

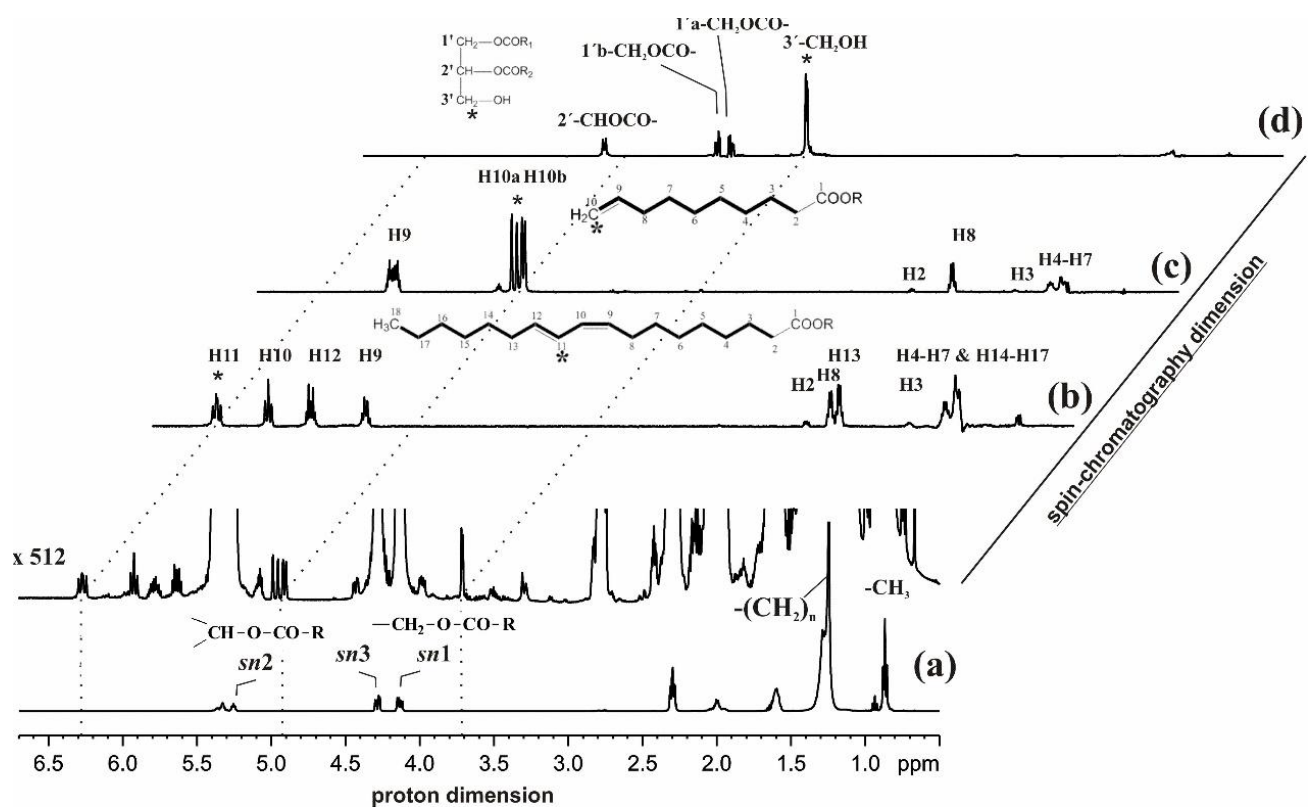


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

# ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΩΤΟΤΥΠΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ- ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΤΩΝ SPIN



Χριστίνα Δ. Παπαεμμανουήλ

Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

***Στην οικογένεια μου, που είναι πάντα δίπλα μου και  
με υποστηρίζει σε κάθε βήμα μου!***

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμολογίας και Πεπτιδοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ιωάννη Π. Γεροθανάση. Την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή συμπληρώνουν ο Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ιωάννης Ρούσσης και ο Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ανδρέας Γ. Τζάκος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ιωάννη Π. Γεροθανάση, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, για την συνεχή καθοδήγηση του σε κάθε προσπάθεια διεκπεραίωσης της διατριβής μου, καθώς και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε αλλά και για όλες τις σημαντικές υποδείξεις που έκανε σε κάθε βήμα μου.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Ρούσση, για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές του κατά τη διόρθωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανδρέα Γ. Τζάκο, για το ενδιαφέρον του, τις υποδείξεις του, τη συνεργασία του και την φιλική του υποστήριξη κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον υπεύθυνο του Κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Δρ. Κων/νο Τσιαφούλη για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου έδωσε κατά τη λήψη των φασμάτων NMR. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Δημήτριο Αλίβερτη, για την υπομονή του κατά την εκπαίδευση μου στον χώρο του εργαστηρίου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για τη βοήθεια που μου προσέφερε σε κάθε δυσκολία μου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου του Εργαστηρίου Ενζυμολογίας και Πεπτιδοχημείας Μαριάννα Σακκά, Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, Μαρία Χατζηαθανασιάδου, Σιμόνη Συμεού για την συνεργασία τους και τη φιλική ατμόσφαιρα καθώς και τους συναδέλφους μου άλλων εργαστηρίων Αντωνία Σαράντου, Αναστασία Ορφανίδου, Μαρία Βάβουρα για την ιδιαίτερη φιλία τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου και την αδερφή μου για την ηθική, ψυχολογική, συνασθηματική και οικονομική συμπαράσταση που μου προσέφεραν το διάστημα εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής και συνεχίζουν να είναι δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

Χριστίνα Δ. Παπαεμμανουήλ

Ιωάννινα, Δεκέμβριος 2015



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>Περιεχόμενα.....</b>	<b>4</b>
<b>Περίληψη.....</b>	<b>7</b>
<b>Summary.....</b>	<b>8</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>9</b>
1.1 Το γάλα και τα προϊόντα γάλακτος.....	11
1.2 Σύσταση του γάλακτος.....	11
1.2.1 Νερό.....	11
1.2.2 Υδατάνθρακες και Ολιγοσακχαρίτες.....	11
1.2.3 Πρωτεΐνες.....	12
1.2.4 Βιταμίνες.....	15
1.2.5 Μεταλλικά Στοιχεία.....	19
1.2.6 Λίπος.....	20
1.3 ΩΦΕΛΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.....	22
1.3.1 Δόμηση και Διατήρηση της Μυϊκής Μάζας.....	22
1.3.2 Πίεση του αίματος.....	22
1.3.3 Τερηδόνα.....	23
1.3.4 Μάθηση και Μνήμη.....	23
1.3.5 Καρκίνος.....	24
1.4 ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	24
1.4.1.1 Συζυγές Λινελαϊκό Οξύ (Conjugated Linoleic Acid, CLA).....	25
1.4.1.2 Σύντομη Περιγραφή.....	28
1.4.1.3 Μικροβιακή Σύνθεση των CLA στο Στομάχι των Μυρηκαστικών.....	28
1.4.1.4 Βιολογικές Ιδιότητες των CLA.....	30
1.4.2 Ω-3 και Ω-6 Λιπαρά Οξέα.....	31
1.4.2.1 Βιοχημεία των Ωμέγα Λιπαρών Οξέων.....	33
1,4,3 Δράση των Ωμέγα Λιπαρών Οξέων στην Υγεία.....	34
1.4.4 Ο Λόγος ω6/ω3.....	35
<b>2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ.....</b>	<b>44</b>

2.1 Εισαγωγή.....	44
2.2 Εκχύλιση Λιπιδίων από Φαγητά και Βιολογικά Υγρά.....	48
2.3 Έμμεσες Μέθοδοι Προσδιορισμού των Συνολικών Λιπιδίων.....	48
2.3.A Μέτρηση Πυκνότητας.....	49
2.3.B Διηλεκτρική Μέθοδος.....	49
2.3.Γ Φασματοσκοπία Υπερύθρου.....	49
2.3.Δ Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Χαμηλής Ανάλυσης.....	50
2.3.Ε Θολωσιμετρικές και Χρωματομετρικές Μέθοδοι.....	51
2.3.ΣΤ Μέθοδος Υπερήχων.....	51
2.3.Ζ Απορρόφηση Ακτινών-Χ.....	52
2.4 Ανάλυση του Λιπιδικού Κλάσματος.....	52
2.4.A. Φυσικοχημικές Ιδιότητες της Λιπιδικής Φάσης.....	52
2.4.B Χαρακτηρισμός της Λιπιδικής Φάσης, με Χρωματογραφικές Μεθόδους.....	54
2.4.Γ Φασματοσκοπικές Τεχνικές Ανάλυσης των Λιπιδίων.....	61
<b><u>3. ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ-ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ.....</u></b>	<b><u>72</u></b>
3.1 Χημική Μετατόπιση.....	72
3.2 Τοπική Διαμαγνητική Προστασία.....	73
3.3 Τοπική Παραμαγνητική Προστασία.....	74
3.4 Μαγνητική Ανισοτροπία.....	75
3.5 Επίδραση του Διαλύτη και των Δεσμών Υδρογόνου.....	76
3.6 Σταθερές Σύζευξης.....	77
3.7 Ομοπυρηνική Σύζευξη Spin-Spin $^1\text{H}-^1\text{H}$ (Spin-Spin Coupling).....	77
3.8 Ετεροπυρηνική Σύζευξη Spin- Spin $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (Spin- Spin Coupling).....	80
3.9 Φαινόμενο Ανταλλαγής Πρωτονίων-Επίδραση Δεσμού Υδρογόνου και pH.....	81
3.10 Μελέτη Δυναμικών και Θερμοδυναμικών Ισορροπιών με τη Φασματοσκοπία NMR....	83
3.11 Φασματοσκοπία NMR Δύο Διαστάσεων.....	84
3.12 ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR.....	91
<b><u>4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΩΤΟΤΥΠΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΤΩΝ SPIN.....</u></b>	<b><u>100</u></b>
4.1 Εισαγωγή.....	100

4.2 Θεωρητικό Υπόβαθρο της Μεθοδολογία Επιλεκτικού TOCSY μιας Διάστασης (Selective 1D- TOCSY).....	101
4.3 Υλικά και Μέθοδοι.....	102
4.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	103
4.4.1 Πειράματα Επιλεκτικού 1DT OCSY Πρότυπων Ενώσεων-Επίδραση του Χρόνου Ανάμειξης (Mixing Time).....	103
4.4.2 Εφαρμογή της Μεθόδου στο Λιπιδικό Κλάσμα Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων.....	105
4.5 Ποσοτικοποίηση Λιπιδίων με τη Χρήση Πειράματος 1D TOCSY –Σύγκριση με την Κλασική Μέθοδο και τη Μέθοδο Ανάλυσης GC-MS.....	112
4.6 Συμπεράσματα.....	115

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής αποτελεί η ανάλυση και η μελέτη της λιπιδικής φάσης γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων με εφαρμογή της φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR. Η μελέτη της λιπιδικής φάσης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων έγινε με την ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής, βασισμένη στη φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR, η οποία καλείται επιλεκτικό πείραμα TOCSY μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY).

