (RRT) ως προς το ενδεκαανοϊκό οξύ..... | 54 |
| Πίνακας 20: Τιμές του πειραματικού παράγοντα διόρθωσης (F_{CE}) τεσσάρων διαφορετικών μιγμάτων μεθυλεστέρων σε διαφορετικά split ratio και σύγκριση με τον θεωρητικό παράγοντα διόρθωσης (F_{CT})..... | 57 |
| Πίνακας 21 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων του δείγματος 1849 ^a σύμφωνα με το πιστοποιητικό ανάλυσης.. | 58 |
| Πίνακας 22 Συντελεστές μετατροπής των FAMES σε ισοδύναμα τριακυλογλυκερολών f_{TG_i} και λιπαρών οξέων f_{FA_i} | 61 |
| Πίνακας 23 Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων του CRM 1849 ^a (AOAC 996.06), n=9..... | 62 |
| Πίνακας 24 Συγκριτική αξιολόγηση δείγματος βρεφικής σκόνης γάλακτος του εμπορίου (AOAC 996.06), n=17..... | 65 |
| Πίνακας 25 Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων σε δείγμα βρεφικής σκόνης CRM 1849 ^a (Μέθοδος Christie), n=5..... | 67 |
| Πίνακας 26 Ανάκτηση μεθυσίωσης τριενδεκανοϊνης (n=5)..... | 69 |
| Πίνακας 27 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος Sanilac σύμφωνα..... | 69 |
| Πίνακας 28 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος CRM..... | 71 |
| Πίνακας 29 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος Sanilac σύμφωνα με την άμεση μέθοδο μεθυσίωσης δύο σταδίων (τροποποιημένη ISO 12966-2)..... | 72 |

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑΣ

Οι γενικές αρχές οι οποίες αφορούν την επισήμανση των συστατικών των τροφίμων (General Guidelines for Claims) βασίζονται στον Κώδικα Τροφίμων (Codex Alimentarius). Στόχος αυτών είναι κυρίως η ενημέρωση των καταναλωτών ώστε να πραγματοποιούν υγιεινές επιλογές στον τομέα της διατροφής τους, αλλά και η ενθάρρυνση των βιομηχανιών να παράγουν ασφαλέστερα προϊόντα για την υγεία (Hawke, 2004).

Από νομοθετικής άποψης δεν έχει υιοθετηθεί ακόμα μια παγκόσμια κοινή πορεία σχετικά με την επισήμανση των λιπαρών οξέων στα τρόφιμα. Σε πολλές χώρες το ανάλογο νομοθετικό πλαίσιο είναι ελλιπές ή ανύπαρκτο, ενώ αντίθετα σε άλλες αρκετά αυστηρό. Στην Ευρώπη συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΚ 1169/2011 (EUROPA, 2011), παρέχονται οι απαιτήσεις και προδιαγραφές για την επισήμανση ορισμένων συστατικών του προϊόντος, τα οποία θα πρέπει να αναγράφονται σε μορφή λίστας πάνω στη συσκευασία, με συγκεκριμένες προδιαγραφές μορφοποίησης κειμένου. Μάλιστα με βάση τη νέα απόφαση (E/E) 2019/649 του Κοινοβουλίου (EUROPA, 2019), της 24^{ης} Απριλίου 2019, καθίσταται πλέον αναγκαίο να επισημαίνεται η περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων στο τρόφιμο και δη των *trans*, εφόσον η ποσότητα αυτών υπερβαίνει τα 2 γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια προϊόντος. Μέχρι πρότινος προαιρετική ήταν η επισήμανση των *trans* λιπαρών οξέων σε Βέλγιο, Γερμανία, Ολλανδία, Πολωνία, Ηνωμένο Βασίλειο και Ελλάδα, ενώ σε κάποιες χώρες όπως η Φιλανδία και η Βουλγαρία παρέχονταν κάποιες διατροφικές αναφορές. Η τακτική αυτή αναμένεται να αλλάξει εντός του χρονικού περιθωρίου προσαρμογής εξαιτίας της νέας απόφασης του Κοινοβουλίου που προαναφέρθηκε. Παρόμοια τακτική ακολουθείται και σε άλλες χώρες εκτός Ευρώπης. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων για τη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία (Food Standard Agency Australia New Zealand), ήδη πραγματοποιούνται ενέργειες για να γίνει υποχρεωτική η επισήμανση στα *trans* λιπαρά οξέα (FSAANZ).

Η Δανία ήταν η πρώτη που όρισε το 2003, υποχρεωτική επισήμανση των *trans* λιπαρών οξέων εφόσον η περιεκτικότητά τους ξεπερνά τα 2 γραμμάρια ανά 100 γραμμάρια συνολικής λιπαρής ύλης δημιουργώντας παγκόσμια καινοτομία. Ακολούθησε με την ίδια οδηγία, η Ελβετία (2008), η Αυστρία (2009), η Ισλανδία (2011), η Ουγγαρία (2013) και η Νορβηγία (2014) (Laaninen T. , 2016). Στις 11 Ιουλίου 2003, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) δημοσίευσε στο Ομοσπονδιακό Μητρώο (Federal Register) τη σύστασή του σχετικά με την υποχρεωτική επισήμανση των *trans* λιπαρών οξέων στην ετικέτα συμβατικών τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής. Σύμφωνα με την οδηγία που εξέδωσε, ο κανόνας τέθηκε σε ισχύ από την 1^η Ιανουαρίου 2006 (FDA, 2003), (Strigley C. T., 2017). Την ίδια πολιτική ακολούθησε το 2007 και η νότια Κορέα, θέτοντας υποχρεωτική την επισήμανση της συνολικής λιπαρής ύλης και ειδικότερα των *trans* λιπαρών οξέων σε αναψυκτικά, έτοιμα γεύματα, *poodles* και βρεφικές τροφές (Hye-Kyung, 2007).

Σε κάθε περίπτωση ο Κώδικας Τροφίμων (Codex Alimentarius) αναφέρει τη σημαντικότητα της διατροφικής επισήμανσης των προϊόντων και μάλιστα προτρέπει και στην αναγραφή των *trans* λιπαρών οξέων (Hawke, 2004). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, η υψηλή κατανάλωση *trans* λιπαρών οξέων, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας καρδιακής νόσου, καρδιαγγειακών ασθενειών, παχυσαρκίας και διαβήτη τύπου II (Laaninen T. , 2016). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) καθώς και με τον ΕΦΕΤ η κατανάλωση των *trans* λιπαρών καλό είναι να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα καθώς είναι δυνατό να οδηγήσει σε αύξηση της LDL-χοληστερόλης ή ακόμα και της ολικής, καθώς και στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων (EFSA-ΕΦΕΤ, 2010). Η διαπίστωση αυτή φαίνεται να επαληθεύεται συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία.

Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα παρατηρείται μια παγκόσμια τάση προς την επισήμανση της λιποπεριεκτικότητας και των λιπαρών οξέων των τροφίμων με έμφαση στα *trans* λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα

ανάλογα με το είδος τους, μπορεί να έχουν είτε ευεργετικές είτε αρνητικές συνέπειες στην υγεία του καταναλωτή. Γι' αυτό λοιπόν κρίνεται απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός τους.

2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Η διατύπωση ενός κοινού ορισμού για τα λιπίδια δεν είναι εύκολο να οριστεί καθώς η τάξη των λιπιδίων χαρακτηρίζεται από ετερογένεια ως προς την χημική δομή και τους βιολογικούς τους ρόλους. Στα περισσότερα επιστημονικά βιβλία, τα λιπίδια αναφέρονται σε ένα σύνολο ενώσεων, οι οποίες διαλύονται στους συνήθεις υδρόφοβους οργανικούς διαλύτες (π.χ. χλωροφόρμιο). Σύμφωνα με τους Christie & Han, ένας κατά σύμβαση ορισμός των λιπιδίων θα μπορούσε να είναι ο εξής: «Τα λιπίδια αποτελούνται από τα λιπαρά οξέα και τα παράγωγά τους, καθώς επίσης και από ουσίες που σχετίζονται βιοσυνθετικά ή λειτουργικά με αυτά». Ωστόσο, ο ορισμός αυτός είναι αρκετά παραπλανητικός αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι πολλές ουσίες οι οποίες θεωρούνται πλέον με βάση τον παραπάνω ορισμό λιπίδια, διαλύονται ευκολότερα στο νερό συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες. Τα λιπίδια δύναται να προέρχονται από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς. Τα λιπίδια φυτικής (σπόροι, φρούτα, καρποί) και ζωικής (κρέας, λιπαρά ψάρια, αυγό, γάλα) προέλευσης αποτελούνται κυρίως από λιπαρά οξέα συνδεδεμένα είτε με εστερικό δεσμό σε μία τριυδροξύ-αλκοόλη (γλυκερόλη) ή σε άλλη αλκοόλη (π.χ. χοληστερόλη), είτε με αμιδικό δεσμό σε μακριάς αλυσίδας βάσεις (π.χ. σφιγγοσίνη) ή και κάποιες φορές άλλες αμίνες (Christie., 2010). Ως εκ τούτου ο Christie, αναφερόμενος στα λιπαρά οξέα, συνεχίζει διευκρινίζοντας πως «αποτελούν ενώσεις που συντίθεται στη φύση από τη συμπύκνωση μονάδων μηλονυλο συνενζύμου με την επίδραση κάποιας συνθάσης λιπαρού οξέος». Συνήθως απαντώνται στη φύση σε γραμμικές αλυσίδες άρτιου αριθμού ανθράκων (C_{12} - C_{24}) και μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. (Christie., 2010).

Οι όροι «Λίπη» και «Έλαια» είναι χημικώς ταυτόσημοι και αναφέρονται σε λιπίδια τα οποία ανευρίσκονται στην στερεά ή στην υγρή κατάσταση, αντιστοίχως, σε θερμοκρασία δωματίου (Wade, 2012). Τα εδάδιμα λίπη και έλαια συγκεκριμένα, όπως ακριβώς ορίζονται στο άρθρο 70 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, «νοούνται με την ευρεία έννοια της λέξης, όλα τα φερόμενα στο εμπόριο και χρησιμοποιούμενα για τη διατροφή του ανθρώπου κατάλληλα γλυκερίδια των διαφόρων λιπαρών οξέων, φυτικής ή ζωικής προέλευσης, τα οποία μπορεί να περιέχουν μικρές ποσότητες άλλων λιποειδών, όπως φωσφατίδια, ασωπονοποίητα συστατικά και ενυπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα» (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών). Ο McMurry διευκρινίζει πως από χημικής άποψης τα ζωικά λίπη και τα έλαια αποτελούνται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες, δηλαδή τριεστέρες της γλυκερόλης με τρία καρβοξυλικά οξέα που φέρουν μακριές ανθρακικές ευθείες αλυσίδες, αν και φαίνονται διαφορετικά στη φυσική τους κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου (McMurry, 2011)(S. Indelicato, 2017). Μάλιστα θεωρείται ότι αποτελούν την πιο σημαντική κατηγορία των βρώσιμων ελαίων και λιπών και περιγράφονται από κάποια βασικά γνωρίσματα, δηλαδή από το συνολικό αριθμό ανθράκων που ισούται με το άθροισμα των ανθράκων των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο μόριο, από το βαθμό ακορεστότητας των αντίστοιχων λιπαρών οξέων και από τη θέση και τη διαμόρφωση των διπλών δεσμών στα λιπαρά οξέα (Buchgraber, 2004). Τα στερεά λίπη περιέχουν μεγαλύτερη αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA), ενώ τα έλαια υπερτερούν στην περιεκτικότητα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA) ή και πολυακόρεστων (PUFA) (J. Salimon, 2013) Εκ φύσεως τα περισσότερα πολυακόρεστα λιπαρά βρίσκονται στη *cis* μορφή τους, αλλά η επεξεργασία τους πριν την κατανάλωση (π.χ. τηγάνισμα, ραφινάρισμα, εκχύλιση) προκαλεί τον ισομερισμό σε *trans* διαμορφώσεις ενός ποσοστού (J. Salimon, 2013).

3. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ

Το βρεφικό γάλα αποτελεί υποκατάστατο του μητρικού γάλακτος και μοναδική τροφή του νεογέννητου. Η πρόσληψη των κατάλληλων λιπαρών οξέων είναι μείζονος σημασίας καθώς συσχετίζεται με την ανάπτυξη του νευρικού ιστού. Επιπλέον, μελέτες αναφέρουν πως η λήψη *trans* ισομερών από τα βρέφη έχει τα αντίθετα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα και ότι το *trans* ισομερές του ελαϊκού οξέος επηρεάζει την ισορροπία των λιποπρωτεϊνών στον οργανισμό (J. M. Chardigny, 1996).

Οι βρεφικές τροφές αποτελούν ειδική κατηγορία στα τρόφιμα, εξαιτίας του καταναλωτικού κοινού στο οποίο απευθύνονται. Σύμφωνα με την Οδηγία 2006/141/EK της Επιτροπής (Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2006), διευκρινίζεται πως τα παρασκευάσματα που κυκλοφορούν για βρέφη και δεύτερης ηλικίας μωρά θα πρέπει να ανταποκρίνονται στις διατροφικές τους ανάγκες. Οι παιδικές τροφές οφείλουν να έχουν τέτοια σύσταση ώστε να «ανταποκρίνονται στις ανάγκες των υγιών βρεφών». Στόχος της οδηγίας αυτής είναι να οριστεί με ακρίβεια η σύσταση των βρεφικών τροφών που προέρχονται από πρωτεΐνες αγελαδινού γάλακτος ή πρωτεΐνες σόγια ή μίγμα αυτών, καθώς και από τα προϊόντα υδρόλυσης αυτών των πρωτεϊνών. Η σύσταση του βρεφικού γάλακτος θα πρέπει να αναφέρεται στην ετικέτα του προϊόντος. Ως προς τα λιπίδια λοιπόν, η περιεκτικότητα των βρεφικών τροφών θα πρέπει να ανέρχεται σε 1,05 g/100 kJ έως 1,4 g/100 kJ ή αντίστοιχα σε 4,4 g/100 kcal έως 6,0 g/100 kcal, όσο αφορά τις βρεφικές τροφές. Η ποσότητα αυτή διαφέρει στα παρασκευάσματα για παιδιά έως και δύο ετών με ελάχιστο όριο το 0,96 g/100 kJ ή 4,0 g/ 100 kcal. Το τελικό προϊόν και στις δύο περιπτώσεις απαγορεύεται να περιέχει σησαμέλαιο και βαμβακέλαιο. Η περιεκτικότητα σε λαυρικό και μυριστικό οξύ οφείλει να αντιστοιχεί μεμονωμένα ή αθροιστικά στο 20% της συνολικής περιεκτικότητας των λιπιδίων, ενώ το ερουκικό αντίστοιχα να μην ξεπερνά το 1% των συνολικών λιπαρών ουσιών. Επιπρόσθετα, το λινελαϊκό οξύ στη μορφή των λινελαϊκών γλυκεριδίων θα πρέπει να κυμαίνεται από 70 mg/100 kJ (300 mg/100 kcal) έως 285 mg/100 kJ (1200 mg/100 kcal) και το α-λινολενικό δε θα πρέπει να είναι λιγότερο από 12 mg/100 kJ (50 mg/100 kcal). Ο λόγος των παραπάνω ουσιών οφείλει να κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15. Από την ίδια οδηγία ορίζεται και η περιεκτικότητα των *trans* ισομερών των λιπαρών οξέων, η οποία δε θα πρέπει να ξεπερνά το 3% των συνολικών λιπαρών ουσιών. Στα βρεφικά παρασκευάσματα είναι δυνατό να προστεθούν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Long Chained Polyunsaturated fatty acids, LCP) με 20-22 άτομα άνθρακα υπό την προϋπόθεση ότι δεν ξεπερνούν το 1% της συνολικής ποσότητας των λιπαρών για n-3 LCP και 2% της συνολικής ποσότητας των λιπαρών για n-6 LCP. Το αραχιδονικό αποτελεί εξαίρεση και θα πρέπει να φτάνει έως 1% της αντίστοιχης ποσότητας. Τέλος, ως προς τη σύσταση, το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (20:5 n-3) θα πρέπει να είναι χαμηλότερο από το εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ (22:6 n-3) και το τελευταίο χαμηλότερο από τα n-6 LCP του προϊόντος. Αναφορά γίνεται ξεχωριστά και στα φωσφολιπίδια, τα οποία δε θα πρέπει να ξεπερνούν τα 2 g/L στα βρεφικά παρασκευάσματα. Οι περιορισμοί αυτοί αναγράφονται συνοπτικά και στον Πίνακα 1 που παρατίθεται παρακάτω.

Η συσκευασία των βρεφικών τροφών μπορεί να φέρει ισχυρισμούς εφόσον πληροί συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Ως προς τα προστιθέμενα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ο ισχυρισμός που αφορά στην προσθήκη του εικοσιδυαεξαενοϊκού οξέος είναι ο εξής: «Η περιεκτικότητα σε εικοσιδυαεξαενοϊκό οξύ δεν είναι μεγαλύτερη από 0,2 % της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες» (Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2006).

Πίνακας 1 Νομοθετικοί περιορισμοί στη σκόνη βρεφικού γάλακτος

| Λιπίδια εκ των οποίων <i>trans</i> Λαυρικό & Μυριστικό Ερουκικό Οξύ Λινελαϊκό οξύ α-λινολενικό οξύ | 0,96 g/100 kJ - 1,4 g/100 kJ ή 4,0 g/100 kcal - 6,0 έως 3% * έως 20%* έως 1% * | Εξαιρέση: βαμβακέλαιο Μεμονωμένα ή μαζί Υπό μορφή λινελαϊκών |
|---|---|--|
| Φωσφολιπίδια | έως 2 g/l | |
| Προσθήκη: n-3 LCP n-6 LCP Προϋπόθεση: (20:5 n-3) < (22:6 n-3) < n-6 LCP | έως 1 % * έως 2% * | Εξαιρέση: αραχιδονικό |
| * ως προς την συνολική ποσότητα λιπαρής | | |

4. ΡΟΛΟΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Η μελέτη των λιπιδίων έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι είναι καθοριστικής σημασίας για ζωτικές λειτουργίες ζώων, φυτών και μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπίδια αποτελούν την κύρια αποθήκη ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό και τους φυτικούς ιστούς. Οι λιπαρές ύλες προσφέρουν 9 kcal/g δηλαδή 2,5 φορές περισσότερη ενέργεια από τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες. Επιπλέον είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών ρυθμίζοντας τη διαπερατότητά τους και έχουν μεγάλη διατροφική αξία (W.W. Christie, 1993) (McMurry, 2011) (Strigley C. T., 2017). Έλλειψη αυτών μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές και αποδιοργάνωση του οργανισμού. Μάλιστα ο McMurry αναφέρει πως αν ένα νεογέννητο τραφεί για μεγάλο χρονικό διάστημα με γάλα φτωχό σε λιπαρά και συγκεκριμένα στο λινελαϊκό (ω-3) και το λινολενικό οξύ (ω-6), θα εμφανίσει προβλήματα ανάπτυξης και σοβαρές δερματίτιδες. Αυτά τα δύο μάλιστα ανήκουν στα απαραίτητα λιπαρά οξέα, δηλαδή σε αυτά που ο άνθρωπος έχει ανάγκη αλλά δεν μπορεί να τα συνθέσει. Χάρη στο λίπος επίσης, προστατεύονται όργανα του σώματος από τυχόν χτυπήματα. Πρακτική εφαρμογή έχουν και στη μόνωση σε διεπιφάνειες, αφού προσφέρουν στεγάνωση, αλλά και στη λίπανση. Επιπλέον, συνεισφέρουν στην πλευστότητα των θηλαστικών της θάλασσας και στη μετάδοση υπερηχητικών μηνυμάτων μεταξύ τους, καθώς και στην αναπαραγωγή των εντόμων, αφού αποτελούν συστατικό κάποιων φερομονών (X. Han & W. W. Christie, 2010). Σημαντικό ρόλο στον οργανισμό κατέχουν και οι προσταγλαδίνες, οι οποίες αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία των λιπαρών και δρουν ως αγγελιαφόροι μηνυμάτων στο νευρικό σύστημα.

Τα λιπίδια κατέχουν σημαντικό ρόλο και ως συστατικό των τροφίμων (Πίνακας 1) καθώς συμβάλουν στα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά, βελτιώνοντας τη γεύση και την υφή και συνεισφέροντας στη δομή τους (C. T. Strigley, 2017) (Πίνακας 2) (EUFIC, Functions, Classification And Characteristics Of Fats, 2014). Τα λιπίδια χαρίζουν μια ευχάριστη και κρεμώδη υφή στο στόμα (mouthfeel). Επίσης, έχουν την ιδιότητα να διαλύουν αρωματικές ουσίες και πρόδρομες ενώσεις που χαρίζουν χαρακτηριστικό άρωμα στο τρόφιμο. Σε ορισμένες περιπτώσεις δρουν και ως γαλακτωματοποιητές, δηλαδή ενώσεις που καθιστούν δυνατή την ανάμιξη λιπαρής και υδατικής φάσης (Belitz H.D., Grosch W., Schieberle, 2014). Παράλληλα, οι λιπαρές ύλες επιτείνουν τη διάρκεια ζωής στο ράφι αφού δεσμεύουν και συγκρατούν την περιεχομένη υγρασία του τροφίμου (EUFIC, Functions, Classification And Characteristics Of Fats, 2014).

*Πίνακας 2 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν τα λιπίδια στα τρόφιμα
Τροποποιήθηκε από (EUFIC, Functions, Classification And Characteristics Of Fats, 2014)*

| ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ | ΣΚΟΠΟΣ | ΕΞΗΓΗΣΗ |
|---------------------|----------------------|--|
| Ενσωμάτωση αέρα | Βελτίωση υφής | Τρόφιμα όπως κέικ ή mousse απαιτούν ενσωματωμένο αέρα. Αυτό επιτυγχάνεται με την παγίδευση φυσαλίδων αέρα στο μίγμα ζάχαρης-λιπιδίων ώστε να σχηματιστεί σταθερός αφρός. |
| Επικάλυψη | Τραγανή υφή | Επικάλυψη ζυμών και μπισκότων ώστε να μην απορροφούν υγρασία |
| Flakiness | Δημιουργία στρώσεων | Βοηθά στο διαχωρισμό των στρωμάτων γλουτένης και αμύλου. Κατά τη θέρμανση δημιουργούνται κενά με αέρα μεταξύ των στρωμάτων εξαιτίας της λιπαρής ύλης που λιώνει. Ως εκ τούτου οι παραγόμενοι υδρατμοί παγιδεύονται και ωθούν τη ζύμη να φουσκώσει (πχ σφολιάτες) |
| Μεταφορά θερμότητας | Ομοιόμορφο ψήσιμο | Σε επεξεργασίες τροφίμων όπως το τηγάνισμα, η θερμότητα μεταφέρεται εξίσου σε όλο το προϊόν προσφέροντας ομοιόμορφο ψήσιμο. |
| Διατηρησιμότητα | Αύξηση ζωής στο ράφι | Συγκράτηση υγρασίας |
| Glazing | Βελτίωση εμφάνισης | Προσδίδουν λαμπερή εμφάνιση στο τρόφιμο πχ sauce |

5. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

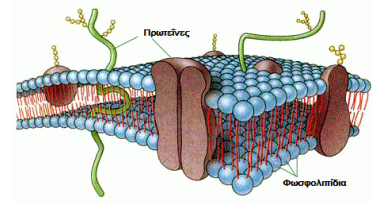
Με βάση τη δομή τους, τα λιπίδια ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: τα απλά (Πίνακας 3), τα σύνθετα (Πίνακας 4) και τα παράγωγα λιπίδια.

Τα απλά λιπίδια περιέχουν δύο είδη δομικών μονάδων και είναι γενικώς ουδέτερα. Σε αυτή την κατηγορία υπάγονται οι μονο-, δι- και τρι- ακυλογλυκερόλες οι οποίες αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης συνδεδεμένο αντίστοιχα με ένα έως τρία λιπαρά οξέα και αποτελούν το 98% των λιπαρών υλών των τροφίμων. Επίσης υπάγονται οι κηροί οι οποίοι είναι εστέρες που προκύπτουν από την αντίδραση μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων με ανώτερες αλκοόλες. Έχουν συνήθως άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα και συνεισφέρουν κυρίως στη λειτουργία της μόνωσης σε ζώα και έντομα (Wade, 2012) (McMurry, 2011). Επιπλέον προστατεύουν την επιφάνεια των φύλλων και των βλαστών από την αφυδάτωση και από προσβολή από μικροοργανισμούς. Οι κηροί είναι μεν λιποδιαλυτοί σε υψηλές θερμοκρασίες, αλλά σε θερμοκρασία δωματίου κρυσταλλώνουν προκαλώντας θόλωση του ελαίου (Belitz H.D., 2014). Ανάλογα με την προέλευσή τους, ταξινομούνται σε ζωικούς, φυτικούς και ορυκτούς. Σημαντική εφαρμογή βρίσκουν στην αύξηση της διάρκειας ζωής των φρούτων κατά την αποθήκευση, όταν προστίθενται στην επιφάνειά τους. Τέλος ως απλά λιπίδια χαρακτηρίζονται και οι εστέρες στερολών δηλαδή το προϊόν της σύνδεσης λιπαρού οξέος και στερόλης.

Πίνακας 3 Κατηγορίες απλών λιπιδίων και τα αντίστοιχα δομικά συστατικά

| ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΠΛΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ | ΔΟΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ |
|---------------------------------|----------------------------|
| Μονο-, Δι-, Τρι-ακυλογλυκερόλες | Λιπαρό οξύ, Γλυκερόλη |
| Κηροί | Λιπαρό οξύ, Λιπαρή αλκοόλη |
| Εστέρες στερόλης | Λιπαρό οξύ, Στερόλη |

Τα σύνθετα λιπίδια περιέχουν περισσότερα από δύο είδη δομικών μονάδων και εμφανίζουν πολικότητα. Κύριες υποκατηγορίες των σύνθετων λιπιδίων αποτελούν τα γλυκεροφωσfolιπίδια και τα σφιγγολιπίδια. Ο κύριος βιολογικός τους ρόλος είναι η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και η συγκράτηση των πρωτεϊνών, οι οποίες μεταφέρουν μηνύματα εντός και εκτός του κυττάρου. Τα γλυκεροφωσfolιπίδια περιέχουν ένα μόριο γλυκερόλης εστεροποιημένο με δύο μόρια λιπαρών οξέων, συνήθως με C₁₂-C₂₀ με το ένα μάλιστα να είναι κορεσμένο και το άλλο ακόρεστο, και ένα μόριο φωσφορικού οξέος (McMurry, 2011). Τα γλυκεροφωσfolιπίδια είναι ευαίσθητα στην αυτοξειδωση. Σ' αυτά ανήκουν οι κεφαλίνες (εστέρες της αιθανολαμίνης) και οι λεκιθίνες (εστέρες της χολίνης), οι οποίες, λόγω της πολικής κεφαλής και των άπολων αλυσίδων, δημιουργούν συσσωματώματα και λιπιδική διπλοστιβάδα (Εικόνα 2) (Wade, 2012). Εξωτερικά βρίσκεται η υδρόφιλη κεφαλή του μορίου και εσωτερικά της διπλοστιβάδας βρίσκεται το υδρόφοβο τμήμα (Εικόνα 1). Τα σφιγγολιπίδια διαθέτουν στο μόριο τους σφιγγοσίνη ή κάποια συγγενική διυδροξυαμίνη. Κυρίως βρίσκονται στον εγκέφαλο και σε νευρικούς ιστούς Η σφιγγομυελίνη συγκεκριμένα βρίσκεται στο περίβλημα των νευρικών ιστών και αποτελείται από κεραμίδιο και φωσφορυλοχολίνη.

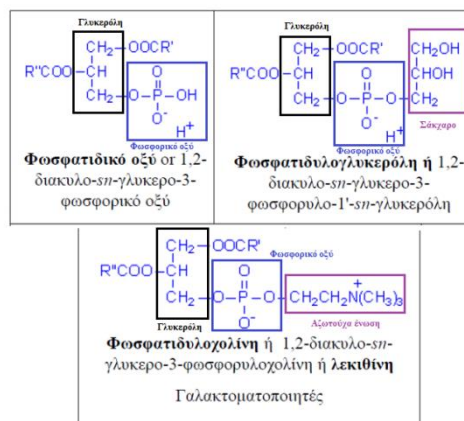


Εικόνα 1 Διπλοστιβάδα φωσfolιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη

Χημεία Τροφίμων, Belitz et al., 2014

Πίνακας 4 Πίνακας σύνθετων λιπιδίων και τα αντίστοιχα δομικά τους συστατικά

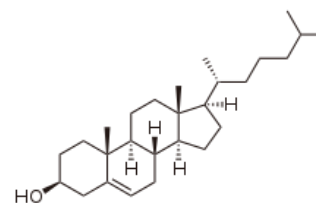
| ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ | ΔΟΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ |
|------------------------------|---|
| Γλυκεροφωσfolιπίδια | Εστέρες λιπαρών οξέων, Γλυκερόλη, Φωσφορικό οξύ+ Αζωτούχα ένωση/Σάκχαρο |
| Σφιγγολιπίδια | Λιπαρό οξύ, Σφιγγοσίνη, Φωσφορικό οξύ+ Αζωτούχα ένωση/Σάκχαρο |



Εικόνα 2 Παραδείγματα φωσfolιπιδίων

Τα παράγωγα λιπίδια συνήθως προέρχονται από απλά ή σύνθετα ή άλλα λιπίδια. Σε αυτή την κατηγορία υπάγονται τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, οι στερόλες, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K, καθώς και κάποιοι υδρογονάνθρακες, όπως το σκουαλένιο και τα καροτενοειδή (καροτένιο, ξανθοφύλλες). Άξια περαιτέρω αναφοράς είναι τα στεροειδή τα οποία περιέχουν ένα πολύ χαρακτηριστικό τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων. Συνήθως αποτελούν ορμόνες που εκκρίνονται από αδένες και μεταφέρονται με τη βοήθεια του αίματος. Είναι και αυτά βιοχημικοί ρυθμιστές όπως οι προσταγλαδίνες. Βασικό παράγωγο των στεροϊδών είναι οι στερόλες,

οι οποίες αποτελούνται από τρεις δακτυλίους έξι ατόμων άνθρακα και ένα δακτύλιο πέντε ατόμων άνθρακα που συνδέεται με μια αλειφατική αλυσίδα. Συναντώνται στα φυτά και στα ζώα, με κυριότερη ζωική στερόλη τη χοληστερόλη. Η συγκεκριμένη είναι πρόδρομη ουσία για την παραγωγή χολικών οξέων, ενώ η 7-δεϋδροχοληστερόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο της βιταμίνης D, η οποία παράγεται κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Παρόλα αυτά, υψηλή περιεκτικότητα της χοληστερόλης (Εικόνα 3) στο αίμα και ιδιαίτερα σε λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), θεωρείται υπεύθυνη για την άμβλυση των καρδιαγγειακών παθήσεων (Wikipedia)



Εικόνα 3 Μόριο της χοληστερόλης.

Παρατηρείται το σύστημα των τεσσάρων δακτυλίων που χαρακτηρίζει το σύστημα.

Τα λιπίδια με βάση την πολικότητά τους διακρίνονται σε ουδέτερα και σε πολικά. Όσο πιο μακριές είναι οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων που τα συνιστούν, τόσο μικρότερη και η πολικότητα του μορίου. Το γεγονός αυτό βασίζεται στη στερεοχημεία του μορίου. Η ανθρακική αλυσίδα είναι άπολη συνεπώς η πολικότητα των λιπιδίων οφείλεται στην ύπαρξη της εστερικής ομάδας. Η μεγάλη ανθρακική αλυσίδα παρεμποδίζει εξαιτίας του μεγέθους της τη δράση της πολικής εστερικής ομάδας. Αντίθετα, λιπαρά οξέα μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας τα οποία παρουσιάζουν μικρότερη στερεοχημική παρεμπόδιση της ανθρακικής αλυσίδας στην εστερική ομάδα, εμφανίζουν μεγαλύτερη πολικότητα. (Belitz H.D., 2014). Η ιδιότητα αυτή καθιστά δυνατή την διάλυση λιπιδίων σε διαφορετικούς διαλύτες, την προσρόφηση σε επιφάνειες, την αλληλεπίδραση με βιοπολυμερή και τη σταθεροποίηση των μορίων. Στα ουδέτερα ανήκουν τα λιπαρά οξέα με περισσότερους από 12 άνθρακες στην ανθρακική αλυσίδα, οι ακυλογλυκερόλες, οι κηροί, οι στερόλες και οι εστέρες τους, τα καροτενοειδή και οι τοκοφερόλες. Αντίθετα ως πολικά λιπίδια αναφέρονται τα γλυκεροφωσfolιπίδια, τα γλυκερογλυκολιπίδια, τα σφιγγοφωσfolιπίδια και τα σφιγγογλυκολιπίδια. Τέλος με βάση το προϊόν της αντίδρασης σαπωνοποίησης, δηλαδή της κατεργασίας με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) εν θερμώ, αξιολογούνται τα κλάσματα που προκύπτουν. Στην περίπτωση προϊόντων διαλυτών στο νερό, τα λιπίδια χαρακτηρίζονται ως σαπωνοποιούμενα. Συγκεκριμένα από τις ακυλογλυκερόλες παράγονται μετά νατρίου άλατα λιπαρών οξέων (σάπωνες) και γλυκερόλη, από τους κηρούς μετά νατρίου άλατα λιπαρών οξέων και λιπαρές αλκοόλες ενώ από τα φωσfolιπίδια προκύπτουν μετά νατρίου άλατα λιπαρών οξέων, γλυκερόλη ή σφιγγοσίνη, φωσφορικό νάτριο (Na_3HPO_4) και αμίνη ή ινοσιτόλη. Στην περίπτωση που παράγονται προϊόντα αδιάλυτα στο νερό και διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες, τότε τα λιπίδια χαρακτηρίζονται ως ασαπωνοποιήτα. Συνήθως το 0,2-1,5% των λιπών και των ελαίων ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Τέτοιες ενώσεις χαρακτηρίζονται οι στερόλες, οι υδρογονάνθρακες, τα καροτενοειδή, οι τοκοφερόλες και οι ανώτερες αλκοόλες.

5.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Ως δομικό συστατικό των λιπιδίων προαναφέρθηκαν κυρίως τα λιπαρά οξέα, δηλαδή μόρια με αλυσίδες υδρογονανθράκων που έχουν στο ένα άκρο τους μια καρβοξυλική ομάδα (Εικόνα 4). Η ύπαρξή τους στην ανθρώπινη διατροφή μπορεί να έχει είτε ευεργετικά αποτελέσματα αν πρόκειται για παράδειγμα για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, είτε ανεπιθύμητες συνέπειες όπως στην περίπτωση των κορεσμένων και των *trans* λιπαρών οξέων τα οποία συμβάλλουν σε σοβαρές καρδιαγγειακές ασθένειες (Moulin, 2016). Οι φυσικοχημικές

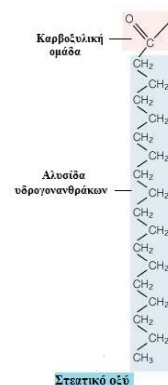
ιδιότητες των λιπιδίων, καθώς και η θρεπτική τους αξία, οφείλονται στα λιπαρά οξέα που τα αποτελούν (Ichihara, 2016).

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στα ζώα γίνεται στο κυτταρόπλασμα, στα φυτά στους χλωροπλάστες ή στα προπλαστίδια των ριζών και των σπερμάτων (Wikipedia, 2017). Αν και στη φύση είναι δυνατό να βρεθούν σε ελεύθερη, μη εστεροποιημένη δομή, πιο συχνά συναντώνται ως εστέρες, συνδεδεμένα με γλυκερόλη, χοληστερόλη ή κάποια αλειφατική αλκοόλη μακριάς αλυσίδας (W.W. Christie, 1993). Συνεπώς τα λιπαρά οξέα αποτελούν μέρος των τριακυλογλυκερολών και ως εκ τούτου δεν χαρακτηρίζονται ως ελεύθερα λιπαρά οξέα. Μάλιστα το ποσοστό αυτών στη λιπαρή ύλη αποτελεί κριτήριο ποιότητας.

Τα λιπαρά οξέα διαφέρουν στον αριθμό ατόμων άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας και ανάλογα με αυτόν μπορούν να χαρακτηριστούν ως μικρής (έως 5 άτομα C, SCFA), μεσαίας (6-12 άτομα C, MCFA), μακριάς (13-21 άτομα C, LCFA) ή πολύ μακριάς (περισσότερα από 22 άτομα C, VLCFA) αλυσίδας (EUFIC, 2014). Συνήθως βέβαια τα λιπαρά οξέα έχουν άρτιο αριθμό ανθράκων με κάποιες εξαιρέσεις όπως για παράδειγμα στα γαλακτοκομικά. Αυτά που προκύπτουν από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών συνήθως δεν είναι διακλαδισμένα και έχουν άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα από 12-20 (McMurtry, 2011).

Πίνακας 5 Κυριότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα τρόφιμα
Τροποποιήθηκε από Belitz et. al, 2014

| Συντομογραφικός Προσδιορισμός | Κοινή Ονομασία |
|-------------------------------|----------------|
| 14:0 | Μυριστικό οξύ |
| 16:0 | Παλμιτικό οξύ |
| 18:0 | Στεατικό οξύ |
| 18:1(9) | Ελαϊκό οξύ |
| 18:2(9,12) | Λινελαϊκό οξύ |
| 18:3(9,12,15) | Λινολενικό οξύ |



Εικόνα 4 Δομή λιπαρών οξέων

Στον Πίνακα 5 παρατίθενται τα κυριότερα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα τρόφιμα. Όπως παρατηρείται, τα λιπαρά οξέα προσδιορίζονται συντομογραφικά, αναφέροντας τον αριθμό ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα και τον αριθμό, τη θέση αλλά και τη διαμόρφωση των διπλών δεσμών που περιέχονται στο μόριο. Όλοι οι δεσμοί θεωρούνται *cis*, ενώ για τους *trans* γράφεται η ειδική επισήμανση “*tr*” (Belitz H.D., 2014).

Ταυτόχρονα υπάρχει και μια κοινή εμπειρική ονομασία για κάθε λιπαρό οξύ η οποία όμως δεν παρέχει πληροφορίες για τη δομή του μορίου. Συνήθως παρέχει πληροφορίες από την πηγή προέλευσης του λιπαρού οξέος. Στη βιβλιογραφία συναντάται και η συστηματική ονομασία κατά IUPAC.