Τα λιπίδια του γάλακτος είναι πολύ σημαντικά καθώς προσδίνουν διακριτή υφή και διατροφικές και οργανοληπτικές ιδιότητες στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η ακριβής ανάλυση των λιπιδίων που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της διατροφικής αξίας και την προετοιμασία διατροφικών υλικών που προορίζονται για συγκεκριμένη λειτουργία και εφαρμογή. Η ανάλυση των λιπιδίων αυτών όμως αποτελεί μεγάλη πρόκληση διότι είναι αρκετά περίπλοκη, μπορεί να απαιτεί ειδική προετοιμασία και πολλά βήματα ανάλυσης.

Το πείραμα επιλεκτικό TOCSY μιας διάστασης (selective 1D TOCSY) αποτελεί μια σημαντική τεχνική NMR για τη διερεύνηση της αλληλουχίας  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  μέσω σταθερών σύζευξης  $J$  σε μόρια μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους. Επίσης, έχει εφαρμοστεί στην ανάλυση μιγμάτων και στον προσδιορισμό συστατικών σε μικρή αναλογία. Η τεχνική αυτή αναμένεται να έχει σημαντικές εφαρμογές στην έρευνα τροφίμων.



## SUMMARY

The aim of this master thesis is the analysis and the study of the lipid phase of milk and milk products, using the spectroscopic method Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR). The study of the lipid phase of milk and milk products has been achieved by developing a new technique, based on the NMR Spectroscopy. This technique is called Selective 1D TOCSY.

Milk lipids are supposed to be important as they give distinct texture, nutritional and organoleptic properties in dairy products. Accurate analysis of lipids present in a small percentage is important to determine the nutritional value as well as preparing food materials for this function and application. Though the analysis of these lipids is supposed to be a real challenge, as it is complicated, requires special preparation and many derivatization steps.

Selective 1D TOCSY experiment is an important technique based on NMR Spectroscopy, for investigating  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  sequence through  $J$  coupling constants in low and medium molecular weight molecules. It has also been applied to the analysis of mixtures and identifying components in minor percentage. This technique is expected to have important applications in food research.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 ΤΟ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα (Σχήμα 1.1.1), το οποίο αποτελεί την πρώτη βασική διατροφή των νεαρών θηλαστικών, παράγεται στους μαστικούς αδένες των θηλυκών θηλαστικών. Είναι ένα ετερογενές μίγμα λίπους και πρωτεϊνών σε νερό το οποίο περιέχει επίσης υδατάνθρακες, με κυρίαρχη τη λακτόζη, βιταμίνες και στοιχεία. Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, προέρχονται από διαφορετικά είδη ζώων, όπως είναι η κατσίκια, το πρόβατο και η αγελάδα.<sup>1</sup>



**Σχήμα 1.1.1:** Γάλα

Καθώς το γάλα αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από νερό, μπορεί να συμπυκνωθεί προς παραγωγή γάλακτος εβαπορέ και τυριών. Σε όλο τον κόσμο καταναλώνεται σε διαφορετικές μορφές, εκτός του γάλακτος, όπως είναι το τυρί, το γιαούρτι, ή ως συστατικό σούπας ή σάλτσας.

Σύμφωνα με τα νομοθετικά πλαίσια, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα πρέπει να περιέχουν ένα συγκεκριμένο ποσοστό ολικού στερεού υπολείμματος (δηλαδή συστατικών του γάλακτος εκτός του νερού), όπως επίσης και ένα συγκεκριμένο ποσοστό ολικού στερεού υπολείμματος άνευ λίπους. Το λιπαρό κλάσμα του γάλακτος είναι το πιο ακριβό συστατικό του και η περιεκτικότητά του καθορίζει το αν το γάλα προσφέρεται για λιανική πώληση ως αυτούσιο προϊόν, ή ως προϊόν με μικρό ποσοστό λίπους όπως είναι το γάλα 2%, 1%, ½% ή γάλα χωρίς λιπαρά (0%).<sup>1</sup>

Το γάλα μπορεί να κατεργαστεί, συμπυκνωθεί, να “ενισχυθεί”, ομογενοποιηθεί, παστεριωθεί και να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή προϊόντων με διαφορετική

γεύση, υφή, διατροφική αξία και διάρκεια ζωής. Μπορεί να μετατραπεί σε προϊόντα, όπως είναι το βουτυρόγαλα, το τυρί, η κρέμα γάλακτος, το παγωτό και το γιαούρτι, τα οποία είναι δυνατό να περιέχουν διαφορετικά επίπεδα λίπους. Η σκόνη γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε πληθώρα τροφίμων. Η προσθήκη του στα τρόφιμα συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης ή του ασβεστίου.

Οι υψηλές θερμοκρασίες είναι δυνατό να συμβάλλουν στην πήξη του γάλακτος. Παρόλα αυτά πρέπει να υπάρχει έλεγχος όταν αυτό χρησιμοποιείται στα τρόφιμα. Η χρήση του γάλακτος απαιτεί ασφαλή χειρισμό και αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες.<sup>1</sup>

Αν και θεωρείται από τα σημαντικότερα τρόφιμα για την διατροφή του ανθρώπου και των ζώων, αρκετά μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού δεν μπορεί να καταναλώσει το γάλα. Ο λόγος είναι ότι αρκετοί άνθρωποι δεν έχουν το ένζυμο λακτάση, το οποίο μεταβολίζει τη λακτόζη. Για να μπορέσει αυτός ο πληθυσμός να καταναλώσει γάλα, έχουν γίνει επιτυχείς προσπάθειες παρασκευής γάλακτος χωρίς λακτόζη.<sup>2</sup> Από την άλλη πλευρά, για το ποσοστό αυτό είναι πιο εύκολη η κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως είναι το τυρί και το ζυμωμένο γάλα, καθώς τα γαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν σε αυτά τα προϊόντα διασπούν την λακτόζη στα απλούστερα μόρια γλυκόζη και γαλακτόζη, τα οποία είναι εύπεπτα από τον οργανισμό.<sup>3</sup>

### Ορισμός

Σύμφωνα με τον οργανισμό FDA (Food and Drug Administration), το γάλα ορίζεται ως: η γαλακτική έκκριση, πρακτικά απαλλαγμένη από πρωτόγαλα, η οποία λαμβάνεται από το πλήρες άρμεγμα μιας ή περισσότερων υγιών αγελάδων<sup>1</sup> (Σχήμα 1.1.3).



**Σχήμα 1.1.2:** Γάλα

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως τα γαλακτοκομικά προϊόντα προσφέρουν πάρα πολλά οφέλη στην υγεία. Αρκετά συστατικά του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων παίζουν ρόλους που δεν μπορούσε να σκεφτεί ο

ανθρώπινος νους μία ή δυο γενιές πριν, όπως είναι τα οφέλη στο γαστρεντερικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα.<sup>4</sup> Αυτές οι θετικές δράσεις τους προκύπτουν από τις πρωτεΐνες, τα μεταλλικά στοιχεία, τις βιταμίνες, τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες που αποτελούν τη σύσταση του γάλακτος, όπως περιγράφονται παρακάτω.<sup>3</sup>

## **1.2 Σύσταση του Γάλακτος**

Το γάλα ποικίλλει ως προς τη φυσική και χημική σύνθεσή του, ανάλογα με διάφορους παράγοντες όπως είναι η ηλικία και η φυλή των αγελάδων, το επίπεδο δραστηριότητας τους, το στάδιο της γαλουχίας τους, η χρήση ή όχι φαρμάκων και το διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των αρμεγμάτων. Αποτελείται κυρίως από νερό και περιέχει ορισμένα στερεά υπολείμματα με και χωρίς λίπος. Στο στερεό υπόλειμμα υπάρχουν συστατικά όπως είναι η λακτόζη, οι καζεΐνες, οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος και διάφορα μέταλλα. Επίσης, το γάλα περιέχει και φυσικό λίπος, το οποίο βρίσκεται με τη μορφή κυρίως τριγλυκεριδίων, και σε μικρό ποσοστό ελεύθερων λιπαρών οξέων.

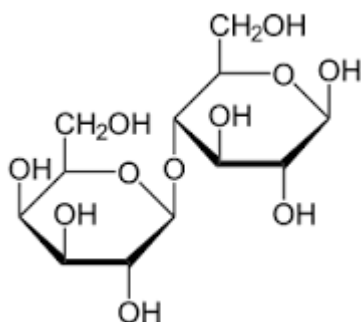
### **1.2.1 Νερό**

Το βασικό συστατικό του γάλακτος είναι το νερό, το οποίο βρίσκεται σε ποσοστό περίπου 87-88%. Αν το νερό αυτό απομακρυνθεί, η διάρκεια ζωής του γάλακτος μπορεί να αυξηθεί αρκετά.<sup>1</sup>

### **1.2.2 Υδατάνθρακες και Ολιγοσακχαρίτες**

Οι υδατάνθρακες είναι υδατοδιαλυτά μόρια και ως εκ τούτου βρίσκονται στην υδατική φάση του γάλακτος, σε ποσοστό περίπου 5%. Κύριος υδατάνθρακας είναι ο δισακχαρίτης λακτόζη (Σχήμα 1.2.2.1). Η λακτόζη αποτελεί το περισσότερο από το 99% των υδατανθράκων στο γάλα.<sup>3</sup> Εμφανίζει χαμηλή διαλυτότητα και μπορεί να καθιζάνει από το διάλυμα με τη μορφή κοκκώδους ιζήματος. Μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, κατόπιν οξίνισης, λόγω βακτηριακής ζύμωσης. Επίσης, η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ μπορεί να γίνει και κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του τυριού. Η λακτόζη έχει την ικανότητα να διεγείρει την απορρόφηση του Ca στο έντερο.<sup>5</sup> Ακόμη, μπορεί να υδρολυθεί ενζυματικά στο έντερο, σχηματίζοντας γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, που χρησιμοποιούνται εύκολα από το βακτήριο

*Bifidobacterium*, και συμβάλλουν στη βελτίωση της λειτουργίας του πεπτικού συστήματος.<sup>4</sup>



**Σχήμα 1.2.2.1:** Ο δισακχαρίτης λακτόζη.

Το αγελαδινό γάλα περιέχει 1g ολιγοσακχαρίτη/L, ενώ στο μητρικό γάλα η συγκέντρωση του ολιγοσακχαρίτη είναι 7-12 g/L.<sup>6</sup> Οι ολιγοσακχαρίτες λαμβάνονται από το γάλα και διέρχονται μέσω της γαστρεντερικής οδού και είναι διαθέσιμοι για τα ευεργετικά βακτήρια του παχέος εντέρου, βοηθώντας την ανάπτυξή τους.

Ολιγοσακχαρίτες περιέχονται επίσης και στις αλυσίδες των γλυκοπρωτεϊνών του αίματος και συμβάλλουν σημαντικά στην προστασία των νεογέννητων από μικρόβια και διάφορες τοξίνες.<sup>7</sup>

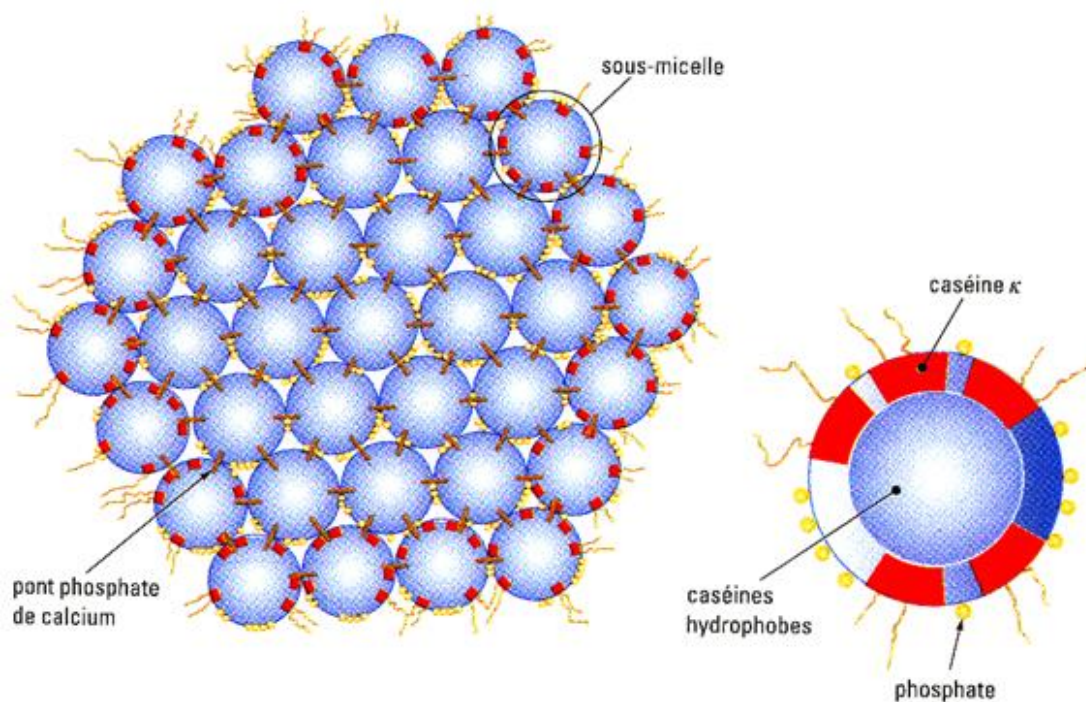
### 1.2.3 Πρωτεΐνες

Το κλάσμα των πρωτεϊνών αντιπροσωπεύει το 3-4% της σύστασης του γάλακτος και μπορεί να απομονωθεί από αυτό με υπερφυγοκέντρωση. Η πιο σημαντική πρωτεΐνη του γάλακτος είναι η καζεΐνη (Σχήμα 1.2.3.1), η οποία αποτελεί το 80% της συνολικής πρωτεΐνης του γάλακτος. Για την ακρίβεια οι καζεΐνες αποτελούν μια ομάδα παρόμοιων πρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να απομονωθούν από το πρωτεϊνικό κλάσμα με οξείδωση του γάλακτος, μέχρι το pH του να φτάσει στην τιμή 4.6 (το ισοηλεκτρικό σημείο). Σε αυτό το pH οι καζεΐνες χάνουν τη δράση τους καθώς, από υδρόφοβες που είναι, αρχίζουν να ενυδατώνονται και δεν φέρουν πλέον φορτίο. Οι άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες είναι περισσότερο υδρόφιλες, παραμένουν διασκορπισμένες στην υδατική φάση.<sup>1</sup>

Υπάρχουν τρία κύρια κλάσματα της καζεΐνης, τα οποία είναι γνωστά ως  $\alpha_s$ -,  $\beta$ -, και κ-καζεΐνη. Η  $\alpha_s$ - καζεΐνη περιλαμβάνει δύο κλάσματα: την  $\alpha_{s1}$ - και την  $\alpha_{s2}$ - καζεΐνη, τα οποία όμως είναι δύσκολο να διαχωριστούν μεταξύ τους. Τα τέσσερα κλάσματα,  $\alpha_{s1}$ - $\beta$ -, κ-, και  $\alpha_{s2}$ - καζεΐνης υπάρχουν σε αναλογία 3:3:1:8. Και τα τέσσερα κλάσματα είναι φωσφοπρωτεΐνες, καθώς περιέχουν αρκετές φωσφορικές ομάδες, οι οποίες είναι εστεροποιημένες με το αμινοξύ σερίνη. Τα κλάσματα  $\alpha_s$ - και  $\beta$ - καζεΐνη περιέχουν αρκετές φωσφορικές ομάδες και, ως αποτέλεσμα, είναι ευαίσθητες στο ασβέστιο και μπορούν να υποστούν πήξη με την προσθήκη ασβεστίου. Η κ- καζεΐνη

έχει μόνο μία φωσφορική ομάδα και δεν παρουσιάζει ευαισθησία στο ασβέστιο. Επίσης, τα κλάσματα  $\alpha_s$ - και  $\beta$ - καζεΐνης είναι πολύ υδρόφοβα, ενώ, από την άλλη πλευρά, η  $\kappa$ - καζεΐνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία περιέχει μια όξινη (φορτισμένη) υδατανθρακική ομάδα, γεγονός που την καθιστά αρκετά υδρόφιλη.<sup>1</sup>

Στο γάλα, τα κλάσματα της καζεΐνης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, καθώς και με κολλοειδή φωσφορικού ασβεστίου, σχηματίζοντας σφαιρικές δομές, οι οποίες είναι γνωστές ως μικκύλια καζεΐνης (Σχήμα 1.2.3.1). Οι υδρόφοβες  $\alpha_s$ - και  $\beta$ - καζεΐνες βρίσκονται κυρίως στο εσωτερικό των μικκυλίων ενώ η υδρόφιλη  $\kappa$ - καζεΐνη βρίσκεται στην επιφάνεια του μικκυλίου. Η τελευταία είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα των μικκυλίων στο γάλα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό οφείλεται στο ότι η υδρόφιλη  $\kappa$ - καζεΐνη έχει αρνητικό φορτίο το οποίο σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το φορτισμένο υδρόφιλο τμήμα του μορίου του υδατάνθρακα τείνει να προεξέχει από την επιφάνεια του μικκυλίου, προδίδουν στα μικκύλια στερεική σταθερότητα.<sup>1</sup>



**Σχήμα 1.2.2:** Μικκύλιο Καζεΐνης

Τα μικκύλια της καζεΐνης υφίστανται πήξη με οξίνιση σε pH 4.6-5.2. Καθώς τα μικκύλια προσεγγίζουν το ισοηλεκτρικό τους σημείο, μειώνεται το φορτίο τους και το επίπεδο ενυδάτωσής τους. Ακόμη, η δομή της  $\kappa$ - καζεΐνης, που μοιάζει με αυτή της τρίχας, μεταβάλλεται μειώνοντας την στερεοχημική παρεμπόδιση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μικκύλια να χάνουν τη σταθερότητα τους και έτσι συσσωματώνονται. Αυτή είναι η βάση για την παραγωγή του τυριού cottage, το οποίο είναι ένα όξινο τυρί που περιέχει γάλα με πηγμένη καζεΐνη. Το οξύ προκαλεί επίσης την απομάκρυνση του ασβεστίου από τα μικκύλια, με αποτέλεσμα το τυρί cottage να είναι φτωχό σε ασβέστιο σε σχέση με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα.<sup>1</sup>

Τα μικκύλια καζεΐνης μπορούν επίσης να υποστούν θρόμβωση με την προσθήκη του ενζύμου ρεννίνης, το οποίο προστίθεται στο γάλα με σκοπό την παραγωγή τυτιάς ή τυριού. Η ρεννίνη διασπά έναν συγκεκριμένο δεσμό στην κ- καζεΐνη και προκαλεί την απομάκρυνση των φορτισμένων και υδρόφιλων δομών από τα μικκύλια. Ως αποτέλεσμα, η επιφάνεια του μικκυλίου παραμένει χωρίς φορτίο, γίνεται υδρόφοβη και ασταθής και έτσι τα μικκύλια συσσωματώνονται και σχηματίζουν το τυρόπηγμα. Το τυρόπηγμα μπορεί να διαχωριστεί από το τυρόγαλα και να υποστεί επεξεργασία προς σχηματισμό τυριού. Η ρεννίνη δεν απομακρύνει το ασβέστιο από τα μικκύλια.<sup>1</sup>

Τα μικκύλια της καζεΐνης είναι σχετικά σταθερά στη θέρμανση και δεν μετουσιώνονται (σε ουδέτερο pH), εκτός εάν οι θερμοκρασίες είναι πολύ υψηλές και η θέρμανση είναι παρατεταμένη. Αυτό αποτελεί πρόβλημα σε θερμαινόμενα συμπυκνωμένα προϊόντα γάλακτος, όπως το γάλα εβαπορέ. Το πρόβλημα αυτό αποφεύγεται με την προσθήκη καρραγενάνης για την προστασία της πρωτεΐνης.<sup>1</sup>

Οι καζεΐνες περιέχουν τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα τμήματα. Επίσης, περιέχουν υψηλό ποσοστό του αμινοξέος προλίνη και έτσι είναι πρωτεΐνες με ευέλικτη δευτεροταγή δομή. Ως αποτέλεσμα, προσροφώνται εύκολα σε μια διεπιφάνεια ελαίου-νερού σχηματίζοντας ένα σταθερό φιλμ, το οποίο αποτρέπει τη συνένωση των σταγονιδίων του γαλακτώματος με αποτέλεσμα να αποτελούν εξαιρετικούς γαλακτωματοποιητές.<sup>1</sup>

Το υπόλοιπο 20% των πρωτεϊνών του γάλακτος, αποτελείται από την πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Αυτό το κλάσμα αποτελείται κυρίως από την α-λακταλβουμίνη, την β-λακτογλοβουλίνη και την αλβουμίνη του ορού.<sup>3</sup> Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι πιο ενυδατωμένες από την καζεΐνη και μετουσιώνονται και καθιζάνουν με τη θερμότητα και όχι με οξύ.

Στις πρωτεΐνες του γάλακτος ανήκουν επίσης και ένζυμα όπως είναι η λιπάση, η πρωτεάση και η αλκαλική φωσφατάση, οι οποίες υδρολύουν τα τριγλυκερίδια, τις πρωτεΐνες και τους φωσφορικούς εστέρες, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 1.2.3.1 αναφέρονται οι μέσες τιμές της ποιότητας των πρωτεϊνών για το γάλα και τα διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένης της βιολογικής τους αξίας, της πεπτικότητας, της καθαρής πρωτεϊνικής χρήσης των, της αποτελεσματικότητάς τους.<sup>1</sup>

	Βιολογική αξία	Πεπτικότητα	Καθαρή Πρωτεϊνική Χρήση	Αποτελεσματικότητα
Γάλα	84.5	96.9	81.6	3.09
Καζεΐνη	79.7	96.3	72.1	2.86
Λακταλβουμίνη	82	97	79.5	3.43
Σκόνη γάλακτος χωρίς λιπαρά	-	-	-	3.11