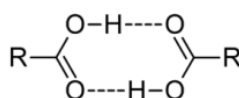
Η ονομασία λοιπόν προκύπτει από την προσμέτρηση των ανθράκων στο μόριο του λιπαρού οξέος. Στο συνολικό αριθμό των ανθράκων προσμετράται και ο άνθρακας της καρβοξυλικής ομάδας. Η ονομασία προκύπτει από τον μητρικό άνθρακα και αντικαθιστώντας την κατάληξη «-ιο» με την κατάληξη «-οϊκό οξύ». Η αρίθμηση ξεκινά από τον άνθρακα sp^2 στο άκρο του μορίου.

Με βάση την ακορεστότητα του μορίου δηλώνεται στην ονομασία η ύπαρξη ή μη των διπλών δεσμών. Στην περίπτωση που το λιπαρό οξύ είναι κορεσμένο, δηλαδή δεν υπάρχουν διπλοί δεσμοί στο μόριό του, προστίθεται η κατάληξη «-ανοϊκό οξύ». Ο διπλός δεσμός περιγράφεται στο όνομα του μορίου με την κατάληξη «-ενοϊκό οξύ». Εφόσον στο λιπαρό οξύ που ονοματίζεται υπάρχουν δύο, τρεις ή περισσότεροι δεσμοί, αντίστοιχα δηλώνεται στην κατάληξη «-διενοϊκό οξύ», «-τριενοϊκό οξύ», κ.ο.κ.

Αντίστοιχα στην ονοματολογία δηλώνεται και η θέση ακορεστότητας με το πρόθεμα *cis* ή *trans*. Ξεκινώντας την καταμέτρηση από τη λειτουργική ομάδα του λιπαρού οξέος, ορίζεται η ακριβής *x* θέση του

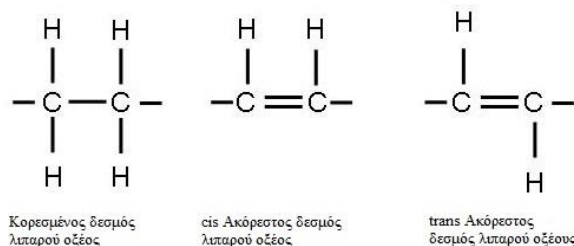
διπλού δεσμού με το πρόθεμα Δ^X . Εναλλακτικά ένα σύστημα ονοματολογίας που χρησιμοποιείται κατά κόρων από τους βιολόγους είναι με το πρόθεμα ω καθώς ομαδοποιεί τα λιπαρά οξέα με βάση της βιολογικές του ιδιότητες. Με το ω δηλώνεται η θέση του διπλού δεσμού ξεκινώντας την καταμέτρηση από τη μεθυλομάδα που βρίσκεται στο άκρο της αλυσίδας του μορίου. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα λιπαρά ω -3 (α -λινολενικό οξύ, EPA, DHA) τα οποία είναι απαραίτητα για τον οργανισμό του ανθρώπου. Εναλλακτικά συναντάται πιο συχνά πλέον η ονοματολογία n - x με n τον αριθμό των ανθράκων του λιπαρού οξέος και x τη θέση του διπλού δεσμού από τη μεθυλομάδα (S. Indelicato, 2017).

Γενικότερα, τα καρβοξυλικά οξέα τείνουν να δημιουργούν διμερή (Εικόνα 5) εξαιτίας των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων. Η διευθέτηση αυτή των μορίων δημιουργεί ένα τύπου κρυσταλλικό πλέγμα (πάκτωμα). Επιπλέον, ο όξινος χαρακτήρας των οξέων δημιουργείται κατά την απόσπαση του πρωτονίου της καρβοξυλομάδας και του σχηματισμού ενός ανιόντος, ενεργειακά σταθερού λόγω συντονισμού (Belitz H.D., 2014).



Εικόνα 5 Σχηματισμός διμερούς

Τα λιπαρά οξέα ταξινομούνται σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα ανάλογα με τον αριθμό διπλών δεσμών που περιέχουν στο μόριό τους (Εικόνα 6). Όσο αυξάνει ο αριθμός των διπλών δεσμών, τόσο πιο ευαίσθητο στην οξείδωση είναι το μόριο.



Εικόνα 6 Τύποι δεσμών που συναντώνται στα λιπαρά οξέα

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) δεν περιέχουν κανένα διπλό δεσμό. Αυτά που είναι ζωικής ή φυτικής προέλευσης είναι ευθύγραμμης αλυσίδας και συνήθως έχουν 14, 16 ή 18 άτομα άνθρακα. Όσο μικρότερος ο βαθμός ακορεστότητας του μορίου, τόσο αυξάνεται το σημείο τήξεως του και η χημική του αδράνεια (HAN, 2010).

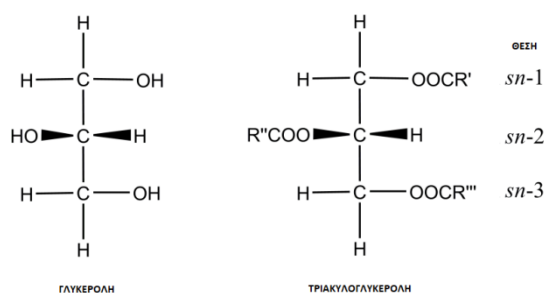
Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) περιέχουν μόνο έναν διπλό δεσμό. Χαρακτηρίζονται συνήθως από 10 έως 30 άτομα άνθρακα. Βρίσκονται σε *cis* ή *trans* ισομερή. Τα λιπαρά οξέα με γεωμετρία *cis* απαντώνται σε αφθονία στη φύση, ενώ τα αντίστοιχα *trans* ισομερή ανευρίσκονται είτε σε πολύ μικρές ποσότητες είτε παράγονται κατά την επεξεργασία των λιπαρών υλών.

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) περιέχουν περισσότερους από έναν διπλούς δεσμούς και γενικά χαρακτηρίζονται από χαμηλά σημεία τήξεως. Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των διπλών δεσμών που περιέχουν. Ξεχωρίζουν οι ομάδες ω -3, ω -6 εξαιτίας των ευεργετικών ιδιοτήτων τους. Σε αυτές ανήκουν αντίστοιχα οι οικογένειες λινολενικού και του λινελαϊκού οξέος (Belitz H.D., 2014). Να σημειωθεί πως το λινελαϊκό οξύ καθώς και το α -λινολενικό δεν βιοσυντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό, και επομένως η πρόσληψή τους μέσω της τροφής είναι πολύ σημαντική. Γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα λιπαρά οξέα (Belitz H.D., 2014).

Βιομηχανικά η *trans* διαμόρφωση προκύπτει κυρίως κατά την υδρογόνωση ελαίων και λιπών όπως στη μαργαρίνη στην οποία προστίθεται βουτυραλδεΐδη που προσδίδει γεύση βουτύρου (X. Han & W. W. Christie, 2010) (Wade, 2012) (McMurry, 2011). Βασικό λοιπόν είναι για τον καταναλωτή να γνωρίζει και να μπορεί να πληροφορηθεί μέσω της επισήμανσης στη συσκευασία για την περιεκτικότητα και τα είδη των λιπαρών σε ένα τρόφιμο, ώστε να μπορεί να κάνει σωστές και υγιεινές επιλογές τροφίμων για τον ίδιο (Srigley C. T., 2017).

5.2 ΤΡΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΕΣ

Οι τριακυλογλυκερόλες (ή τριγλυκερίδια: ο όρος αυτός πλέον δεν ενδείκνυται) προκύπτουν κατά τη σύνδεση λιπαρών οξέων με γλυκερόλη και θεωρούνται ουδέτερα λιπίδια (Εικόνα 7). Τα τρία λιπαρά οξέα μπορεί να είναι όμοια ή και διαφορετικά μεταξύ τους. Ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των ακυλογλυκερολών, και βρίσκονται σε αφθονία στη φύση. Στα τρόφιμα μάλιστα περισσότερο από το 98% των λιπαρών οξέων βρίσκονται με τη μορφή των τριακυλογλυκερολών.



Εικόνα 7 Προβολή κατά Fischer της γλυκερόλης και του αντίστοιχου μορίου τριακυλογλυκερόλης.

Η κάθε τριακυλογλυκερόλη μπορεί να διαφέρει από μια ομόλογη της ως προς τη στεreoχημεία. Η διάκριση αυτή οφείλεται στη διαφορετική σύνδεση των λιπαρών οξέων με τον κορμό της γλυκερόλης (Buchgraber, 2004).

Από την επιτροπή της UPAC-IUB προτείνεται η *sn*-ονοματολογία με βάση τη στεreoχημική αρίθμηση και τις προβολές Fisher των μορίων. Όταν αντικατασταθεί το υδρογόνο της υδροξυλομάδας από κάποια άλλη ομάδα, μπορεί να διατηρεί το όνομα του αρχικού μορίου και το όνομα του υποκαταστάτη να εισαχθεί ως πρόθεμα στην ονομασία του μορίου με την κατάληξη «-οΐλο». Γενικότερα η ονοματολογία των τριακυλογλυκερολών συνδέεται άμεσα με τα λιπαρά οξέα των μορίων τους (S. Indelicato, 2017). Συχνά δηλώνεται το αντίστοιχο λιπαρό οξύ με κάποιο χαρακτηριστικό του γράμμα (π.χ. Ρ παλμιτικό οξύ, Ο ελαϊκό οξύ) και η κατάληξη «-ίνη».

Ο αριθμός Z περιγράφει όλες τις πιθανές διαφορετικές τριακυλογλυκερόλες οι οποίες μπορούν να υπάρξουν σε ένα έλαιο, με η τον αριθμό των αριθμό των λιπαρών οξέων που προσδιορίστηκαν (Belitz H.D., 2014):

$$Z = \frac{n^3 + n^2}{2} \quad \text{Εξίσωση 1}$$

Από στεreoχημικής άποψης η θέση των λιπαρών οξέων στην τριακυλογλυκερόλη επηρεάζει σημαντικά την βιοδιαθεσιμότητά τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά τη διαδικασία της πέψης των

τριακυλογλυκερολών στο λεπτό έντερο και με τη δράση της παγκρεατικής λιπάσης, απελευθερώνονται τα λιπαρά οξέα στις θέσεις *sn*-1 και *sn*-3. Ως εκ τούτου προκύπτουν δύο ελεύθερα λιπαρά οξέα και μία *sn*-2-μονοακυλογλυκερόλη. Στην περίπτωση κορεσμένων μεγάλου μοριακού βάρους απελευθερούμενων λιπαρών οξέων, σχηματίζονται αδιάλυτα άλατα ασβεστίου τα οποία επηρεάζουν λιγότερο το λιπιδικό προφίλ του αίματος.

Οι ιδιότητες των τριακυλογλυκερολών εξαρτώνται από τη σύσταση των λιπαρών οξέων που απαντώνται στο μόριό τους. Για παράδειγμα, η ύπαρξη ακόρεστων λιπαρών οξέων παρεμποδίζει τη διατεταγμένη διεύθετηση των μορίων στο χώρο, με αποτέλεσμα να μειώνεται το σημείο τήξης σε σχέση με τα κορεσμένα (Belitz H.D., 2014). Ο μεγάλος αριθμός τριακυλογλυκερολών οφείλεται στην ποικιλία λιπαρών οξέων και στον τρόπο σύνδεσης αυτών με τη γλυκερόλη αλλά και στα αντίστοιχα στερεοϊσομερή (S. Indelicato, 2017).

6. ΒΑΣΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Λιπίδια όπως οι τριακυλογλυκερόλες αντιδρούν με πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, σε βασικές και σε όξινες συνθήκες. Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιούνται αντιδράσεις πυρηνόφιλης άκυλο υποκατάστασης με μηχανισμό προσθήκης - απόσπασης. Ο Wade αναφέρει αυτολεξεί πως η δραστηριότητα των οξέων ως προς την πυρηνόφιλη προσβολή, εξαρτάται από τη δομή τους και τη φύση του προσβάλλοντος πυρηνόφιλου. Ως προς τις ιδιότητες τους, το αντιδρών και το προϊόν διαφέρουν σημαντικά. Ανάλογα με την αλληλεπίδραση του μορίου με την αποχωρούσα ομάδα και με τη σταθερότητα του προϊόντος που προκύπτει κατά την αντίδραση, ευνοείται περισσότερο ή λιγότερο η αντίδραση που λαμβάνει χώρα.

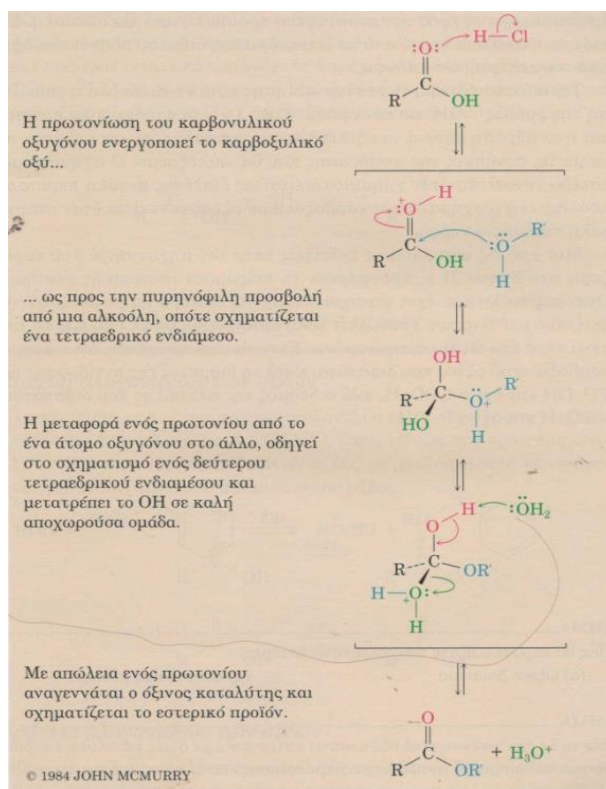
Τα λίπη και τα έλαια αποτελούνται > 98% από τριακυλογλυκερόλες, συνεπώς μελετώνται και αυτά με την ευρύτερη κατηγορία των εστέρων. Περιέχουν στο μόριο τους τρία λιπαρά οξέα, γεγονός που προσδίδει μεγάλο μοριακό βάρος και χαμηλή πτητικότητα. Κατά τη μετεστεροποίηση με βασική κατάλυση όμως, προκύπτουν τρεις μεθυλεστέρες χαμηλότερου μοριακού βάρους και πολύ πτητικότεροι. Η τακτική αυτή χρησιμοποιείται για παράδειγμα κατά τη μετατροπή μαγειρικών λαδιών σε καύσιμο βιοντίζελ (Wade, 2012). Ευρεία εφαρμογή έχει και κατά την ανάλυση λιπών και ελαίων με αέρια χρωματογραφία (GC).

6.1 ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ

Τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε εστέρες μέσω της αντίδρασης εστεροποίησης κατά Fisher (Εικόνα 8). Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζεται ως πυρηνόφιλη άκυλο υποκατάσταση μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος και μιας αλκοόλης. Κατά τη θέρμανση λοιπόν του οξέος σε αλκοολούχο διάλυμα και παρουσία όξινου καταλύτη προκύπτει εστέρας.

Σύμφωνα με τον McMurry, η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου ενεργοποιεί το καρβοξυλικό οξύ ως προς την πυρηνόφιλη προσβολή από μια αλκοόλη και σχηματίζεται το ενδιάμεσο προϊόν, το οποίο έχει τετραεδρική δομή. Το προϊόν αυτό μετασχηματίζεται σε δεύτερο ενδιάμεσο κατά την μεταφορά ενός πρωτονίου από το ένα άτομο του οξυγόνου στο άλλο. Με αυτόν τον τρόπο η υδροξυλομάδα μετατρέπεται σε καλή αποχωρούσα ομάδα. Τέλος, αποσπάται ένα πρωτόνιο οπότε σχηματίζεται ξανά ο όξινος καταλύτης και σχηματίζεται ο εστέρας. Ο μηχανισμός που περιγράφεται, φαίνεται και στη συνέχεια στην Εικόνα 8.

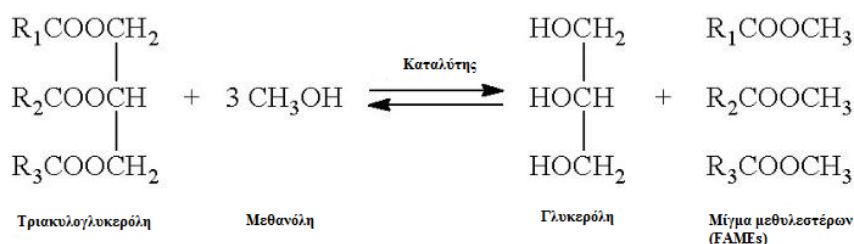
Η παρουσία του όξινου καταλύτη συνεισφέρει στην ενεργοποίηση του καρβοξυλικού οξέος, καθώς αυξάνει τη δραστηριότητά του. Η αντίδραση είναι αμφίδρομη σε όλα τα στάδια. Συνεπώς, με την προσθήκη αλκοόλης ευνοείται η παραγωγή του εστέρα, ενώ με περίσσεια νερού η αντίδραση αντιστρέφεται.



Εικόνα 8 Εστεροποίηση κατά Fischer
 Λήφθηκε από McMurry, 2011

6.2 ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ

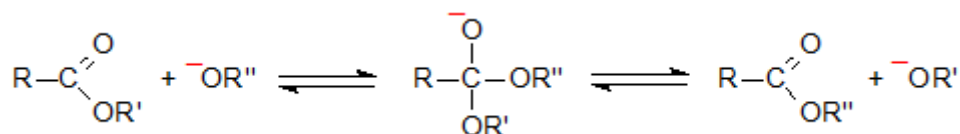
Η μετεστεροποίηση μπορεί να συμβεί είτε σε όξινες είτε σε βασικές συνθήκες, όπου μία αλκοξυ-ομάδα αντικαθιστά μία άλλη. Η προσθήκη ή η αφαίρεση αλκοόλης οδηγεί στον επιθυμητό εστέρα και η ισορροπία αποκαθίσταται. Συνεπώς πρόκειται για μία αναστρέψιμη διαδικασία (Wade, 2012). Σχετικά με τον ορισμό της μετεστεροποίησης, βιβλιογραφικά φαίνεται να μην έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Οι Kirk-Othmer, Christie και Clark-Hawley θεωρούν πως ο όρος μετεστεροποίηση (transesterification) υποδιαιρείται σε τρεις κατηγορίες, την ανταλλαγή εστέρα-οξέος, την ανταλλαγή εστέρα-αλκοόλης και την ανταλλαγή εστέρα-εστέρα μεταξύ των αντιδρώντων μορίων, ενώ οι Bailey, Markley και Gustone θεωρούν ότι αναφέρεται μόνο στην ανταλλαγή εστέρα-εστέρα (Bannon J. et al., 1982). Ουσιαστικά πρόκειται για τη μετατροπή των ελαίων και των λιπών, δηλαδή των εστέρων της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα, σε μονοεστέρες μικρότερης μοριακής μάζας και μεγαλύτερης πτητικότητας, ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Τα λιπίδια μετατρέπονται στους αντίστοιχους εστέρες λιπαρών οξέων, συνήθως μεθυλεστέρες (FAMES: fatty acid methyl esters), και έπειτα εισάγονται στον αεριοχρωματογράφο. Μάλιστα ο σχηματισμός των μεθυλεστέρων αποτελεί κρίσιμο στάδιο. Παράγοντες, όπως η μη πλήρης (ποσοτικά) μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες, σημαντικές μεταβολές στη δομή και την γεωμετρία των μορίων και η παραγωγή παρεμποδίζοντων παραπροϊόντων, είναι πιθανό να συμβούν και να έχουν αντίκτυπο στον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στο δείγμα. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται βασικός ή όξινος καταλύτης σε περίσσεια μεθανολικού μέσου τότε προκύπτει γλυκερόλη και ένα μίγμα μεθυλεστέρων, ανάλογο των αρχικών λιπαρών οξέων που συμμετέχουν στο αντιδρών μόριο της τριακυλογλυκερόλης (X. Han & W. W. Christie, 2010). Η αντίδραση αυτή ονομάζεται μεθυλίωση ή διαμεθυλίωση (Εικόνα 9). Η πιο συχνά εφαρμοζόμενη τεχνική μεθυλίωσης είναι με μεθοξείδιο του νατρίου ή με τριφθοριούχο βόριο. Οι πρώτες αναφορές για τη συγκεκριμένη μέθοδο ξεκινούν μάλιστα από το 1961, ενώ το 1966 εγκρίθηκε από την AOCS (Bannon J. et al., 1982).



Εικόνα 9 Αντίδραση μεθυλίωσης μιας τριακυλογλυκερόλης

6.3 ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΒΑΣΕΙΣ

Η μετεστεροποίηση που καταλύεται από βάσεις αποτελείται από δύο στάδια, την προσθήκη του πυρηνόφιλου και την απόσπαση της αποχωρούσας ομάδας (μηχανισμός προσθήκης-απόσπασης). Ουσιαστικά πρόκειται για μία αντίδραση πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης. Οι μέθοδοι αυτές είναι πιο ταχείες και πιο απλές σε σχέση με της όξινης κατάλυσης. Το ιόν αλκοξειδίου είναι ισχυρά πυρηνόφιλο και προσβάλλει τον άνθρακα της καρβονυλομάδας του εστέρα. Σχηματίζεται ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Αποσπάται και σχηματίζεται μία νέα αλκοόλη, ενώ παράλληλα σχηματίζεται ένας νέος εστέρας όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10 (Wade, 2012) (W.W. Christie).



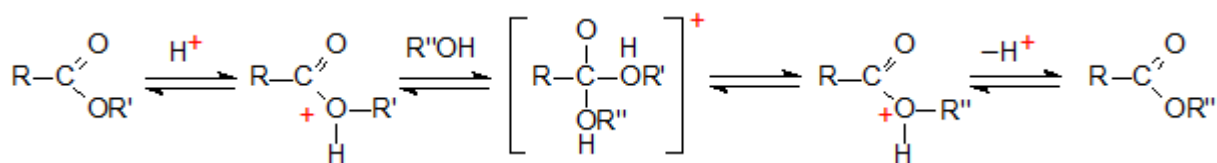
Εικόνα 10 Μετεστεροποίηση λιπιδίων καταλύομενη από βάσεις, Christie 2010

Οι ακυλογλυκερόλες και τα γλυκεροφωσfolιπίδια μετεστεροποιούνται ταχέως παρουσία άνυδρης μεθανόλης και βασικού καταλύτη, συνήθως μεθοδείξιο του νατρίου. Η αλκοόλη (π.χ. μεθανόλη) θα πρέπει να βρίσκεται σε περίσσεια ώστε να οδηγηθεί η αντίδραση προς την επιθυμητή κατεύθυνση (σχηματισμός εστέρα) (Bannon J. et al., 1982) (W.W. Christie). Στην περίπτωση που υπάρχει νερό αντί της αλκοόλης, η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι υδρόλυση και όχι μετεστεροποίηση. Συνεπώς θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην παρουσία νερού ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις (W.W. Christie). Η συγκεκριμένη τεχνική συνίσταται για ουδέτερα λιπίδια (Bannon J. et al., 1982). Επιπρόσθετα, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν εστεροποιούνται σε αλκαλικές συνθήκες, δεδομένου ότι σχηματίζεται το ανιόν του καρβοξυλικού οξέος (RCOO⁻), το οποίο δεν υπόκειται σε πυρηνόφιλη προσβολή λόγω του αρνητικού του φορτίου.

6.4 ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΟΞΕΑ

Η μετεστεροποίηση σε όξινες συνθήκες αποτελεί πιο πολύπλοκη διαδικασία εξαιτίας της πρόσθετης μεταφοράς πρωτονίων (Εικόνα 11). Αρχικά λαμβάνει χώρα πρωτονίωση του εστέρα και έπειτα προσθήκη της αλκοόλης προς σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Στη συνέχεια με την απόσπαση της αποχωρούσας

ομάδας, σχηματίζεται ένα δεύτερο ενδιάμεσο, και τέλος λαμβάνει χώρα αποπρωτονίωση προς παραγωγή του τελικού προϊόντος (Wade, 2012).



Εικόνα 11 Μετεστεροποίηση λιπιδίων καταλυόμενη από οξέα, Christie 2010

Η όξινα καταλυόμενη μεθυλίωση λειτουργεί αποδοτικά σχεδόν σε όλες τις κατηγορίες λιπιδίων αν και μελέτες έχουν επιστήσει την προσοχή στην περίπτωση των συζυγιακών διενίων που ισομερίζονται. Επιπρόσθετα ο Krammer αναφέρει πως στην εφαρμογή σε γαλακτοκομικά προϊόντα σχηματίστηκαν αλλυλικά μεθοξυ-σύμπλοκα και συνεπώς δεν συστήνεται για ανάλογες εφαρμογές (J. Krammer, 1997). Στην περίπτωση των γαλακτοκομικών βέβαια δε συνίσταται καθώς βιβλιογραφικά αναφέρεται πως στο αποτέλεσμα υπερεκτιμάται το ποσοστό των *trans* ισομερών του 18:2 ενώ υποτιμάται των αντίστοιχων *cis* ισομερών του 18:2 (J. Krammer, 1997)(P. A. Golay, 2006). Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην ύπαρξη νερού κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης, αφού η παρουσία αυτού θα οδηγήσει σε υδρόλυση του ενδιάμεσου προς σχηματισμό οξέος (Christie., 2010).

6.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΥΤΗ

6.5.1 ΟΞΙΝΟΙ ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ

I. Μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου (HCl)

Το άνυδρο διάλυμα υδροχλωρίου 5% (w/v) σε μεθανόλη είναι αυτό που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην προετοιμασία των μεθυλεστέρων, σύμφωνα με τον Christie. Κύριο πλεονέκτημα του συγκεκριμένου αντιδραστήριου είναι ότι εστεροποιεί στον ίδιο βαθμό όλα τα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα όλα να αναλύονται εξίσου αποτελεσματικά, αν και η διαδικασία απαιτεί πολύ χρόνο. Δυσκολία αντιμετωπίζεται κατά τον προσδιορισμό κάποιων απλών λιπιδίων, όπως οι εστέρες της χοληστερόλης και οι τριακυλογλυκερόλες, τα οποία δεν διαλύονται στο ανωτέρω αντιδραστήριο και απαιτούν προηγουμένως την προσθήκη αδρανούς διαλύτη για την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Συνήθεις διαλύτες είναι το βενζόλιο (τοξικό- αποφεύγεται), τολουόλιο, χλωροφόρμιο, τετραϋδροφουράνιο και ο μεθυλο-*t*-βουτυλο-αιθέρας. Επίσης, έχει προταθεί και ο οξικός μεθυλεστέρας αν και η αντίδραση λαμβάνει χώρα με μικρότερο ρυθμό. Σύμφωνα με τον Christie, η παρουσία όξινων καταλυτών μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό διαφόρων παραπροϊόντων από την μεθανόλη αν υπερθερμανθεί το διάλυμα παρουσία οξυγόνου. Σε περιβάλλον αζώτου, ο κίνδυνος αυτός ελαχιστοποιείται. Ένυδρο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης, εφόσον προστεθεί διμεθοξυπροπάνιο για τη δέσμευση του νερού. Το διμεθοξυπροπάνιο σχηματίζει πολυμερή παραπροϊόντα, τα οποία παρεμποδίζουν την ανάλυση (W.W. Christie).

II. Μεθανολικό διάλυμα θεικού οξέος (H₂SO₄/CH₃OH)

Αντίστοιχα μπορεί να λειτουργήσει και το θεικό οξύ σε μεθανόλη σε συγκεντρώσεις 1 έως και 2%, με παρόμοιους χρόνους αντίδρασης. Και σε αυτή την περίπτωση απαιτείται κάποιος αδρανής διαλύτης για την

διαλυτοποίηση των λιπιδίων. Σε μεγαλύτερη συγκέντρωση το θειικό οξύ αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό μέσο με αποτέλεσμα να καθίσταται ακατάλληλο για την ανάλυση των πολυακόρεστων λιπαρών (W.W. Christie).

III. Μεθανολικό διάλυμα τριφθοριούχου βόριου ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$)

Το τριφθοριούχο βόριο (οξύ κατά Lewis), στη μορφή του συμπλόκου συναρμογής με μεθανόλη, αποτελεί έναν δραστικό όξινο καταλύτη για την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων. Μπορεί να εφαρμοσθεί σε πολλές κατηγορίες λιπιδίων, ωστόσο απαιτούνται μεγαλύτεροι χρόνοι αντίδρασης και διαλυτής. Υπάρχουν ενδείξεις ότι παρατεταμένη αποθήκευση του αντιδραστήριου οδηγεί στο σχηματισμό διαφόρων παραπροϊόντων. Γενικώς, το αντιδραστήριο έχει περιορισμένο χρόνο ζωής και πρέπει να φυλάσσεται υπό ψύξη. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο χρησιμοποιείται ευρέως σε μεθόδους της IUPAC και AOCS.

6.5.2 ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ

I. Μεθοξείδιο του νατρίου ή καλίου σε άνυδρη μεθανόλη $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ή $\text{KOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$

Το πιο σύνηθες αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το μεθοξείδιο του νατρίου 0,5 M έως 2M σε άνυδρη μεθανόλη. Ο τρόπος παρασκευής είναι απλός με διάλυση μεταλλικού νατρίου σε ξηρή μεθανόλη. Το διάλυμα διατηρείται υπό ψύξη για μερικούς μήνες, αν και σταδιακά απορροφά διοξείδιο του άνθρακα από την ατμόσφαιρα το οποίο καταβυθίζεται ως ανθρακικό άλας. Ενδεχομένως να σχηματιστούν και άλλα παραπροϊόντα τα οποία δρουν παρεμποδιστικά κατά την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Για την αποφυγή τους προτείνεται η χρήση μεθανόλης από την οποία έχει εκδιωχθεί το οξυγόνο. Η εστεροποίηση λαμβάνει χώρα άμεσα και χαρακτηριστικά αναφέρεται πως οι τριακυλογλυκερόλες απαιτούν 2-5 λεπτά για να αντιδράσουν πλήρως. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και με το μεθοξείδιο του καλίου. Γενικότερα το μεθοξείδιο του καλίου είναι αντίστοιχης αποτελεσματικότητας με αυτό του νατρίου. Βέβαια η δραστηκότητά του με τη μεθανόλη είναι πιο έντονη (έντονα εξώθερμη αντίδραση) και γι' αυτό συνιστάται ιδιαίτερη προσοχή κατά την προετοιμασία του διαλύματος (W.W. Christie).

Σύμφωνα με τον Krammer, η χρήση NaOCH_3 σε συνδυασμό με HCl ή BF_3 , καθώς και η διαβίβαση του διαζωμεθανίου προηγουμένως είναι αυτή που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων του γάλακτος (J. Krammer, 1997).

II. Μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου ή του νατρίου KOH ή $\text{NaOH}/\text{CH}_3\text{OH}$

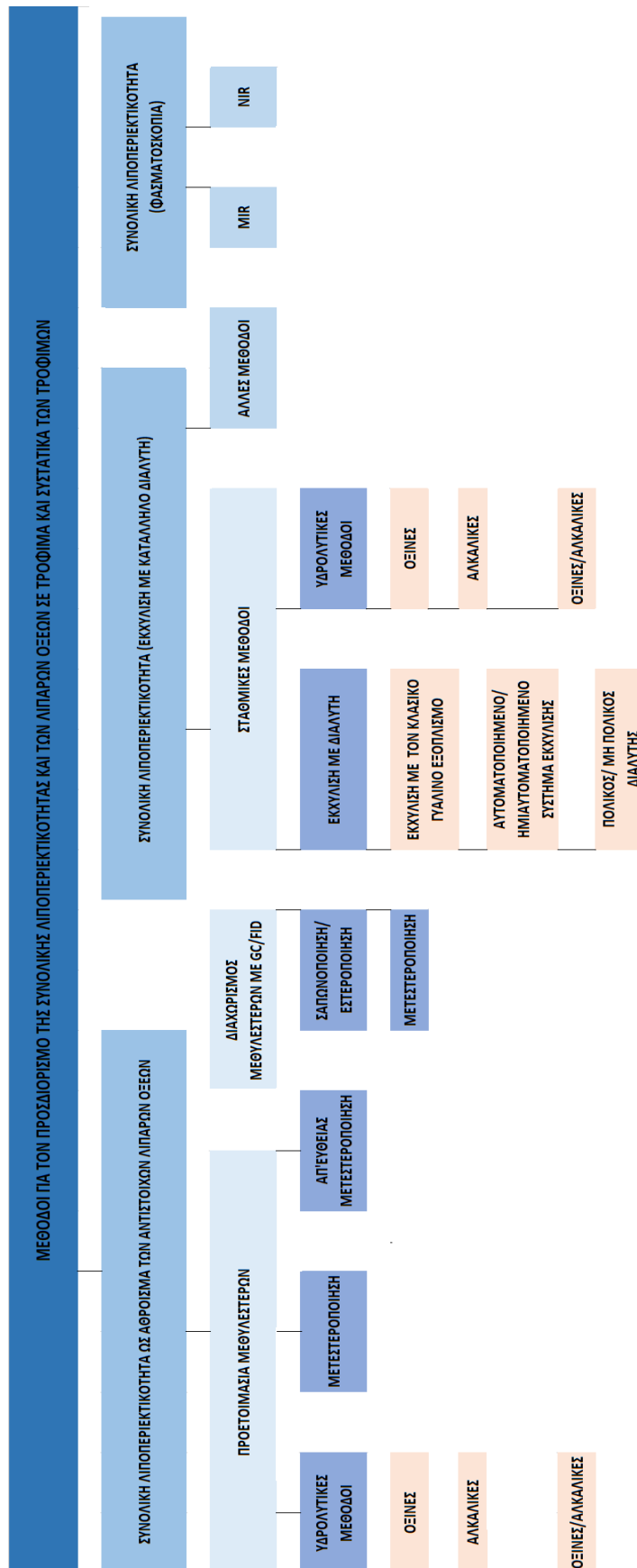
Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο το οποίο προτείνεται από διάφορες μεθόδους είναι το μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου ή του καλίου σε συγκεντρώσεις συνήθως από 0,5M έως 2M. Παρασκευάζεται με τη διάλυση των αντίστοιχων υδροξειδίων σε άνυδρη μεθανόλη. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι ισχυρά εξώθερμη και μάλιστα στην περίπτωση του καλίου αποφεύγεται εξαιτίας της επικινδυνότητας. Επιπλέον η μεθανόλη που χρησιμοποιείται θα πρέπει να είναι άνυδρη καθώς ακόμα και ίχνη νερού μετέπειτα είναι δυνατό να υδρολύσουν τους εστέρες. Το παρασκευασθέν διάλυμα είναι αρκετά σταθερό αν και με την πάροδο του χρόνου δύναται να αντιδράσει με το ατμοσφαιρικό διοξείδιο του άνθρακα, παράγοντας ανεπιθύμητες ουσίες που επηρεάζουν τη χρωματογραφική ανάλυση.

Η δραστηκότητα του συγκεκριμένου καταλύτη είναι ισχυρή. Οι τριακυλογλυκερόλες μετεστεροποιούνται πλήρως σε 2-5 λεπτά και η φωσφατιδυλοχολίνη σε μόλις 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Αντίστοιχες αντιδράσεις απαιτούν περισσότερο χρόνο για να πραγματοποιηθούν όταν χρησιμοποιούνται αλκοόλες

μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Ο Christie αναφέρει επίσης πως η αποτελεσματικότητα ως προς το χρόνο αντίδρασης αυξάνεται όταν διασπώνται τα απλά λιπαρά πριν την αντίδραση μετεστεροποίησης. Για αυτό το σκοπό προτείνει μάλιστα τη χρήση τολουολίου ή διχλωρομεθανίου και ως πιο βραδεία αντιδραστήρια το τετραυδροφουράνιο, το εξάνιο, το διαιθυλαιθέρα κ.ά.

7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Πλέον υπάρχει ένα μεγάλο εύρος αναλυτικών τεχνικών (Εικόνα 12) για τον προσδιορισμό του ολικού λίπους και των λιπαρών οξέων στα τρόφιμα και στα συστατικά των τροφίμων. Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται ανάλογα με το σκοπό που εξυπηρετούν. Στην περίπτωση των αναλύσεων ρουτίνας εφαρμόζονται κυρίως σταθμικές μέθοδοι, ενώ όπου απαιτείται επισημάνση πραγματοποιείται ανάλυση με αεριοχρωματογράφο (C. T. Srigley, 2017). Η επισημάνση των τροφίμων σχετικά με την περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων απαιτεί αξιόπιστες και οριζόντιες μεθόδους ανάλυσης, οι οποίες να μπορούν να προσδιορίσουν όσο το δυνατό μεγαλύτερο εύρος λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανόμενων και των αντίστοιχων ισομερών τους (Moulin, 2016). Σύμφωνα με τον FDA δεν προτείνεται κάποια συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορισμού, αλλά γίνονται αποδεκτά τα αποτελέσματα οποιασδήποτε μεθόδου παρουσιάζει ορθότητα και ικανοποιητική ακρίβεια. Τέτοιες μέθοδοι ονομάζονται επίσημες και έχουν αξιολογηθεί και διαπιστευθεί είτε εθνικά είτε παγκόσμια από οργανισμούς όπως AOAC, AOCS και ISO. Οι συγκεκριμένες παρουσιάζουν ακρίβεια, ευαισθησία, ορθότητα, ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και εφαρμόζονται σε συγκεκριμένα τρόφιμα (C. T. Srigley, 2017).



Εικόνα 12 Αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού ολικού λίπους και λιπαρών οξέων, Srigley 2017

Η ανάλυση των λιπιδίων αποτελεί πρόκληση εξαιτίας δυσκολιών που καλείται ο αναλυτής να αντιμετωπίσει. Τέτοιες είναι η μεγάλη ποικιλία των τροφίμων με συνέπεια οι υπάρχουσες μέθοδοι να μην είναι επαρκείς και εφαρμόσιμες για κάθε κατηγορία τροφίμων, η πολυπλοκότητα της σύστασης των λιπαρών οξέων και το μεγάλο εύρος των ειδών των λιπαρών οξέων που εμπεριέχονται στα τρόφιμα (Strigley C. T., 2017). Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως στην περίπτωση των τριακυλογλυκερολών, οι πιθανοί συνδυασμοί σύνδεσης των λιπαρών οξέων στη γλυκερόλη είναι τόσο πολλοί που καθιστούν την ανάλυση δύσκολη (Πίνακας 6). Στο λίπος του γάλακτος έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 400 λιπαρά οξέα με πιθανούς συνδυασμούς από τους οποίους προκύπτουν σχεδόν 64 χιλιάδες τριακυλογλυκερόλες (Buchgraber M. et al., 2004).