**Πίνακας 1.2.3.1:** Μέσες τιμές ποιότητας πρωτεϊνών του γάλακτος.

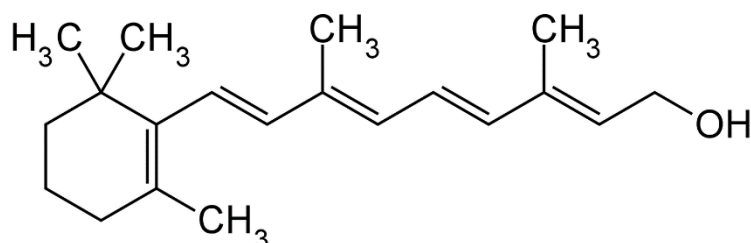
Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών, έχει προτείνει μια μέθοδο, η οποία κατατάσσει τις πρωτεΐνες ανάλογα με την βιο-διαθεσιμότητα των αμινοξέων τους. Στη λίστα αυτή οι πρωτεΐνες του γάλακτος βρίσκονται ψηλά.<sup>8</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι η πεπτική αξία των πρωτεϊνών του γάλακτος (95%) και της καζεΐνης (94,1%) είναι μεγαλύτερη από εκείνες που βρίσκονται στη σόγια, στο καλαμπόκι, στο μπιζέλι και στο σιτάρι.<sup>8</sup> Έχει αποδειχθεί πως ένας αριθμός πεπτιδίων που προέρχονται από το γάλα είναι βιοδραστικά και για το λόγο αυτό έχουν προστεθεί σε διάφορα εμπορικά προϊόντα όπως είναι τα αναψυκτικά.<sup>9</sup>

#### 1.2.4 Βιταμίνες

Το γάλα αποτελεί πηγή όλων των βιταμινών, εκτός από τη βιταμίνη C, η οποία διασπάται κατά την παστερίωση.<sup>3</sup> Το γάλα περιέχει υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές βιταμίνες. Από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιέχει κυρίως βιταμίνες του συμπλέγματος B, ενώ από τις λιποδιαλυτές περιέχει σε μεγάλο ποσοστό τις βιταμίνες A και D και σε μικρότερο ποσοστό τις βιταμίνες E και K.<sup>1</sup>

Κάθε βιταμίνη έχει διαφορετικό μεν, αλλά καθοριστικό ρόλο στο γάλα:

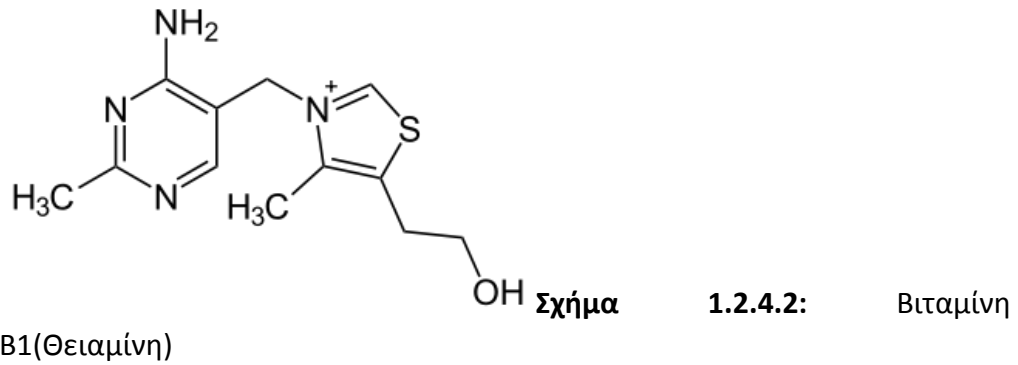
- Η βιταμίνη A (ρετινόλη) (Σχήμα 1.2.4.1) αποτελεί φυσικό συστατικό του λίπους στο πλήρες γάλα. Είναι πολύ σημαντική για την όραση και εμπλέκεται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στην αναπαραγωγή και στην κυτταρική επικοινωνία, διαφοροποίηση και ανάπτυξη.<sup>10</sup> Λόγω του ρόλου της στον οργανισμό είναι δυνατό να γίνεται εμπλουτισμός των γαλακτοκομικών προϊόντων με βιταμίνη A.



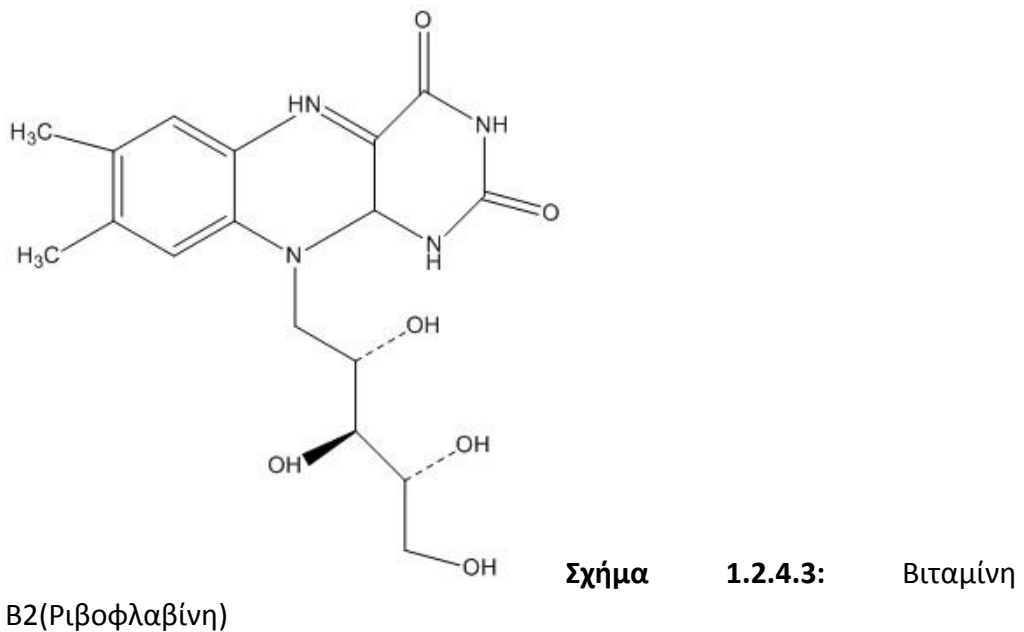
Σχήμα 1.2.4.1: Βιταμίνη A (Ρετινόλη)

- Η βιταμίνη B1 (θειαμίνη) (Σχήμα 1.2.4.2) συμβάλλει στον μεταβολισμό των αμινοξέων με διακλαδισμένη αλυσίδα, των υδατανθράκων και των λιπαρών οξέων.<sup>11</sup>

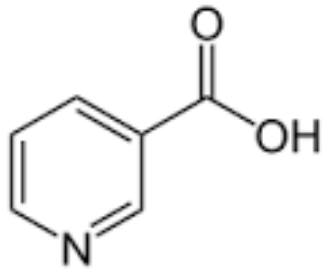




- Η βιταμίνη B2 (ριβοφλαβίνη) (Σχήμα 1.2.4.3) συμμετέχει στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών.<sup>11</sup> Το υδατικό κλάσμα του γάλακτος είναι πλούσιο στη ριβοφλαβίνη, η οποία είναι ένα πρασινωπό φθορίζον μόριο. Ακόμη, η ριβοφλαβίνη έχει σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση, αλλά καταστρέφεται εύκολα κατά την έκθεση του γάλακτος στο ηλιακό φως.

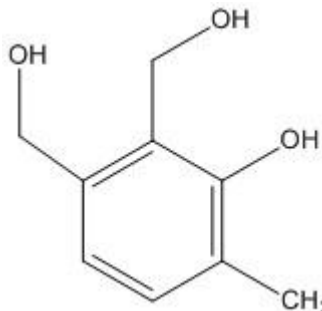


- Η βιταμίνη B3 (νιασίνη) (Σχήμα 1.2.4.4) αποτελεί πρόδρομο μόριο των συνενζύμων NAD και NADP, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον καταβολισμό αλκοολών, υδατανθράκων, λιπών, πρωτεϊνών, καθώς και για τη σύνθεση των μακρομορίων.<sup>11</sup>



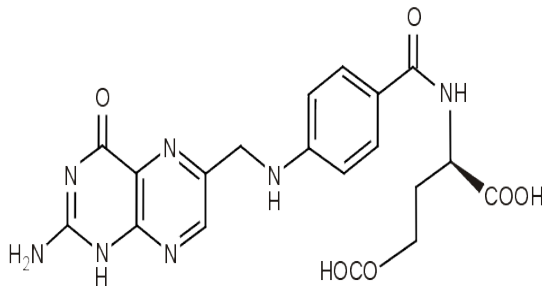
**Σχήμα 1.2.4.4:** Βιταμίνη Β3 (Νιασίνη)

- Η βιταμίνη Β6 (πυριδοξίνη) (Σχήμα 1.2.4.5) έχει ενεργό ρόλο σε περισσότερες από 100 ενζυμικές αντιδράσεις, οι περισσότερες από τις οποίες σχετίζονται με το μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Επίσης, συμμετέχει στην γνωστική ανάπτυξη, καθώς και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού.<sup>10</sup>



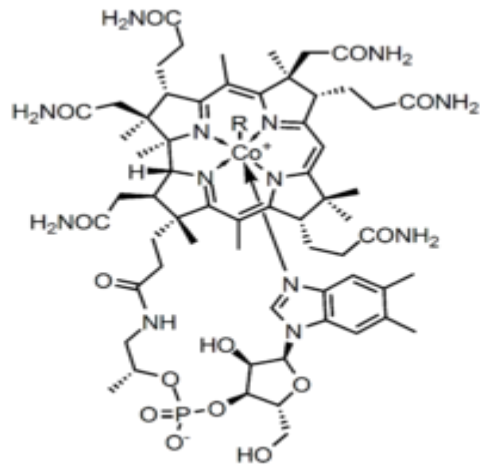
**Σχήμα 1.2.4.5:** Βιταμίνη Β6 (Πυριδοξίνη)

- Η βιταμίνη Β9 (φυλλικό οξύ) (Σχήμα 1.2.4.6) χρησιμοποιείται στη σύνθεση DNA, RNA και αμινοξέων.<sup>10</sup>



**Σχήμα 1.2.4.6:** Βιταμίνη Β9 (Φυλλικό Οξύ)

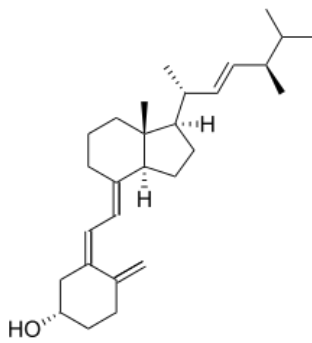
- Η βιταμίνη Β12 (κοβαλαμίνη) (Σχήμα 1.2.4.7) βοηθάει στη σύνθεση του DNA και της αιμογλοβίνης. Επίσης έχει ενεργό ρόλο στη διατήρηση των νευρικών κυττάρων.<sup>12</sup>



R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

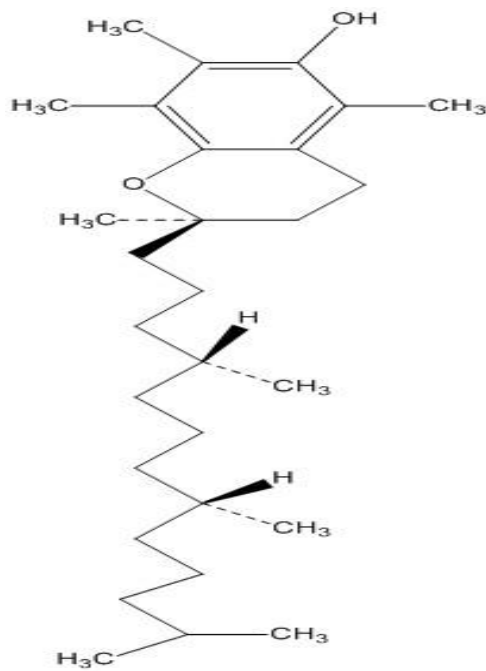
**Σχήμα 1.2.4.7:** Βιταμίνη B12 (Κοβαλαμίνη)