Πίνακας 6 Αριθμός τριακυλογλυκερολών στο λίπος από πιθανούς συνδυασμούς λιπαρών οξέων
 Τροποποιήθηκε από M. Buchgaberetal, 2004

| ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΡΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΩΝ | | |
|-------------|----------------------------|-------------------|------------------|
| | ΙΣΟΜΕΡΗ | ΟΠΤΙΚΑ ΙΣΟΜΕΡΗ | ΧΩΡΙΣ ΙΣΟΜΕΡΗ |
| 2 | 8 | 6 | 4 |
| 3 | 27 | 18 | 10 |
| 4 | 64 | 48 | 20 |
| 5 | 125 | 75 | 35 |
| 10 | 1000 | 550 | 220 |
| 20 | 8000 | 4200 | 1540 |
| 40 | 64000 | 32800 | 11480 |

Οι συμβατικές μέθοδοι προσδιορισμού λιπιδίων είναι ως επί το πλείστον σταθμικές και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του συνολικού λίπους ενός τροφίμου. Το ζήτημα με τις σταθμικές μεθόδους είναι ότι συχνά υποτιμούν το θερμιδικό περιεχόμενο του τροφίμου καθώς στη μάζα του εκχυλίσματος συμπεριλαμβάνονται συστατικά τα οποία δεν περιέχουν λιπαρά οξέα, όπως λιποδιαλυτές βιταμίνες, ασαπωνοποίητα συστατικά και κάποια μακρομόρια μη λιπιδικής φύσεως. Η σταθμική προσέγγιση είναι ουσιαστικά μια ανακριβής εκτίμηση της συνολικής λιποπεριεκτικότητας που βασίζεται στη συνολική μάζα του εκχυλίσματος από το δείγμα. Η εκχύλιση συνήθως πραγματοποιείται με τη χρήση μη πολικών διαλυτών σε συνθήκες reflux ή με το συνδυασμό ενός πολικού και ενός μη πολικού διαλύτη ώστε να αποφευχθούν αλληλεπιδράσεις με τη μήτρα του δείγματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της τελευταίας διαδικασίας αποτελεί η μέθοδος Bligh- Dyer. Εναλλακτικά βέβαια ο σταθμικός προσδιορισμός δύναται να λάβει χώρα σε δύο στάδια. Αρχικά το δείγμα υφίσταται υδρόλυση ώστε να διασπαστεί η μήτρα του και στη συνέχεια το περιεχόμενο λίπος εκχυλίζεται με κάποιο μη πολικό διαλύτη. Η υδρόλυση, όξινη ή βασική, με σκοπό να διασπαστούν οι δεσμοί των λιπιδίων με τους υδρογονάνθρακες, τις πρωτεΐνες, τους πολυσακχαρίτες ή και το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα τροφίμων φυτικής προέλευσης που ίσως παρεμποδίζει την ανάλυση. Στον ακόλουθο Πίνακα 7 παρουσιάζονται κάποιες μέθοδοι εκχύλισης καθώς και το υπόστρωμα στο οποίο εφαρμόζονται (C. T. Strigley, 2017). Αντίστοιχα στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται κάποιες μέθοδοι οι οποίες πραγματοποιούνται σε δύο στάδια. Παρατηρείται πως στα περισσότερα τρόφιμα πραγματοποιείται όξινη υδρόλυση ενώ στην περίπτωση των γαλακτοκομικών εφαρμόζεται αλκαλική στην περίπτωση των τυροκομικών προϊόντων ή συνδυασμός όξινης και αλκαλικής υδρόλυσης στα υπόλοιπα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ευαίσθητη φύση των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα συγκεκριμένα προϊόντα. Το λίπος των γαλακτοκομικών προϊόντων είναι αρκετά σύνθετο ως προς την ανάλυσή του εξαιτίας του αριθμού των λιπαρών οξέων που περιέχει. Αναφέρεται πως στα γαλακτοκομικά περιέχονται 30-40 κύρια λιπαρά οξέα και μυριάδες άλλα μικρότερης σημασίας όπως διακλαδισμένης αλυσίδας, οξο-, κετο- και υδρόξυ- λιπαρά οξέα που φτάνουν σε συνολικό αριθμό τα 400 (Golay

P., 2006) Με την προκατεργασία της υδρόλυσης καθιζάνουν τα ουδέτερα λιπίδια της μεμβράνης των λιποσφαιριδίων του γάλακτος (C. T. Srigley, 2017). Επιπρόσθετα μία ιδιαίτερη κατηγορία λιπαρών οξέων που παρουσιάζεται στα γαλακτοκομικά είναι κάποια συγκεκριμένα ισομερή *trans* λιπαρών οξέων όπως τα συζυγικά ισομερή του λινελαϊκού οξέος (Golay P., 2006).

Πίνακας 7 Σταθμικές μέθοδοι εκχύλισης ανά υπόστρωμα

| Μέθοδος | Υπόστρωμα εφαρμογής | Πρωτόκολλο Εκχύλισης | Οργανικός Διαλύτης |
|----------------------------|--|---|--|
| AOAC 920.39 ή AOAC 945.38F | Ζωοτροφές και μίγματα αυτών | Soxhlet | Άνυδρος διαιθυλαιθέρας |
| AOAC 938.06 | Βούτυρο | Εκχύλιση | Διαιθυλαιθέρας ή Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 948.22 | Ξηροί καρποί | Soxhlet | Διαιθυλαιθέρας |
| AOAC 960.39 | Κρέας | Soxhlet | Άνυδρος διαιθυλαιθέρας ή Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 985.15 | Κρέας και Πουλερικά | Αυτοματοποιημένη εκχύλιση με χρήση υπερήχων | Μεθυλενοχλωρίδιο |
| AOAC 991.36 | Κρέας και Κρεατοσκευάσματα | Randall/Soxtec | Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 2003.05 | Ζωοτροφές και Σιτηρά | Αυτοματοποιημένη/ Ημιαυτοματοποιημένη εκχύλιση (Randall/Soxtec) | Άνυδρος διαιθυλαιθέρας |
| AOAC 2003.06 | Ζωοτροφές και Σιτηρά | Αυτοματοποιημένη/ Ημιαυτοματοποιημένη εκχύλιση (Randall/Soxtec) | Εξάνιο |
| AOCS Am 5-04 | Ελαιούχοι σπόροι, κρέας, ζωοτροφές και τρόφιμα | Αυτοματοποιημένη/ Ημιαυτοματοποιημένη εκχύλιση | Πετρελαϊκός αιθέρας |

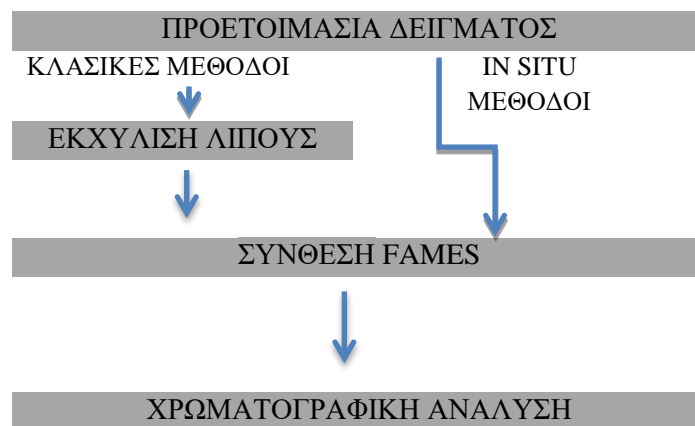
Πίνακας 8 Σταθμικές μέθοδοι προσδιορισμού λίπους που πραγματοποιούνται σε δύο στάδια

| Μέθοδος | Υπόστρωμα εφαρμογής | Πρωτόκολλο Υδρόλυσης | Οργανικός Διαλύτης |
|--------------|--|----------------------|-------------------------------------|
| AOAC 922.06 | Αλεύρι | Όξινη | Διαιθυλαιθέρας/Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 925.12 | Ζυμαρικά | Όξινη | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 925.32 | Αυγά | Όξινη | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 945.44 | Μπάρες με σύκα και κράκερς με σταφίδες | Όξινη | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 948.15 | Θαλασσινά | Όξινη | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 950.54 | Dressings | Όξινη | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 963/15 | Κακάο | Όξινη | Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 920.115 | Ζαχαρούχο συμπυκνωμένο γάλα | Βασική | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 932.06 | Σκόνη γάλακτος | Βασική | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 989.05 | Γάλα | Βασική | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
| AOAC 933.05 | Τυρί | Όξινη και Βασική | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |

| | | | |
|-------------|-------------------------|--------|-------------------------------------|
| AOAC 986.25 | Σκόνη βρεφικού γάλακτος | Βασική | Διαιθυλαιθέρας /Πετρελαϊκός αιθέρας |
|-------------|-------------------------|--------|-------------------------------------|

Υπάρχουν βέβαια και κάποιες φασματοσκοπικές μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται σε συγκεκριμένες μήτρες τροφίμου. Το πλεονέκτημα των συγκεκριμένων μεθόδων είναι ότι προσδιορίζουν ταυτόχρονα όλα τα κύρια συστατικά του τροφίμου (λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, υγρασία και τέφρα). Οι μέθοδοι υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) οι οποίες είναι οι πιο συχνά εφαρμοζόμενες βασίζονται στο νόμο Beer – Lambert και είναι γρήγορες, μη καταστροφικές για το τρόφιμο και απαιτούν ελάχιστη ή και καθόλου προετοιμασία του δείγματος (C. T. Srigley, 2017).

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της λιποπεριεκτικότητας με αέρια χρωματογραφία περιλαμβάνουν αρχικά το στάδιο της εκχύλισης των λιπιδίων και έπειτα τη μετατροπή τους σε FAMES. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι απευθείας μεθυλίωσης, οι οποίες συνδυάζουν τα παραπάνω δύο στάδια (εκχύλιση, μεθυλίωση) σε ένα (Εικόνα 13). Κατόπιν, οι FAMES αναλύονται με αέρια χρωματογραφία όπου και διαχωρίζονται με βάση το μήκος της αλυσίδας τους, το βαθμό ακορεστότητας, και τη γεωμετρία των διπλών δεσμών. Ο αεριοχρωματογράφος με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID) χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Μάλιστα αναφέρεται πως τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθόδου παρουσιάζουν μεγάλη ακρίβεια σε σχέση με τις παλιότερες συμβατικές σταθμικές μεθόδους (C. T. Srigley, 2017). Παράμετροι όπως το μήκος της στήλης, η στατική φάση και οι συνθήκες λειτουργίας επηρεάζουν τη σταθερότητα των PUFAs και συνεπώς των *cis* και *trans* ισομερών τους (J. Salimon, 2013). Γενικώς, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ευπαθή με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται ευκόλως η συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων τους. Ως εκ τούτου, η βαθμονόμηση με ποσοτικά πρότυπα για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, πιθανώς να μην εξάγει αξιόπιστα αποτελέσματα. Αυτός είναι ο λόγος άλλωστε που κάποιοι αναλυτές βασίζονται στη χρήση θεωρητικών συντελεστών απόκρισης (Schreiner, 2005). Ανατρέχοντας κανείς στη βιβλιογραφία, βρίσκει διαθέσιμες αρκετές μεθόδους AOAC οι οποίες εφαρμόζονται σε συγκεκριμένες μήτρες τροφίμων και αναλύονται σε αεριοχρωματογράφο. Ειδική περίπτωση αποτελεί η AOAC 996.06. Η συγκεκριμένη υποδιαιρείται σε τρεις βασικές κατηγορίες ανάλογα με το υπόστρωμα που αναλύεται. Επισημαίνεται λοιπόν πως ανάλογα το υπόστρωμα, θα πρέπει να αξιολογείται κατάλληλα το δείγμα. Δεν είναι δυνατό με βάση τις υπάρχουσες, επίσημες μεθόδους να εφαρμοσθεί μία μέθοδος σε οποιοδήποτε δείγμα τροφίμου.



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση ανάλυσης λιπαρών οξέων δείγματος

7.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Τα δείγματα πρέπει να προετοιμαστούν κατάλληλα με σκοπό να διαχωριστούν ποσοτικά τα λιπίδια από τα υπόλοιπα συστατικά του αναλυόμενου υποστρώματος, όπως αμινοξέα, υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες,

χωρίς να υποβαθμιστούν ποιοτικά και ποσοτικά και χωρίς να υπάρξει επιμόλυνση του δείγματος με ξένες ουσίες (D. S. Nichols, T. Jordan, N. Kerr, 2011). Το στάδιο της προετοιμασίας βρίσκει μεγάλη εφαρμογή σε πολλές μεθόδους, κάποιες από τις οποίες παρατίθενται και στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9 Μέθοδοι που απαιτούν προετοιμασία πριν τη μεθύλιωση

| Μέθοδος | Υπόστρωμα Εφαρμογής | Χημική Αντίδραση | Καταλύτης Μεθύλιωσης |
|---------------|--|--|--------------------------------|
| AOAC 969.33 | Ζωικά και Φυτικά Λίπη και έλαια | Σαπωνοποίηση/ Εστεροποίηση | BF ₃ |
| | Λιπαρά οξέα | Εστεροποίηση | BF ₃ |
| AOAC 996.01 | Δημητριακά με 0.5-13% συν. λίπος | Όξινη υδρόλυση/ Εστεροποίηση | NaOH/ BF ₃ |
| AOAC 996.06 | Τρόφιμα εκτός γαλακτοκομικών και τυριού | Όξινη υδρόλυση/ Εστεροποίηση | BF ₃ |
| | Γαλακτοκομικά | Βασική υδρόλυση/ Εστεροποίηση | BF ₃ |
| | Τυρί | Όξινη και Βασική υδρόλυση/ Εστεροποίηση | BF ₃ |
| AOAC 2012.13 | Γαλακτοκομικά, Σκόνη βρεφικού γάλακτος | Μετεστεροποίηση | CH ₃ Ona |
| AOCS Ce 2b-11 | Μήτρες που δεν απαιτούν όξινη προκατεργασία | Σαπωνοποίηση/ Εστεροποίηση | NaOH/ BF ₃ |
| AOCS Ce 2c-11 | Μήτρες που απαιτούν όξινη προκατεργασία | Όξινη υδρόλυση/ Σαπωνοποίηση/ Εστεροποίηση | NaOH/ BF ₃ |
| AOCS Ce 2-66 | Λιπαρά οξέα | Εστεροποίηση | BF ₃ |
| | Κοινά λίπη και έλαια | Σαπωνοποίηση/ Εστεροποίηση | NaOH/ BF ₃ |
| | Λίπη και έλαια με οξύτητα <2% | Μετεστεροποίηση | KOH |
| ISO 5509 | Λίπη και έλαια ζωικής και φυτικής προέλευσης, λιπαρά οξέα, σάπωνες | Σαπωνοποίηση/ Εστεροποίηση | NaOH/ BF ₃ |
| | Λίπη και έλαια ζωικής και φυτικής προέλευσης, Λιπαρή ύλη γάλακτος | Μετεστεροποίηση | Υδροξείδιο τριμεθυλοσουλφονίου |
| | Λίπη και έλαια ζωικής και φυτικής προέλευσης με οξύτητα ελεύθ. λιπαρών οξέων <2% | Μετεστεροποίηση | KOH |

7.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΥΣ

Με τις κλασικές μεθόδους γίνεται εκχύλιση του λίπους συνήθως με κάποιο οργανικό διαλύτη όπως στη μέθοδο Bligh & Dryer ή στην Folch, αλλά συχνά προκύπτει μεγάλος όγκος επικίνδυνων αποβλήτων ενώ με άλλες όπως η Soxhlet απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι επεξεργασίας (Christie., 2010).

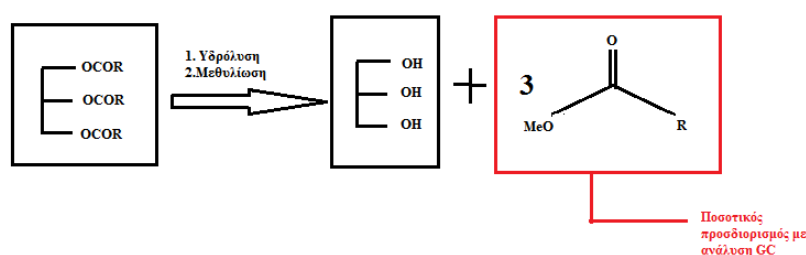
Μια σχετικά πρόσφατη μέθοδος η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι αυτή των μικροκυμάτων. Η συγκεκριμένη χαρακτηρίζεται ως γρήγορη, εύκολη και σχετικά χαμηλή σε κόστος. Το ενδεχόμενο των οξειδώσεων λόγω ακτινοβολίας θεωρείται πως δεν υφίσταται στις συνήθεις συνθήκες ανάλυσης και μάλιστα αναφέρεται πως δεν υποβαθμίζεται τόσο το δείγμα όσο σε άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούν θέρμανση (Christie., 2010).

Μία άλλη μέθοδος εκχύλισης βασίζεται στη χρήση υπερκρίσιμων υγρών (Supercritical Fluid Extraction, SFE). Βασικό πλεονέκτημά της είναι η σημαντική μείωση στη χρήση οργανικών διαλυτών και αποβλήτων, αλλά οι χρόνοι ανάλυσης είναι παρόμοιοι με αυτούς των μικροκυμάτων. Η θερμοκρασία και η πίεση θα πρέπει να ρυθμίζονται με μεγάλη ακρίβεια ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα. Έχει αναφερθεί πως η SFE έχει εφαρμοσθεί σε πολλές περιπτώσεις και τα αποτελέσματα φαίνονται πολύ ικανοποιητικά ώστε να αντικαταστήσει άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούν οργανικούς διαλύτες (Christie., 2010). Η

αποτελεσματικότητά της είναι τέτοια που η AOCS την συμπεριέλαβε στις επίσημες μεθόδους για την ανάλυση λιπαρών σε σπορέλαια (oilseed) αν και σε υποστρώματα όπου τα λιπίδια αλληλεπιδρούν σε μεγάλο βαθμό μετά υπόλοιπα συστατικά των τροφίμων φαίνεται να υστερεί.

Στα πλαίσια των εργαστηριακών δοκιμών πραγματοποιήθηκε μάλιστα και εκχύλιση Pressurized Liquid Extraction (PLE) με χρήση συνδυασμού οργανικών διαλυτών. Συγκεκριμένα μίγμα δείγματος Sanilack και άμμου (1:9) εκχυλίστηκε διαδοχικά με μίγμα 3 διαλυτών (μεθανόλη, CH₂Cl₂,εξάνιο) σε αναλογία 1:1:1. Τα αποτελέσματα της αναμενόμενης συνολικής λιποπεριεκτικότητας ήταν ικανοποιητικά.. Παρ' όλα αυτά δε μελετήθηκε περαιτέρω το είδος των περιεχόμενων λιπαρών ή κάποια πιθανή τους μετατροπή ως προς την ισομέρεια λόγω μεγάλης πίεσης, εξαιτίας της έλλειψης χρόνου.

7.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ (FAMES)



Εικόνα 14 Σύνθεση μεθυλεστέρων

Οι προς ανάλυση ουσίες θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή πτητικότητα και σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Εάν οι ουσίες δεν είναι αρκετά πτητικές, διασπώνται εύκολα σε υψηλές θερμοκρασίες ή/και εμφανίζουν πολικότητα η οποία δεν καθιστά εύκολο το διαχωρισμό τους (πχ καρβοξυλικά οξέα), τότε θα πρέπει να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγά τους, τα οποία να είναι κατάλληλα για ανάλυση. Ο ακριβής προσδιορισμός των λιπαρών οξέων επιτυγχάνεται, αφού πρώτα γίνει πλήρη μετατροπή των ακυλο-υπολειμμάτων των τριγλυκεριδίων συνήθως σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (Εικόνα 14) ή και άλλων σε ειδικές περιπτώσεις. Τα παράγωγα αυτά είναι πιο απλά ως προς τη δομή τους, πιο μικρά και πιο πτητικά (W.W. Christie, 1993). Η αντίδραση προς παραγωγή μεθυλεστέρων επιτυγχάνεται με όξινη ή με βασική κατάλυση του δείγματος (Ichihara, 2016).

Τα δείγματα φυσικής προέλευσης και τα τρόφιμα περιέχουν διάφορα είδη λιπιδίων. Αν και κατά την ανάλυση ίσως κυριαρχούν λίγες από αυτές, μπορεί να υπάρχουν και άλλες σε μικρότερη συγκέντρωση που να έχουν μεγαλύτερη σημασία (D. S. Nichols, T. Jordan, N. Kerr, 2011). Για παράδειγμα, και σύμφωνα με τον Kramer, με τη χρήση μεθοξειδίου του νατρίου τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα N- ακυλολιπίδια δε μεθυλιώνονται και συνεπώς δεν είναι δυνατό να προσδιοριστούν (J. Krammer, 1997)

7.4 IN SITU Ή ΑΠ' ΕΥΘΕΙΑΣ ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ

Στην μέθοδο της απ' ευθείας μετεστεροποίησης το στάδιο της εκχύλισης των λιπιδίων αντιπαρέρχεται και τα λιπαρά οξέα λαμβάνονται και μετατρέπονται ταυτόχρονα σε FAMES (P. A. Golay, 2006). Τον Ιούνιο του 2012 συνυπογράφηκε συνθήκη μεταξύ της AOAC International και του οργανισμού ISO σχετικά με την υιοθέτηση μιας κοινής πορείας ανάλυσης των λιπιδίων σε γαλακτοκομικά τρόφιμα και σε βρεφικές τροφές με αέρια χρωματογραφία τριχοειδούς στήλης. Τα λιπαρά οξέα στη συγκεκριμένη μέθοδο προσδιορίζονται απ' ευθείας. Στην προτεινόμενη μέθοδο προστίθεται μεθοξείδιο του νατρίου CH₃ONa, ώστε να μετατραπούν τα

λιπαρά οξέα στους αντίστοιχους εστέρες (FAMES). Αυτοί με τη σειρά τους διαχωρίζονται σε στήλη υψηλής πολικότητας και ταυτοποιούνται βάσει του χρόνου κατακράτησης πρότυπων ουσιών (Moulin, 2016).

Βασικό πλεονέκτημα των *in situ* μεθόδων είναι η εξοικονόμηση χρόνου και αντιδραστηρίων. Συνεπώς είναι εύκολη, γρήγορη, με μικρό κόστος και λίγα απόβλητα. Επιπλέον το δείγμα καταπονείται σε μικρότερο βαθμό και μειώνεται η πιθανότητα υποβάθμισης των λιπαρών οξέων (P. A. Golay, 2006) Προτιμάται καθώς εξάγονται καλά αποτελέσματα και υπάρχουν λιγότερες απώλειες λόγω μεταφοράς σε σύγκριση με την εκχύλιση (C. T. Strigley, 2017).

Κατά την *in situ* μετεστεροποίηση θα πρέπει να δίνεται προσοχή στην πλήρη μετατροπή όλου του περιεχόμενου λίπους στους αντίστοιχους εστέρες, δηλαδή θα πρέπει να εφαρμόζεται κατάλληλος διαλύτης ώστε να διαλυθούν πλήρως τα λιπίδια. Επιπλέον η παρουσία νερού επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα αφού έρευνες δείχνουν πως οι τριακυλογλυκερόλες και ιδιαίτερα αυτές που περιλαμβάνουν κορεσμένες μακρινές αλυσίδες λιπαρών οξέων, υδρολύονται, καθιζάνουν και μειώνεται η δραστηκότητά τους (P. A. Golay, 2006)(Christie., 2010).

Όπως προαναφέρθηκε και στις συνθήκες μετεστεροποίησης, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε όξινες ή σε βασικές συνθήκες, ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο εφαρμόζεται. Η οξύτητα του περιβάλλοντος της αντίδρασης επηρεάζει διαφορετικά τα λιπαρά οξέα και το τελικό αποτέλεσμα. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Τα μόρια με μικρότερη επιφάνεια επαφής είναι πιο δραστικά. Μάλιστα στην AOAC 996.06 αναφέρεται χαρακτηριστικά πως στα πλαίσια της προκατεργασίας, το δείγμα θα πρέπει να κονιορτοποιηθεί πλήρως. Σχετικά με την ποσότητα του καταλύτη, θα πρέπει να είναι αρκετή για να λάβει χώρα η αντίδραση χωρίς όμως να πλεονάζει καθώς είναι πιθανό να πραγματοποιηθεί σαπωνοποίηση (Christie., 2010). Ο χρόνος της αντίδρασης θα πρέπει να ληφθεί υπόψη καθώς οι αντιδράσεις απ' ευθείας μετεστεροποίησης απαιτούν περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθούν σε σχέση με τις κλασικές. Τέλος, ένας ακόμα παράγοντας που επιδρά στην εστεροποίηση είναι η θερμοκρασία καθώς επηρεάζει την ισορροπία της αντίδρασης. Στον παρακάτω Πίνακα 10 αναφέρονται συνοπτικά οι παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση της εστεροποίησης:

Πίνακας 10 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση εστεροποίησης

| |
|----------------------------------|
| Οξύτητα περιβάλλοντος αντίδρασης |
| Μέγεθος σωματιδίων |
| Ποσότητα καταλύτη |
| Χρόνος αντίδρασης |
| Θερμοκρασία |

Η απ' ευθείας μετεστεροποίηση έχει προταθεί από το 1963 με σκοπό την ανάλυση λιπιδίων στους μικροοργανισμούς με ανάμιξη του δείγματος με μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου. Έκτοτε η μέθοδος τροποποιήθηκε και βρίσκει εφαρμογή σε διάφορα τρόφιμα. Μια ακόμα τροποποίηση αυτής της μεθόδου η οποία περιλαμβάνει την ανάμιξη του δείγματος με 5% (v/v) διάλυμα ακετυλο-χλωριδίου εφαρμόστηκε για την ανάλυση των λιπαρών οξέων του μητρικού γάλακτος και του λιπώδη ιστού. Στην περίπτωση τροφίμων που περιέχουν συζυγιακά ισομερή λινελαϊκών προτιμώνται βασικά καταλυόμενες διαδικασίες μετεστεροποίησης ώστε να μην αλλάξει η ισομέρεια των λιπαρών οξέων του δείγματος (Golay P., 2006) (W.W. Christie). Αν και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), δε βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στα γαλακτοκομικά προϊόντα, οι Park και Goins (1994) πρότειναν μία μέθοδο δύο σταδίων στην οποία μεθυλιώνονται και αυτά. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH/CH₃OH) στους 90° C για 10 λεπτά και έπειτα προσθήκη BF₃. Σε μία ακόμη μέθοδος που προτάθηκε από τον Gob (1997) χρησιμοποιείται 5% (v/v) μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH/CH₃OH) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Αν και η διαδικασία αυτή δεν απαιτεί θέρμανση ή τη χρήση BF₃, ανάλογα με τη φύση του τροφίμου ίσως

χρειαστεί κάποια προκατεργασία. Επιπλέον βρίσκει εφαρμογή και στη δύσκολη ως προς τη διαχείριση, μήτρα της σκόνης βρεφικού γάλακτος.

Η σκόνη βρεφικού γάλακτος αναλύθηκε διεξοδικά από τον Golay (2006) σύμφωνα με τον οποίο η χρήση μεθανολικού διαλύματος υδροχλωρίου σε γαλακτοκομικά προϊόντα δεν είναι κατάλληλη καθώς χάνονται από τον προσδιορισμό τα λιπαρά οξέα μικρής αλύσου. Επιπρόσθετα αναφέρει πως συγκριτικά με μη άμεσες μεθόδους, η απ' ευθείας μετεστεροποίηση πλεονεκτεί καθώς αποφεύγονται διαδικασίες που οδηγούν στην υποβάθμιση του δείγματος και απώλειες και ως εκ τούτου αυξάνεται η βεβαιότητα των αποτελεσμάτων (Golay P., 2006).

8. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

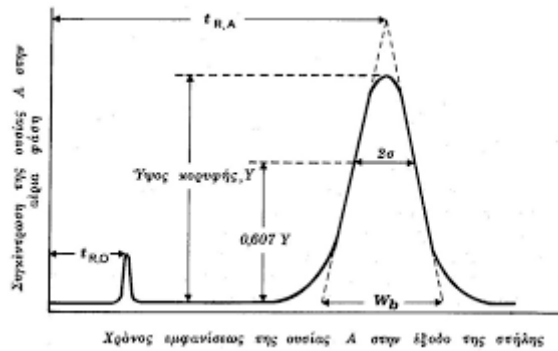
Η χρωματογραφία αποτελεί μια σειρά τεχνικών με σκοπό το φυσικό διαχωρισμό και προσδιορισμό των συστατικών ενός μίγματος. Διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό των λιπιδίων. Παραδείγματα αυτών είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (GC). Η τελευταία βρίσκει εφαρμογή για διάφορες κλάσεις λιπιδίων και ιδιαίτερος αποτελεί μέθοδο επιλογής για τον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την κατανομή των συστατικών μεταξύ μιας κινητής φάσης (φέρων αέριο) και μίας στατικής φάσης (στήλη) και βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών όπως είναι η πολικότητα, το σημείο ζέσεως, το μέγεθος των μορίων και άλλα (Χατζηιωάννου Θ., 2010). Τα συστατικά κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα στη στήλη επηρεαζόμενα λόγω της διαφορετικής αλληλεπίδρασης με τη στατική φάση και ως κατά συνέπεια εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους (Χατζηιωάννου Θ., 2010). Με την τοποθέτηση ενός ανιχνευτή στην έξοδο της στήλης μπορεί να επιτευχθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυθέντων ουσιών (Χατζηιωάννου Θ., 2010). Το διάγραμμα που προκύπτει από το σήμα του ανιχνευτή σε συνάρτηση του χρόνου κατακράτησης ονομάζεται χρωματογράφημα.

Σύμφωνα με τον Χατζηιωάννου λοιπόν δίνονται οι παρακάτω ορισμοί:

- Ως όγκος κατακράτησης ή ανασχέσεως, V_R , ορίζεται ο όγκος που απαιτείται για να εκλουσθεί μια ουσία στο μέγιστο της συγκέντρωσής της.
- Ως χρόνος κατακράτησης ή ανασχέσεως, t_R , ορίζεται ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ εισαγωγής του δείγματος στην είσοδο της στήλης και εμφάνισης του μέγιστου της κορυφής της ουσίας στο χρωματογράφημα. Εάν F είναι η ογκομετρική ταχύτητα ροής της κινητής φάσης σε μονάδες όγκου ανά μονάδες χρόνου, τότε:

$$t_R = V_R / F$$

Στην επικρατούσα θεωρία των πλακών λαμβάνονται υπόψη οι εξής συνθήκες, ότι δηλαδή ο συντελεστής κατανομής είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης, ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων αποκαθίσταται σχεδόν ακαριαία και ότι η ταχύτητα διάχυσης σε μία φάση είναι αμελητέα. Με βάση αυτές τις παραδοχές, προκύπτει λοιπόν η παρακάτω καμπύλη του χρωματογραφήματος:



Εικόνα 15 Χρωματογράφημα των ουσιών Α & Β (αδρανής) κατά σειρά εξόδου από τη στήλη

Από το σχήμα (Εικόνα 15) διακρίνονται επιπρόσθετα τα παρακάτω σύμβολα (Χατζηιωάννου Θ., 2010): w_b : εύρος κορυφής, απόσταση μεταξύ των σημείων τομής της γραμμής βάσεων και των εφαπτομένων στα σημεία καμπής των γραμμών της κορυφής. Αντίστοιχα, $w_{1/2}$ είναι το εύρος που αντιστοιχεί στο ύψος της μισής κορυφής, $Y/2$. Εφόσον η καμπύλη χαρακτηρίζεται από την κατανομή Gauss, ισχύει η σχέση $w_b=4\sigma$
 σ : η τυπική απόκλιση της κατανομής της κορυφής, είναι ίση με το ημιεύρος της κορυφής σε ύψος $Y/\sqrt{e}=0.607Y$.

Μέτρο του διαχωρισμού δύο ουσιών Α και Β, δηλαδή του βαθμού αλληλοεπικάλυψης των δύο αντίστοιχων κορυφών τους στο χρωματογράφημα, είναι η διαχωριστική ικανότητα ή διαχωριστικότητα R (resolution) και θεωρώντας πως η ουσία Α εξέρχεται πρώτη ορίζεται ως:

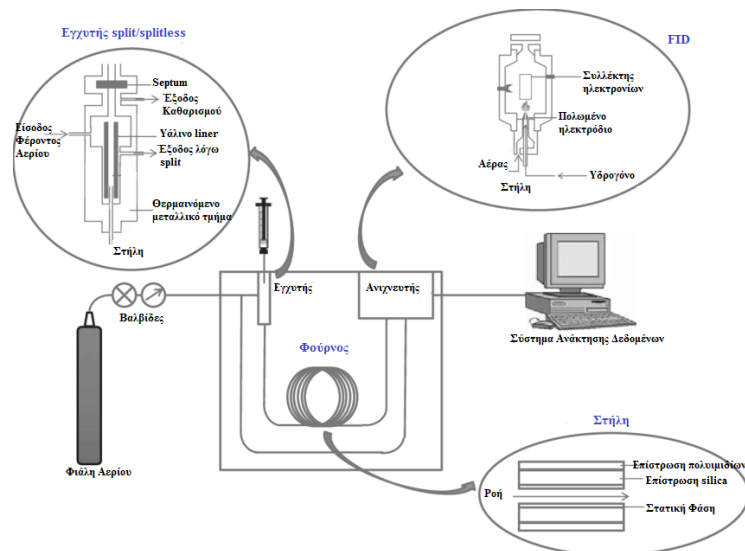
$$R = \frac{\Delta t_R}{4\sigma} = \frac{(t_{R,B}-t_{R,A})}{0.5(W_A+W_B)} = \frac{2(t_{R,B}-t_{R,A})}{W_A+W_B} \quad \text{Εξίσωση 2}$$

Αντί της διαφοράς του χρόνου συγκρατήσεως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο όγκος συγκρατήσεως. Η παραπάνω σχέση εάν εφαρμοσθεί για το εύρος που αντιστοιχεί στο μισό της κορυφής μπορεί να γραφεί:

$$R = \frac{2(t_{R,B}-t_{R,A})}{1,699(W_{1/2}^A+W_{1/2}^B)} = \frac{1,177(t_{R,B}-t_{R,A})}{(W_{1/2}^A+W_{1/2}^B)} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

Με αυτόν τρόπο εξάγεται η σχέση 1, η οποία αναφέρεται βιβλιογραφικά από τους Golay & Moulin.

Στη συνέχεια στην εικόνα 16 παρουσιάζονται σχηματικά τα βασικά μέρη ενός αέριου χρωματογράφου, ενώ στην εικόνα 17 παρουσιάζεται ο αεριοχρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε για τις πειραματικές δοκιμές της παρούσας εργασίας:



Εικόνα 16 Σχηματικό διάγραμμα αεριοχρωματογράφου

Προαναφέρθηκε πως το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και συνήθως χρησιμοποιείται He, N₂, και H₂, δηλαδή αέρια που είναι χημικά αδρανή. Κριτήριο επιλογής του φέροντος αερίου είναι ο τύπος ανιχνευτή που χρησιμοποιείται και πιο συγκεκριμένα το φέρον αέριο θα πρέπει να διαφέρει σημαντικά ως προς μία φυσικοχημική ιδιότητά του από τις διαχωριζόμενες ουσίες στην οποία βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή.

Στο ρυθμιστή πίεσης και ως αποτέλεσμα στο ροόμετρο (βαλβίδες), ρυθμίζονται οι συνθήκες πίεσης ώστε να εξασφαλίζεται συνεχής ροή με ακριβή μέτρηση της ταχύτητάς της. Η ταχύτητα ροής επηρεάζει την ακρίβεια της μέτρησης του χρόνου κατακράτησης και συνεπώς την ταυτοποίηση των ουσιών. Στη συνέχεια φαίνεται το σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Το δείγμα εξαερώνεται και εισάγεται όσο το δυνατό πιο γρήγορα ώστε να αποφεύγεται η διασπορά του, η οποία επηρεάζει τη διαχωριστική ικανότητα. Ο φούρνος θερμαίνεται είτε σε σταθερή θερμοκρασία είτε με μεταβαλλόμενη με βάση προκαθορισμένο πρόγραμμα. Στην θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία (programmed-temperature gas chromatography) αποφεύγονται πολλά μειονεκτήματα του ισόθερμου προγράμματος.

Βασική προϋπόθεση για τον διαχωρισμό των ουσιών αποτελεί η επιλογή κατάλληλης στήλης. Οι στήλες διακρίνονται σε πακεταρισμένες και σε τριχοειδείς. Οι πακεταρισμένες κατασκευάζονται από υάλινους, μεταλλικούς (ανοξείδωτος χάλυβας, χαλκό, αλουμίνιο) ή πλαστικούς (Teflon) σωλήνες, έχουν μήκος συνήθως 2-3 m και διάμετρο 2-4 mm. Το πληρωτικό υλικό (υλικό στήριξης) των συγκεκριμένων στηλών κατανέμεται σε ομοιόμορφο και λεπτό πάχος και καλύπτεται με ένα επίσης λεπτό στρώμα στατικής φάσης πάχους 0,05-1 μm. Οι τριχοειδείς στήλες αντίθετα έχουν μικρότερη εσωτερική διάμετρο (0,25-0,32 mm), πολύ μεγαλύτερο μήκος (20-100 m) όπως για παράδειγμα αυτή της εικόνας 23 και σταθερό πληρωτικό υλικό. Εξαιτίας της μεγαλύτερης αυτής σταθερότητας του πληρωτικού υλικού, χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, μεγαλύτερη αποδοτικότητα και καλύτερη διαχωριστικότητα. Για τον προσδιορισμό των *trans* ισομερών των λιπαρών οξέων, βιβλιογραφικά προτείνεται η επιλογή στήλης συνολικού μήκους 100 m. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η στήλη της Εικόνας 18.

Ως προς τον ανιχνευτή, τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι η ευαισθησία, η σταθερότητα, η περιοχή γραμμικότητας, ο χρόνος απόκρισης και η χημική δραστηριότητα (Χατζηωάννου Θ., 2010).