- Η βιταμίνη D (καλσιφερόλη) (Σχήμα 1.2.4.8) βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο γάλα και βοηθάει στην απορρόφηση Ca και P από τα οστά, συμβάλλοντας στην ανάπτυξή τους.<sup>10</sup>



**Σχήμα 1.2.4.8:** Βιταμίνη D (Καλσιφερόλη)

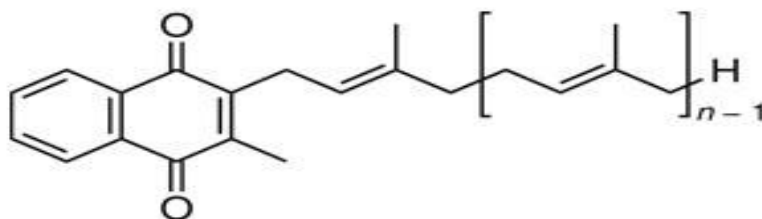
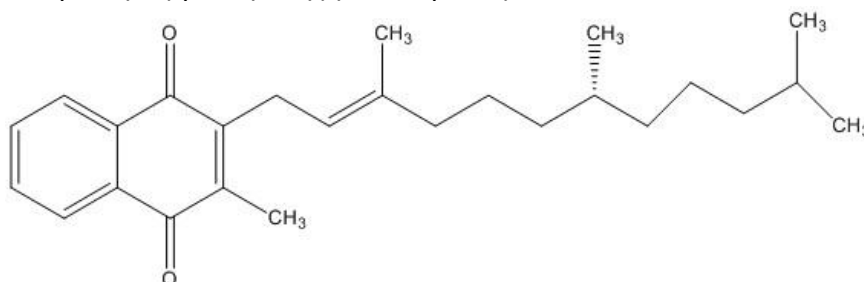
- Η βιταμίνη E (τοκοφερόλη) (Σχήμα 1.2.4.9) είναι αντιοξειδωτική και εμποδίζει τον τραυματισμό των κυττάρων.<sup>10</sup>



Σχήμα 1.2.4.9: Βιταμίνη Ε

(Τοκοφερόλη)

- Οι βιταμίνες K1 (φιλοκινόνη) και K2 (μενακινόνη) (Σχήμα 1.2.4.10) παράγονται από βακτήρια στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα και είναι απαραίτητες για την πήξη του αίματος.<sup>11</sup>



Σχήμα 1.2.4.10: Βιταμίνη K1 (φιλοκινόνη) και K2 (μενακινόνη)

### 1.2.5 Μεταλλικά Στοιχεία

Στο γάλα βρίσκονται κυρίως τα μέταλλα Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, Se και Zn, τα οποία είναι υπεύθυνα για έναν αριθμό βασικών διεργασιών στο σώμα.<sup>11,13</sup> Η

συγκέντρωσή τους αποτελεί περίπου το 1% της σύστασης του γάλακτος, με το 1/3 του ασβεστίου να βρίσκεται στο διάλυμα και τα 2/3 να είναι διεσπαρμένα με τη μορφή κolloειδών. Το ασβέστιο σχηματίζει σύμπλοκο με την καζεΐνη, όπως επίσης με τον φωσφόρο και το κιτρικό οξύ. Μια επαρκής πρόσληψη Ca αυξάνει την οστική πυκνότητα κατά την ανάπτυξη του σκελετού και αποτρέπει την απώλεια οστών και οστεοπορωτικών καταγμάτων, που συμβαίνουν κυρίως στις μεγάλες ηλικίες.<sup>14</sup> Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση Ca από τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι κατά 50-100% πιο αποτελεσματική από το ποσοστό που λαμβάνεται από συμπληρώματα διατροφής.<sup>9</sup> Το Ca, αλλά και τα άλλα στοιχεία που βρίσκονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε αυτά είναι πλήρη είτε χαμηλών λιπαρών, μειώνουν τη συσσώρευση του λίπους στο σώμα και επιταχύνουν την απώλεια βάρους.<sup>15</sup> Σε μια σημαντική μελέτη που έγινε ανάμεσα σε ανθρώπους και ζώα, χρησιμοποιώντας μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, αλλά μια αρκετά αυξημένη συγκέντρωση μεταλλικών στοιχείων, τα διατροφικά στοιχεία έδειξαν σημαντική αύξηση της LDL (Low-Density Lipoprotein, «κακή χοληστερόλη»), ενώ η HDL (High-Density Lipoprotein, «κακή χοληστερόλη») δεν παρουσίασε αύξηση.<sup>16</sup> Το Ca μειώνει την απορρόφηση του λίπους στο έντερο μέσω σχηματισμού σαπώνων. Επίσης, μειώνει τα επίπεδα χοληστερόλης μέσω δέσμευσης του φωσφορικού ασβεστίου με τα χολικά οξέα, τα οποία ξαναδημιουργούνται στο ήπαρ από την LDL και την χοληστερόλη.<sup>17</sup> Τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία παρέχουν τουλάχιστον 70% του Ca στη διατροφή<sup>18</sup>, έχουν χαρακτηριστεί ως οι καλύτερες πηγές ασβεστίου εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε αυτό το στοιχείο.<sup>12</sup>

### 1.2.6 Λίπος

Τα λιπίδια του γάλακτος υπάρχουν σε αυτό με τη μορφή σφαιριδίων και αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια, που περιβάλλονται από τη MFGM (Milk Fat Globule Membrane). Η MFGM αποτελείται κατά 60% από πρωτεΐνες και 40% λιπίδια, όπως είναι τα πολικά φωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια, η χοληστερόλη, καθώς και από κάποια άλλα συστατικά που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό.<sup>19</sup> Τα πολικά λιπίδια είναι λιγότερα από 40mg/ 100g γάλακτος, αλλά έχουν βιολογική δράση. Παράδειγμα αποτελεί η παρεμπόδιση του καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς και η δράση τους έναντι διαφόρων εντερικών παθογόνων.<sup>19</sup> Οι πρωτεΐνες της MFGM είναι κυρίως γλυκοπρωτεΐνες, όπως η βουτυροφίλη, η οποία μπορεί να καταστείλει τη σκλήρυνση κατά πλάκας, καθώς και τα BrCa1, και BrCa2, τα οποία φαίνονται να αναστέλλουν τον καρκίνο του μαστού.<sup>20</sup> Το λίπος του γάλακτος αποτελείται από περίπου 72% κορεσμένα λιπαρά οξέα, 25% μονοακόρεστα και 3% πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ο ρόλος του είναι η μεταφορά ενώσεων που προκαλούν τη γεύση του γάλακτος και η μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών, A, D, E, K.<sup>21</sup> Το γάλα περιέχει ή είναι δυνατό να ενισχυθεί με λιποδιαλυτές βιταμίνες. Επίσης, περιέχει τις χρωστικές ουσίες καροτένιο και ξανθοφύλλη. Το λίπος περιέχει ακόμη τη στερόλη χοληστερόλη, καθώς και φωσφολιπίδια, τα οποία όμως βρίσκονται στο μεγαλύτερο ποσοστό τους (95%) με τη μορφή τριγλυκεριδίων, με

κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτά έχουν ποικίλα σημεία τήξεως και παρουσιάζουν ευαισθησία στην οξειδωση. Τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο γάλα αποτελούνται από πολλές αλυσίδες λιπαρών οξέων μικρού μήκους όπως είναι το κορεσμένο βουτυρικό οξύ, καθώς και τα οξέα καπροϊκό, καπρυλικό και καπρικό<sup>1</sup> (πίνακας 1.2.6.1).

Ομάδα	Ποσοστό (% w/w)
Τριγλυκερίδια	98
Διγλυκερίδια	0.3
Μονογλυκερίδια	0,03
Ελεύθερα λιπαρά οξέα	0.1
Φωσφολιπίδα	0.8
Στερόλες	0.3
Καροτενοειδή	Ίχνη
Λιποδιαλυτές βιταμίνες	Ίχνη
Υδατοδιαλυτές βιταμίνες	Ίχνη

**Πίνακας 1.2.6.1:** Σύσταση (% w/w) του λίπους του γάλακτος.

Το λίπος έχει χαμηλή πυκνότητα και μπορεί εύκολα να υποστεί φυγοκέντριση ή αποκορύφωση από το γάλα, παράγοντας γάλα με χαμηλό ποσοστό λίπους ή άπαχο. Στο πλήρες γάλα το λίπος βρίσκεται σε ποσοστό 3-4%, ενώ σε γάλατα μικρού ποσοστού λίπους βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα. Επίσης, στην κρέμα γάλακτος υπάρχει αρκετά μεγάλο ποσοστό λίπους. Το λίπος αποτελεί το πιο ακριβό συστατικό του γάλακτος και ως εκ τούτου οι παραγωγοί του πληρώνονται με βάση αυτό. Όταν απομακρύνονται το λίπος και τα καροτενοειδή που περιέχονται στο γάλα, αυτό αλλάζει χρώμα και αποκτά ένα μελανό χρώμα.

Τα σφαιρίδια του λίπους είναι λιγότερο πυκνά από ότι το νερό στην υδατική φάση του γάλακτος. Έτσι, κατά την αποβουτύρωση, αυτά ανεβαίνουν στην επιφάνεια. Όταν γαλακτωματοποιείται κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης, παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των λιποκυττάρων καθώς και αύξηση του ιξώδους, επειδή το λίπος κατανέμεται σε όλο το υγρό. Καθώς το γάλα υφίσταται επεξεργασία παραμένουν σε αυτό μεμβράνες λιπιδίων και πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της λεκιθίνης.

Το λιπαρό κλάσμα του γάλακτος ποικίλει αρκετά σε θερμίδες. Η πληρότητα του αρμέγματος καθορίζει τον πλούτο της περιεκτικότητας σε λίπος. Επιπλέον, τα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και άλλα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, περιέχουν μια σειρά από κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, καθένα από τα οποία επηρεάζει το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών με διάφορους τρόπους.<sup>1</sup>

### 1.3 ΩΦΕΛΗ ΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν βασικό συστατικό της διατροφής καθώς προσφέρουν πολλά οφέλη στον άνθρωπο, τα σημαντικότερα των οποίων περιγράφονται παρακάτω:

#### 1.3.1 Δόμηση και Διατήρηση της Μυϊκής Μάζας

Είναι γεγονός ότι η υγεία του σώματος (φυσική κατάσταση), συχνά ενισχύεται με συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος. Έχει βρεθεί πως το 26% των αμινοξέων των πρωτεϊνών του γάλακτος έχουν στη διακλαδισμένη αλυσίδα τους λευκίνη, η οποία συμβάλλει στη δημιουργία των μυών.<sup>22</sup> Η σύσταση των πρωτεϊνών του ορού μοιάζει αρκετά με αυτή των σκελετικών μυών.

Μία μετανάλυση, που προέκυψε από 14 μελέτες και με τη βοήθεια 600 συμμετεχόντων, έδειξε πως οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος έχουν πολύ θετική επίδραση στο σώμα και συμβάλλουν στη μείωση του βάρους και του λίπους, όταν χρησιμοποιούνται ως συμπλήρωμα διατροφής.<sup>23</sup> Οι ηλικιωμένοι συχνά λαμβάνουν το μισό της πρωτεΐνης που καταναλώνεται ημερησίως, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σαρκοπενία, δηλαδή απώλεια της μυϊκής μάζας.<sup>4</sup>

Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε, 15 άτομα ηλικίας 60-85 χρόνων κατανάλωσαν πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος. Το αποτέλεσμα ήταν πως βελτιώθηκε η συσσώρευση των σκελετικών μυών και αυξήθηκε η μυϊκή τους μάζα.<sup>24</sup>

Η καζεΐνη μπορεί να προωθήσει την ανάπτυξη των μυών. Μελέτη που έγινε σε 56 αρχάριους αρσιβαρίστες που ασκούνται 1 ώρα την ημέρα, 5 ημέρες την εβδομάδα για 12 εβδομάδες, έδειξε ότι η κατανάλωση αποβουτυρωμένου γάλακτος μετά τις προπονήσεις τους, οδήγησε σε μεγαλύτερη ανάπτυξη της μυϊκής μάζας από ότι αν καταναλωθούν σόγια ή υδατανθρακούχα αναψυκτικά.<sup>25</sup>

#### 1.3.2 Πίεση του Αίματος

Οι καζεΐνες διευκολύνουν την απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου από το λεπτό έντερο και αποτελούν τα κύρια υποστρώματα για την παραγωγή των βιοδραστικών πεπτιδίων.<sup>26</sup> Αυτά είναι μικρά πεπτίδια τα οποία αποτελούν προϊόντα είτε ζύμωσης του γάλακτος από τα βακτήρια *Lactobacilli*, είτε πέψης της πρωτεΐνης στο έντερο. Τα πεπτίδια αυτά απορροφούνται από το έντερο χωρίς να καταστρέφονται. Μερικά από αυτά τα βιοδραστικά μόρια είναι λακτο-τριπεπτίδια. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα Ile- Pro- Pro και Val- Pro- Pro, τα οποία έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών<sup>26</sup> και υπάρχουν σε τυριά σουηδικής προέλευσης, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 19 και 182 mg/kg.<sup>4</sup> Αυτά τα λακτο-τριπεπτίδια αναστέλλουν το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE) in

vitro. Το ένζυμο αυτό μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I σε αγγειοτενσίνη II, μια ορμόνη, η οποία περιορίζει τη συστολή των αιμοφόρων αγγείων και οδηγεί σε υπέρταση. Το ACE που βρίσκεται στα γαλακτοκομικά προϊόντα έχει δείχθει πως μπορεί να σχετίζεται με τη χαμηλή πίεση του αίματος.<sup>27</sup> Μελέτη που έγινε σε πάνω από 2500 Ουαλούς άνδρες σε χρονικό διάστημα 22,8 χρόνων, έδειξε ότι η υψηλή πρόσληψη γάλακτος (5586 ml/ ημέρα) συσχετίστηκε με χαμηλή συστολική αρτηριακή πίεση (κατά 10,4 mmHg) και λιγότερη αρτηριακή δυσκαμψία. Εκτός από το βούτυρο, το οποίο παρουσίασε αρνητικές δράσεις, τα γαλακτοκομικά προϊόντα βρέθηκε πως είναι ωφέλιμα για την καρδιά.<sup>28</sup> Μια μελέτη που έγινε σε πάνω από 2200 κατοίκους ενός προαστίου του Ρότερνταμ, ηλικίας 55 χρόνων, έδειξε ότι η κατανάλωση προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά συσχετίστηκε με τη μείωση της υπέρτασης κατά 20%.<sup>29</sup> Μια ανασκόπηση των ερευνών που έχουν γίνει πρόσφατα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων βοηθάει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης.<sup>6</sup>

### 1.3.3 Τερηδόνα

Το τυρί έχει συνδεθεί με την προστασία από την τερηδόνα, μέσω μιας σειράς μηχανισμών που είναι μερικώς μόνον κατανοητοί και δεν περιορίζονται αποκλειστικά στην παρουσία Ca. Πιθανόν τα βιοενεργά πεπτίδια που προέρχονται από την καζεΐνη, έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δράση βακτηρίων και τη ρυθμιστική ικανότητα της μεμβράνης που περιβάλλει τα δόντια και να βελτιώνουν το σμάλτο των δοντιών.<sup>30</sup> Από σχετική μελέτη όμως κατά την οποία από το γάλα απομακρύνθηκε η καζεΐνη, η λακτόζη και το λίπος, προέκυψε προστασία του σμάλτου των δοντιών, προφανώς λόγω της πρωτεΐνης πεπτόνη η οποία προέρχεται από την καζεΐνη-β και αποτελεί δευτερεύον συστατικό της πρωτεΐνης του ορού του γάλακτος.<sup>31</sup>

### 1.3.4 Μάθηση και Μνήμη

Ένα πεπτίδιο που παράγεται από τη β-καζεΐνη, η β-καζομορφίνη-5 (Tyr- Pro- Phe- Pro- Gly), είναι ένας μ-οπιουειδής αγωνιστής υποδοχέας (τέτοιοι αγωνιστές, όπως η μορφίνη, δρουν ως αναλγητικά) και μπορεί να βοηθήσει στη μάθηση και στη μνήμη. Κλινικές δοκιμές που έγιναν πάνω σε ποντίκια, έδειξαν ότι η χορήγηση χαμηλής δόσης β-καζομορφίνης-5 μπορεί να βελτιώσει τη μνήμη και τη μάθηση.<sup>32</sup> Οι β-καζομορφίνες είναι σημαντικές για τη ψυχοκινητική ανάπτυξη των βρεφών καθώς το μητρικό γάλα είναι πολύ πιο ωφέλιμο από αυτό των βοοειδών.<sup>33</sup>



### 1.3.5 Καρκίνος

Μελέτες έχουν δείξει ότι η λακτοφερίνη, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μικρό ποσοστό στο γάλα, έχει αντικαρκινικές ιδιότητες. Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια, τα οποία είχαν ένα ανθρωπινό γονίδιο που προκαλεί όγκο στον πνεύμονα, η λακτοφερίνη μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς και την πρόκληση φλεγμονής στον πνεύμονα.<sup>34</sup> Επίσης, η λακτοφερίνη μείωσε την βιωσιμότητα των κυττάρων καρκίνου του μαστού.<sup>35</sup> Ένα πεπτίδιο της λακτοφερίνης αποδείχθηκε πως συμβάλλει στη μείωση των βλαβών στο DNA που προκαλούνται από καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.<sup>36</sup> Έχουν γίνει επιτυχείς προσπάθειες κλωνοποίησης πεπτιδίων από τη λακτοφερίνη και την  $\alpha_5$ -καζεΐνη στο βακτήριο *Streptococcus thermophiles*, το οποίο αποτελεί μια κοινή καλλιέργεια εκκίνησης για το τυρί και το γιαούρτι, το οποίο πιθανό να βελτιστοποιήσει την δραστηριότητα αυτών των πεπτιδίων.<sup>37</sup>

Ακόμη, σε έρευνα που έχει διεξαχθεί για τη μελέτη της βιταμίνης D και του ασβεστίου έχει βρεθεί ότι και αυτά τα δύο συστατικά συμβάλλουν σημαντικά στη μείωση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Άλλες παθήσεις όπως είναι η πάχυνση, η δυσανεξία στη γλυκόζη, η υπέρταση και η δυσλιπιδαιμία (δηλαδή η αύξηση των λιπιδίων στο αίμα), είναι παράγοντες του μεταβολικού συνδρόμου το οποίο αυξάνει τον κίνδυνο για διαβήτη τύπου II, καθώς και τον κίνδυνο καρδιοπαθειών. Η πρόσληψη της βιταμίνης D και του ασβεστίου από τα γαλακτοκομικά προϊόντα προκαλεί μείωση του διαβήτη τύπου II.

### 1.4 ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα και η κατανάλωση τους συχνά προκαλεί αύξηση στα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα. Αυτό μαζί με την πεποίθηση ότι το γάλα είναι παχυντικό ως τρόφιμο, φαίνεται πως οδήγησαν ευρέως στην άποψη ότι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν παράγοντες παχυσαρκίας και καρδιαγγειακών παθήσεων και ότι πρέπει να περιοριστεί η κατανάλωσή τους. Έχουν προταθεί αρκετές υποθέσεις και έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες ώστε να εξηγήσουν τον κίνδυνο που κρύβει για την υγεία το γάλα και τα προϊόντα του.<sup>4</sup> Η απάντηση που δίνουν όλες αυτές οι μελέτες είναι ότι η κατανάλωση του γάλακτος προκαλεί αύξηση της χοληστερόλης στο αίμα.

Παρόλα αυτά, το συμπέρασμα που έχει προκύψει από 76 μελέτες, δεν ήταν ξεκάθαρο για το αν η κατανάλωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι ωφέλιμη ή όχι.<sup>38</sup> Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ποιότητα και τον ρόλο αυτών των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο γάλα, καθώς αυτά χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα σημαντικά για τη διατροφή και κατ'επέκταση, την υγεία του ανθρώπου. Αν και βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στο γάλα, χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα λιπαρά οξέα καθώς ο οργανισμός δεν μπορεί να τα

συνθέσει μόνος του και πρέπει να τα λαμβάνει με τη διατροφή. Τέτοια λιπαρά οξέα είναι τα γνωστά ωμέγα λιπαρά οξέα, που προέρχονται από το λινελαϊκό οξύ (C18:2). Το μόριο αυτό έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές για την δράση και την χρησιμότητά του στη διατροφή και, επομένως, στην υγεία του ανθρώπου.