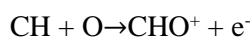
Εικόνα 17 Αεριοχρωματογράφος Agilent Technologies 7890



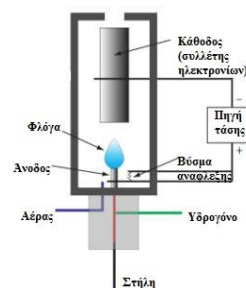
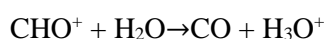
Εικόνα 18 Χρωματογραφική στήλη μήκους 100m

9. ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΦΛΟΓΑΣ (FLAME IONIZATION DETECTOR, FID)

Αρχή λειτουργίας των ανιχνευτών ιοντισμού είναι ότι η ηλεκτρική αγωγιμότητα ενός αερίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε αυτό. Στην περίπτωση του ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Εικόνα 19), το αέριο που εκλούεται από τη στήλη αναμιγνύεται με υδρογόνο, συνθετικό αέρα και καίγεται. Η φλόγα βρίσκεται σε χώρο εφαρμοζόμενης τάσης οπότε παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα εξαιτίας των φορτισμένων σωματιδίων. Το σήμα που παράγεται καταγράφεται και προκύπτει το χρωματογράφημα (Χατζηιωάννου Θ., 2010). Συγκεκριμένα πραγματοποιείται ο ιοντισμός:



Το παραγόμενο ιόν είναι ασταθές και για κάθε 100000 άτομα που εισάγονται στη φλόγα πραγματοποιείται η αντίδραση:



Εικόνα 19 Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας

Το σήμα του ανιχνευτή είναι ανάλογο των ατόμων άνθρακα που καίγονται και ονομάζονται ενεργοί (C*). Επειδή ακριβώς κάποιοι άνθρακες της αλυσίδας των λιπαρών οξέων είναι συνδεδεμένα με ετεροάτομα και συγκεκριμένα οξυγόνο, δεν ιοντίζονται κατάλληλα. Ως συνέπεια η απόκριση του ανιχνευτή μειώνεται (J. Visentainer, 2014).

Σύμφωνα με τον Χατζηιωάννου, ο FID αποκρίνεται στην ταχύτητα ροής μάζας και η απόκρισή του είναι γραμμική σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (10^8). Η χρήση του συγκεκριμένου ανιχνευτή θεωρείται και ως πλεονέκτημα της ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία, αφού ο FID αποκρίνεται πολύ αποτελεσματικά στις οργανικές ενώσεις και εμφανίζει πολύ καλή γραμμικότητα (Buchgraber M. et al., 2004). Μάλιστα βιβλιογραφικά αναφέρεται συχνά πως είναι ο ιδανικός ανιχνευτής για τον προσδιορισμό των λιπαρών, καθώς είναι φθηνός, με ταχεία απόκριση και προσφέρει πολύ καλή γραμμικότητα από τους μεθυλεστέρες χαμηλού μοριακού βάρους μέχρι και αυτούς μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας. Στον Πίνακα 11 αναφέρονται κάποιες ενδεικτικές μέθοδοι προσδιορισμού λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία.

Πίνακας 11 Ενδεικτικές μέθοδοι προσδιορισμού λιπαρών με αέρια χρωματογραφία

| Επίσημη Μέθοδος | Προσδιορισμός |
|-----------------|---|
| AOAC 966.33 | Λιπαρά οξέα σε έλαια και λίπη |
| AOAC 996.06 | Συνολικό λίπος, κορεσμένο και ακόρεστο, σε δείγματα τροφίμων |
| AOAC 991.39 | Ενθυλακωμένα έλαια ψαριών |
| AOAC 994.15 | <i>cis</i> και <i>trans</i> δεκαοκτανοϊκά ισομερή και λιπαρά οξέα |
| AOAC 985.21 | <i>trans</i> λιπαρά οξέα σε μαργαρίνη |
| AOAC 996.06 | Συνολική λιποπεριεκτικότητα, Κορεσμένα, Μονοακόρεστα, Πολυακόρεστα και <i>trans</i> λιπαρά οξέα |
| AOAC 2012.13 | Λιπαρά οξέα σε γαλακτοκομικά και βρεφικό γάλα |

10. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

10.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η μέθοδος σχετικής κανονικοποίησης βασίζεται στην % έκφραση του εμβαδού της απόκρισης του εκάστοτε μεθυλεστέρα συσχετισμένο ως προς το συνολικό εμβαδό των συνολικών μεθυλεστέρων του δείγματος. Ακριβώς επειδή υπάρχει αλληλεξάρτηση μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθυλεστέρων, η μέθοδος είναι επιρρεπής στη διάδοση των σφαλμάτων. Για παράδειγμα η παράλειψη μιας κορυφής ή η ολοκλήρωση μιας πλεονάζουσας μπορεί να αλλοιώσει καθοριστικά το τελικό αποτέλεσμα. Ως εκ τούτου προτιμάται η χρήση ενός εσωτερικού προτύπου (Internal Standard, IS)(J. Visentainer, 2014).

10.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Σύμφωνα με τον Whelpton, ως εσωτερικό πρότυπο ορίζεται μία ουσία, εκτός του αναλύτη, το οποίο μπορεί να προστεθεί σε οποιοδήποτε στάδιο με σκοπό τη διόρθωση των συστηματικών σφαλμάτων. Ο Haefelinger (1981) όρισε τα κριτήρια με τα οποία επιλέγεται ορθά ένα εσωτερικό πρότυπο. Η συγκεκριμένη ουσία λοιπόν θα πρέπει να διαχωρίζεται σαφώς από τις υπόλοιπες ουσίες, γνωστές και άγνωστες, σε ένα χρωματογράφημα. Επιπλέον θα πρέπει να εκλούεται κοντά στην προσδιοριζόμενη ουσία και να έχει παρόμοια συγκέντρωση με αυτή. Τέλος θα πρέπει να παρουσιάζει χημική συγγένεια με την προσδιοριζόμενη ουσία και να είναι χημικά σταθερή. Εκτός από την αποφυγή σφαλμάτων, το εσωτερικό πρότυπο βοηθά στην κατανόηση της αποτελεσματικότητας μιας αντίδρασης ή και μιας εκχύλισης.

Ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζεται, διακρίνεται σε ισότοπο, ομόλογο, γενόσημο και χωρίς χημική συγγένεια. Στην περίπτωση των λιπαρών χρησιμοποιείται το ομόλογο εσωτερικό πρότυπο ώστε να βεβαιωθεί η πορεία της εκχύλισης τόσο για τον αναλύτη όσο και για το εσωτερικό πρότυπο (Whelpton, 2005).

10.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΙΟΡΘΩΣΗΣ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κάθε μεθυλεστέρας έχει διαφορετική απόκριση. Συνεπώς συνίσταται η χρήση παράγοντα διόρθωσης για κάθε μεθυλεστέρα. Οι παράγοντες διόρθωσης διακρίνονται σε θεωρητικούς (F_{CT}) και πειραματικούς (ή εμπειρικούς) (F_{CE}).

Ο υπολογισμός του F_{CT} βασίζεται σε δύο δεδομένα: α) ο FID αποκρίνεται αναλογικά στο σχετικό ποσοστό της μάζας της ανθρακικής αλυσίδας του FAME (και επομένως στον αριθμό των ενεργών ανθράκων των μορίων (C^*)) και β) δεν αποκρίνεται αποτελεσματικά στον άνθρακα της καρβοξυλομάδας (COO^-). Εάν ορισθεί αυθαίρετα ως $F_{CT}=1$ για κάποιον από τους μεθυλεστέρες, τότε μπορούν να συσχετισθούν με αυτόν και οι υπόλοιποι μεθυλεστέρες. Επομένως, ο F_{CT} μπορεί να θεωρηθεί ως σταθερά η οποία παραμένει αμετάβλητη από οργανολογικά σφάλματα. Έχοντας ως δεδομένο τις τιμές του θεωρητικού παράγοντα για το στεατικό μεθυλεστέρα από τη βιβλιογραφία, μπορούν να συσχετιστούν οι υπόλοιποι FAMES ανάλογα με το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιείται. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του μεθυλεστέρα του δεκατριανοϊκού οξέος ($C_{13} Me$), υπολογίζεται αναλυτικά στον Πίνακα 5 ο F_{CT} , θεωρώντας ως εσωτερικό πρότυπο τον μεθυλεστέρα του στεατικού οξέος ($C_{18} Me$):

Πίνακας 12 Πραγματοποίηση υπολογισμών του F_{ct} για τον μεθυλεστέρα του δεκατριανοϊκού οξέος

| | | | |
|---|--------------------------|---------|-------|
| Μεθυλεστέρας δεκατριανοϊκού οξέος: | $C_{14}H_{28}O_2$ | 228,376 | g/mol |
| Μεθυλεστέρας στεατικού οξέος: | $C_{19}H_{38}O_2$ | 298,508 | g/mol |
| Εφόσον ο άνθρακας της ομάδας COO^- δεν ανταποκρίνεται στον FID: | | | |
| $C_{13} Me$ | $13 C^* \times 12,0110=$ | 156,143 | |
| $C_{18} Me$ | $18 C^* \times 12,0110=$ | 216,198 | |
| Σχετικό ποσοστό C^* σε κάθε FAME: | | | |
| $C_{13} Me$ | | 68,37 % | = A |
| $C_{18} Me$ | | 72,43 % | = B |
| Μεθυλεστέρας δεκατριανοϊκού οξέος: | $F_{CT} = B/A = 1,06$ | | |

Οι πειραματικοί παράγοντες διόρθωσης (F_{CE}) προσδιορίζονται κατόπιν ανάλυσης πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων, χρησιμοποιώντας τα εμβαδά των κορυφών και τις μάζες των FAMES, σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:

$$F_{CE} = A_p \times M_x / M_p \times A_x$$

όπου:

A_p, M_p = εμβαδό και μάζα εσωτερικού προτύπου, αντιστοίχως

A_x, M_x = εμβαδό και μάζα FAME

Το πηλίκο F_{CE}/F_{CT} θα πρέπει να προσεγγίζει τη μονάδα, διαφορετικά αποτελεί ένδειξη πως το σύστημα της αέριας χρωματογραφίας χρειάζεται διορθώσεις (J. Visentainer, 2014) . Κατά προέκταση μπορεί να εφαρμοσθεί και στους υπόλοιπους μεθυλεστέρες όπως για παράδειγμα σε αυτόν του ενδεκαανοϊκού οξέος (Πίνακας 13).

Πίνακας 13 Υπολογισμός F_{CT} ως προς το $C_{11:0}$ και το $C_{13:0}$

| ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ | F_{CT} ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΣΤΕΑΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | F_{CT} ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΔΕΚΑΤΡΙΑΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ | F_{CT} ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΕΝΔΕΚΑΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ |
|-------------------|--|---|---|
| C _{4:0} | 1,54 | 1,45 | 1,40 |
| C _{5:0} | 1,40 | 1,32 | 1,28 |
| C _{6:0} | 1,31 | 1,24 | 1,19 |
| C _{7:0} | 1,24 | 1,17 | 1,13 |
| C _{8:0} | 1,19 | 1,13 | 1,09 |
| C _{9:0} | 1,15 | 1,09 | 1,05 |
| C _{10:0} | 1,12 | 1,06 | 1,02 |
| C _{11:0} | 1,10 | 1,04 | 1,00 |
| C _{12:0} | 1,08 | 1,02 | 0,98 |
| C _{12:1} | 1,07 | 1,01 | 0,97 |
| C _{13:0} | 1,06 | 1,00 | 0,96 |
| C _{14:0} | 1,04 | 0,99 | 0,95 |
| C _{14:1} | 1,04 | 0,98 | 0,94 |
| C _{15:0} | 1,03 | 0,97 | 0,94 |
| C _{15:1} | 1,02 | 0,97 | 0,93 |
| C _{16:0} | 1,02 | 0,96 | 0,93 |
| C _{16:1} | 1,01 | 0,96 | 0,92 |
| C _{16:2} | 1,00 | 0,95 | 0,91 |
| C _{16:3} | 1,00 | 0,94 | 0,91 |
| C _{16:4} | 1,00 | 0,94 | 0,91 |
| C _{17:0} | 1,01 | 0,95 | 0,92 |
| C _{17:1} | 1,00 | 0,95 | 0,91 |
| C _{18:0} | 1,00 | 0,94 | 0,91 |
| C _{18:1} | 0,99 | 0,94 | 0,90 |
| C _{18:2} | 0,99 | 0,93 | 0,90 |
| C _{18:3} | 0,98 | 0,92 | 0,89 |
| C _{18:4} | 0,97 | 0,92 | 0,89 |
| C _{19:0} | 0,99 | 0,94 | 0,90 |
| C _{20:0} | 0,98 | 0,93 | 0,90 |
| C _{20:1} | 0,98 | 0,92 | 0,89 |
| C _{20:2} | 0,97 | 0,92 | 0,89 |
| C _{20:3} | 0,97 | 0,91 | 0,88 |
| C _{20:4} | 0,96 | 0,91 | 0,87 |
| C _{20:5} | 0,95 | 0,90 | 0,87 |
| C _{21:0} | 0,98 | 0,92 | 0,89 |
| C _{22:0} | 0,97 | 0,92 | 0,89 |
| C _{22:1} | 0,97 | 0,91 | 0,88 |
| C _{22:2} | 0,96 | 0,91 | 0,88 |
| C _{22:3} | 0,96 | 0,90 | 0,87 |
| C _{22:4} | 0,95 | 0,90 | 0,87 |
| C _{22:5} | 0,94 | 0,89 | 0,86 |

| | | | |
|-------------------|------|------|------|
| C _{22:6} | 0,94 | 0,89 | 0,85 |
| C _{23:0} | 0,97 | 0,91 | 0,88 |
| C _{24:0} | 0,96 | 0,91 | 0,88 |
| C _{24:1} | 0,96 | 0,90 | 0,87 |

11. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων σε δείγματα τροφίμων με έμφαση στη σκόνη βρεφικού γάλακτος. Το συγκεκριμένο προϊόν αποτελεί πρόκληση τόσο εξαιτίας της δύσκολης, ως προς την ανάλυση, μήτρας που διαθέτει, αλλά και ως προς το καταναλωτικό κοινό στο οποίο απευθύνεται και το οποίο είναι ευαίσθητο από τη φύση του. Ο προσδιορισμός αυτός θα πραγματοποιηθεί με την επίσημη μέθοδο AOAC 996.06 καθώς και με δύο άμεσες μεθόδους μεθυλίωσης. Στόχος είναι να αποδοθεί άμεσα, ικανοποιητικά και με αξιοπιστία η συνολική λιποπεριεκτικότητα και τα επί μέρους λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο εκάστοτε τρόφιμο, ικανοποιώντας έτσι την τάση της εποχής για την καλύτερη ενημέρωση των καταναλωτών σχετικά με τη διατροφή τους.

Το πρώτο στάδιο αφορά στο διαχωρισμό μίγματος 37 μεθυλεστέρων, καθώς και ενδεδειγμένων ισομερών τους με αεριοχρωματογράφο. Εν συνεχεία θα εφαρμοσθεί η επίσημη μέθοδος AOAC 996.06 σε δείγματα τροφίμων της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. τα οποία θεωρούνται ως τρόφιμα συχνής κατανάλωσης τόσο από ενήλικες όσο και από παιδιά. Σε τελευταίο στάδιο θα εφαρμοσθούν πειράματα απευθείας μεθυλίωσης ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα με αυτά της επίσημης μεθόδου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

12. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ως υλικό αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο δείγμα βρεφικής σκόνης NIST SRM 1849a απόλυτου γνωστής συγκέντρωσης λιπαρών οξέων, ώστε να εξακριβωθεί η ορθότητα και η ακρίβεια των μεθόδων. Στη συνέχεια, η μελέτη επεκτάθηκε σε δείγμα βρεφικής σκόνης του εμπορίου, η οποία απευθύνεται σε νεογνά ηλικίας 0-6 μηνών. Οι μέθοδοι τέλος δοκιμάστηκαν και σε άλλες μήτρες τροφίμων και συγκεκριμένα σε σοκολάτα υγείας, γάλακτος και με stevia, σε μπάρες δημητριακών με κανέλα και μέλι, σε μπάρες δημητριακών με σοκολάτα, σε τρούφα σοκολάτας και σε σταγόνες σοκολάτας. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν χαρακτηρίζονται από χαμηλή υγρασία, γεγονός προαπαιτούμενο για τις μεθόδους άμεσης μετεστεροποίησης. Τα δείγματα που επελέγησαν είναι τρόφιμα τα οποία θεωρούνται από τους καταναλωτές ως τρόφιμα υψηλής λιποπεριεκτικότητας. Ταυτόχρονα επελέγησαν υποκατάστατα αυτών (σοκολάτα με stevia) καθώς και μπάρες δημητριακών οι οποίες θεωρούνται ως πιο υγιεινές επιλογές από τους καταναλωτές.

13. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

13.1 ΑΟΑC 996.06

I. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Σκοπός είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων σε τρόφιμα, ο υπολογισμός της συνολικής λιποπεριεκτικότητας καθώς και επιμέρους των κορεσμένων, των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

II. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το λίπος και τα λιπαρά οξέα εκχυλίζονται από το τρόφιμο με υδρολυτικές μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές είναι όξινης, βασικής ή συνδυασμός αυτών, ανάλογα με τη φύση του τροφίμου που εφαρμόζονται. Πυρογαλλόλη προστίθεται ώστε να ελαχιστοποιηθεί η οξειδωτική υποβάθμιση των λιπαρών οξέων του δείγματος κατά την ανάλυση. Η τριακυλογλυκερόλη τριενδεκανοϊνη (C_{11:0}) προστίθεται ως εσωτερικό πρότυπο. Το λίπος εκχυλίζεται σε μίγμα διαιθυλαιθέρα και πετρελαϊκού αιθέρα και στη συνέχεια μετεστεροποιείται με BF₃ σε μεθανόλη. Οι παραγόμενοι μεθυλεστέρες ποσοτικοποιούνται έπειτα από έγχυση σε αέριο χρωματογράφο, υπολογιζόμενοι με το ενδεκανοϊκό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο. Το συνολικό λίπος αποτελεί το άθροισμα των αντίστοιχων λιπαρών οξέων εκφραζόμενα ως ισοδύναμα τριακυλογλυκερολών. Στην περίπτωση των μονοακόρεστων λαμβάνονται υπόψη μόνο τα *cis* ισομερή των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων.

Στη γενική περίπτωση των τροφίμων, εξαιρουμένων των γαλακτοκομικών και των τυροκομικών προϊόντων, το δείγμα χωνεύεται με υδροχλώριο και αιθανόλη σε θερμό υδατόλουτρο για 40 λεπτά. Στα γαλακτοκομικά όμως απαιτούνται διαφορετικά αντιδραστήρια. Συγκεκριμένα, το δείγμα υποβάλλεται σε επεξεργασία με αιθανόλη και αμμωνία με σκοπό την εξασθένιση των δεσμών μεταξύ λιπιδίων και πρωτεϊνών και τη διάσπαση των γαλακτωμάτων που οφείλονται στο λίπος. Τέλος στα τυροκομικά προϊόντα και στα δείγματα που περιλαμβάνουν τυρί απαιτείται συνδυασμός όξινης και βασικής υδρόλυσης ώστε να διασπαστούν πλήρως οι δεσμοί λιπιδίων και πρωτεϊνών και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιπιδίων και υδρογονανθράκων (C. T. Srigley, 2017).

III. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Πυρογαλλόλη
- Υδροξείδιο του αμμωνίου 25 %
- HCl 8.3M, 12M
- Διαιθυλαιθέρας κατάλληλος για εκχύλιση
- Πετρελαϊκός αιθέρας – Άνυδρος
- Αιθανόλη 95 % v/v
- Τολουόλιο
- Χλωροφόρμιο
- Θειϊκό νάτριο – Άνυδρο
- Υπερκάθαρο νερό
- Φαινολοφθαλεΐνη
- Τριφθοριούχο βόριο 7 % (w/w) σε μεθανόλη. Παρασκευάζεται από εμπορικά διαθέσιμο BF₃ 14 % (w/w), σε απαγωγό εστία
- Μίγμα διαιθυλαιθέρα-πετρελαϊκού αιθέρα - 1:1 (v/v)

IV. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Διάλυμα εσωτερικού προτύπου (IS): Τριενδεκανοΐνη (TAG-C_{11:0}) - 5,00 mg/mL σε CHCl₃
Σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL ζυγίζονται με ακρίβεια 2,50 g τριγλυκεριδίου C_{11:0}. Το τριγλυκερίδιο διαλύεται πλήρως σε περίπου 400 mL CHCl₃ υπό ανάδευση και στη συνέχεια συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με διαλύτη.
- Πρότυπο μίγμα FAMES το οποίο περιέχει και τα *trans* ισομερή του C_{18:1} (Πίνακας 14)

Πίνακας 14 Συστατικά μίγματος μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (όπως αναφέρονται στα αντίστοιχα πιστοποιητικά)

| A/A | Μεθυλεστέρας (methyl ester) | Καθαρότητα | CAS No |
|-----|--|------------|------------|
| 1 | C _{4:0} Βουτυρικός (Butyric) | 99,9 | 623-42-7 |
| 2 | C _{6:0} Καπροϊκός (Caproic) | 99,9 | 106-70-7 |
| 3 | C _{8:0} Καπρυλικός (Caprylic) | 99,9 | 111-11-5 |
| 4 | C _{10:0} Καπρικός (Capric) | 99,9 | 110-42-9 |
| 5 | C _{11:0} Ενδεκανοϊκός (Undecanoic) | 99,9 | 1731-86-8 |
| 6 | C _{12:0} Λαυρικός (Lauric) | 99,9 | 111-82-0 |
| 7 | C _{13:0} Δεκατριανοϊκός (Tridecanoic) | 98,7 | 1731-88-0 |
| 8 | C _{14:0} Μυριστικός (Myristic) | 99,9 | 124-10-7 |
| 9 | C _{14:1} Μυριστελαϊκός (Myristoleic) | 99,9 | 56219-06-8 |
| 10 | C _{15:0} Δεκαπεντανοϊκός (Pentadecanoic) | 99,6 | 7132-64-1 |
| 11 | C _{15:1} Δεκαπεντενοϊκός (Pentadecenoic) | 99,0 | 90176-52-6 |
| 12 | C _{16:0} Παλμιτικός (Palmitic) | 99,9 | 112-39-0 |
| 13 | C _{16:1} Παλμιτελαϊκός (Palmitoleic) | 99,9 | 1120-25-8 |
| 14 | C _{17:0} Μαργαρικός (Margaric) | 99,6 | 1731-92-6 |
| 15 | C _{17:1} Μαργαρελαϊκός (Margaroleic) | 98,4 | 75190-82-8 |
| 16 | C _{18:0} Στεατικός (Stearic) | 99,9 | 112-61-8 |
| 17 | t-C _{18:1} <i>trans</i> Ελαϊδικός (<i>trans</i> elaidic) | 99,9 | 1937-62-8 |
| 18 | C _{18:1} Ελαϊκός (Oleic) | 99,9 | 112-62-9 |
| 19 | t-C _{18:2} <i>trans</i> Λινελαϊδικός (<i>trans</i> | 99,9 | 2566-97-4 |
| 20 | C _{18:2} Λινελαϊκός (Linoleic) | 98,9 | 112-63-0 |
| 21 | C _{20:0} Αραχιδικός (Arachidic) | 99,9 | 16326-32-2 |

| | | | |
|----|---|------|------------|
| 22 | C _{18:3} γ-Λινολενικός (g-linolenic) | 99,9 | 301-00-8 |
| 23 | C _{20:1} Εικοσενοϊκός (Eicosenic) | 99,9 | 1120-28-1 |
| 24 | C _{18:3} Λινολενικός (Linolenic) | 99,9 | 2390-09-2 |
| 25 | C _{21:0} Εικοσιενανοϊκός (Heneicosanoic) | 99,9 | 2463-02-7 |
| 26 | C _{20:2} Εικοσαδιενοϊκός (Eicosadienoic) | 99,9 | 6064-90-0 |
| 27 | C _{22:0} Βεχενικός (Behenic) | 99,8 | 21061-10-9 |
| 28 | C _{20:3} γ- Εικοσατριενοϊκός (g- | 99,4 | 2566-89-4 |
| 29 | C _{22:1} Ερουκικός (Erucic) | 99,9 | 5568288-7 |
| 30 | C _{20:3} Εικοσατριενοϊκός (Eicosatrienoic) | 99,7 | 929-77-1 |
| 31 | C _{23:0} Εικοσιτριανοϊκός (Tricosanoic) | 99,9 | 2734-47-6 |
| 32 | C _{20:4} Αραχιδονικός (Arachidonic) | 99,9 | 1120-34-9 |
| 33 | C _{22:2} Εικοσιδυαδιενοϊκός | 99,9 | 6101243 |
| 34 | C _{24:0} Λιγνοκηρικός (Lignoceric) | 99,9 | 2433-97-8 |
| 35 | C _{20:5} Εικοσαπενταενοϊκός | 99,9 | 2442-49-1 |
| 36 | C _{24:1} Νερβονικός (Nervonic) | 99,9 | 2733-88-2 |
| 37 | C _{22:6} Εικοσιδυαεξαενοϊκός | 99,9 | 2566-90-7 |

V. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Αέριος χρωματογράφος (Agilent Technologies 7890) εξοπλισμένος με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID), τριχοειδή στήλη, εισαγωγή διαμοιρασμού (split/splitless) και αυτόματο δειγματολήπτη.
- Τριχοειδής στήλη Agilent CP-Sil 88 for FAME 100 m x 0.25 mm x 0.2 μm
- Φιάλες Mojonnier
- Φιαλίδια για αεριοχρωματογράφο
- Σφαιρικές φιάλες των 250 mL
- Αναδευόμενο υδατόλουτρο
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού (Buchi ROTAVAPOR RII)
- Αναδευτήρας Vortex
- Θερμαινόμενη βάση δοκιμαστικών σωλήνων με αέριο αζώτου
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με πώμα

VI. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το δείγμα κονιορτοποιείται και ομογενοποιείται πριν την εκχύλιση. Στη φιάλη Mojonnier ζυγίζεται (με ακρίβεια 0,1 mg) τέτοια ποσότητα δείγματος, ώστε να περιέχονται 100-200 mg λίπους.

VII. ΠΟΡΕΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Ανάλογα με το είδος του τροφίμου που μελετάται, ακολουθείται διαφορετική πορεία υδρόλυσης. Στην εικόνα 20 απεικονίζεται η συνολική πορεία της αντίδρασης. Συγκεκριμένα:

A. Για όλα τα τρόφιμα εξαιρουμένων των γαλακτοκομικών και των τυροκομικών προϊόντων των τυροκομικών προϊόντων ακολουθείται όξινη κατάλυση:

Ποσότητα κονιορτοποιημένου και ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg ώστε να περιέχει 100-200 mg λίπους. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε φιάλη Mojonnier, όσο το δυνατόν πιο χαμηλά στον πυθμένα. Κατόπιν προστίθενται 100 mg πυρογαλλικό οξύ και 2 mL διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Το διάλυμα αναδεύεται και προστίθενται 2 mL αιθανόλη. Το μίγμα αναδεύεται ξανά ώστε ολόκληρη η ποσότητα του δείγματος να βρίσκεται εν διαλύσει και προστίθενται 10 mL υδροχλωρικού οξέος 8,3M. Η φιάλη τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση για 40 min στους 70-80 °C. Στη συνέχεια η φιάλη απομακρύνεται από το υδατόλουτρο, αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθεται επαρκής ποσότητα αιθανόλης ώστε να καλύψει το κατώτερο σφαιρικό τμήμα της φιάλης και ανακινείται ελαφρώς.

B. Για τα γαλακτοκομικά εφαρμόζεται η βασική υδρόλυση:

Ποσότητα κονιορτοποιημένου και ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg ώστε να περιέχει 100-200 mg λίπους. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε φιάλη Mojonnier, όσο το δυνατόν πιο χαμηλά στον πυθμένα. Προστίθενται 100 mg πυρογαλλικό οξύ και 2 mL διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Προστίθενται πέτρες βρασμού, 2 mL αιθανόλη και 4 mL νερό. Η φιάλη ανακινείται έτσι ώστε όλα τα προστιθέμενα συστατικά να βρίσκονται μέσα στην υγρή φάση. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mL NH₄OH 8,3 M και το διάλυμα αναδεύεται επαρκώς. Η φιάλη τοποθετείται σε κινούμενο υδατόλουτρο στους 70-80 °C για 10 λεπτά. Κάθε 5 λεπτά η φιάλη ανακινείται σε vortex ώστε να μην υπάρχουν σωματίδια κολλημένα πάνω στα τοιχώματα. Μετά τη χώνευση, το διάλυμα απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και προστίθενται μερικές σταγόνες διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης. Ο βασικός χαρακτήρας του διαλύματος (ροζ χρώμα) διατηρείται με την προσθήκη NH₄OH. Στην περίπτωση που το χρώμα είναι δυσδιάκριτο, το pH ελέγχεται με pH-μετρικό χαρτί. Τέλος προστίθεται αιθανόλη ώστε να καλύψει τον πυθμένα της φιάλης και ανακινείται ελαφρώς.

Γ. Στα τυροκομικά προϊόντα εφαρμόζεται ένας συνδυασμός της βασικής και της όξινης υδρόλυσης:

Αρχικά όπως και στις άλλες δύο περιπτώσεις, ποσότητα κονιορτοποιημένου και ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg ώστε να περιέχει 100-200 mg λίπους. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε φιάλη Mojonnier, όσο το δυνατόν πιο χαμηλά στον πυθμένα. Προστίθεται 100 mg πυρογαλλικό οξύ και 2 mL διαλύματος C_{11:0}. Προστίθενται πέτρες βρασμού, 2 mL αιθανόλη. Η φιάλη ανακινείται έτσι ώστε όλα τα προστιθέμενα συστατικά να βρίσκονται μέσα στην υγρή φάση. Προστίθεται 4 mL νερό και το διάλυμα αναδεύεται καλά. Στη συνέχεια προστίθεται 2 mL NH₄OH 8,3 M και το διάλυμα αναδεύεται καλά ξανά. Η φιάλη τοποθετείται σε κινούμενο υδατόλουτρο ανάδευσης στους 70-80 °C για 20 λεπτά. Κάθε 10 λεπτά η φιάλη ανακινείται σε vortex ώστε να μην υπάρχουν σωματίδια κολλημένα πάνω στα τοιχώματα. Προστίθενται 10 mL HCl 12 M και η φιάλη τοποθετείται σε ατμόλουτρο με νερό που βράζει για ακόμη 20 λεπτά. Κάθε 10 λεπτά η φιάλη ανακινείται σε vortex. Μετά τη χώνευση, το διάλυμα απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστίθεται αιθανόλη ώστε να καλύψει τον πυθμένα της φιάλης και ανακινείται ελαφρώς.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΟΥΣ

Μετά την υδρόλυση, ακολουθεί η ίδια πορεία εκχύλισης του λίπους. Στη φιάλη Mojonnier προστίθενται 25 mL διαιθυλαιθέρα. Η φιάλη πωματίζεται και τοποθετείται σε αναδευτήρα (Wrist Action Shaker) για 5 λεπτά. Το πώμα εκπλένεται με μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα και διαιθυλαιθέρα. Προστίθενται 25 mL πετρελαϊκού αιθέρα στη φιάλη, πωματίζεται και ανακινείται ξανά για 5 λεπτά. Η φιάλη τοποθετείται σε φυγόκεντρο στα 600xg ή διαφορετικά αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 1 ώρα έως ότου η ανώτερη φάση του διαλύματος να είναι διαυγής. Το πώμα εκπλένεται με μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα και διαιθυλαιθέρα και η αιθερική στιβάδα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη. Η φιάλη τοποθετείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού μέχρι την πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη. Το υπόλειμμα είναι το εκχυλισμένο λίπος.

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

Το λίπος διαλύεται σε 2-3 mL χλωροφορμίου και 2-3 mL διαιθυλαιθέρα και μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ο διαλύτης εξατμίζεται στους 40 °C υπό ρεύμα αζώτου. Έπειτα προστίθενται 2 mL BF₃ και 1mL τολουόλιο, ο σωλήνας πωματίζεται και τοποθετείται στους 100 °C για 45 min. Αναδεύεται περίπου κάθε 10 λεπτά. Ο όγκος του δείγματος θα πρέπει να παραμείνει αμετάβλητος κατά τη θέρμανση. Μόλις το διάλυμα ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 5 mL νερού και 1 g θειικού νατρίου. Το διάλυμα ανακινείται έντονα και η ανώτερη στιβάδα μεταφέρεται σε φιαλίδιο για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται με τη χρήση αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με FID. Οι συνθήκες λειτουργίας και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα παρατίθενται στους πίνακες 15 και 16 αντίστοιχα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που εφαρμόζεται ξεκινά από μία σχετικά υψηλή θερμοκρασία (100 °C) και φτάνει έως και τους 240 °C.

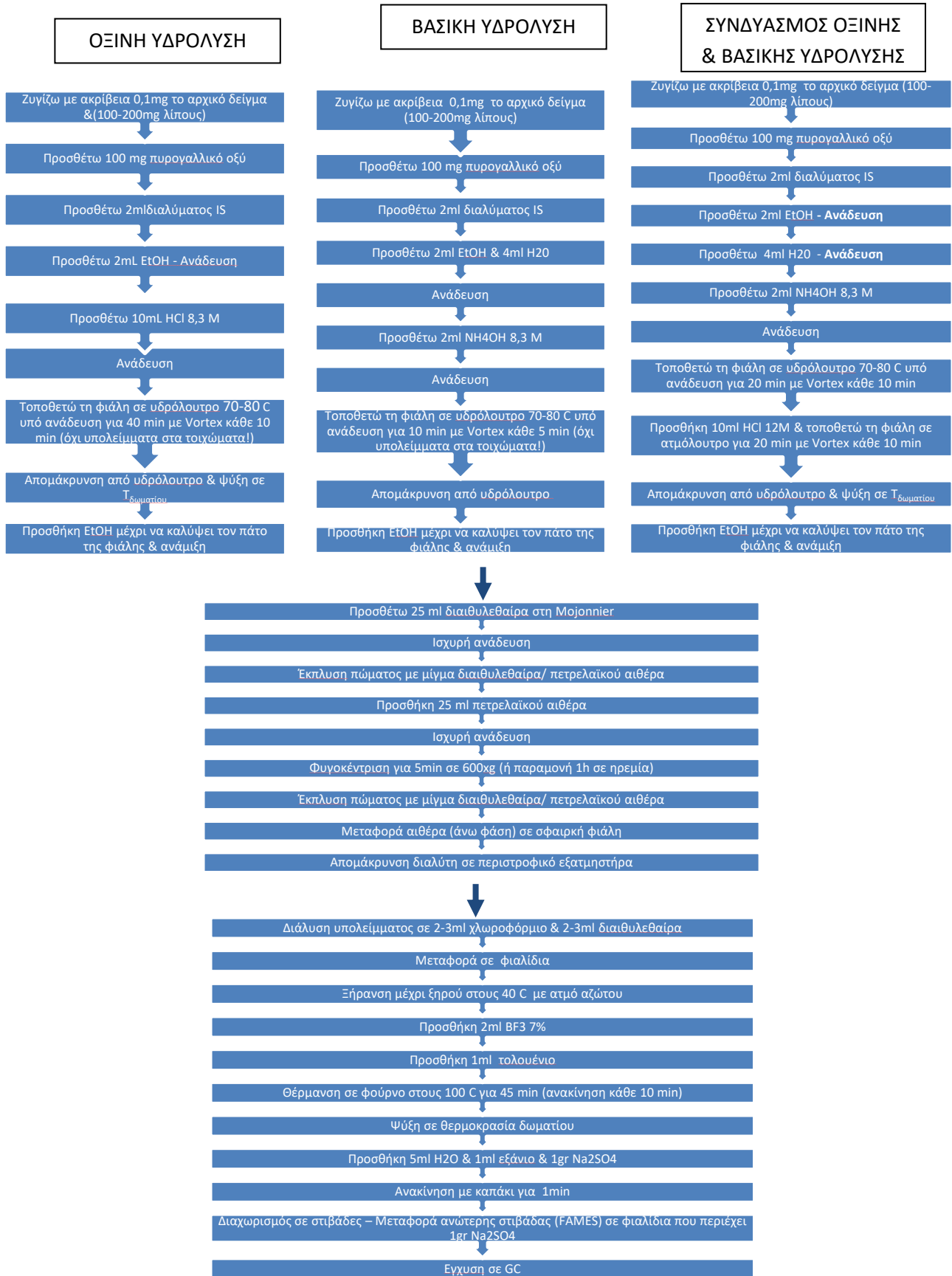
Πίνακας 15 Συνθήκες λειτουργίας GC (AOAC 996.06)

| | |
|----------------------------------|------------|
| Ροή φέροντος αερίου (σταθερή) | 0,8 ml/min |
| Λόγος διαμοιρασμού (Split ratio) | 1:200 |
| Φέρον αέριο | Ήλιο |

Πίνακας 16 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα GC (AOAC 996.06)

| | | |
|----------------------------|---------|-------------------|
| Θερμοκρασία Εισαγωγή | 225 °C | |
| Θερμοκρασία Ανιχνευτή | 285 °C | |
| Αρχική θερμοκρασία φούρνου | 100 °C | Διατήρηση: 4 min |
| Ρυθμός ανόδου | 3°C/min | |
| Τελική θερμοκρασία φούρνου | 240 °C | Διατήρηση: 15 min |

ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ



Εικόνα 20 Σχηματική απεικόνιση ΑΟΑC 996.06

13.2 ΜΕΘΟΔΟΙ *IN SITU* ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ

13.2.1 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ CHRISTIE (ΟΞΙΝΗ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΕΝΟΣ ΣΤΑΔΙΟΥ)

I. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Σκοπός είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων σε τρόφιμα, ο υπολογισμός της συνολικής λιποπεριεκτικότητας καθώς και των κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως ακριβώς και στην επίσημη μέθοδο AOAC 996.06.

II. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος Christie τροποποιήθηκε ώστε να πραγματοποιείται *in situ* μεθύλιωση στο δείγμα τροφίμου. Το ελεύθερα λιπαρά οξέα του δείγματος εστεροποιούνται και οι ακυλογλυκερόλες μετεστεροποιούνται με χρήση διαλύματος θεικού οξέος σε μεθανόλη. Ο οξικός μεθυλεστέρας αν και παράγεται ως παραπροϊόν, δεν επηρεάζει την πορεία της αντίδρασης (Christie., 2010).

III. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Μίγμα εσωτερικών προτύπων TAG C_{11:0} και Me C_{13:0} συγκέντρωσης 10 mg/mL σε επτάνιο ή τολουόλιο. Παρασκευάζεται με διάλυση 1 g TAG C_{11:0} και 1 g Me C_{13:0} σε επτάνιο ή τολουόλιο σε ογκομετρική φιάλη των 100mL. Το διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη.
- Θεικό οξύ σε μεθανόλη H₂SO₄/MeOH 1%
- Διάλυμα χλωριούχου νατρίου NaCl 36% (w/v)
- Επτάνιο ή εξάνιο
- Άνυδρο θεικό νάτριο Na₂SO₄

IV. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

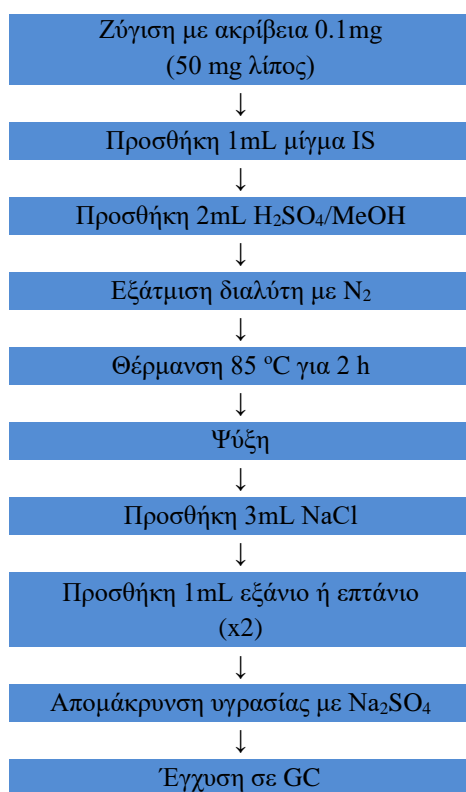
- Αέριος χρωματογράφος (Agilent Technologies 7890) εξοπλισμένος με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας, τριχοειδή στήλη, εισαγωγή διαμοιρασμού (split/splitless) και αυτόματο δειγματολήπτη.
- Τριχοειδής στήλη Agilent CP-Sil 88 for FAME 100 m x 0.25 mm x 0.2 μm
- Δοκιμαστικούς σωλήνες 15 mL
- Ογκομετρική φιάλη 100 mL
- Φιαλίδια με πάμα και ελαστικό παρέμβυσμα PTFE/silicone/PTFE
- Περιστροφικός αναδευτήρας κενού
- Θερμαινόμενη βάση δοκιμαστικών σωλήνων με ρεύμα αζώτου
- Σιφόνια
- Σύριγγα gas-tight
- Φυγόκεντρος

V. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην περίπτωση των τροφίμων ζυγίζεται τέτοια ποσότητα δείγματος ώστε σε κάθε σωλήνα να περιέχονται (με ακρίβεια 0,1 mg) περίπου 50 mg λίπους.

VI. ΠΟΡΕΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει την προζυγισθείσα ποσότητα δείγματος, προστίθενται 1 mL διαλύματος εσωτερικών προτύπων και 2 mL H₂SO₄/MeOH 1%. Ο σωλήνας τοποθετείται στο ρεύμα N₂ για 10 s προς εκδίωξη του οξυγόνου και πωματίζεται άμεσα. Αναδεύεται ήπια και τοποθετείται σε συσκευή θερμοστάτησης για 2 h στους 85 °C. Κατόπιν, ψύχονται οι σωλήνες για τουλάχιστον 15 min αλλά όχι περισσότερο από 1h. Σε αυτό το στάδιο η πορεία μπορεί να διακοπεί, το δείγμα να ψυχθεί στους -20 °C και να συνεχιστεί την επόμενη μέρα. Στη συνέχεια προστίθενται 3 mL NaCl 36% και το διάλυμα αναδεύεται σε vortex. Τέλος προστίθεται 1 mL εξάνιο ή επτάνιο, πωματίζεται ο σωλήνας και αναδεύεται σε κυκλοαναμίκτη για 1 min. Αφήνεται σε ηρεμία για 1-4 h. Εναλλακτικά φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 6 min. Παραλαμβάνεται η οργανική φάση και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη μια φορά. Οι μεθυλεστέρες τοποθετούνται σε γυάλινο σωλήνα με μικρή ποσότητα Na₂SO₄ ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Το διάλυμα ανακινείται έντονα και η ανώτερη στιβάδα μεταφέρεται σε φιαλίδιο για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο. Στην εικόνα 21 παρατίθεται συνοπτικά η συνολική πειραματική πορεία.



Εικόνα 21 Σχηματική απεικόνιση της τροποποιημένης μεθόδου Christie

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται με τη χρήση αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή FID με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης συνολικού μήκους 100 m. Οι συνθήκες λειτουργίας και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα παρατίθενται στους πίνακες 17 και 18 αντίστοιχα. Στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικά split ratio (1:25, 1:50, 1:100 και 1:200) ώστε να μελετηθεί η βέλτιστη διαχωριστικότητα των λιπαρών οξέων.

Πίνακας 17 Συνθήκες λειτουργίας GC (Μέθοδος Christie)

| | |
|----------------------------------|------------|
| Ροή φέροντος αερίου (σταθερή) | 0,8 ml/min |
| Λόγος διαμοιρασμού (Split ratio) | 1:50 |
| Φέρον αέριο | Ήλιο |

Πίνακας 18 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα GC (Μέθοδος Christie)

| | | |
|----------------------------|----------|-------------------|
| Θερμοκρασία Εισαγωγή | 225 °C | |
| Θερμοκρασία Ανιχνευτή | 285 °C | |
| Αρχική θερμοκρασία φούρνου | 100 °C | Διατήρηση: 4 min |
| Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας | 3 °C/min | |
| Τελική θερμοκρασία φούρνου | 240 °C | Διατήρηση: 15 min |

13.2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ISO 12966-2 (ΟΞΙΝΗ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΗ ΚΑΤΑΛΥΣΗ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ)

I. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΠΕΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

Σκοπός είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων σε τρόφιμα, ο υπολογισμός της συνολικής λιποπεριεκτικότητας καθώς και επιμέρους των κορεσμένων, των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών.

II. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο πρότυπο ISO 12966-2 αλλά έχει τροποποιηθεί ώστε να εφαρμόζεται απευθείας σε δείγμα τροφίμου (όχι λίπος). Η όλη πορεία λαμβάνει χώρα σε πωματισμένο φιαλίδιο και χρησιμοποιείται συνδυασμός αντιδραστηρίων ώστε να επιτευχθεί διαδοχικά αλκαλική και όξινη μεθυλίωση. Ο αλκαλικός καταλύτης μετεστεροποιεί τις ακυλογλυκερόλες σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στους αντίστοιχους σάπωνες. Ο όξινος καταλύτης μετατρέπει τους σάπωνες σε μεθυλεστέρες.

III. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Μίγμα εσωτερικών προτύπων TAG C_{11:0} και Me C_{13:0} συγκέντρωσης 10 g/mL σε επτάνιο ή τολουόλιο Παρασκευάζεται με την αραιώση 1 g TAG C_{11:0} και 1 g Me C_{13:0} σε επτάνιο ή τολουόλιο σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σφραγισμένο ερμητικά στην κατάψυξη.
- Θεϊκό οξύ σε μεθανόλη H₂SO₄/MeOH 1 mol/l
- Υδροξείδιο του νατρίου σε μεθανόλη NaOH/MeOH 0.5 mol/l
- Φαινολοφθαλείνη σε μεθανόλη
- Διάλυμα χλωριούχου νατρίου NaCl 36% (w/v)
- Επτάνιο ή εξάνιο
- Άνυδρο θεϊκό νάτριο Na₂SO₄

IV. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Αέριος χρωματογράφος (Agilent Technologies 7890) εξοπλισμένος με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας, τριχοειδή στήλη, εισαγωγή διαμοιρασμού (split/splitless) και αυτόματο δειγματολήπτη.
- Τριχοειδής στήλη Agilent CP-Sil 88 for FAME 100 m x 0.25mm x 0.2μm
- Δοκιμαστικούς σωλήνες 15 mL με καπάκι
- Ογκομετρική φιάλη 100 mL
- Φιαλίδια με καπάκια PTFE/silicone/PTFE
- Περιστροφικός αναδευτήρας
- Θερμαινόμενη βάση δοκιμαστικών σωλήνων με ατμό αζώτου
- Σιφόνια
- Σύριγγα gas-tight
- Φυγόκεντρος

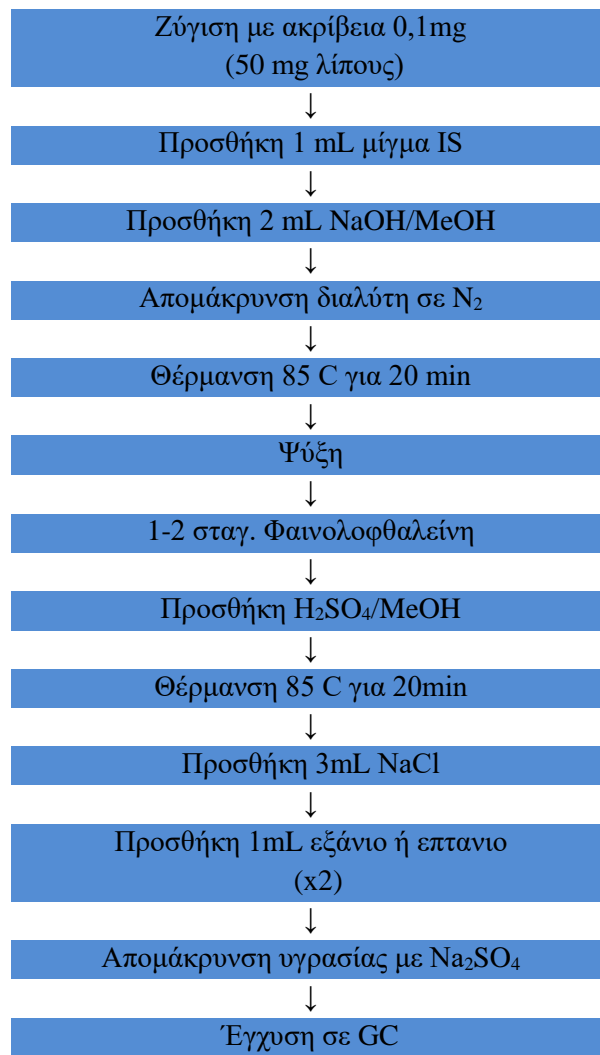
V. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ – ΤΡΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην περίπτωση των τροφίμων ζυγίζεται τέτοια ποσότητα ώστε σε κάθε σωλήνα να περιέχονται (με ακρίβεια 0,1 mg) περίπου 50 mg λίπους. Στην περίπτωση καθαρού λίπους ή ελαίων ακριβώς 50 mg δείγματος.

VI. ΠΟΡΕΙΑ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αρχικά προθερμαίνεται το θερμομπλοκ στους 85 °C. Παράλληλα σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιλαμβάνει τη ζυγισθείσα ποσότητα δείγματος, προστίθενται 1 mL διαλύματος εσωτερικών προτύπων και 2 mL NaOH/MeOH 0,5 M. Το διάλυμα προτύπων προστίθεται με σύριγγα gas-tight ενώ το οξύ με γυάλινο σιφόνιο. Το προκύπτον διάλυμα τοποθετείται σε ρεύμα N₂ για 10 s και πωματίζεται άμεσα. Αναδεύεται ήπια και τοποθετείται στο θερμομπλοκ για 20 min στους 85 °C. Μόλις ολοκληρωθεί η θέρμανση τα δείγματα ψύχονται για τουλάχιστον 15 min αλλά όχι περισσότερο από 1 h. Εναλλακτικά μπορεί να ψυχθεί σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Προστίθενται 1-2 σταγόνες φαινολοφθαλείνης και το διάλυμα χρωματίζεται ροζ-μωβ. Έπειτα προστίθενται αρκετή ποσότητα θειικού οξέος σε μεθανόλη και το διάλυμα αποχρωματίζεται. Προστίθενται επιπλέον ποσότητα του όξινου καταλύτη 0,2 mL. Αναδεύεται ήπια και τοποθετείται στο θερμομπλοκ για ακόμα 20 min στους 85 °C. Στη συνέχεια αφού ψυχθεί, προστίθενται 4 mL NaCl 36% και το διάλυμα αναδεύεται σε vortex. Τέλος προστίθεται 1 mL εξάνιο ή επτάνιο και ο σωλήνας πωματίζεται ώστε να μην υπάρχουν απώλειες. Το διάλυμα αναδεύεται σε vortex και αφήνεται σε ηρεμία για 1-4 h. Εναλλακτικά φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για 6 min. Παραλαμβάνεται η οργανική φάση και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη μια φορά. Το συγκεντρωθέν εξάνιο ή επτάνιο με τους μεθυλεστέρες τοποθετείται σε γυάλινο σωλήνα με μικρή ποσότητα Na₂SO₄ ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Το διάλυμα ανακινείται έντονα και η ανώτερη στιβάδα μεταφέρεται σε φιαλίδιο για έγχυση στον αεριοχρωματογράφο.

Στην εικόνα 22 παρατίθεται συνοπτική η συνολική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που περιγράφηκε παραπάνω:



Εικόνα 22 Σχηματική απεικόνιση τροποποιημένης ISO 12966-2

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

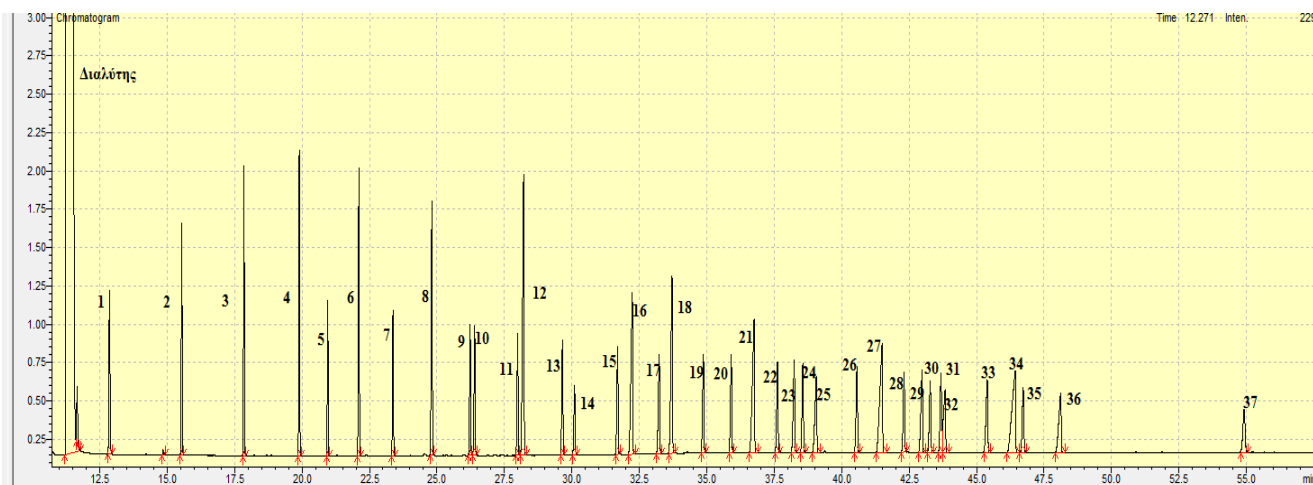
Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται με τη χρήση αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με FID. Οι συνθήκες λειτουργίας και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα αντιστοιχούν σε εκείνες της ενότητας 13.2.1 και παρατίθενται αναλυτικά στους Πίνακες 17 και 18. Στα ίδια δείγματα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικά split ratio (1:25, 1:50, 1:100 και 1:200) ώστε να μελετηθεί η βέλτιστη διαχωριστικότητα των λιπαρών οξέων.

14. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

14.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΩΝ

Σε πρώτο στάδιο, όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκε ο διαχωρισμός μίγματος 37 μεθυλεστέρων πρότυπου μίγματος. Αναλύθηκαν 3 διαφορετικές παρτίδες του ίδιου πρότυπου μίγματος μεθυλεστέρων. Πρόκειται για τα CRM 47885 με lot number LRAB5516 (Dec 2020), XA19945V (Apr 2019) και το μίγμα με αριθμό 14056 (Apr 2011) της εταιρείας Supelco. Τα δείγματα είχαν παρόμοιες συγκεντρώσεις οι οποίες και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τον υπολογισμό της λιποπεριεκτικότητας των τροφίμων που μελετήθηκαν.

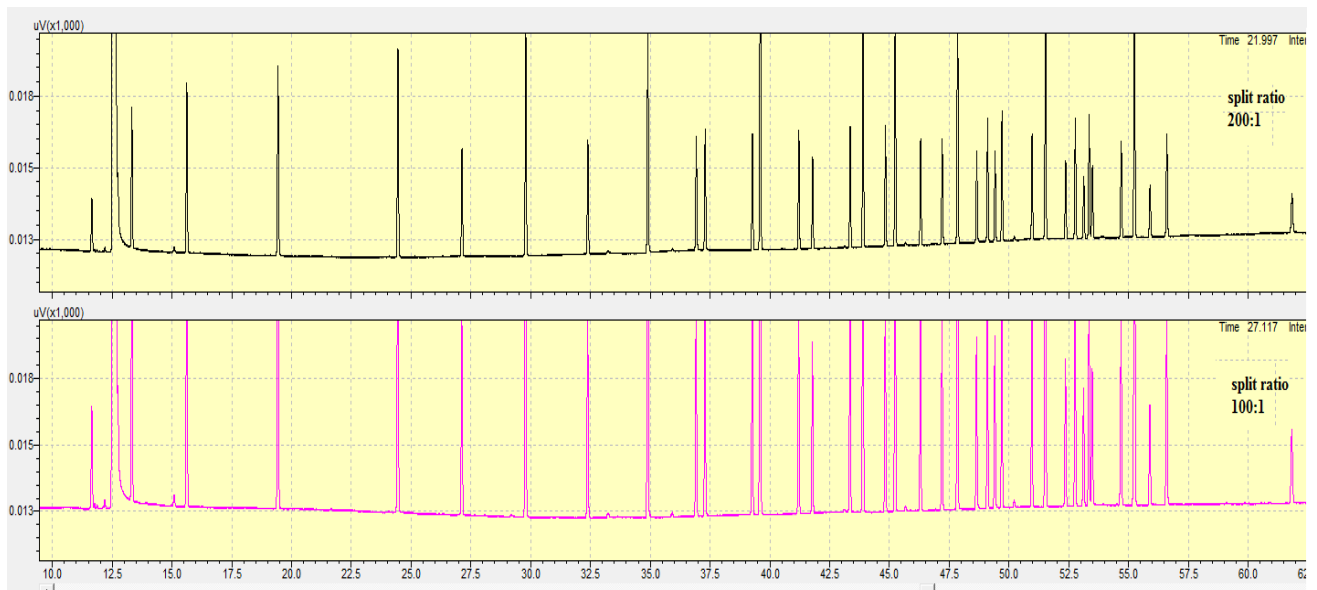
Αρχικά εξετάστηκε ο διαχωρισμός των 37 μεθυλεστέρων σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρονται στους Πίνακες 15 και 16, οι οποίες προτείνονται από τη μέθοδο AOAC 996.06. Το χρωματογράφημα που εξήχθη παρουσιάζεται στην Εικόνα 23, βάσει της οποίας ο διαχωρισμός των 37 FAMES κρίνεται ικανοποιητικός. Συνεπώς οι συνθήκες λειτουργίες που προτείνονται από την AOAC 996.06 είναι κατάλληλες και για το συγκεκριμένο μίγμα.



Εικόνα 23 Χρωματογράφημα μίγματος 37 μεθυλεστέρων (split ratio 200:1)

Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικούς λόγους διαμοιρασμού (split ratio - 50:1, 20:1, 100:1 και 200:1), χωρίς όμως να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές στο διαχωρισμό των κορυφών. Όσο μειώνεται το split ratio, τόσο μειώνεται και η δυνατότητα διαχωρισμού λιπαρών οξέων που εκλύονται σε πολύ κοντινούς χρόνους. Για παράδειγμα σε split ratio 50:1 παρατηρήθηκε πως ο διαχωρισμός μεταξύ του μεθυλεστέρα του αραχιδονικού οξέος (κορυφή # 31) και του εικοσιτριανοϊκού οξέος (κορυφή # 32) δεν ήταν τόσο καλός όσο στο split ratio 100:1. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι καθώς μειώνεται το split ratio, αυξάνεται η ποσότητα της ουσίας προς διαχωρισμό και επομένως αυξάνεται το εύρος της χρωματογραφικής κορυφής. Το συγκεκριμένο ζήτημα θα συζητηθεί περαιτέρω καθώς με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση του αριθμού των αναλύσεων στη συγκεκριμένη χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε, παρατηρείται δυσκολία του διαχωρισμού των δύο αυτών εστέρων. Κατά συνέπεια μέχρι το τέλος της μελέτης θα οριστεί σύμβαση σε κάποια δείγματα πως οι δύο αυτοί εστέρες συνεκλούνται.

Στην Εικόνα 24 φαίνεται επίσης πως επηρεάζει το split ratio το ύψος και το πόσο οξείες είναι οι κορυφές. Όταν το split ratio διπλασιάζεται, δηλαδή όταν η ποσότητα που εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο είναι η μισή, το ύψος των κορυφών μειώνεται περίπου στο μισό του αρχικού, το οποίο είναι αναμενόμενο.



Εικόνα 24 Σύγκριση του μίγματος 37 FAMES σε δύο διαφορετικά split ratio (ίδια κλίμακα)

Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων πραγματοποιήθηκε βάσει της σειράς έκλουσης που αναφέρεται στην επίσημη μέθοδο AOAC 996.06. Δεδομένου ότι υπάρχουν αρκετά κρίσιμα ζεύγη κορυφών, των οποίων οι χρόνοι κατακράτησης διαφέρουν ελάχιστα, η ταυτοποίησή τους βασίστηκε στη διαφορετική συγκέντρωσή τους στο πρότυπο μίγμα και άρα στο διαφορετικό ύψος των κορυφών. Σύμφωνα με τα προηγούμενα, προέκυψε η σειρά έκλουσης των 37 μεθυλεστέρων, που παρουσιάζεται στον Πίνακα 19. Παράλληλα παρατίθεται και ο σχετικός χρόνος έκλουσης των μεθυλεστέρων ως προς το ενδεκανοϊκό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο.

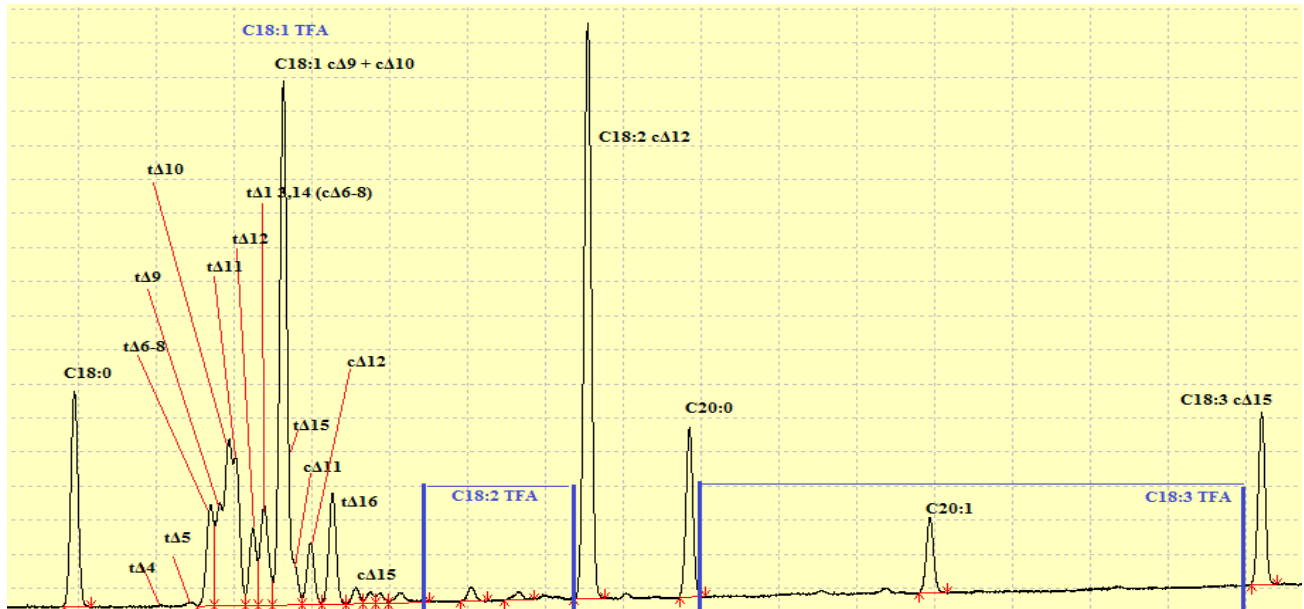
Πίνακας 19 Σειρά έκλυσης μίγματος μεθυλεστέρων και σχετικός χρόνος κατακράτησης (RRT) ως προς το ενδεκανοϊκό οξύ

| A/A | Μεθυλεστέρας | Χρόνος (min) | RRT |
|-----|--------------------------|--------------|-------|
| 1 | C _{4:0} | 13.322 | 0.529 |
| 2 | C _{6:0} | 15.244 | 0.605 |
| 3 | C _{8:0} | 16.711 | 0.661 |
| 4 | C _{10:0} | 20.868 | 0.826 |
| 5 | C _{11:0} | 25.214 | 1.000 |
| 6 | C _{12:0} | 27.889 | 1.106 |
| 7 | C _{13:0} | 30.538 | 1.212 |
| 8 | C _{14:0} | 33.108 | 1.314 |
| 9 | C _{14:1} | 35.482 | 1.408 |
| 10 | C _{15:0} | 37.035 | 1.471 |
| 11 | C _{15:1} | 37.866 | 1.503 |
| 12 | C _{16:0} | 39.371 | 1.564 |
| 13 | C _{16:1} | 40.073 | 1.591 |
| 14 | C _{17:0} | 41.384 | 1.644 |
| 15 | C _{17:1} | 42.244 | 1.677 |
| 16 | C _{18:0} | 43.522 | 1.729 |
| 17 | C _{9t-18:1} | 44.180 | 1.755 |
| 18 | C _{18:1 n-9} | 44.963 | 1.786 |
| 19 | C _{9t-18:2} | 45.560 | 1.809 |
| 20 | C _{18:2} | 46.573 | 1.850 |
| 21 | C _{20:0} | 47.403 | 1.883 |
| 22 | C _{18:3 n-6} | 48.097 | 1.910 |
| 23 | C _{20:1} | 48.791 | 1.938 |
| 24 | C _{18:3 n-3} | 49.207 | 1.955 |
| 25 | C _{21:0} | 49.513 | 1.967 |
| 26 | C _{11, 14-20:2} | 50.084 | 1.989 |
| 27 | C _{22:0} | 51.140 | 2.031 |
| 28 | C _{20:3 n-6} | 51.791 | 2.057 |
| 29 | C _{22:1 n-9} | 52.499 | 2.086 |
| 30 | C _{20:3 n-3} | 52.891 | 2.101 |
| 31 | C _{20:4 n-6} | 53.206 | 2.114 |
| 32 | C _{23:0} | 53.500 | 2.126 |
| 33 | C _{22:2 n-6} | 54.709 | 2.174 |
| 34 | C _{24:0} | 55.278 | 2.196 |
| 35 | C _{20:5 n-3} | 55.910 | 2.221 |
| 36 | C _{24:1 n-9} | 56.622 | 2.250 |
| 37 | C _{22:6 n-3} | 61.848 | 2.457 |

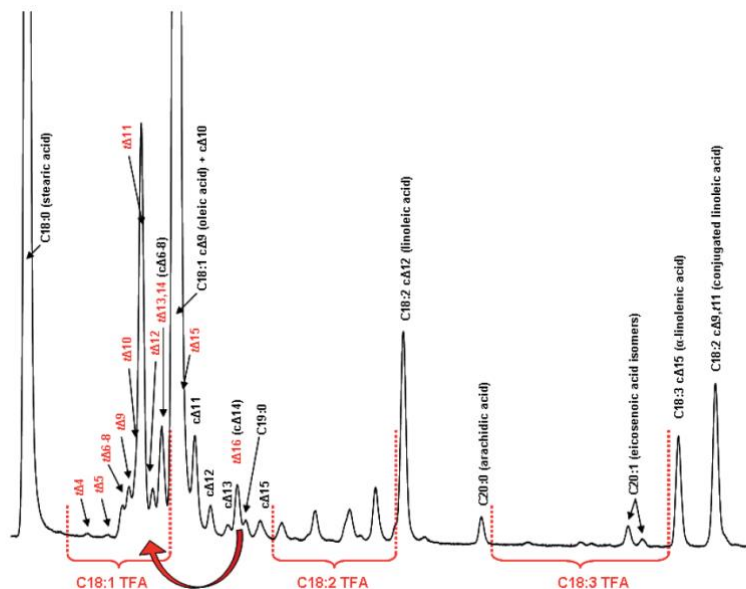
Επιπρόσθετα μελετήθηκε ο διαχωρισμός σε μίγμα *cis* και *trans* ισομερών του C_{18:1} της Sigma-Aldrich (40495-U, Lot number: LRA89696). Στην Εικόνα 25 παρουσιάζεται το προκύπτον χρωματογράφημα των *trans* ισομερών του ελαϊκού οξέος (C_{18:1}). Παράλληλα φαίνεται στην Εικόνα 26, η ίδια περιοχή των TFA όπως αυτή παρατίθεται στην AOAC 2012.13 υπό παρόμοιες χρωματογραφικές συνθήκες. Η κορυφή του C_{18:1} *trans* Δ16 είναι δυσδιάκριτη καθώς συνεκλύεται μαζί με το *cis* ισομερές του C_{18:1}. Αναφέρεται μάλιστα πως στην περίπτωση που στο προς ανάλυση δείγμα περιέχεται λιπαρή ύλη γάλακτος, τότε δύο ισομερή, το C_{18:1} *trans* Δ15 και το C_{18:1} *trans* Δ16, περικλείονται στην περιοχή του C_{18:1}. Ο διαχωρισμός του C_{18:1} *trans* Δ16 είναι δυνατό να επιτευχθεί χρήση στήλης μήκους 100 m, ενώ όσο αφορά το διαχωρισμό του C_{18:1} *trans* Δ15 απαιτείται προεπεξεργασία με TLC Ag⁺ ή HPLC Ag⁺ πριν το αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό. Σημαντικό είναι να

αναφερθεί πως πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση εάν δεν συμπεριληφθεί στο άθροισμα των *trans* λιπαρών οξέων το C_{18:1} *trans* Δ15 (AOAC 2012.13).

Στην περίπτωση που το προς ανάλυση δείγμα περιέχει ιχθυέλαιο ή λιπαρή ύλη γάλακτος, εκλούεται ένα ακόμα ισομερές του C_{20:1} πριν το C_{20:1} n-9, το οποίο ακόμη και αν κατά λάθος ληφθεί υπόψη ως ισομερές του C_{18:3} το σφάλμα είναι αμελητέο.



Εικόνα 25 Χρωματογράφημα *trans* ισομερών μίγματος



Εικόνα 26 Εικόνα *trans* ισομερών σε γαλακτοκομικά προϊόντα, AOAC 2012.13

Από τα εμβαδά των κορυφών υπολογίστηκε ο συντελεστής απόκρισης R_i κάθε μεθυλεστέρα, σύμφωνα με την παρακάτω σχέση που δίνεται στην μέθοδο AOAC 996.06:

$$R_i = \frac{P_i \times W_{C_{11:0}}}{W_i \times P_{C_{11:0}}} \quad \text{Εξίσωση 2}$$

όπου

P_i : εμβαδό της κορυφής του εκάστοτε μεθυλεστέρα

W_i : συγκέντρωση του εκάστοτε μεθυλεστέρα σύμφωνα με το πιστοποιητικό του αντίστοιχου CRM μίγματος της SUPELCO

$P_{C_{11:0}}$: εμβαδό της κορυφής του ενδεκανοϊκού μεθυλεστέρα (εσωτερικό πρότυπο)

$W_{C_{11:0}}$: συγκέντρωση του ενδεκανοϊκού μεθυλεστέρα σύμφωνα με το πιστοποιητικό του CRM

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται οι αντίστροφες τιμές των συντελεστών απόκρισης ($1/R_i$), οι οποίες ισοδυναμούν με τις τιμές του πειραματικού παράγοντα διόρθωσης (F_{CE}) και είναι άμεσα συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες τιμές του θεωρητικού παράγοντα διόρθωσης (F_{CT}) (βλ. μέρος 10.3). Παρατηρώντας το πηλίκο F_{CE}/F_{CT} είναι εμφανές ότι για τα περισσότερα λιπαρά οξέα προσεγγίζει την ιδανική τιμή της μονάδας (1). Ωστόσο, αρκετοί μεθυλεστέρες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων εμφανίζουν σχετικά μεγάλες αποκλίσεις από το βέλτιστο αποτέλεσμα, δηλαδή τη μονάδα (1). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην αστάθεια των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων, με συνέπεια να μεταβάλλεται η συγκέντρωσή τους στο πρότυπο μίγμα σε σχέση με την αρχική πιστοποιημένη τιμή που χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς των συντελεστών απόκρισης. Η συγκεκριμένη εικόνα φαίνεται να επαναλαμβάνεται σε όλα τα διαφορετικά πρότυπα μίγματα μεθυλεστέρων που αναλύθηκαν.

Το πηλίκο F_{CE}/F_{CT} φαίνεται να επηρεάζεται και με την πάροδο του χρόνου καθώς λαμβάνει χώρα η συγκεκριμένη μελέτη. Στον ίδιο Πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα του μίγματος CRM της SUPELCO με lot LRAB5516 (Dec 2020) το οποίο αναλύθηκε περίπου 4 μήνες αφότου ξεκίνησε να χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη στήλη. Αν και το χρονικό διάστημα είναι μικρό, αναλύθηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων συνεπώς είναι ξεκάθαρη η επίδραση της φθοράς της στήλης στο διαχωρισμό ορισμένων κορυφών. Παρατηρείται πως το κρίσιμο ζεύγος αραχιδονικού ($C_{20:4}$ n-6) και εικοσιτριανοϊκού μεθυλεστέρα ($C_{23:0}$) συνεκλούνται στο FAMEMIX_3 και FAMEMIX_4, και γι' αυτόν τον λόγο τα αντίστοιχα κελιά του πίνακα είναι κενά. Η δυσκολία διαχωρισμού του συγκεκριμένου ζεύγους η οποία επηρεάζει και το τελικό αποτέλεσμα, αναφέρεται συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία .

Πίνακας 20: Τιμές του πειραματικού παράγοντα διόρθωσης (F_{CE}) τεσσάρων διαφορετικών μιγμάτων μεθυλεστέρων σε διαφορετικά split ratio και σύγκριση με τον θεωρητικό παράγοντα διόρθωσης (F_{CT})

| | FAME MIX_1 18/12/2018 200:1 | FAME MIX_2 20/12/2018 200:1 | FAME MIX_3 7/1/2019 100:1 | FAME MIX_4 8/1/2019 100:1 | Μέση Τιμή F_{CE} | F_{CT} | F_{CE}/F_{CT} |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------|----------|-----------------|
| C _{4:0} | 1,60 | 1,58 | 1,50 | 1,47 | 1,52 | 1,402 | 0.922 |
| C _{6:0} | 1,27 | 1,27 | 1,23 | 1,23 | 1,25 | 1.192 | 0.954 |
| C _{8:0} | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1,11 | 1.086 | 0.978 |
| C _{10:0} | 1,03 | 1,03 | 1,04 | 1,04 | 1,04 | 1.023 | 0.984 |
| C _{11:0} | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1.000 | 1.000 |
| C _{12:0} | 0,97 | 0,97 | 0,95 | 0,94 | 0,96 | 0,981 | 1.022 |
| C _{13:0} | 0,97 | 0,96 | 0,93 | 0,92 | 0,94 | 0,972 | 1.034 |
| C _{14:0} | 0,95 | 0,94 | 0,90 | 0,89 | 0,91 | 0,965 | 1.060 |
| C _{14:1} | 0,95 | 0,94 | 0,90 | 0,89 | 0,91 | 0,951 | 1.045 |
| C _{15:0} | 0,95 | 0,92 | 0,89 | 0,87 | 0,90 | 0,943 | 1.048 |
| C _{15:1} | 0,96 | 0,95 | 0,90 | 0,89 | 0,92 | 0,939 | 1.021 |
| C _{16:0} | 0,92 | 0,92 | 0,87 | 0,85 | 0,88 | 0,931 | 1.058 |
| C _{16:1} | 0,93 | 0,94 | 0,89 | 0,87 | 0,90 | 0,928 | 1.031 |
| C _{17:0} | 0,64 | 0,64 | 0,61 | 0,59 | 0,61 | 9.921 | 1.510 |
| C _{17:1} | 0,92 | 0,91 | 0,87 | 0,85 | 0,88 | 0,919 | 1.044 |
| C _{18:0} | 0,92 | 0,90 | 0,87 | 0,85 | 0,88 | 0,912 | 1.036 |
| t-C _{18:1} | 0,93 | 0,91 | 0,87 | 0,86 | 0,89 | 0,911 | 1.024 |
| C _{18:1} | 0,91 | 0,88 | 0,85 | 0,84 | 0,86 | 0,904 | 1.051 |
| t-C _{18:2} | 0,94 | 0,92 | 0,89 | 0,87 | 0,90 | 0,898 | 0.998 |
| C _{18:2} | 0,92 | 0,90 | 0,86 | 0,85 | 0,88 | 0,898 | 1.020 |
| C _{20:0} | 0,89 | 0,87 | 0,84 | 0,82 | 0,85 | 0,897 | 1.055 |
| C _{18:3 (GLA)} | 0,95 | 0,93 | 0,89 | 0,88 | 0,91 | 0,892 | 0.980 |
| C _{20:1} | 0,91 | 0,88 | 0,85 | 0,84 | 0,87 | 0,891 | 1.024 |
| C _{18:3} | 0,98 | 0,97 | 0,94 | 0,92 | 0,95 | 0,892 | 0.939 |
| C _{21:0} | 0,89 | 0,88 | 0,85 | 0,82 | 0,85 | 0,890 | 1.047 |
| C _{20:2} | 0,83 | 0,77 | 0,78 | 0,77 | 0,80 | 0,886 | 1.108 |
| C _{22:0} | 0,89 | 0,80 | 0,84 | 0,82 | 0,85 | 0,885 | 1.041 |
| C _{20:3} | 1,03 | 1,01 | 0,99 | 0,97 | 1,00 | 0,880 | 0.880 |
| C _{22:1} | 0,90 | 0,86 | 0,86 | 0,84 | 0,87 | 0,880 | 1.011 |
| C _{20:3} | 0,80 | 0,77 | 0,75 | 0,74 | 0,76 | 0,880 | 1.158 |
| C _{23:0} | 0,72 | 0,67 | | | 0,43 | 0,880 | 2.047 |
| C _{20:4} | 1,01 | 1,01 | | | 0,85 | 0,875 | 1.029 |
| C _{22:2} | 1,01 | 0,98 | 0,97 | 0,93 | 0,97 | 0,875 | 0.902 |
| C _{24:0} | 0,88 | 0,86 | 0,82 | 0,81 | 0,84 | 0,876 | 1.043 |
| C _{20:5} | 0,57 | 0,56 | 0,55 | 0,53 | 0,55 | 0,869 | 1.580 |
| C _{24:1} | 0,94 | 0,92 | 0,89 | 0,87 | 0,90 | 0,871 | 0.968 |
| C _{22:6} | 0,81 | 0,78 | 0,77 | 0,75 | 0,78 | 0,855 | 1.096 |

Στο βουτυρικό οξύ η απόκλιση είναι αναμενόμενη καθώς εκλούεται στην αρχή της χρωματογραφικής ανάλυσης, στην περιοχή έκλουσης των διαλυτών. Συνεπώς λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των διαλυτών και κατά συνέπεια του μεγάλου εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής τους επηρεάζεται και η πιο κοντινή

κορυφή σε αυτούς, δηλαδή η κορυφή του βουτυρικού οξέος. Μεγάλες αποκλίσεις φαίνεται να υπάρχουν και στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ιδιαίτερα στο EPA (C_{20:5}). Πρόκειται για τα λιπαρά οξέα με τους περισσότερους διπλούς δεσμούς και κατά συνέπεια με τη μεγαλύτερη χημική αστάθεια. Επιπρόσθετα σημαντικές αποκλίσεις φαίνεται να υπάρχουν και στα κάποια μονοακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το μαργαρικό (C_{17:0}) και το τρικοσανοϊκό (C_{23:0}). Οι αποκλίσεις αυτές παρουσιάζονταν σε όλα τα πρότυπα μίγματα μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της παρούσας μελέτης.