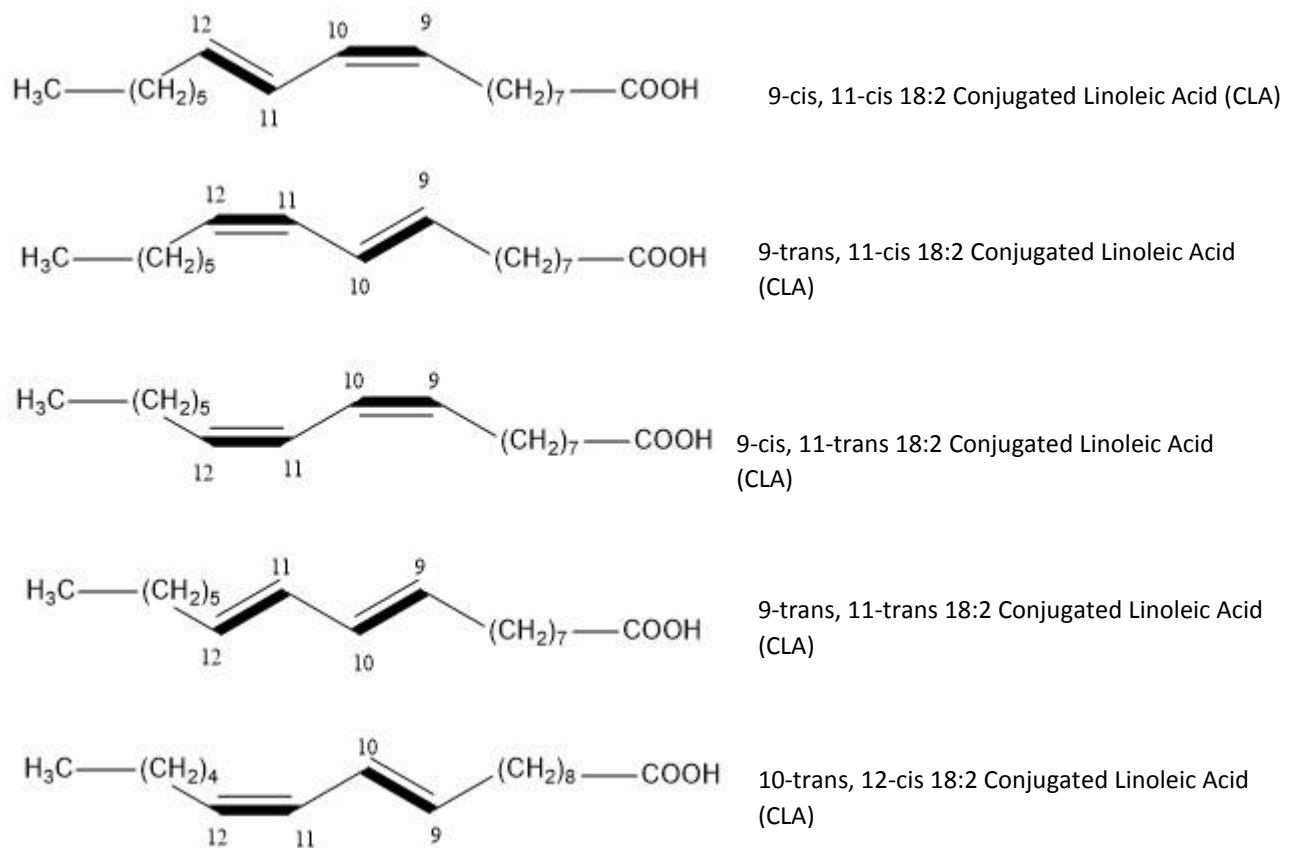
Τα πιο σημαντικά από αυτά τα λιπαρά οξέα, και τα οφέλη που έχουν για την υγεία, περιγράφονται παρακάτω:

#### **1.4.1.1 Συζυγές Λινελαϊκό Οξύ (Conjugated Linoleic Acid, CLA)**

Ο όρος συζυγές λινελαϊκό οξύ, (Conjugated Linoleic Acid, CLA), είναι ένας συλλογικός όρος, ο οποίος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τα διαφορετικά ισομερή (ισομερή θέσης και γεωμετρικά ισομερή), του δεκαοκταδιενικού (λινελαϊκού) οξέος. Από τα ισομερή των CLA, τα δύο κύρια είναι τα 9-cis, 11-trans CLA (c9, t11- octadecadienoic acid) και 10-trans, 12-cis CLA (t10, c12- octadecadienoic acid). Φυσιολογικά, τα CLA απαντώνται στα φωσφολιπίδια του ανθρώπινου πλάσματος, στο μεγαλύτερο ποσοστό των γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και στο κρέας διαφορετικής προέλευσης (Πίνακας 1.4.1.1). Η σύνθεση των CLA προέρχεται κυρίως από τη διαδικασία μικροβιακής βιοϋδρογόνωσης στο στομάχι των ζώων από βακτήρια. Το υπεύθυνο βακτήριο για τη σύνθεση των CLA είναι το *Butyrivibrio fibrisolvens*, το οποίο παράγει την ισομεράση του λινελαϊκού οξέος, ένα ένζυμο το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των CLA. Ως εκ τούτου, κατά κύριο λόγο, βρίσκεται στα μηρυκαστικά και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στο γάλα, εκτός από τα κύρια ισομερή, (9-cis, 11-trans CLA και το 10-trans, 12-cis CLA), υπάρχουν και άλλα ισομερή, σε υπολογίσιμο ποσοστό. Αυτά τα ισομερή είναι τα 9-trans, 11-trans CLA, 9-trans, 11-cis, CLA και το 9-cis, 11-cis CLA (Σχήμα 1.4.1.1, Πίνακας 1.4.1.2).

Είδος Τροφίμου	Ποσοστό CLA	Ποσοστό ισομερούς 9-cis, 11-trans CLA	Είδος Τροφίμου	Ποσοστό CLA	Ποσοστό ισομερούς 9-cis, 11-trans CLA
<b>Γαλακτοκομικά Προϊόντα</b>			<b>Φρέσκο Κρέας</b>		
Γάλα	5.5	92	Φρέσκος Μοσχαρίσιος Κιμάς	4.3	85
Βούτυρο	4.7	88	Βόειο Κρέας	2.7	79
Κρέμα Γάλακτος	4.6	90	Μοσχαρίσιο Κρέας	2.9	84
Πλήρες Γιαούρτι	4.8	84	Αρνί	5.6	92
Γιαούρτι χωρίς Λιπαρά	1.7	83	Χοιρινό Κρέας	0.6	82
Παγωτό	3.6	86	<b>Πουλερικά</b>		
Τυρί Cheddar	3.6	93	Κοτόπουλο	0.9	84
Τυρί Cottage	4.5	83	<b>Έλαια Φυτικής Προέλευσης</b>		
Μοσαρέλα	4.9	85	Κνήκος	0.7	44
<b>Θαλασσινά</b>			Ηλιοτρόπιο	0.4	38
Σολωμός	0.3	-	Canola	0.5	44
Γαρίδες	0.6	-	Καλαμπόκι	0.2	39

**Πίνακας 1.4.1.1:** Σύσταση των CLA (mg/g fat) σε επιλεγμένα τρόφιμα.<sup>39</sup>



**Σχήμα 1.4.1.1:** Γεωμετρικά Ισομερή του (9, 11) 18:2 Συζυγούς Λινελαϊκού Οξέος και το 10-trans, 12-cis 18:2 συζυγές λινελαϊκό οξύ (Conjugated Linoleic Acid, CLA).

ΙσομερήCLA	% Ποσοστό
9-cis, 11-trans CLA	76.5
9-cis, 11-cis CLA	4.8
9-trans, 11-trans CLA	9.4
10-trans, 12-cis CLA	1.1

**Πίνακας 1.4.1.2:** Γεωμετρικά ισομερή και ισομερή θέσης των CLA που βρίσκονται στο γάλα και τα ποσοστά τους.<sup>40</sup>

Το λίπος του γάλακτος είναι η πλουσιότερη διατροφικά πηγή των CLA. Έχει βρεθεί ότι περιέχει περίπου 30mg/g CLA και κυρίως με τη μορφή του ισομερούς 9-cis, 11-trans.<sup>41</sup> Τα CLA θεωρούνται παγκοσμίως ως ένα από τα πιο σημαντικά συμπληρώματα διατροφής του ανθρώπου καθώς έχει βρεθεί πως έχουν αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές δράσεις.<sup>42-44</sup> Τα CLA είναι δυνατό να δρουν κατά του καρκίνου στα διάφορα στάδια ανάπτυξής του, αύξησης και μετάστασής του, μέσω της αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, του

μεταβολισμού της βιταμίνης A και του μεταβολισμού των προσταγλανδινών. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα CLA μειώνουν σημαντικά τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E στην επιδερμίδα του ποντικού, αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη όγκου. Τα CLA αποτελούν επίσης προστατευτική μορφή έναντι των διαφόρων καταβολικών πορειών και η χρήση των, ως συμπληρωμάτων διατροφής, δίνει διαφορετικές απαντήσεις στο προφίλ των λιπιδίων.

#### **1.4.1.2 Σύντομη Περιγραφή**

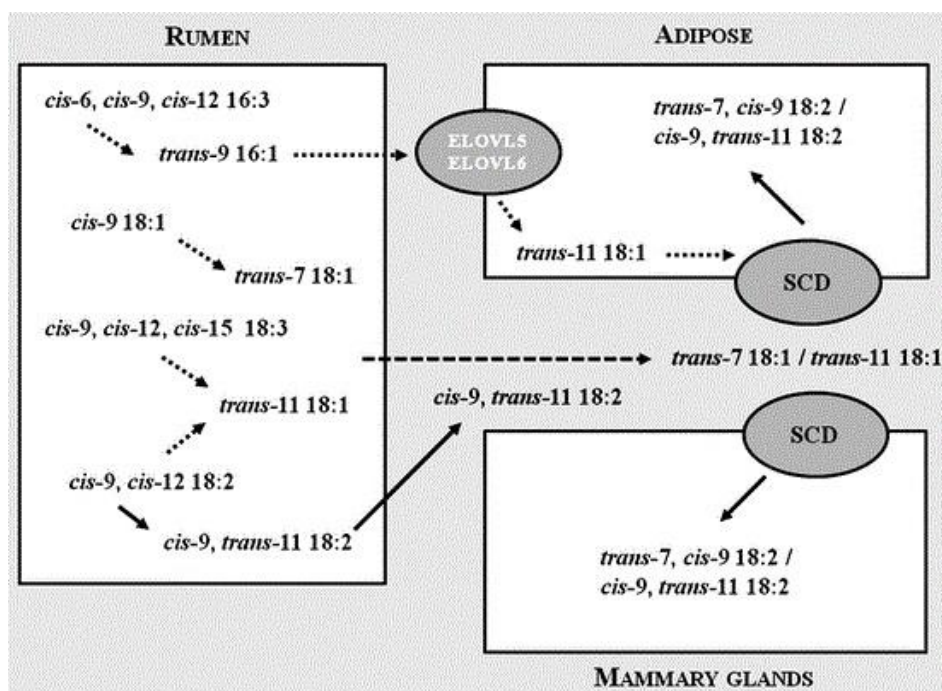
Τα CLA, εκτός από το γάλα, βρίσκονται στους ιστούς των ζώων και σε άλλες πηγές τροφίμων όπως π.χ. το κρέας, τα πουλερικά, τα αυγά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυριά και γιαούρτι), ακόμη και αν έχουν υποστεί διαδικασίες θερμότητας. Παρόλο που τα έλαια φυτικής προέλευσης αποτελούν φτωχή πηγή σε CLA, αυτά παράγονται από το λινελαϊκό οξύ που βρίσκεται στο έλαιο του ηλιοτρόπιου, μετά από ειδική επεξεργασία αυτού του ελαίου.

Το ισομερές 9-cis, 11-trans CLA, το οποίο είναι γνωστό και ως rumenic acid (RA), παράγεται στο στομάχι των μηρυκαστικών, μέσω μικροβιακού μεταβολισμού του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος. Το άλλο ισομερές που βρίσκεται στους ιστούς είναι το 10-trans, 12-cis CLA. Εκτός από αυτά τα ισομερή στο εμπόριο βρίσκονται και άλλα ισομερή CLA, σε μικρότερο όμως ποσοστό. Αυτά είναι τα 9-trans, 11-cis, 10-cis, 12-cis, 9-trans, 11-trans και 10-trans, 12-trans. Επίσης υπάρχουν ισομερή με συζυγείς διπλούς δεσμούς στις θέσεις 8, 10 και 11,13. Τα διαφορετικά ισομερή είναι υπεύθυνα για διαφορετικές βιολογικές δράσεις.