Η επιλογή των πειραματικών συντελεστών απόκρισης που χρησιμοποιούνται περαιτέρω για την επεξεργασία αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων του δείγματος CRM σκόνης βρεφικού γάλακτος που αναλύθηκε, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία καθώς και με την περίοδο που αναλύθηκε το δείγμα.

14.1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΟΑC 996.06 ΣΕ CRM ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

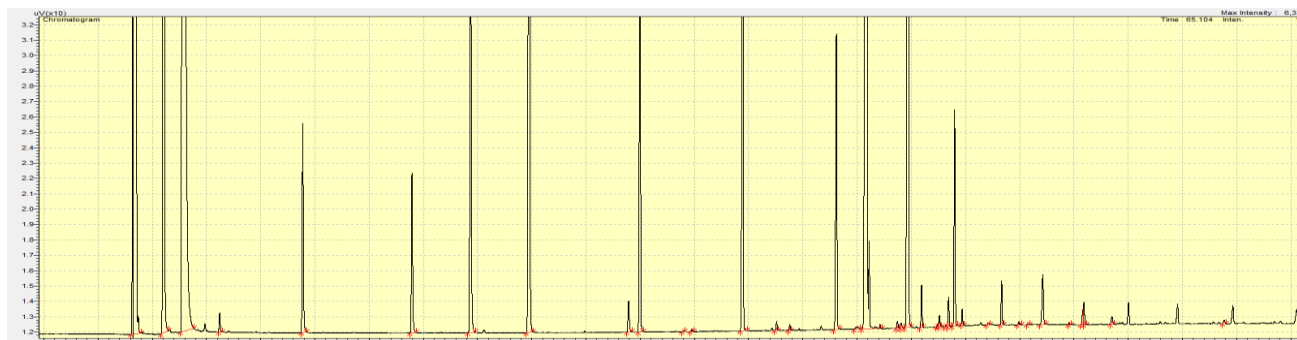
Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκε το δείγμα CRM (ή SRM) με κωδικό 1849^a και αναφερόμενο συγκεκριμένα ως “Infant/Adult Nutritional Formula” (Gonzalez, 2014), το οποίο φυλασσόταν σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C). Στον Πίνακα 21 παρατίθενται οι πιστοποιημένες τιμές του χρησιμοποιούμενου CRM, όπως αναφέρονται στο πιστοποιητικό που το συνοδεύει.

Πίνακας 21 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων του δείγματος 1849^a σύμφωνα με το πιστοποιητικό ανάλυσης

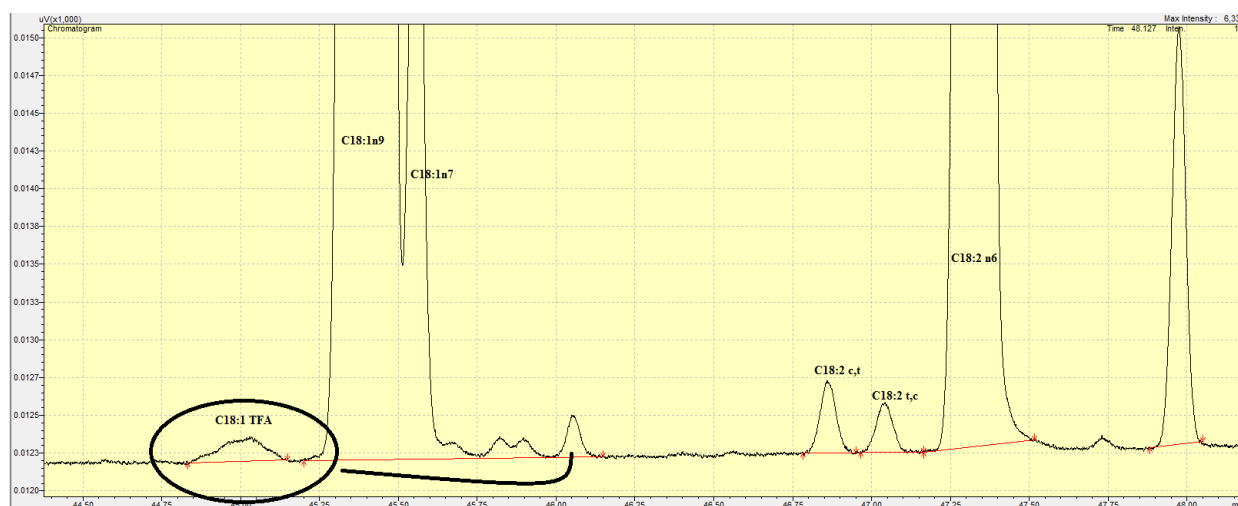
| Λιπαρό οξύ | g/100 g δείγματος |
|-------------------------|-------------------|
| C _{8:0} | 0,74 |
| C _{16:0} | 2,1 |
| C _{16:1} | 0,0222 |
| C _{18:0} | 0,809 |
| C _{18:1} | 10,7 |
| C _{18:2} | 5,72 |
| C _{20:0} | 0,0822 |
| C _{18:3} | 0,591 |
| C _{22:0} | 0,066 |
| C _{20:4} | 0,123 |
| C _{24:0} | 0,0387 |
| C _{24:1} | 0,0202 |
| C _{20:6} | 0,0179 |
| Συνολικό Λίπος % | 30,43 |
| Κορεσμένα % | 11,10 |
| Μονοακόρεστα % | 6,07 |
| Πολυακόρεστα % | 9,42 |

Το δείγμα προετοιμάστηκε με βάση την πορεία της βασικής υδρόλυσης της ΑΟΑC 996.06, η οποία εφαρμόζεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Το χρωματογράφημα που προέκυψε παρουσιάζεται στην Εικόνα 27, ενώ η Εικόνα 28 παρουσιάζει εστιασμένη την περιοχή του χρωματογραφήματος όπου εκκλούνται ο μεθυλεστέρας του ελαϊκού και ο μεθυλεστέρας του λινελαϊκού οξέος. Τα διάφορα ισομερή αυτών των εστέρων ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της επίσημης μεθόδου ΑΟΑC 2012.13 (P. A. Golay J. M., 2016) καθώς και με βάση το πρότυπο μίγμα *trans* ισομερών που περιγράφηκε παραπάνω. Στην Εικόνα 28 αναγράφονται επίσης τα αναφερόμενα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα καθώς και τα ισομερή τους. Όπως

φαίνεται και στις δύο εικόνες, τα προκύπτοντα χρωματογραφήματα φέρουν διακριτές, οξείες κορυφές. Ως εκ τούτου συμπεραίνεται πως οι χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν κατάλληλες. Δοκιμές πραγματοποιήθηκαν και σε διαφορετικά split ratio, παρ' όλα αυτά το 200:1 της προτεινόμενης μεθόδου AOAC 996.06 ήταν αυτό με τα βέλτιστα αποτελέσματα.



Εικόνα 27 Χρωματογράφημα CRM 1849^a



Εικόνα 28 Περιοχή trans και cis ισομερών του 18:1 και του 18:2 του CRM 1849^a

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω υπολογισμοί οι οποίοι αναφέρονται στην AOAC 996.06:

Αρχικά υπολογίζεται από την Εξίσωση 3 η μάζα κάθε FAME. Κατόπιν, με χρήση συντελεστών μετατροπής και της Εξίσωσης 4, ο κάθε μεθυλεστέρας εκφράζεται ως ισοδύναμο της αντίστοιχης τριακυλογλυκερόλης.

$$W_{FAME,i} = \frac{Pt_i W_{tC11:0} 1.0067}{Pt_{C11:0} Ri} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

$$W_{TG,i} = W_{FAME,i} \times f_{TG,i} \quad \text{Εξίσωση 4}$$

Pt_i : εμβαδό κορυφής του εκάστοτε FAME_i στο δείγμα

$Pt_{C11:0}$: εμβαδό κορυφής του ενδεκανοϊκού μεθυλεστέρα (εσωτερικό πρότυπο)

1,0067: συντελεστής μετατροπής της τριενδεκανοϊνης σε ενδεκανοϊκό μεθυλεστέρα

$W_{tC11:0}$: η μάζα της τριενδεκανοϊνης που προστέθηκε στο δείγμα (= 0,01g αν η διαδικασία ακολουθηθεί επακριβώς)

Ri : συντελεστής απόκρισης

$f_{TG,i}$: παράγοντας μετατροπής του εκάστοτε FAME_i σε ισοδύναμο τριακυλογλυκερόλης

Η συνολική λιποπεριεκτικότητα του δείγματος εκφράζεται ως το άθροισμα των ισοδυνάμων των τριακυλογλυκερολών (συμπεριλαμβανομένων των *cis* και *trans* ισομερών):

$$\text{Συνολικό λίπος, \%} = \sum W_{TGi} / W_{\text{sample}} \quad \text{Εξίσωση 5}$$

όπου: W_{sample} = η μάζα του δείγματος τροφίμου

Από την Εξίσωση 6 υπολογίζεται η μάζα κάθε λιπαρού οξέος, ως γινόμενο της μάζας του αντίστοιχου μεθυλεστέρα επί το συντελεστή μετατροπής μεθυλεστέρα σε ισοδύναμα λιπαρού οξέος:

$$W_i = W_{FAME,i} \times f_{FA,i} \quad \text{Εξίσωση 6}$$

Η περιεκτικότητα κορεσμένου λίπους (% w/w) εκφράζεται ως το άθροισμα των κορεσμένων λιπαρών οξέων που εμπεριέχονται στο δείγμα:

$$\text{Κορεσμένο λίπος, \%} = \left(\sum \text{κορεσμένο } W_i / W_{\text{sample}} \right) \times 100\% \quad \text{Εξίσωση 7}$$

Η περιεκτικότητα μονοακόρεστου λίπους (% w/w) εκφράζεται ως το άθροισμα μόνο των *cis* ισομερών των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων που εμπεριέχονται στο δείγμα:

$$\text{Μονοακόρεστο λίπος, \%} = \left(\sum \text{μονοακόρεστο } W_i / W_{\text{sample}} \right) \times 100\% \quad \text{Εξίσωση 8}$$

Η περιεκτικότητα πολυακόρεστου λίπους (% w/w) εκφράζεται ως το άθροισμα μόνο των *cis* ισομερών των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που εμπεριέχονται στο δείγμα:

$$\text{Πολυακόρεστο λίπος, \%} = \left(\sum \text{πολυακόρεστο } W_i / W_{\text{sample}} \right) \times 100\% \quad \text{Εξίσωση 9}$$

Οι συντελεστές μετατροπής των μεθυλεστέρων σε ισοδύναμα τριακυλογλυκερολών και λιπαρών οξέων αναφέρονται στην AOAC 996.06 και παρατίθενται στον ακόλουθο Πίνακα 22.

Πίνακας 22 Συντελεστές μετατροπής των FAMES σε ισοδύναμα τριακυλογλυκερολών f_{TG_i} και λιπαρών οξέων f_{FA_i}

| Λιπαρό οξύ | f_{TG_i} | f_{FA_i} |
|-------------------|------------|------------|
| C _{4:0} | 0,9868 | 0,8627 |
| C _{6:0} | 0,9897 | 0,8923 |
| C _{8:0} | 0,9915 | 0,9114 |
| C _{10:0} | 0,9928 | 0,9247 |
| C _{11:0} | 0,9933 | 0,9300 |
| C _{12:0} | 0,9937 | 0,9346 |
| C _{13:0} | 0,9941 | 0,9386 |
| C _{14:0} | 0,9945 | 0,9421 |
| C _{14:1} | 0,9944 | 0,9417 |
| C _{15:0} | 0,9948 | 0,9453 |
| C _{15:1} | 0,9947 | 0,9449 |
| C _{16:0} | 0,9950 | 0,9481 |
| C _{16:1} | 0,9950 | 0,9477 |
| C _{17:0} | 0,9953 | 0,9507 |
| C _{17:1} | 0,9952 | 0,9503 |
| C _{18:0} | 0,9955 | 0,9530 |
| C _{18:1} | 0,9955 | 0,9527 |
| C _{18:1} | 0,9955 | 0,9527 |
| C _{18:2} | 0,9954 | 0,9524 |
| C _{18:2} | 0,9954 | 0,9524 |
| C _{20:0} | 0,9959 | 0,9570 |
| C _{18:3} | 0,9954 | 0,9520 |
| C _{20:1} | 0,9959 | 0,9568 |
| C _{18:3} | 0,9954 | 0,9520 |
| C _{21:0} | 0,9961 | 0,9588 |
| C _{20:2} | 0,9958 | 0,9565 |
| C _{22:0} | 0,9962 | 0,9604 |
| C _{20:3} | 0,9958 | 0,9562 |
| C _{22:1} | 0,9962 | 0,9602 |
| C _{20:3} | 0,9958 | 0,9562 |
| C _{23:0} | 0,9958 | 0,9560 |
| C _{20:4} | 0,9964 | 0,9620 |
| C _{22:2} | 0,9962 | 0,9600 |
| C _{24:0} | 0,9965 | 0,9963 |
| C _{20:5} | 0,9958 | 0,9557 |
| C _{24:1} | 0,9965 | 0,9632 |
| C _{22:6} | 0,9961 | 0,9590 |

Στον Πίνακα 26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δειγμάτων CRM τα οποία παρασκευάστηκαν με βάση την AOAC 996.06 σε σύγκριση με τα αναμενόμενα του πιστοποιητικού. Συγκριτικά με τα αναμενόμενα αποτελέσματα τα οποία αναφέρονται στο πιστοποιητικό, στα περισσότερα λιπαρά οξέα δε φαίνεται να

υπάρχουν διαφοροποιήσεις. Εξαιρέση αποτελούν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία εμφανίζουν και τις μεγαλύτερες αποκλίσεις. Αν ανατρέξει κανείς στους παράγοντες διόρθωσης, θα διαπιστώσει πως η πλειονότητα των αποτελεσμάτων που απέχουν από τη μονάδα συναντάται στα πολυακόρεστα και στα μονοακόρεστα. Πιθανώς εξαιτίας αυτού να επηρεάζεται και το τελικό αποτέλεσμα. Βέβαια, όπως έχει προαναφερθεί, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συχνά αντιμετωπίζουν κωλύματα κατά τον προσδιορισμό τους, εξαιτίας της ασταθούς τους φύσης. Μη λογικό αποτέλεσμα προκύπτει στην περίπτωση του *cis*-11,14- εικοσαδιενοϊκού οξέος του οποίου η συγκέντρωση προκύπτει διπλάσια από την αναμενόμενη. Το γεγονός αυτό παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα CRM που αναλύθηκαν. Παρ' όλα αυτά, όσο αφορά τη συνολική λιποπεριεκτικότητα καθώς και μεμονωμένα τα κορεσμένα, τα μονοακόρεστα και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός του αποδεκτού εύρους, όπως αυτό ορίζεται από το αντίστοιχο πιστοποιητικό έγγραφο του 1849^α.

Στον ίδιο Πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα που υπολογίστηκαν με βάση τον θεωρητικό παράγοντα διόρθωσης F_{CT} . Παρατηρείται λοιπόν πως και με τους δύο τρόπους υπολογισμού, τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις. Το γεγονός αυτό είναι θετικό, καθώς συμπεραίνεται πως οι παράγοντες διόρθωσης, οι οποίοι έχουν υπολογιστεί από πειραματικά δεδομένα τείνουν στους θεωρητικούς. Σχετικά με την περιεκτικότητα των επιμέρους μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, η χρήση θεωρητικών παραγόντων διόρθωσης προσεγγίζει σε μεγαλύτερο βαθμό τις πιστοποιημένες τιμές.

Η σχετική τυπική απόκλιση παρουσιάζει παρόμοια εικόνα. Σε κάποιους μεθυλεστέρες είναι αναμενόμενη η υψηλή της τιμή, όπως στο μεθυλεστέρα του βουτυρικού. Να σημειωθεί πως στον προσδιορισμό των *trans* ισομερών δεν ορίζεται ο τρόπος προσδιορισμού από την AOAC 996.06. Στα συγκεκριμένα δείγματα ακολουθήθηκε η συνιστώμενη προσέγγιση από την AOAC 2012.13, η οποία όμως ίσως προκαλέσει ασάφειες στην έκφραση των αποτελεσμάτων εξαιτίας του δυσδιάκριτου των κορυφών.

Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως, εφόσον το δείγμα είναι στερεό και σε μορφή σκόνης, δεν είναι δυνατό να υπάρχει απόλυτη ομοιογένεια. Μικρές διακυμάνσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων ίσως οφείλονται και στο συγκεκριμένο γεγονός.

Πίνακας 23 Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων του CRM 1849^α (AOAC 996.06), n=9

| Λιπαρό Οξύ | Αναμενόμενες τιμές (g/100g) | F_{CE} | | Ανάκτηση % | F_{CT} | |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------|------------|---------------------------------|-------|
| | | Μέση τιμή (\pm SD) | %RSD | | Μέση τιμή (\pm SD) (g/100 g) | %RSD |
| C _{4:0} | | 0,02 (0,01) | 56,92 | | 0,02 (0,01) | 56,92 |
| C _{6:0} | | 0,06 (0,002) | 2,96 | | 0,06 (0,002) | 2,96 |
| C _{8:0} | 0,74 | 0,69 (0,01) | 1,23 | 93,24 | 0,67 (0,01) | 1,23 |
| C _{10:0} | | 0,51 (0,01) | 1,45 | | 0,50 (0,01) | 1,45 |
| C _{11:0} (IS) | | | | | | |
| C _{12:0} | | 3,70 (0,06) | 1,71 | | 3,81 (0,07) | 1,71 |
| C _{13:0} | | | | | | |
| C _{14:0} | | 1,50 (0,13) | 8,91 | | 1,57 (0,14) | 8,91 |
| C _{14:1} | | | | | | |
| C _{15:0} | | 0,01 (0,01) | 95,46 | | 0,01 | 95,46 |

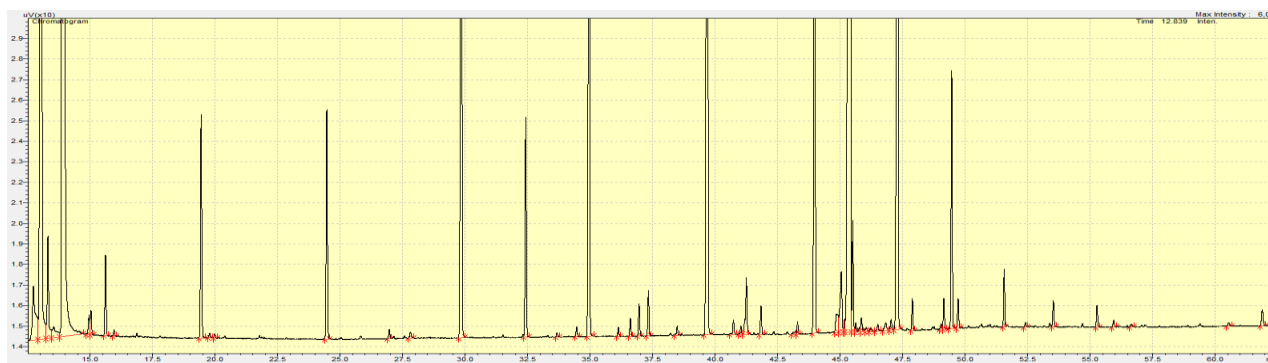
| | | | | | | |
|-------------------------|---------------|---------------------|--------------|--------|---------------------|--------------|
| C _{15:1} | | | | | | |
| C _{16:0} | 2,1 | 2,29 (0,60) | 26,14 | 113,81 | 2,42 (0,63) | 26,14 |
| C _{16:1} | 0,02 | 0,02 (0,002) | 6,79 | 100,00 | 0,02 (0,002) | 6,79 |
| C _{17:0} | | 0,01 (0,003) | 12,04 | | 0,02 (0,003) | 12,04 |
| C _{17:1} | | | | | | |
| C _{18:0} | 0,809 | 0,78 (0,06) | 7,52 | 96,41 | 0,81 (0,06) | 7,52 |
| t-C _{18:1} | | 0,02 (0,003) | 9,94 | | 0,02 (0,003) | 10,11 |
| C _{18:1} | 10,7 | 9,55 (0,94) | 9,86 | 89,25 | 9,98 (0,98) | 9,86 |
| t-C _{18:2} | | | | | | |
| C _{18:2} | 5,72 | 5,29 (0,66) | 12,38 | 92,48 | 5,43 (0,67) | 12,38 |
| C _{20:0} | 0,0822 | 0,10 (0,02) | 15,60 | 103,27 | 0,10 (0,02) | 15,60 |
| C _{18:3 (GLA)} | | 0,01 (0,002) | 31,46 | | 0,01 (0,002) | 31,46 |
| C _{20:1} | | 0,08 (0,01) | 15,21 | | 0,08 (0,01) | 15,21 |
| C _{18:3} | 0,591 | 0,59 (0,11) | 18,62 | 100,53 | 0,55 (0,10) | 18,62 |
| C _{21:0} | | 0,04 (0,01) | 21,76 | | 0,05 (0,01) | 21,76 |
| C _{20:2} | | 0,01 (0,004) | 31,30 | | 0,01 (0,004) | 31,30 |
| C _{22:0} | 0,066 | 0,12 (0,02) | 17,13 | 181,82 | 0,13 (0,02) | 17,13 |
| C _{20:3} | | 0,02 (0,02) | 88,68 | | 0,02 (0,02) | 88,68 |
| C _{22:1} | | | | | | |
| C _{20:3} | | | | | | |
| C _{23:0} | | 0,07 (0,01) | 13,21 | | 0,06 (0,01) | 13,21 |
| C _{20:4} | 0,123 | 0,09 (0,02) | 25,00 | 73,17 | 0,11 (0,03) | 25,00 |
| C _{22:2} | | 0,04 (0,04) | 0,00 | | 0,03 (0,04) | 119,94 |
| C _{24:0} | 0,0387 | 0,11 (0,04) | 32,35 | 284,24 | 0,15 (0,05) | 32,35 |
| C _{20:5} | | 0,03 (0,07) | 0,00 | | 0,07 (0,14) | 196,48 |
| C _{24:1} | 0,0202 | 0,03 (0,02) | 54,62 | 148,51 | 0,04 (0,02) | 54,62 |
| C _{22:6} | 0,0179 | 0,01 (0,003) | 5,98 | 55,87 | 0,02 (0,003) | 8,06 |
| Συνολικό Λίπος % | 30,43 | 25,00 (3,28) | 13,11 | | 25,96 (3,30) | 12,71 |
| Κορεσμένα % | 11,1 | 10,10 (1,04) | 10,25 | | 10,47 (1,08) | 10,30 |
| Μονοακόρεστα % | 6,07 | 9,71 (4,59) | 47,28 | | 9,76 (4,79) | 49,11 |
| Πολυακόρεστα % | 9,42 | 6,08 (0,96) | 15,78 | | 6,28 (1,11) | 17,73 |
| Trans % | | 0,05 (0,04) | 98,26 | | 0,06 (0,05) | 74,54 |

Επιπρόσθετα υπολογίστηκε και η ανάκτηση των δειγμάτων. Στην πλειονότητα τους όπως φαίνεται και στον Πίνακα 23, υπήρχαν καλά αποτελέσματα ανάκτησης. Βεβαίως υπάρχουν περιπτώσεις υπερεκτίμησης ή υποεκτίμησης της αρχικής συγκέντρωσης. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως ουσιαστικά πρόκειται για τα λιπαρά οξέα με τις μεγαλύτερες αποκλίσεις στο συντελεστή απόκρισης.

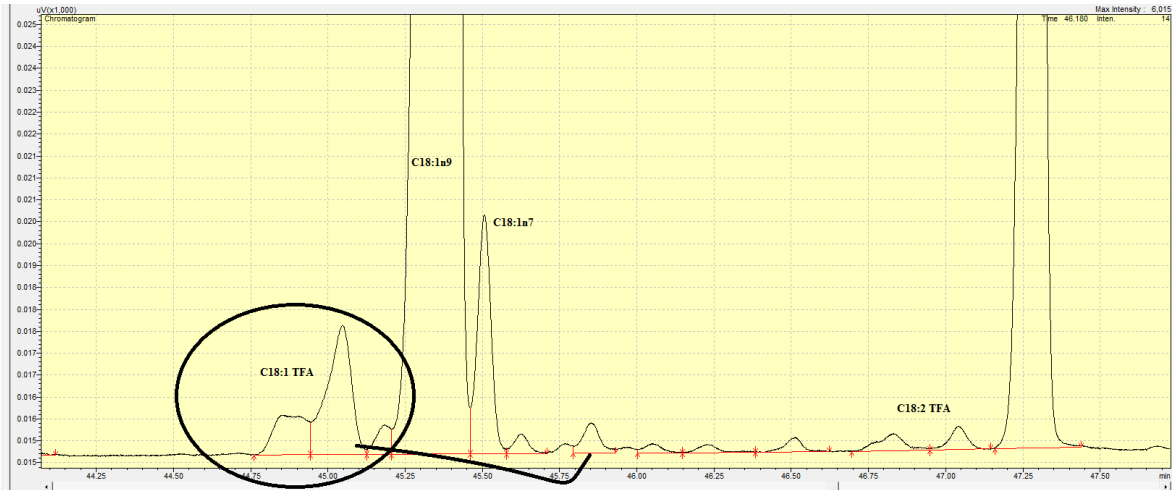
14.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΟΑC 996.06 ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

Κατ' επέκταση της εφαρμογής στο πρότυπο δείγμα CRM 1849^a, η μέθοδος ΑΟΑC 996.06 δοκιμάστηκε και σε τυχαίο δείγμα βρεφικής σκόνης τύπου Sanilac της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε. Από την επεξεργασία με βασική υδρόλυση προκύπτουν χρωματογραφήματα με ευδιάκριτες κορυφές, όπως αυτό που παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 29). Βέβαια θα πρέπει να σημειωθεί πως στο δείγμα βρεφικής σκόνης βρέθηκαν και κορυφές οι οποίες όμως δεν ανήκουν σε κάποιον από τους μεθυλεστέρες του μίγματος FAMES₃₇. Στον πίνακα των προσδιοριζόμενων λιπαρών οξέων που εμπεριέχεται στη μέθοδο ΑΟΑC 996.06, αναφέρονται οι αντίστοιχοι μεθυλεστέρες τους οι οποίοι μπορούν να προσδιοριστούν με την συγκεκριμένη μέθοδο. Δυστυχώς το μίγμα 37 μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκε δεν περιείχε όλες τις αναφερόμενες στην ΑΟΑC 996.06 ενώσεις. Πιθανολογείται λοιπόν πως οι άγνωστες κορυφές του χρωματογραφήματος ίσως ανήκουν σε ισομερή των προσδιοριζόμενων ενώσεων, τα οποία δύναται να προσδιοριστούν με την ΑΟΑC 996.06 αλλά δεν περιέχονται στο συγκεκριμένο μίγμα μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκε.

Στην Εικόνα 30 μάλιστα παρουσιάζεται η περιοχή των *trans* ισομερών η οποία προαναφέρθηκε στην περίπτωση του αντίστοιχου μίγματος καθώς και στη θεωρητική προσέγγιση του Golay (Εικόνες 25 και 26). Με μια πρώτη προσέγγιση, η Εικόνα του δείγματος φαίνεται να ανταποκρίνεται στα αναμενόμενα αποτελέσματα.



Εικόνα 29 Χρωματογράφημα δείγματος βρεφικής σκόνης γάλακτος



Εικόνα 30 Περιοχή *trans* ισομερών του χρωματογραφήματος της βρεφικής σκόνης γάλακτος

Στον Πίνακα 24 φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των δειγμάτων που επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την AOAC 996.06 και συγκεκριμένα με τη μέθοδο βασικής υδρόλυσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακρίβεια συγκριτικά με το αντίστοιχο δείγμα CRM που μελετήθηκε. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στον μεγαλύτερο αριθμό επαναληπτικών μετρήσεων (n=17) που πραγματοποιήθηκαν στο δείγμα Sanilac. Η απόρριψη των έκτροπων τιμών πραγματοποιήθηκε με το κριτήριο Gubbs σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Η ορθότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με αποτελέσματα διεργαστηριακών δοκιμών, οι οποίες όμως δεν είναι δυνατό να παρατεθούν λόγω προστασίας των δεδομένων της εταιρείας.

Πίνακας 24 Συγκριτική αξιολόγηση δείγματος βρεφικής σκόνης γάλακτος του εμπορίου (AOAC 996.06), n=17

| Λιπαρό Οξύ | ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ | | FCE | FCT |
|------------------------|-----------------|--|------------------------------|------------------------------|
| | | | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) |
| C _{4:0} | | | 0,29 (0,03) | 0,24 (0,02) |
| C _{6:0} | | | 0,21 (0,02) | 0,17 (0,01) |
| C _{8:0} | | | 0,51 (0,04) | 0,47 (0,03) |
| C _{10:0} | | | 0,50 (0,04) | 0,47 (0,03) |
| C _{11:0} (IS) | | | | |
| C _{12:0} | 2,4 | | 2,65 (0,23) | 2,45 (0,17) |
| C _{13:0} | | SUM (C _{12:0} & C _{14:0}) <5,4 | 0,01 (0,0004) | 0,01 (0,0004) |
| C _{14:0} | 1,7 | | 1,82 (0,17) | 1,69 (0,13) |
| C _{14:1} | | | 0,07 (0,01) | 0,06 (0,10) |
| C _{15:0} | | | 0,09 (0,01) | 0,08 (0,01) |
| C _{15:1} | | | | |
| C _{16:0} | 3,5 | | 3,49 (0,43) | 3,15 (0,31) |
| C _{16:1} | | | 0,08 (0,07) | 0,15 (0,001) |
| C _{17:0} | | | 0,08 (0,01) | 0,06 (0,01) |
| C _{17:1} | | | 0,02 (0,002) | 0,02 (0,002) |
| C _{18:0} | | | 1,29 (0,13) | 1,18 (0,10) |

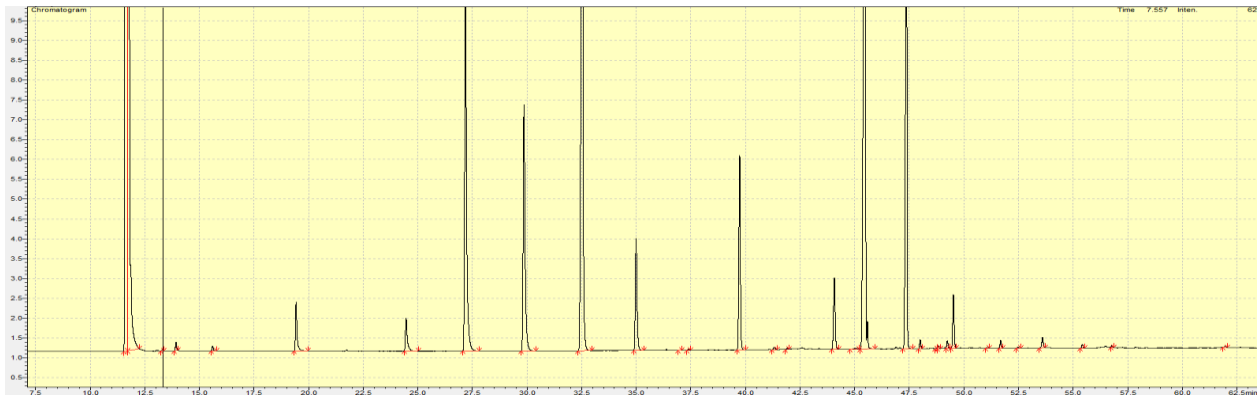
| | | | | |
|-------------------------|-----------|-------------|---------------------|---------------------|
| t-C _{18:1} | | | 0,25 (0,02) | 0,24 (0,01) |
| C _{18:1} | 12 | | 9,78 (0,91) | 8,81 (0,73) |
| t-C _{18:2} | | | 0,14 (0,001) | 0,15 (0,001) |
| C _{18:2} | 4,1 | 1,531-6,125 | 3,81 (0,52) | 3,04 (0,32) |
| C _{20:0} | | | 0,06 (0,01) | 0,05 (0,004) |
| C _{18:3 (GLA)} | | | 0,01 (0,003) | |
| C _{20:1} | | | 0,06 (0,01) | 0,05 (0,003) |
| C _{18:3} | 0,51 | min 0,255 | 0,59 (0,06) | 0,42 (0,03) |
| C _{21:0} | | | 0,05 (0,01) | 0,05 (0,01) |
| C _{20:2} | | | 0,02 (0,01) | 0,01 (0,01) |
| C _{22:0} | | | 0,11 (0,01) | 0,09 (0,01) |
| C _{20:3} | | | 0,01 (0,004) | 0,01 (0,004) |
| C _{22:1} | | | | |
| C _{20:3} | | | | |
| C _{23:0} | 0,06 | max 0,27 | 0,02 (0,01) | 0,01 (0,00) |
| C _{20:4} | | | 0,06 (0,01) | 0,05 (0,01) |
| C _{22:2} | | | 0,02 (0,003) | 0,02 (0,01) |
| C _{24:0} | | | 0,05 (0,01) | 0,04 (0,01) |
| C _{20:5} | | max 0,27 | 0,03 (0,01) | 0,02 (0,01) |
| C _{24:1} | | | 0,01 (0,002) | 0,01 (0,002) |
| C _{22:6} | 0,06 | max 0,27 | 0,10 (0,01) | 0,04 (0,004) |
| Συνολικό Λίπος % | 27 | | 28,26 (0,42) | 24,81 (0,36) |
| Κορεσμένα% | 10 | | 11,76 (0,12) | 10,61 (0,11) |
| Μονοακόρεστα % | 10 | | 9,90 (0,21) | 8,87 (0,19) |
| Πολυακόρεστα % | 6 | | 4,97 (0,10) | 3,84 (0,08) |

Τα αποτελέσματα συνάδουν με την ισχύουσα νομοθεσία. Ζήτημα ίσως να παρουσιάζεται κατ' εξαίρεση στην περίπτωση του C22:6. Η τιμή του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος φαίνεται πάνω από το νομοθετικό όριο κατά την επεξεργασία με τα πειραματικά δεδομένα εν αντιθέσει με τα θεωρητικά. Παρ' όλα αυτά η εκτίμηση αυτή ίσως και να μην είναι αληθής. Το όριο ανίχνευσης είναι πολύ χαμηλό και το ύψος της συγκεκριμένης κορυφής στα χρωματογραφήματα συχνά καλυπτόταν από κορυφές θορύβου.

Ως προς τη συνολική λιποπεριεκτικότητα και την περιεκτικότητα των επί μέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων, τα αποτελέσματα βρίσκονταν εντός των νομοθετικών ορίων (εκτός από μία μικρή απόκλιση των κορεσμένων) και χαρακτηρίζονται από καλή επαναληψιμότητα.

14.4 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ CHRISTIE ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ CRM 1849^α ΚΑΙ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

Στο δείγμα CRM 1849^α πραγματοποιήθηκαν πειράματα άμεσης μεθυλίωσης σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο Christie (όξινη κατάλυση ενός σταδίου). Στην Εικόνα 31 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα.



Εικόνα 31 Χρωματογράφημα CRM 1849^a με την τροποποιημένη μέθοδο Christie

Στον Πίνακα 25 παρουσιάζονται εκτενέστερα τα αποτελέσματα. Παρατηρείται πως οι ανακτήσεις των λιπαρών οξέων (για τα οποία υπάρχει πιστοποιημένη τιμή) είναι σαφώς ικανοποιητικές με εξαίρεση το C_{24:1}. Όσον αφορά τις επιμέρους κατηγορίες λιπαρών οξέων, προέκυψαν παρόμοια αποτελέσματα με τα αντίστοιχα της AOAC 996.06· φαίνεται να αποκλίνει αρκετά η περιεκτικότητα των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Παρ' όλα αυτά, η συνολική λιποπεριεκτικότητα δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την αναμενόμενη τιμή. Αξίζει να σημειωθεί πως κάποια λιπαρά οξέα τα οποία είχαν βρεθεί σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις με τη μέθοδο AOAC 996.06, όπως το ερουκικό (C_{22:1}), με την μέθοδο Christie δεν ανιχνεύθηκαν. Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στην μεγαλύτερη αραίωση του δείγματος που πραγματοποιήθηκε πριν την έγχυση του δείγματος στον αεριοχρωματογράφο στην προκειμένη περίπτωση.

Πίνακας 25 Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων σε δείγμα βρεφικής σκόνης CRM 1849^a (Μέθοδος Christie), n=5

| | Αναμενόμενες Τιμές | Ανάκτηση % | F _{CE} | | F _{CT} | |
|------------------------|--------------------|------------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
| | | | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | %RSD | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | %RSD |
| C _{4:0} | | | 0,01 (0,01) | 85,10 | 0,01 (0,01) | 85,10 |
| C _{6:0} | | | 0,06 (0,00) | 8,82 | 0,05 (0,00) | 8,82 |
| C _{8:0} | 0,74 | 90,83 | 0,65 (0,03) | 5,34 | 0,63 (0,03) | 5,34 |
| C _{10:0} | | | 0,48 (0,02) | 4,74 | 0,47 (0,02) | 4,74 |
| C _{11:0} (IS) | | | | | | |
| C _{12:0} | | | 3,62 (0,15) | 4,03 | 3,72 (0,15) | 4,03 |
| C _{13:0} (IS) | | | | | | |
| C _{14:0} | | | 1,43 (0,06) | 4,44 | 1,50 (0,07) | 4,44 |
| C _{14:1} | | | | | | |
| C _{15:0} | | | 0,01 (0,000) | 15,59 | | |
| C _{15:1} | | | | | | |
| C _{16:0} | 2,1 | 104,96 | 2,13 (0,08) | 3,68 | 2,25 (0,08) | 3,68 |
| C _{16:1} | 0,0222 | 117,56 | 0,02 (0,003) | 18,89 | 0,02 (0,003) | 18,89 |
| C _{17:0} | | | 0,01 (0,002) | 16,82 | 0,01 (0,002) | 16,82 |
| C _{17:1} | | | 0,01 (0,01) | 51,99 | 0,01 (0,01) | 51,99 |
| C _{18:0} | 0,809 | 109,28 | 0,85 (0,03) | 4,00 | 0,88 (0,04) | 4,00 |
| t-C _{18:1} | | | 0,02 (0,004) | 23,74 | 0,02 (0,004) | 23,74 |

| | | | | | | |
|-------------------------|---------------|--------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| C _{18:1} | 10,7 | 103,64 | 10,71 (0,29) | 2,75 | 11,19 (0,31) | 2,75 |
| t-C _{18:2} | | | | | | |
| C _{18:2} | 5,72 | 99,17 | 5,48 (0,14) | 2,51 | 5,62 (0,14) | 2,51 |
| C _{20:0} | 0,0822 | 100,62 | 0,08 (0,002) | 2,52 | 0,08 (0,003) | 2,52 |
| C _{18:3} (GLA) | | | 0,01 (0,001) | 20,91 | 0,01 (0,001) | 20,91 |
| C _{20:1} | | | 0,08 (0,01) | 8,14 | 0,08 (0,01) | 8,14 |
| C _{18:3} | 0,591 | 101,66 | 0,58 (0,01) | 2,52 | 0,55 (0,01) | 2,52 |
| C _{21:0} | | | | | | |
| C _{20:2} | | | | | | |
| C _{22:0} | 0,066 | 106,20 | 0,07 (0,001) | 4,01 | 0,07 (0,001) | 4,01 |
| C _{20:3} | | | 0,01 (0,002) | 10,21 | 0,01 (0,002) | 10,21 |
| C _{22:1} | | | | | | |
| C _{20:3} | | | | | | |
| C _{23:0} | | | | | | |
| C _{20:4} | 0,123 | 94,73 | 0,10 (0,002) | 5,14 | 0,12 (0,01) | 5,14 |
| C _{22:2} | | | | | | |
| C _{24:0} | 0,0387 | 91,38 | 0,03 (0,004) | 3,16 | 0,05 (0,00) | 3,16 |
| C _{20:5} | | | | | | |
| C _{24:1} | 0,0202 | 128,43 | 0,02 (0,002) | 14,31 | 0,03 (0,002) | 14,31 |
| C _{22:6} | 0,0179 | 104,11 | 0,02 (0,01) | 36,64 | 0,03 (0,01) | 36,64 |
| Συνολικό Λίπος % | 30,43 | 94,71 | 27,81 (0,91) | 3,28 | 28,81 (0,95) | 3,28 |
| Κορεσμένα% | 11,1 | 88,18 | 9,43 (0,37) | 3,92 | 9,75 (0,38) | 3,93 |
| Μονοακόρεστα % | 6,07 | 184,55 | 10,83 (0,33) | 3,07 | 11,32 (0,35) | 3,06 |
| Πολυακόρεστα % | 9,42 | 67,07 | 6,10 (0,16) | 2,61 | 6,22 (0,16) | 2,65 |
| Trans % | | | 0,02 (0,002) | 23,74 | 0,02 (0,002) | 23,74 |

Σύμφωνα με την AOAC 2012.13 μπορεί να υπολογιστεί η ανάκτηση μια πορείας μεθυλίωσης σύμφωνα με τον τύπο, εφόσον χρησιμοποιηθεί και δεύτερο εσωτερικό πρότυπο στο δείγμα:

$$Pt \% = \left(\frac{m_{c13:0} * A_{c11:0} * R_{c11:0} * S_{c11:0 TAG}}{A_{c13:0} * m_{c11:0}} \right) * 100 \quad \text{Εξίσωση 10}$$

Όπου m η μάζα των αντίστοιχων προτύπων που ζυγίστηκαν σε mg

A: το εμβαδό της κορυφής του χρωματογραφήματος

S: ο συντελεστής μετατροπής του μεθυλεστέρα του ενδεκανοϊκού τριγλυκεριδίου σε μεθυλεστέρα

Pt %: η ανάκτηση (performance)

Δηλαδή σε μία πορεία μεθυλίωσης μπορεί να προστεθεί και ένα δεύτερο εσωτερικό πρότυπο ώστε να υπολογιστεί η ανάκτηση του πρώτου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο μεθυλεστέρας του C_{13:0}. Βάσει των αποτελεσμάτων (Πίνακας 26), η ανάκτηση του C_{11:0} TAG κρίνεται άκρως ικανοποιητική:

Πίνακας 26 Ανάκτηση μεθυλίωσης τριενδεκανοΐνης (n=5)

| Δείγμα | Pt % |
|------------------|--------------|
| 1 | 98,16 |
| 2 | 98,77 |
| 3 | 97,04 |
| 4 | 103,23 |
| 5 | 102,35 |
| Μέση Τιμή | 99,91 |

Κατ' επέκταση, η μέθοδος άμεσης μεθυλίωσης (τροποποιημένη μέθοδος Christie) εφαρμόστηκε και σε δείγματα Sanilac βρεφικής σκόνης του εμπορίου. Τα αποτελέσματα αυτών ήταν επαναλήψιμα και παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 27. Στην περίπτωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, φαίνεται να υποεκτιμάται η περιεκτικότητά τους. Πιθανώς να υπήρξαν απώλειες λόγω της ευαλλοίωτης φύσης τους. Το γεγονός αυτό έχει ως εκ τούτου επίδραση στον υπολογισμό της συνολικής λιποπεριεκτικότητας του δείγματος.

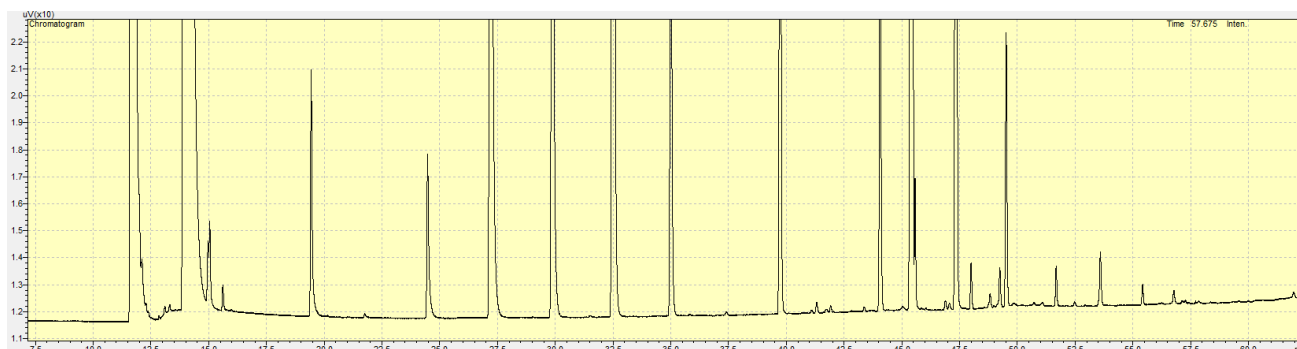
Πίνακας 27 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος Sanilac σύμφωνα με την άμεση μέθοδο μεθυλίωσης Christie

| NOMΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ | F _{CE} | F _{CT} |
|--|------------------------------|------------------------------|
| | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) |
| C _{4:0} | 0,26 (0,01) | 0,22 (0,002) |
| C _{6:0} | 0,21 (0,01) | 0,18 (0,002) |
| C _{8:0} | 0,50 (0,02) | 0,47 (0,004) |
| C _{10:0} | 0,50 (0,01) | 0,48 (0,01) |
| C _{11:0} (IS) | | |
| C _{12:0} | 2,4 | 2,58 (0,12) |
| SUM (C _{12:0} & C _{14:0} <5,4) | | 2,46 (0,03) |
| C _{13:0} (IS) | | |
| C _{14:0} | 1,7 | 1,82 (0,08) |
| C _{14:1} | | 0,07 (0,002) |
| C _{15:0} | | 0,09 (0,004) |
| C _{15:1} | | |
| C _{16:0} | 3,5 | 3,63 (0,25) |
| C _{16:1} | | 0,14 (0,004) |
| C _{17:0} | | 0,07 (0,02) |
| C _{17:1} | | |
| C _{18:0} | | 1,25 (0,08) |
| t-C _{18:1} | | 0,22 (0,01) |
| C _{18:1} | 12 | 9,51 (0,55) |
| t-C _{18:2} | | 0,04 (0,04) |
| C _{18:2} | 4,1 | 4,02 (0,49) |
| C _{20:0} | | 0,06 (0,01) |
| C _{18:3} (GLA) | | 0,01 (0,01) |
| C _{20:1} | | 0,06 (0,000) |

| | | | |
|-------------------------|-----------|---------------------|---------------------|
| C _{18:3} | 0,51 | 0,57 (0,09) | 0,43 (0,004) |
| C _{21:0} | | 0,05 (0,002) | 0,05 (0,001) |
| C _{20:2} | | 0,01 (0,002) | 0,01 (0,002) |
| C _{22:0} | | 0,11 (0,01) | 0,10 (0,001) |
| C _{20:3} | | 0,01 (0,004) | 0,01 (0,003) |
| C _{22:1} | | | |
| C _{20:3} | | | |
| C _{23:0} | 0,06 | 0,01 (0,004) | 0,01 (0,004) |
| C _{20:4} | | 0,07 (0,002) | 0,06 (0,004) |
| C _{22:2} | | 0,06 (0,004) | 0,05 (0,003) |
| C _{24:0} | | 0,06 (0,02) | 0,06 (0,02) |
| C _{20:5} | | 0,02 (0,01) | 0,01 (0,003) |
| C _{24:1} | | 0,01 (0,001) | 0,01 (0,001) |
| C _{22:6} | 0,06 | 0,08 (0,04) | 0,04 (0,00) |
| Συνολικό Λίπος % | 27 | 27,39 (1,97) | 25,16 (0,28) |
| Κορεσμένα% | 10 | 15,93 (4,79) | 17,63 (0,17) |
| Μονοακόρεστα % | 10 | 9,79 (0,56) | 9,12 (0,16) |
| Πολυακόρεστα % | 6 | 4,80 (0,65) | 4,00 (0,03) |

14.5 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΜΕΣΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ (ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ISO 12966-2) ΣΕ ΣΚΟΝΗ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ CRM 1849^a ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ

Κατά την εφαρμογή της άμεσης μεθόδου μεθυλίωσης δύο σταδίων (τροποποιημένη ISO 12966-2/όξινη και βασική κατάλυση) στο δείγμα CRM 1849^a, προέκυψαν χρωματογραφήματα με διακριτές, οξείες κορυφές (Εικόνα 32). Αν και με πρώτη ματιά η εικόνα των χρωματογραφήματων παρουσιάζει ομοιότητες με τα χρωματογραφήματα των άλλων μεθόδων, κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρουσιάστηκαν σημαντικές παρεκκλίσεις ως προς τη συνολική λιποπεριεκτικότητα (Πίνακας 28). Αυτό πιθανώς οφείλεται στα μονοακόρεστα και στα πολυακόρεστα λιπαρά, τα οποία φαίνεται να έχουν υπερεκτιμηθεί. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν επαναληψιμότητα αλλά η ανάκτηση δεν είναι ικανοποιητική, αφού σε όλες τις περιπτώσεις οι ποσότητες που υπολογίζονται είναι μεγαλύτερες από τις αναγραφόμενες στο πιστοποιητικό. Ως εκ τούτου, κρίνεται ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για αυτό το τρόφιμο.



Εικόνα 32 Χρωματογράφημα CRM 1849^a με επεξεργασία με την ISO 12966-2

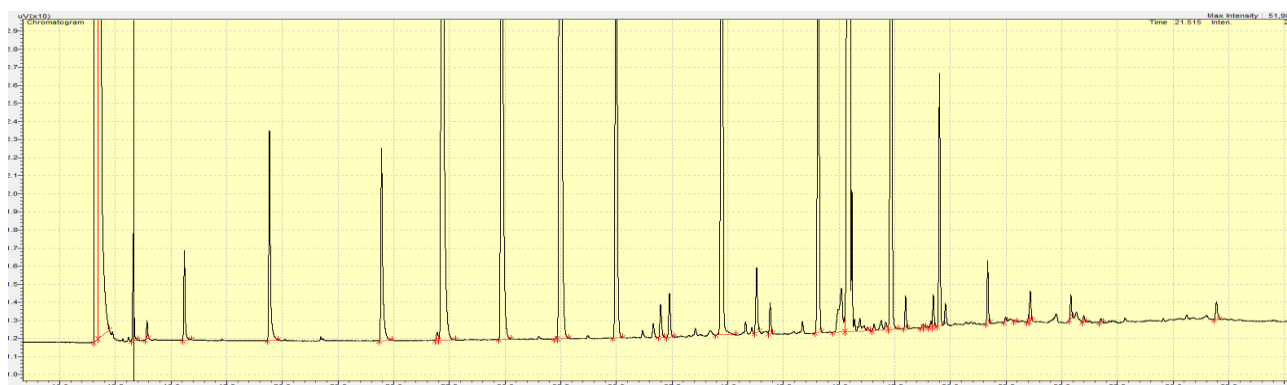
Πίνακας 28 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος CRM σύμφωνα με την άμεση μέθοδο μεθυσίας ISO 12966-2

| | F _{CE} | | | F _{CT} | |
|-------------------------|-----------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|
| | Ανάκτηση % | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | %RSD | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | %RSD |
| C _{4:0} | | 0,02 (0,01) | 36,21 | 0,01 | 88,83 |
| C _{6:0} | | 0,06 (0,01) | 21,81 | 0,06 | 24,35 |
| C _{8:0} | 107,29 | 0,67 (0,07) | 10,36 | 0,64 | 14,11 |
| C _{10:0} | | 0,52 (0,05) | 10,39 | 0,50 | 12,42 |
| C _{11:0 (IS)} | | | | | |
| C _{12:0} | | 4,02 (0,45) | 11,24 | 4,12 | 11,58 |
| C _{13:0 (IS)} | | | | | |
| C _{14:0} | | 1,61 (0,18) | 11,03 | 1,69 | 10,96 |
| C _{14:1} | | | | | |
| C _{15:0} | | 0,01 (0,000) | 32,88 | | |
| C _{15:1} | | | | | |
| C _{16:0} | 134,44 | 2,42 (0,26) | 10,86 | 2,57 | 10,46 |
| C _{16:1} | 128,28 | 0,03 (0,01) | 20,04 | 0,03 | 20,38 |
| C _{17:0} | | 0,01 (0,003) | 30,85 | 0,02 | 43,18 |
| C _{17:1} | | | | | |
| C _{18:0} | 141,71 | 0,98 (0,11) | 11,05 | 1,02 | 10,61 |
| t-C _{18:1} | | | | | |
| C _{18:1} | 137,71 | 12,59 (1,47) | 11,64 | 13,32 | 11,16 |
| t-C _{18:2} | | | | | |
| C _{18:2} | 131,36 | 6,42 (0,73) | 11,43 | 6,65 | 11,03 |
| C _{20:0} | 138,77 | 0,09 (0,02) | 18,62 | 0,10 | 18,37 |
| C _{18:3 (GLA)} | | 0,02 (0,01) | 73,78 | 0,02 | 73,58 |
| C _{20:1} | | 0,07 (0,03) | 51,19 | 0,07 | 51,37 |
| C _{18:3} | 133,81 | 0,67 (0,07) | 10,91 | 0,64 | 11,22 |
| C _{21:0} | | | | | |
| C _{20:2} | | | | | |
| C _{22:0} | 136,32 | 0,07 (0,01) | 14,47 | 0,08 | 13,49 |
| C _{20:3} | | 0,01 (0,01) | 129,17 | 0,01 | 129,17 |
| C _{22:1} | | | | | |
| C _{20:3} | | | | | |
| C _{23:0} | | | | | |
| C _{20:4} | 121,11 | 0,11 (0,01) | 9,62 | 0,13 | 9,35 |
| C _{22:2} | | | | | |
| C _{24:0} | 131,14 | 0,05 (0,01) | 16,94 | 0,06 | 16,58 |
| C _{20:5} | | | | | |
| C _{24:1} | 148,33 | 0,03 (0,01) | 21,20 | 0,03 | 18,55 |
| C _{22:6} | 103,03 | 0,01 (0,01) | 49,83 | 0,02 | 49,90 |
| Συνολικό Λίπος % | 123,51 | 32,01 (3,61) | 11,28 | 33,38 | 10,93 |
| Κορεσμένα% | 111,40 | 10,53 (1,15) | 10,96 | 10,88 | 11,05 |
| Μονοακόρεστα % | 245,33 | 12,71 (1,48) | 11,65 | 13,45 | 11,20 |

| | | | | | |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------|-------------|---------------|
| Πολυακόρεστα % | 88,77 | 7,13 (0,81) | 11,32 | 7,32 | 10,96 |
| Trans | | 0,02 (0,01) | 56,31 | 2,28 | 140,57 |

Όσον αφορά τη σκόνη βρεφικού γάλακτος του εμπορίου τα αποτελέσματα ήταν πιο ικανοποιητικά τόσο ως προς την ορθότητα όσο και ως προς την ακρίβεια, αν και τα χρωματογράφημα εμφάνιζαν αρκετές κορυφές πέρα των μεθυλεστέρων, οι οποίες πιθανώς να προέρχονταν από συστατικά της μήτρας του τροφίμου (Εικόνα 33). Ομοίως με το δείγμα CRM 1849^a, η περιεκτικότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων βρέθηκε υπερεκτιμημένη. Όσον αφορά μεμονωμένα τα λιπαρά οξέα που μελετήθηκαν, μεγάλη τυπική απόκλιση παρατηρείται στο ελαϊκό οξύ το οποίο είναι και το κύριο λιπαρό οξύ του δείγματος.

Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και σε όλα τα δείγματα της ίδιας μήτρας και για όλες τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Γενικά, παρατηρήθηκαν πολύ καλές ανακτήσεις, με εξαίρεση την περίπτωση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Μεμονωμένα σε όλα τα λιπαρά οξέα παρατηρούνται ανακτήσεις μεγαλύτερες από το 100% συνεπώς και αθροιστικά αναμένεται το ποσοστό της ανάκτησης να είναι αρκετά υψηλό. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 29.



Εικόνα 13 Χρωματογράφημα βρεφικής σκόνης Sanilac με εφαρμογή της άμεσης μεθόδου μεθυλίωσης δύο σταδίων (τροποποιημένη ISO 12966-2)

Πίνακας 29 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος Sanilac σύμφωνα με την άμεση μέθοδο μεθυλίωσης δύο σταδίων (τροποποιημένη ISO 12966-2)

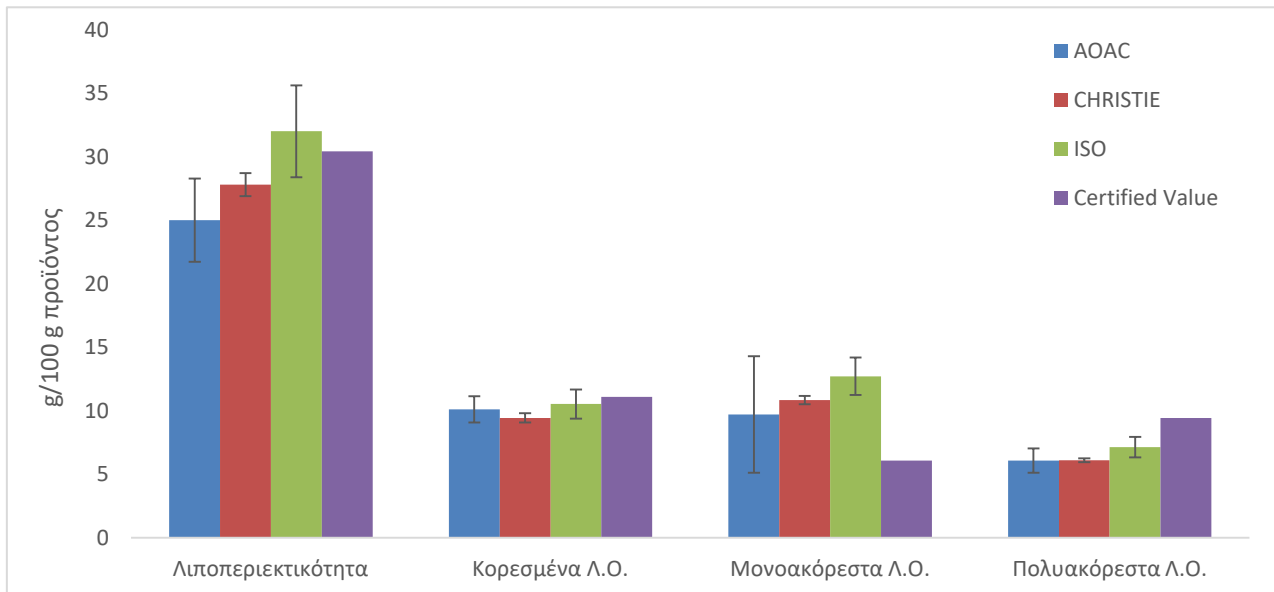
| NOMΟΘΕΤΙΚΑ ΟΡΙΑ | F _{CE} | F _{CT} |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) | Μέση τιμή (± SD) (g/100g) |
| C _{4:0} | 0.27(0.03) | 0.16(0.05) |
| C _{6:0} | 0.22(0.01) | 0.16(0.02) |
| C _{8:0} | 0.60(0.04) | 0.49(0.03) |
| C _{10:0} | 0.63(0.04) | 0.57(0.06) |
| C _{11:0} (IS) | | |
| C _{12:0} | 2,4 | 3.26(0.18) |
| C _{13:0} (IS) | | |
| C _{14:0} | 1,7 | 2.26(0.02) |
| C _{14:1} | | 0.09(0.006) |
| C _{15:0} | | 0.12(0.005) |
| C _{15:1} | | 0.13(0.03) |

| | | | |
|------------------------|-----------|---------------------|---------------------|
| C _{16:0} | 3,5 | 4.58(0.16) | 4.98(1.02) |
| C _{16:1} | | 0.23(0.01) | 0.24(0.07) |
| C _{17:0} | | 0.05(0.00) | 0.11(0.04) |
| C _{17:1} | | | |
| C _{18:0} | | 1.63(0.05) | 1.83(0.44) |
| t-C _{18:1} | | 0.29(0.009) | 0.33(0.08) |
| C _{18:1} | 12 | 12.57(0.31) | 14.34(3.70) |
| t-C _{18:2} | | | |
| C _{18:2} | 4,1 | 4.89(0.19) | 5.50(1.38) |
| C _{20:0} | | 0.07(0.002) | 0.09(0.02) |
| C _{18:3(GLA)} | | | |
| C _{20:1} | | 0.08(0.01) | 0.09(0.03) |
| C _{18:3} | 0,51 | 0.67(0.03) | 0.63(0.14) |
| C _{21:0} | | | |
| C _{20:2} | | | |
| C _{22:0} | | 0.16(0.01) | 0.17(0.05) |
| C _{20:3} | | 0.02(0.009) | 0.02(0.01) |
| C _{22:1} | | 0.04(0.001) | 0.03(0.02) |
| C _{20:3} | | | |
| C _{23:0} | 0,06 | 0.05(0.01) | 0.03(0.04) |
| C _{20:4} | | 0.07(0.001) | 0.09(0.03) |
| C _{22:2} | | | |
| C _{24:0} | | 0.08(0.01) | 0.10(0.04) |
| C _{20:5} | | 0.01(0.006) | 0.04(0.02) |
| C _{24:1} | | | |
| C _{22:6} | 0,06 | 0.09(0.05) | 0.14(0.10) |
| Συνολικό Λίπος | 27 | 34.95 (1.43) | 36.37 (7.49) |
| Κορεσμένα% | 10 | 18.07 (3.28) | 21.37 (2.55) |
| Μονοακόρεστα | 10 | 13.02 (0.39) | 14.91 (3.89) |
| Πολυακόρεστα | 6 | 5.83 (0,29) | 6.55 (1.75) |

15. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ

15.1 ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΕΙΓΜΑ CRM 1849a

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατίθεται συγκριτικό ραβδόγραμμα των τριών μεθόδων που εφαρμόστηκαν (Εικόνα 34). Όσον αφορά την λιποπεριεκτικότητα, οι τρεις μέθοδοι διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,05$). Η μέθοδος AOAC έδωσε την χαμηλότερη τιμή ενώ η μέθοδος ISO την μεγαλύτερη. Ωστόσο, οι τιμές λιποπεριεκτικότητας και των τριών μεθόδων βρίσκονται μέσα στο αποδεκτό εύρος τιμών της πιστοποιημένης τιμής (30.43 g/100g). Όσον αφορά τις επιμέρους κατηγορίες λιπαρών οξέων, η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα ήταν παρόμοια ($p > 0.05$) και δεν διέφερε σημαντικά από την πιστοποιημένη τιμή (11.10 g/100g). Όμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ωστόσο, οι τιμές και των τριών μεθόδων διαφέρουν σημαντικά ($p < 0.05$) από τις αντίστοιχες πιστοποιημένες τιμές.

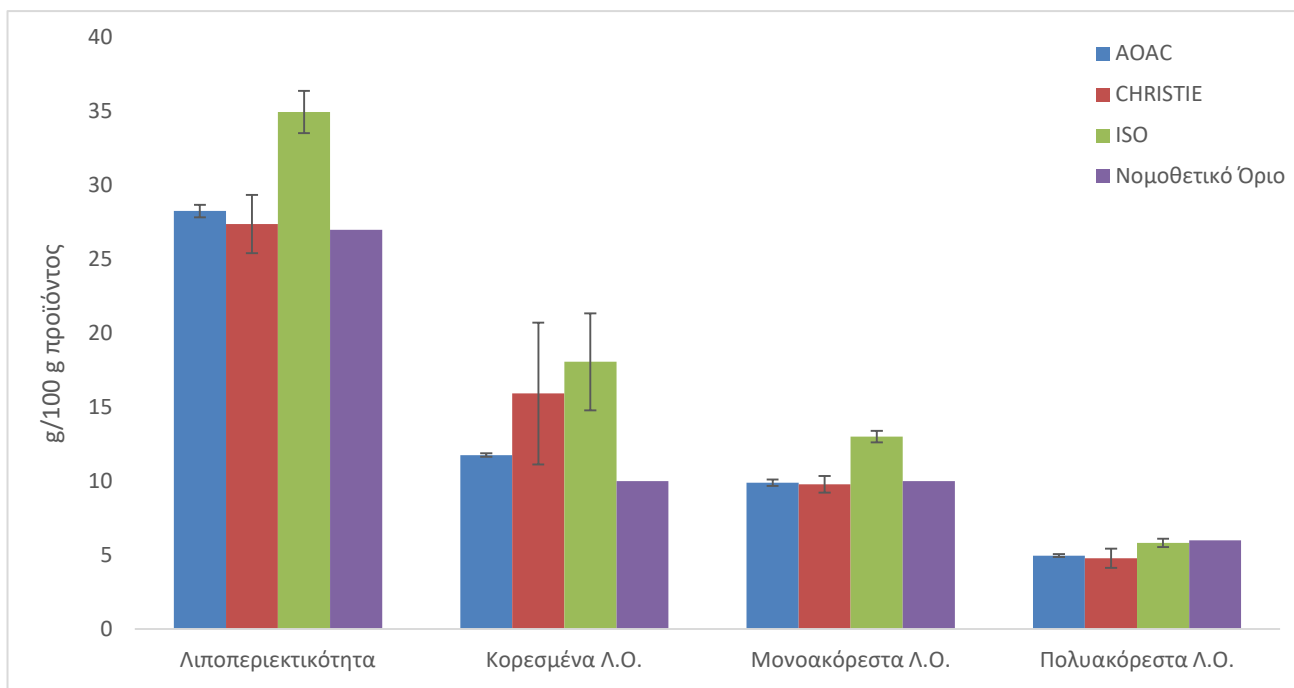


Εικόνα 34 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ολικής λιποπεριεκτικότητας και της περιεκτικότητας των επί μέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο AOAC 996.06 και τις δύο μεθόδους άμεσης μεθυλίωσης (ISO 12966-2 και Christie) σε πρότυπο δείγμα CRM 1849a.

Στο ραβδόγραμμα του Παραρτήματος (Εικόνα 40) παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των εκλούμενων μεθυλεστέρων ανά εφαρμοζόμενη μέθοδο. Μεγάλη διαφορά παρατηρήθηκε στην περίπτωση του ελαϊκού οξέος που προσδιορίστηκε με την μέθοδο ISO 12966-2, το οποίο αποτελεί το κυριότερο λιπαρό οξύ της βρεφικής σκόνης. Ως εκ τούτου, οι αποκλίσεις αυτού επηρέασαν τη συνολική λιποπεριεκτικότητα. Άμεσα επηρεαζόμενο είναι και το σύνολο των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων.

15.2 ΔΕΙΓΜΑ ΣΚΟΝΗΣ ΒΡΕΦΙΚΟΥ ΓΑΛΑΤΟΣ

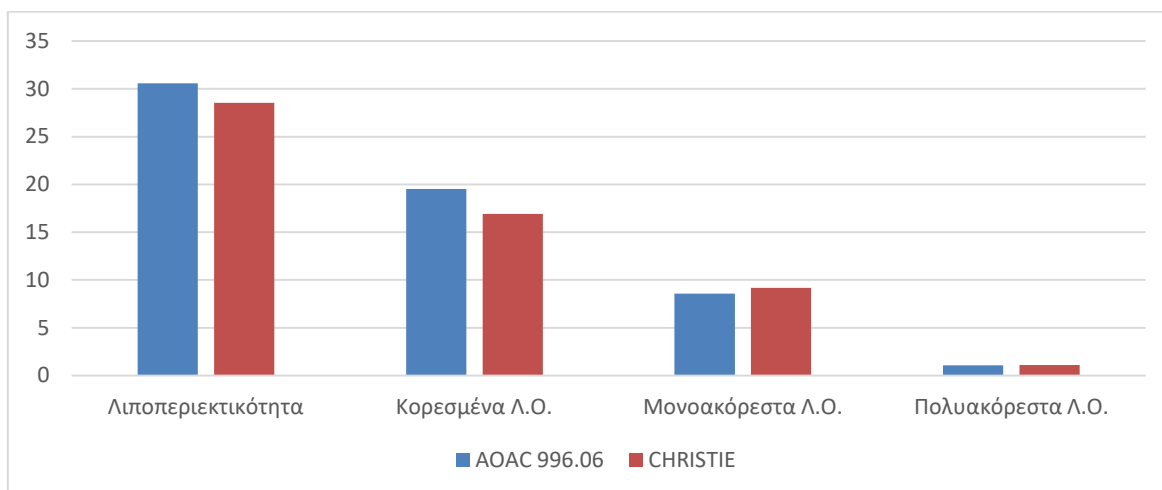
Στην Εικόνα 35 παρουσιάζεται συγκριτικό ραβδόγραμμα των τριών μεθόδων που εφαρμόστηκαν σε σκόνης βρεφικού γάλακτος Sanilac. Παρατηρείται πως η λιποπεριεκτικότητα που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ISO βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ($p < 0.05$) από την αντίστοιχη των δύο άλλων μεθόδων (AOAC 996.06, Christie) σε επίπεδο σημαντικότητας 90%, οι οποίες δεν διέφεραν μεταξύ τους ($p > 0.05$) σε επίπεδο σημαντικότητας έως και 99%. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα διέφερε σημαντικά μεταξύ των τριών μεθόδων. Τέλος, η λιποπεριεκτικότητα και η περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που προσδιορίστηκαν με τις μεθόδους AOAC 996.06 και Christie βρίσκονται εντός των νομοθετικών ορίων, σε αντίθεση με την περιεκτικότητα των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Η εικόνα αυτή των αποτελεσμάτων των κορεσμένων λιπαρών οξέων δε συναντάται στο δείγμα CRM στο οποίο οι μέθοδοι δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p > 0.05$) σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Επιπρόσθετα θα πρέπει να σημειωθεί πως η μέθοδος AOAC 996.06 φαίνεται να μην απέχει σημαντικά από τα νομοθετικά δεδομένα ($p > 0.05$). Ακολουθεί η μέθοδος Christie η οποία παρουσιάζει μεν απόκλιση στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, παρ' όλα αυτά παρουσιάζει και μεγάλη διακύμανση τιμών. Ως εκ τούτου δεν εξάγεται άμεσα ασφαλές συμπέρασμα. Πιθανώς να απαιτούνται περισσότερες πειραματικές δοκιμές.



Εικόνα 35 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ολικής λιποπεριεκτικότητας και της περιεκτικότητας των επί μέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο AOAC 996.06 και τις δύο μεθόδους άμεσης μεθυλίωσης (ISO 12966-2 και Christie) σε βρεφική σκόνη Sanilac.

15.3 DROPS ΜΑΥΡΗΣ ΣΟΚΟΛΑΤΑΣ

Η σοκολάτα είναι ένα δύσκολο υπόστρωμα. Η κλασική μέθοδος για τον προσδιορισμό της συνολικής λιποπεριεκτικότητας πραγματοποιείται σταθμικά, με υδρόλυση και εν συνεχεία με σταδιακές εκχυλίσεις με πετρελαϊκό αιθέρα, διαιθυλαιθέρα και τέλος με μίγμα αυτών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και πειραματικά για να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα ως προς τη συνολική λιποπεριεκτικότητα. Δυστυχώς λόγω έλλειψης χρόνου δεν ήταν δυνατό να εφαρμοσθούν και οι δύο μέθοδοι άμεσης μεθυλίωσης. Επιλέχθηκε η μέθοδος Christie εξαιτίας των πιο ορθών αποτελεσμάτων στην περίπτωση της σκόνης βρεφικού γάλακτος. Γενικότερα τα αποτελέσματα των μεθόδων AOAC 996.06 και Christie φαίνεται να είναι αρκετά ικανοποιητικά και συνάδουν με τα δοθέντα από την εταιρεία δεδομένα αλλά και με τα αποτελέσματα πειραματικών δοκιμών με βάση τη σταθμική μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Πιο αναλυτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στην Εικόνα 44 του Παραρτήματος καθώς και στο συγκριτικό ραβδόγραμμα (Εικόνα 37) των επιμέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τα αναμενόμενα.

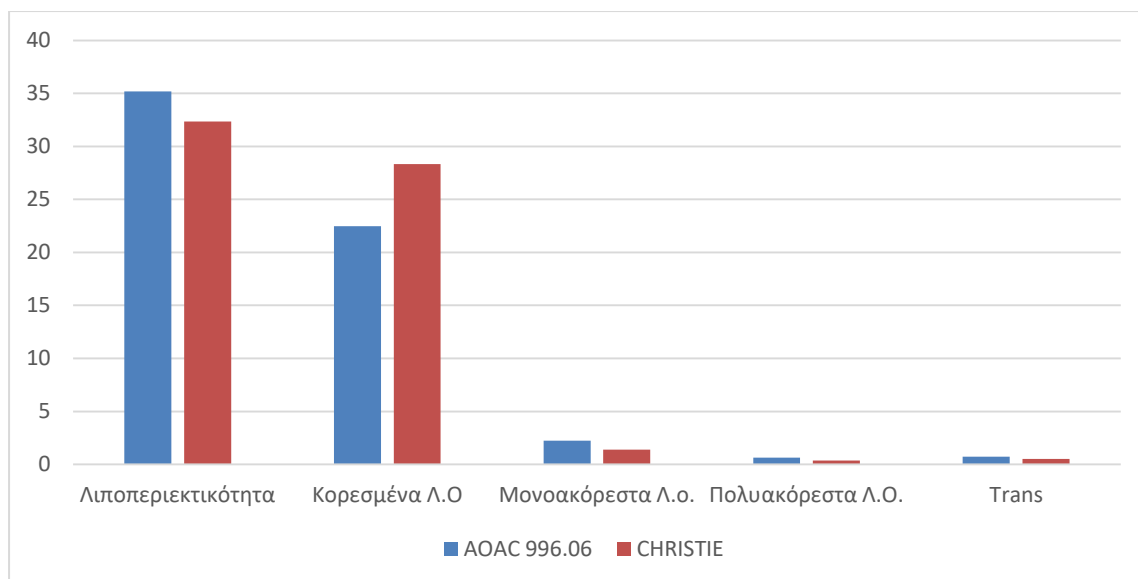


Εικόνα 37 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ολικής λιποπεριεκτικότητας και επί μέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων σε δείγμα μαύρης σοκολάτας

15.4 ΑΠΟΜΙΜΗΣΗ ΣΟΚΟΛΑΤΑΣ

Η μέθοδος Christie εφαρμόστηκε εν συνεχεία και σε δείγματα απομίμησης σοκολάτας. Στο συγκεκριμένο προϊόν δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα της εταιρείας για τα επί μέρους λιπαρά οξέα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκριτικά μεταξύ των δύο μεθόδων (AOAC 996.06, Christie) στην Εικόνα 38 καθώς και στην Εικόνα 42 του Παραρτήματος. Παρ' όλα αυτά δεν είναι δυνατό να αξιολογηθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.

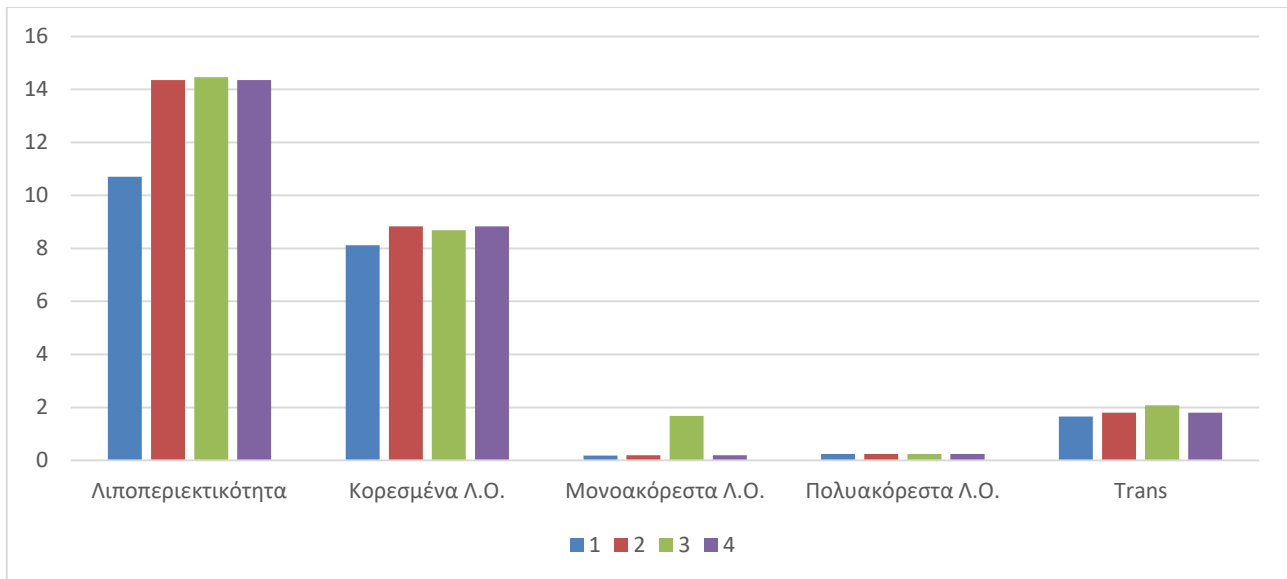
Αν και ως προς τη συνολική λιποπεριεκτικότητα οι δύο μέθοδοι δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά, οι περιεκτικότητες σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 95% ($p < 0.05$). Παρατηρώντας τον αναλυτικό πίνακα στον οποίο απεικονίζονται οι επιμέρους συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων, η διαφορά αυτή κυρίως οφείλεται στο $C_{12:0}$, $C_{14:0}$ και στο $C_{18:0}$.



Εικόνα 38 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ολικής λιποπεριεκτικότητας και επί μέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων μεθόδου AOAC 996.06 και Christie σε δείγμα απομίμησης σοκολάτας

14.6 ΤΡΟΥΦΑ ΣΟΚΟΛΑΤΑΣ

Αντίστοιχα οι μέθοδοι AOAC 996.06 και Christie εφαρμόστηκαν σε ένα δείγμα τρούφας σοκολάτας. Λόγω περιορισμένου χρόνου δεν ήταν δυνατό να αναλυθούν περισσότερα δείγματα, αλλά αναφέρονται ενδεικτικά τα δείγματα 1 και 2 τα οποία φαίνονται και στους παρακάτω πίνακες και ανήκουν στη μέθοδο AOC 996.06 και τα 3 και 4 τα οποία αντιστοιχούν στη μέθοδο Christie. Τα αποτελέσματα είναι πολύ πιο ικανοποιητικά σε σχέση με αυτά της σοκολάτας. Πιθανώς να οφείλεται τόσο στο υπόστρωμα, καθώς η τρούφα ανήκει στα υποκατάστατα σοκολάτας, όσο και στη μορφολογία του δείγματος. Οι μικροί κόκκοι της τρούφας διαλύονται εύκολα και άμεσα στο δοκιμαστικό σωλήνα όπου έλαβε χώρα η αντίδραση. Στο δείγμα 3 παρουσιάζεται μεν περίσσεια στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, αλλά δεδομένων των υπολοίπων συνθηκών ίσως να είναι και τυχαίο γεγονός. Αναλυτικότερα τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 41 του Παραρτήματος καθώς και στην Εικόνα 39.



Εικόνα 39 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ολικής λιποπεριεκτικότητας και επί μέρους κατηγοριών των λιπαρών οξέων σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα τρούφας σοκολάτας

14. 7 ΑΛΛΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Παρόμοιες δοκιμές εφαρμόστηκαν και σε άλλα τρόφιμα της εταιρείας ΓΙΩΤΗΣ Α.Ε., όπως μπάρες σοκολάτας stevia, μπάρες με μήλο, κανέλα και stevia, κακάο και σοκολάτας γάλακτος. Τα δείγματα των τροφίμων που αναλύθηκαν δεν ήταν αρκετά για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων και γι' αυτό τον λόγο δεν παρουσιάζονται. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι η μέθοδος Christie ήταν αυτή που απέδωσε τα πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα, ενώ η AOAC 996.06 παρουσίαζε συγκριτικά χαμηλότερη τιμή συνολικής λιποπεριεκτικότητας. Πιθανώς κατά την εκχύλιση με τους οργανικούς διαλύτες να υπήρξαν μικρές απώλειες της λιπαρής ύλης. Επιπλέον δεν υπήρχαν επαρκή δεδομένα διαθέσιμα από την εταιρεία ώστε να διερευνηθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 39 Δείγματα τροφίμων κατά την επεξεργασία με τη μέθοδο AOAC 996.06

15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Γενικότερα, και οι τρεις μέθοδοι προσδιορισμού λιπαρών οξέων που εφαρμόστηκαν, χαρακτηρίζονταν από καλή επαναληψιμότητα. Η μέθοδος AOAC 996.06, όπως αναμενόταν, επέδειξε καλή ορθότητα αφού άλλωστε είναι και η προτεινόμενη. Σε συνέχεια ως προς την ορθότητα ακολουθεί η άμεση μέθοδος μεθυλίωσης Christie (όξινη κατάλυση ενός σταδίου), η οποία ανταποκρίθηκε στις αρχικές προσδοκίες δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα. Η μέθοδος ISO 12966-2 δεν παρουσίασε εξίσου καλά αποτελέσματα με τις άλλες μεθόδους. Παρουσίασε αποκλίσεις στη συγκέντρωση των επί μέρους λιπαρών οξέων, απέτυχε στον προσδιορισμό όλων των λιπαρών οξέων των μελετούμενων δειγμάτων και παρ' όλα αυτά η περιεκτικότητα των επιμέρους κατηγοριών λιπαρών οξέων καθώς και της συνολικής λιποπεριεκτικότητας βρέθηκε υπερεκτιμημένη.

Θα πρέπει να τονιστεί πως στην περίπτωση των μεθόδων μετεστεροποίησης ο χρόνος της αντίδρασης καθώς και η θερμοκρασία είναι παράγοντες καθοριστικής σημασίας. Πιθανώς στην περίπτωση της μεθόδου ISO για το CRM να μεταβλήθηκε κάποιος από τους παράγοντες αυτούς χωρίς να γίνει αντιληπτό. Βεβαίως όλες οι πορείες πραγματοποιήθηκαν με διαπιστευμένα όργανα, παρ' όλα αυτά κάθε πιθανό ενδεχόμενο θα πρέπει να μελετάται.

Σε αντίθεση με τη μέθοδο AOAC 996.06, οι άλλες δύο πορείες μετεστεροποίησης αντιμετωπίζουν ζήτημα στον προσδιορισμό των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Το γεγονός αυτό προκαλεί έκπληξη καθώς οι υπάρχουσες βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρουν ως επί το πλείστον ζήτημα στον προσδιορισμό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων εξαιτίας της ασταθούς φύσης τους. Πιθανολογείται πως το συγκεκριμένο αποτέλεσμα ίσως οφείλεται στη βαθμονόμηση του οργάνου η οποία βασίστηκε σε μίγμα μεθυλεστέρων το οποίο ήταν διαφορετικό από το αρχικό με το οποίο βαθμονομήθηκε ο αεριοχρωματογράφος στην AOAC 996.06. Η υπερεκτίμηση αυτή είναι αυτή πιθανώς που επηρεάζει τη συνολική λιποπεριεκτικότητα. Το ενδεχόμενο αυτό θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω με την ανάλυση ενός νέου μίγματος μεθυλεστέρων. Το συγκεκριμένο μίγμα, αν και γνωστής συγκέντρωσης, θα θεωρούνταν άγνωστης έτσι ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής ποσότητα των περιεχόμενων λιπαρών οξέων με βάση το μίγμα που χρησιμοποιούνταν για βαθμονόμηση. Εφόσον υπήρχε διαφορά στα αποτελέσματα θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως το μίγμα μεθυλεστέρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό που δημιούργησε την απόκλιση των αποτελεσμάτων. Δυστυχώς λόγω περιορισμένου χρόνου, η σκέψη αυτή δεν αναπτύχθηκε περαιτέρω.

Επιπρόσθετα, όπως φαίνεται και από τα χρωματογραφήματα, η μέθοδος AOAC είναι πιο ευαίσθητη με αποτέλεσμα να προκύπτουν περισσότερες κορυφές στο χρωματογράφημα ως προς τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των μεθόδων. Οι κορυφές αυτές θα μπορούσαν να είναι άλλα λιπαρά οξέα, ίσως ισομερή των ήδη υπαρχόντων ή ουσίες οι οποίες εκχυλίστηκαν από τη μήτρα. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως όταν ένα δείγμα είναι υψηλό σε λιποπεριεκτικότητα, δε συνεπάγεται αυτόματα πως περιέχει υψηλό ποσοστό *trans* λιπαρών οξέων.

Εν κατακλείδι, η μέθοδος AOAC 996.06 είναι μία αξιόπιστη μέθοδος η οποία εξάγει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Σε κάθε περίπτωση τα αποτελέσματα εμπίπτουν εντός των νομοθετικών ορίων και συνεπώς δεν εγείρουν ανησυχίες. Ακριβώς όμως επειδή απαιτεί χρόνο για να πραγματοποιηθεί και μεγάλο όγκο αντιδραστηρίων, κρίνεται καλό να αντικατασταθεί με κάποια άλλη πιο γρήγορη αλλά εξίσου αξιόπιστη μέθοδο. Η μέθοδος Christie η οποία δοκιμάστηκε σε πρότυπο δείγμα σκόνης βρεφικού γάλακτος καθώς και σε σκόνη βρεφικού γάλακτος του εμπορίου, θα μπορούσε να είναι μία τέτοια μέθοδος για το συγκεκριμένο προϊόν. Η μέθοδος ISO 12966-2 καλό θα ήταν να μελετηθεί περαιτέρω εξαιτίας των αποκλίσεων που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του δείγματος CRM.

16. ΣΥΝΤΜΙΣΕΙΣ

AOAC : Association of Official Agricultural Chemists

IOC : International Olive Oil Council, Διεθνής Ένωση Ελαιολάδου

AOCS: American Oils Chemists Society, Αμερικανική Ένωση Χημικών των Ελαίων

CRM: Standard Reference Material, Πρότυπο Υλικό Αναφοράς

EUFIC: European Food Information Council, Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Πληροφόρησης για τα Τρόφιμα

f: συντελεστής μετατροπής

FA:fatty acid, λιπαρό οξύ

FAME : Fatty acid methyl ester, μεθυλεστέρας του λιπαρού οξέως

F_{CE}: πειραματικός/εμπειρικός παράγοντας διόρθωσης

F_{CT}: θεωρητικός παράγοντας διόρθωσης

FDA : Food and Drug Administration, Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων

FID :Flame Ionization Detector, ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

GC :Gas chromatography,αέρια χρωματογραφία, αέριος χρωματογράφος

IS : Internal Standard, εσωτερικό πρότυπο

ISO : International Organization of Standardization, Διεθνής Οργανισμός Πιστοποίησης

MUFA: Monounsaturated fatty acid, Μονοακόρεστο λιπαρό οξύ

P_S: περιοχή χρωματογραφήματος

PUFA : Polyunsaturated fatty acid, Πολυακόρεστο λιπαρό οξύ

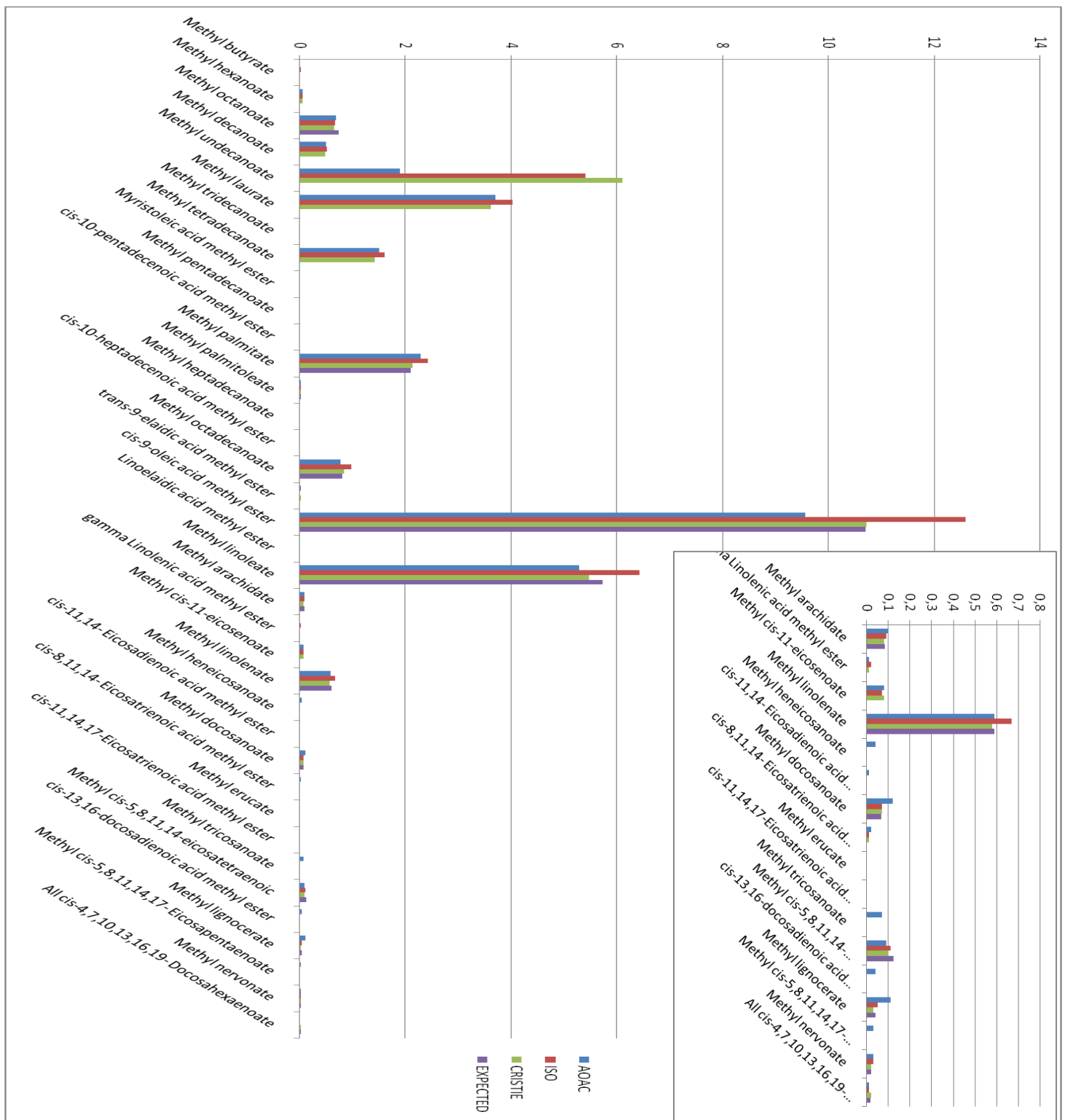
R_F: συντελεστής απόκρισης

SFA: Saturated fatty acid, Κορεσμένο λιπαρό οξύ

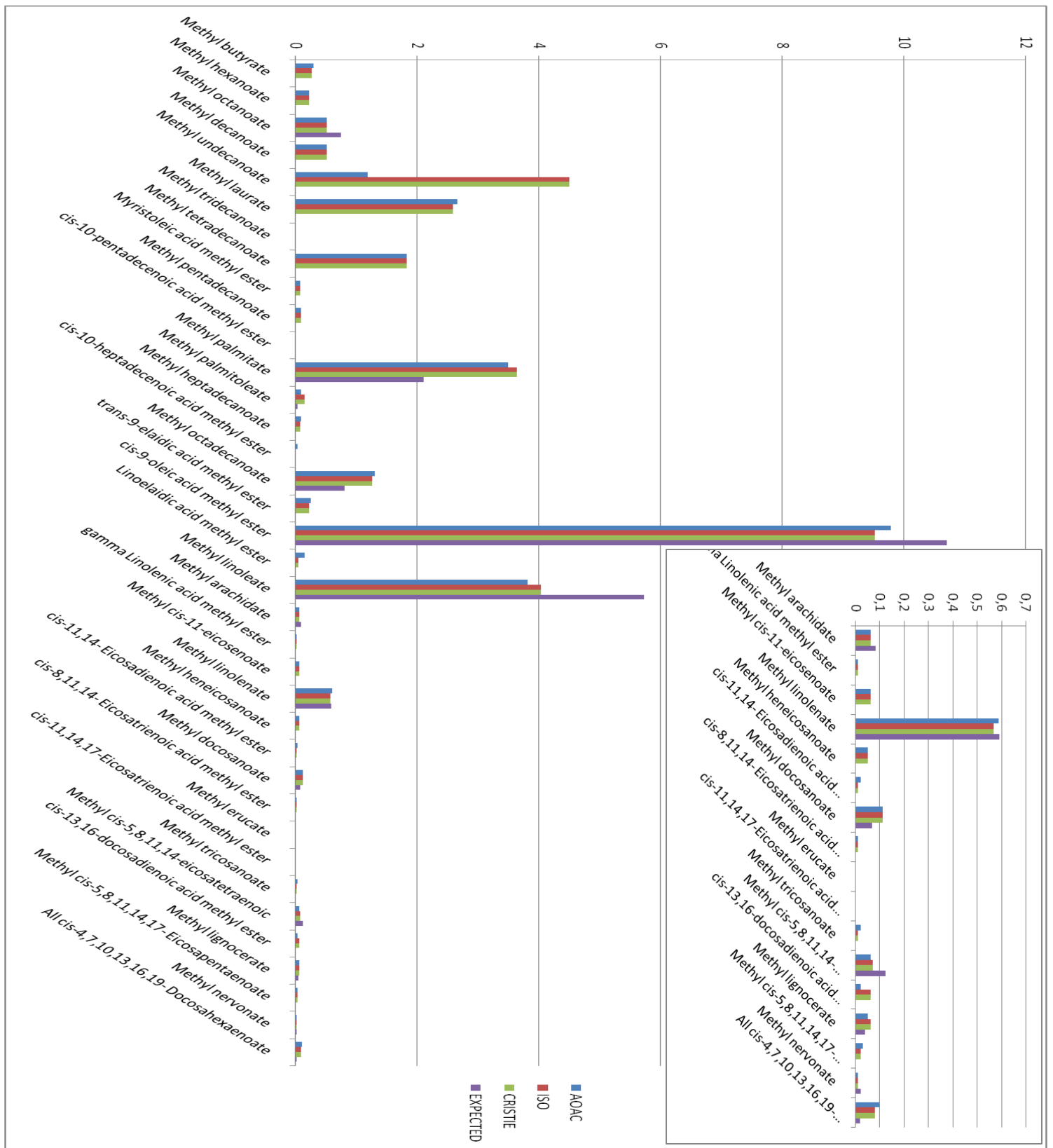
TG: τριγλυκερίδιο

W: μάζα

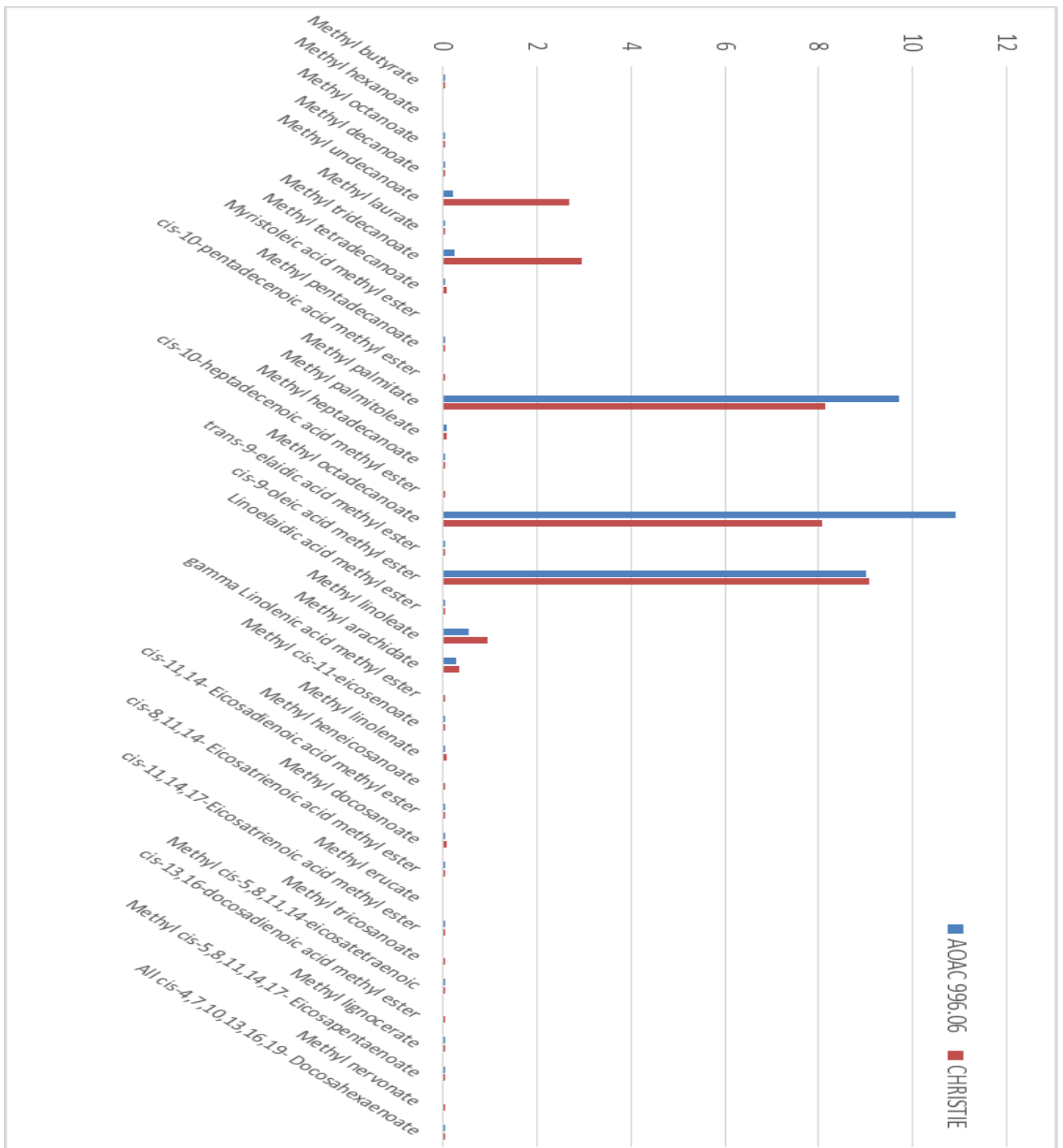
17. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



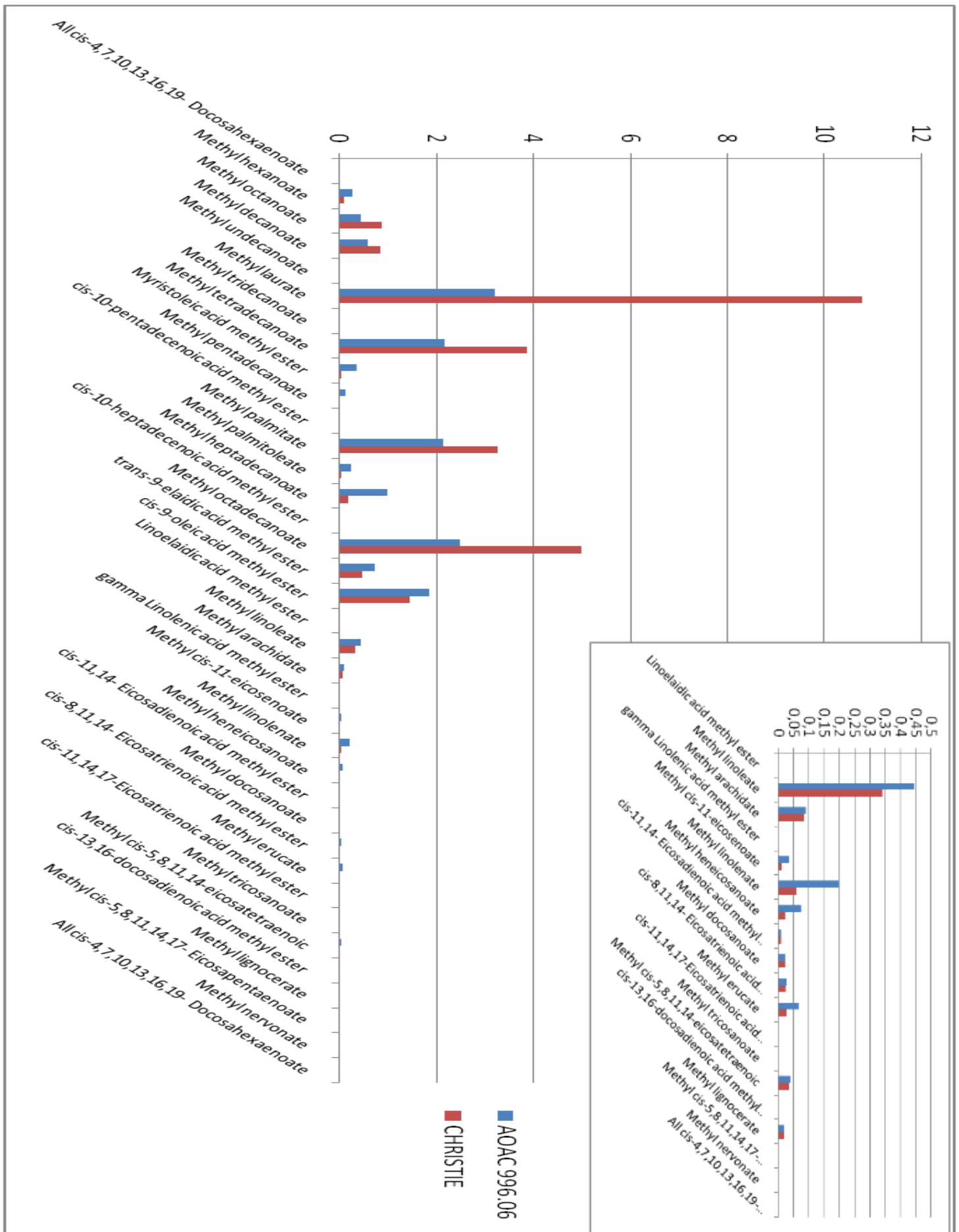
Εικόνα 40 Συγκριτικό ραβδόγραμμα της AOAC 996.06, της ISO 12966-2 και της μεθόδου Christie για το δείγμα CRM 1849^a
 Στο ένθετο φαίνονται με μεγαλύτερη ευκρίνεια τα λιπαρά οξέα χαμηλότερης συγκέντρωσης που εκλύονται σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 41 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ανά λιπαρό οξύ για τις τρεις μεθόδους στη βρεφική σκόνη γάλακτος
 Στο ένθετο φαίνονται με μεγαλύτερη ευκρίνεια τα λιπαρά οξέα χαμηλότερης συγκέντρωσης που εκλύονται σε υψηλές θερμοκρασίες.

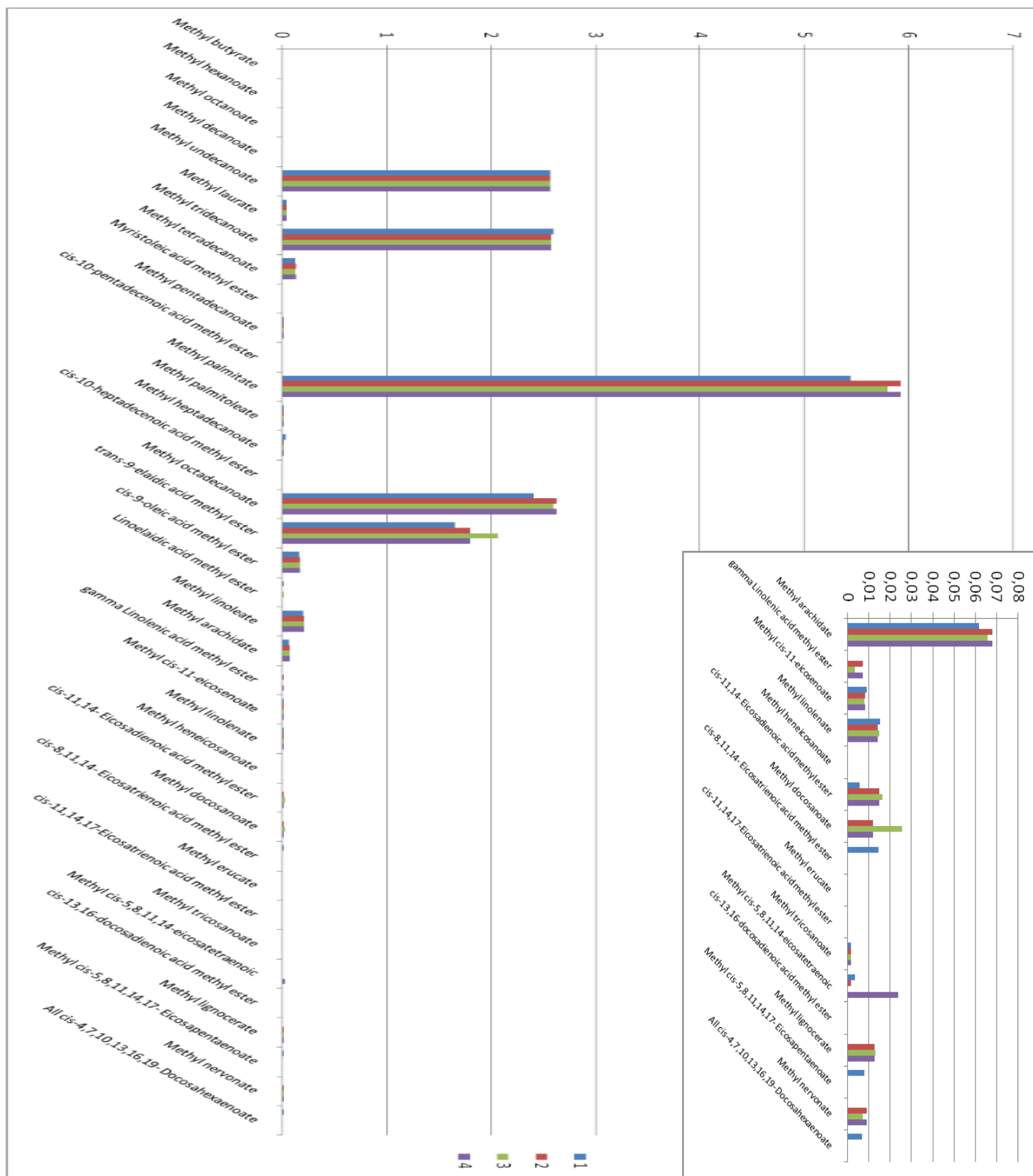


Εικόνα 42 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ανά λιπαρό οξύ των τριών μεθόδων σε δείγμα μαύρης σοκολάτας (drops)



Εικόνα 43 Συγκριτικό ραβδόγραμμα ανά λιπαρό οξύ σε δείγμα απομίμησης σοκολάτας

Στο ένθετο φαίνονται με μεγαλύτερη ευκρίνεια τα λιπαρά οξέα χαμηλότερης συγκέντρωσης που εκλύονται σε υψηλές θερμοκρασίες.



Εικόνα 44 Συγκριτικό ραβδόγραμμα των λιπαρών οξέων σε τέσσερα διαφορετικά δείγματα τρούφας (1,2 AOAC 996.96 - 3,4 Christie)

Στο ένθετο φαίνονται με μεγαλύτερη ευκρίνεια τα λιπαρά οξέα χαμηλότερης συγκέντρωσης που εκλύονται σε υψηλές θερμοκρασίες.

18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Buchgraber M. et al. (2004). Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, pp. 621-648.
- Bannon J. et al. (1982). Analysis of fatty acids methyl esters with high accuracy and reliability. *Journal of chromatography*, pp. 71-89.
- Chardigny J. M. (1996). Fatty acid composition of french infant formulas with emphasis on the content and detailed profile of trans fatty acids. *AOACS*, σσ. 1595-1601.
- Golay P.(2006). Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on trans fatty acid content. *Food Chemistry*, σσ. 1115–1120.
- Golay P. A. (March, 2006). Direct quantification of fatty acids in dairy powders special emphasis on trans fatty acid content. *Journal of AOAC International*, σσ. 210-220.
- Golay P. A (2016). Determination of labeled fatty acids content in milk products, infant formula and adult/pediatric nutritional formula by capillary gas chromatography: Collaborative study, Final Action 2012.13. *AOAC International*, σσ. 210-220.
- Gonzalez C. (2014). Certificate of Analysis. National Institute of Standards and Technology.
- Hawke C. (2004). Nutrition labels and health claims: the global regulatory environment. Geneva: World Health Organization.
- Hye-Kyung (2007). Nutrition policy in South Korea. *Asia Pac J Clin Nutr*, σσ. 343-345.
- Hye-Kyung (2007). Nutrition policy in South Korea. *Asia Pac J Clin Nutr*.
- Ichihara K.(2016). Fatty acid analysis of triacylglycerols: Preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography. *Analytical Biochemistry*, 495.
- Indelicato S. (August, 2017). Triacylglycerols in edible oils: Determination, Characterization, Quantitation, Chemometric approach and evaluation of adulterations. *Journal of Chromatography*, σσ. 1-16.
- Krammer J. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *AOCS Press*, σσ. 1219-1227.
- Laaninen, T. (2016). Trans Fats - Overview of recent developments. European Parliament.
- Laaninen, T. (March 2016). Trans Fats – Overview of recent developments. European Parliament.
- Moulin, G.(2016). Determination of labeled fatty acids content in milk products, infant formula and adult/pediatric nutritional formula by capillary gas chromatography: Collaborative study, Final action 2012.13. *Journal of AOAC International*, pp. 210-222.
- Nichols D. S., Jordan T., Kerr N. (2011). Principles of lipid analysis. Στο D. S. Nichols, Chemical, Biological and Functional aspects of food lipids. Research gate.
- Salimon J.(2013, July). An accurate and reliable method for identification of fatty acids and trans fatty acids in food fats using gas chromatography. *Arabian Journal of Chemistry*, σσ. 1875-1882.
- Schreiner M. (2005, July). Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy. *Journal of Chromatography*, σσ. 126-130.
- Silveira P. R. (2011). Intake recommendations and labeling of trans fat in processed foods in Brazil: analysis of official documents. Brasil.
- Srigley C. T. (2017). Current Analytical Techniques for Food Lipids. In F. a. Administration, Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment (pp. 33–64). Maryland, USA: Scrivener Publishing LLC.
- Visentainer J. (2014). Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in Comparison with Mass Spectrometry with Emphasis on Fatty Acids and Their Esters. Στο Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in Comparison with Mass. Brazil: Maringá State University.
- Whelpton R. (2005). Internal Standards. Στο Quality assurance. London: Elsevier.
- IOC. (2015). DETERMINATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS BY GAS CHROMATOGRAPHY. Madrid, Spain: International Oliveoil Council.
- Official Method AOAC 2003.05
- Official Method AOAC 2003.06
- Official Method AOAC 2012.13
- Official Method AOAC 920.115
- Official Method AOAC 920.39

- Official Method AOAC 922.06
 Official Method AOAC 925.12
 Official Method AOAC 925.32
 Official Method AOAC 932.06
 Official Method AOAC 933.05
 Official Method AOAC 938.06
 Official Method AOAC 945.44
 Official Method AOAC 948.15
 Official Method AOAC 948.22
 Official Method AOAC 950.54
 Official Method AOAC 960.39
 Official Method AOAC 963/15
 Official Method AOAC 985.15
 Official Method AOAC 986.25
 Official Method AOAC 989.05
 Official Method AOAC 991.36
 Official Method AOAC 996.06
 Official Method AOCS Am 5-04
 Official Method AOAC 945.38F
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle. (2014). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Τζιόλα.
- Christie W.W. (1993). Advances in Lipid Methodology. Dundee: Oily Press.
- Han X. & Christie W. W. (2010). Lipid analysis: Isolation, Separation, Identification and lipodomics analysis. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- McMurry. (2011). Οργανική Χημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Wade. (2012). Οργανική Χημεία. Εκδόσεις Τζιόλα.
- Χατζιωάννου Θ., Κ. Μ. (2010). Ενόργανη Ανάλυση. Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (2006). ΟΔΗΓΙΑ 2006/141/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ. ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. (n.d.). Άρθρο 70: Εδώδιμα λίπη και έλαια - Χαρακτηρισμός και Γενικοί όροι επεξεργασίας και Διάθεσης στον καταναλωτή.
- EFSA-ΕΦΕΤ. (2010). efet.gr, Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Fats. Ανάκτηση από http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/nutrition/lipidia.pdf
- EUFIC. (2014, March 2014). Ανάκτηση από Functions, Classification And Characteristics Of Fats: <https://www.eufic.org/en/whats-in-food/article/facts-on-fats-the-basics>
- EUFIC. (2014, March). Functions, Classification And Characteristics Of Fats. Ανάκτηση Απρίλιος 24, 2019, από <https://www.eufic.org/en/whats-in-food/article/facts-on-fats-the-basics>
- EUROPA. (2011). EUROPA-LEX. Ανάκτηση από <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32011R1169>
- EUROPA. (2019, APRIL 24). EUROPA. Ανάκτηση 5 2019, από <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32019R0649&from=EN&fbclid=IwAR311sGVXgD0nbMaEoDL5ftS088WCyFbQavtKbOpejDm9c0zsJvsMj3W4Io>
- FDA. (2003, August). U.S. Department of Human Health & Human Services. Ανάκτηση April 24, 2019, από <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Labeling/Nutrition/ucm053479.htm>
- Food Standard Agency Australia New Zealand. (n.d.). Ανάκτηση από <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/labelling/review/Pages/Technical-evaluation-for-recommendation-13-%28trans-fatty-acids%29-.aspx>

- FSAANZ. (n.d.). Food Standard Agency Australia Neww Zealand. Ανάκτηση April 24, 2019, από <http://www.foodstandards.gov.au/consumer/labelling/review/Pages/Technical-evaluation-for-recommendation-13-%28trans-fatty-acids%29-.aspx>
- Wikipedia.. Ανάκτηση April 24, 2019, από https://en.wikipedia.org/wiki/Trans_fat#Presence_in_food
- Wikipedia. (2010, May 20). Ανάκτηση May 3, 2019, από <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CE%BB%CE%B1%CE%B9%CF%8C%CE%BB%CE%B1%CE%B4%CE%BF>
- Wikipedia. (2017, October 17). Ανάκτηση August 6, 2018, από https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9B%CE%B9%CF%80%CE%B1%CF%81%CF%8C_%CE%BF%CE%BE%CF%8D
- Wikipedia. (2017, Οκτωβρίου 17). Ανάκτηση Αύγουστος 4, 2018, από https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9B%CE%B9%CF%80%CE%B1%CF%81%CF%8C_%CE%BF%CE%BE%CF%8D
- W.W.Christie.AOCS Lipid Library. Ανάκτηση από <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40374>
- U.S. Department of Human Healt & Human Services. (2003, August). U.S. Food & Drug Administration (FDA). Ανάκτηση από <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Labeling/Nutrition/ucm053479.htm>