#### **1.4.1.3 Μικροβιακή Σύνθεση των CLA στους Μαστούς των Μηρυκαστικών**

Τα CLA συντίθενται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο της διαδικασίας βιοϋδρογόνωσης του λινελαϊκού οξέος (Linoleic Acid, LA) προς στεατικό οξύ από το βακτήριο *Butyribrio fibrisolvens*, αλλά και από άλλα βακτήρια.<sup>45,46</sup> Τα CLA μπορούν επίσης να συντεθούν στον μαστικό αδένα από ενδογενή μετατροπή του 11-t, C18:1 (trans vaccenic acid, TVA), η οποία αποτελεί ενδιάμεσο της βιοϋδρογόνωσης του λινελαϊκού ή του λινολενικού οξέος, με τη δράση του ενζύμου αφυδρογονάσης.<sup>47</sup> Η βιοϋδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος αρχίζει με ισομερείωση, όπου ο διπλός δεσμός στον άνθρακα της θέσης 12 υφίσταται μετάθεση στον άνθρακα της θέσης 11, σχηματίζοντας το ισομερές 9-c, 11-t CLA, με ακόλουθη υδρογόνωση του δεσμού 9-cis. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη σύζευξη των διπλών δεσμών 9-cis, 12-cis είναι η ισομεράση του λινελαϊκού οξέος, η οποία βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων και απαιτεί ως υποκατάστατο ένα διενικό σύστημα 9-cis, 12-cis και μια ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα. Το λινολενικό οξύ (Linolenic Acid, LNA), αρχικά υφίσταται ισομερείωση στη θέση 12 προς σχηματισμό του 9-c, 11-t, 15-c C18:3, το οποίο υφίσταται αναγωγή στους διπλούς δεσμούς προς σχηματισμό trans βαξενικού οξέος.

Το ένζυμο 12-cis, 11-trans ισομεράση, που παράγεται από το *B. Fibrisolvans*, υδρογονώνει το 10-trans, 12-cis δεκαοκταδιενικό οξύ<sup>48</sup>, παράγοντας έτσι το 10-trans δεκαοκτενικό οξύ. Περισσότερο από το 50% του λινελαϊκού οξέος μετατρέπεται στο ισομερές 10-trans, 12-cis CLA και μόνο το 10% μετατρέπεται στο 10-trans δεκαοκτενικό οξύ από το βακτήριο *Propionibacterium*.<sup>49</sup> Έχει επίσης βρεθεί ότι και το βακτήριο *Megasphaera elsdenii* YJ-4 παράγει το ισομερές 10-trans, 12-cis στο στομάχι των μυρηκαστικών.<sup>50</sup> Το ισομερές αυτό μπορεί να σχηματιστεί από το λινελαϊκό οξύ, αλλά όχι από το λινολενικό οξύ (Σχήμα 1.4.1.2).



**Σχήμα 1.4.1.2:** Σύνθεση του συζυγούς λινελαϊκού οξέος (18:2 CLA) στους μαστούς νεαρών μηρυκαστικών.

Στον άνθρωπο έχει βρεθεί πως το CLA μπορεί να συντεθεί από το trans βαξενικό οξύ. Επίσης, υπάρχουν αρκετά είδη βακτηρίων στο έντερο του ανθρώπου που επάγουν τη σύνθεση των CLA.<sup>51</sup> Παρόλα αυτά, το ποσοστό των CLA που συντίθενται ενδογενώς ή από τα εντερικά βακτήρια δεν μπορεί να υπολογιστεί. Δεδομένου του γεγονότος ότι ο άνθρωπος δεν έχει μεγάλο ποσοστό βακτηρίων στο πεπτικό του σύστημα, η μοναδική πηγή των CLA είναι η λήψη τους από άλλες πηγές.

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις των CLA στο ανθρώπινο αίμα είναι δυνατό να προέρχονται από δύο δυνατές πορείες<sup>52,53</sup> οι οποίες είναι οι εξής: (i) in vino, μέσω οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος, με σχηματισμό ελεύθερων ριζών και (ii) να προέλθουν από διατροφικές πηγές. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα των CLA στο αίμα μπορούν να αυξηθούν μέσω διατροφής πλούσιας στα CLA.

#### 1.4.1.4. Βιολογικές Ιδιότητες των CLA

Σημαντικό χαρακτηριστικό των CLA είναι το ότι έχουν αρκετές βιολογικές δράσεις, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω:

##### 1. Αντικαρκινικές Δράσεις:

Η αντικαρκινική δράση των CLA έχει αποδειχτεί από μελέτες και πειράματα που έχουν εφαρμοστεί σε ζωικά μοντέλα, για τη νεοπλασία στομάχου, τον όγκο του μαστού<sup>54</sup> και για το θήλωμα του δέρματος.<sup>55</sup> Έχει επίσης βρεθεί ότι τα CLA μειώνουν αποτελεσματικά το μέγεθος και τη μετάσταση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού και καρκινικών κυττάρων του προστάτη, τα οποία έχουν μεταμοσχευθεί σε ποντίκια.<sup>56</sup> Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι τα CLA αναστέλλουν τον in-vitro πολλαπλασιασμό των κυττάρων του κακοήθους μελανώματος, του καρκίνου του παχέος εντέρου καθώς και του καρκίνου του μαστού.<sup>57</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι η δράση των CLA οφείλεται σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, ενώ άλλες μελέτες έδειξαν ότι δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων<sup>57</sup> ή αναστέλλοντας το σχηματισμό του DNA.<sup>58</sup> Παρόλα αυτά, υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους τα CLA επηρεάζουν την καρκινογένεση.<sup>59</sup>

##### 2. Μείωση του Ποσοστού του Λίπους

Γενικά, τα λιπαρά οξέα με trans διπλούς δεσμούς έχουν αρνητική επίδραση στον μεταβολισμό των λιπιδίων και μειώνουν το ποσοστό του λίπους του γάλακτος.<sup>60</sup> Έχει αποδειχθεί πως τα CLA της διατροφής αυξάνουν το επίπεδο των συνολικών κορεσμένων λιπαρών οξέων και, κυρίως, των C14:0, C16:0 και C18:0. Αντίθετα, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και, κυρίως, τα C18:1, n-9, μειώνονται, εξαιτίας της δράσης της στεαρουλ-CoA αφυδρογονάσης, από το ισομερές 10-trans, 12-cis CLA.

Μελέτες έχουν δείξει ότι η έγχυση των CLA στα ήνυστρα των αγελάδων συμβάλλει στην μείωση των λιπαρών ουσιών του γάλακτος, ενώ διατηρείται σταθερό το ποσοστό των πρωτεϊνών του γάλακτος.<sup>61</sup>

##### 3. Αντιαρτηριοσκληρωτική Δράση των CLA

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα CLA συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων.<sup>62,63</sup> Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και του λόγου LDL προς HDL στο πλάσμα του αίματος από τη δράση των CLA.<sup>62</sup>

##### 4. Ρόλος των CLA στη Λειτουργία του Ανοσοποιητικού

Μετά από σοβαρό τραυματισμό, το σώμα ενεργοποιεί τα απαραίτητα συστήματα, όπως είναι το ανοσοποιητικό, ώστε να θεραπευτούν οι ιστοί. Αυτό,

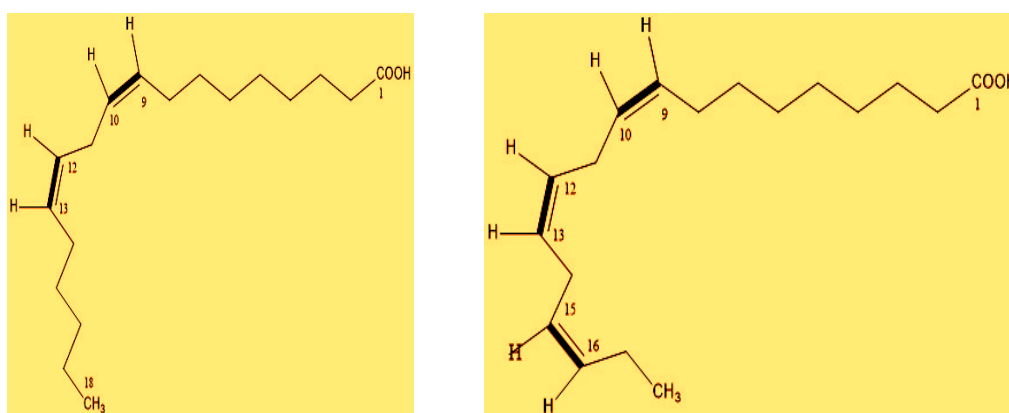
με τη σειρά του, καθιστά το σώμα επιρρεπές σε μολύνσεις. Έχει αποδειχτεί ότι διατροφή εμπλουτισμένη σε CLA, είναι δυνατό να ενισχύσει το ανοσοποιητικό σύστημα κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων τραυματισμού.<sup>43</sup>

## 5. CLA και Διαβήτης

Χαρακτηριστικό των CLA, επίσης, είναι το ότι έχουν αντιδιαβητικές δράσεις, καθώς έχουν τη δυνατότητα να βελτιώνουν την ευαισθησία της ινσουλίνης.<sup>64</sup>

### 1.4.2 Ω-3 και Ω-6 Λιπαρά Οξέα

Το λινελαϊκό οξύ και το λινολενικό οξύ είναι δύο πολύ γνωστά οξέα που ανήκουν στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι γνωστά ως ωμέγα-6 (ω-6) και ωμέγα-3 (ω-3) αντίστοιχα (Σχήμα 1.4.2.1).



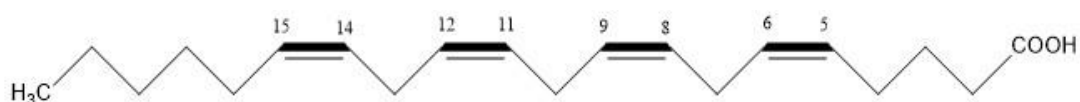
**Σχήμα 1.4.2.1:** Λινελαϊκό οξύ (ω6) και Λινολενικό οξύ (ω3).

Από βιοχημικής πλευράς και τα δύο οξέα έχουν 18 άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα, με το λινελαϊκό οξύ να έχει δύο διπλούς δεσμούς, ενώ το λινολενικό οξύ να έχει τρεις διπλούς δεσμούς. Ο χαρακτηρισμός τους ως ωμέγα (ω) λιπαρών οξέων προέρχεται από το γεγονός ότι η αρίθμηση της ανθρακικής αλυσίδας του μορίου ξεκινάει από τη μεθυλομάδα. Ως εκ τούτου, τα ω-3 ονομάζονται έτσι επειδή ο πρώτος διπλός δεσμός C=C βρίσκεται σε απόσταση τριών δεσμών από τη μεθυλομάδα, (-CH<sub>3</sub>), ενώ τα ω-6 επειδή ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται σε απόσταση έξι διπλών δεσμών από τη μεθυλομάδα (-CH<sub>3</sub>) (Σχήμα 1.4.2.1).

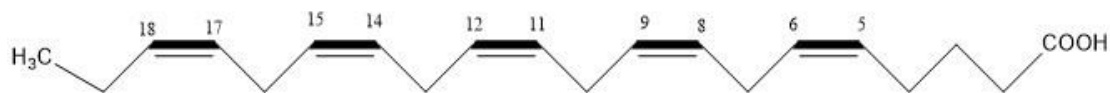


Από άποψη διατροφής τόσο το λινελαϊκό όσο και το λινολενικό οξύ χαρακτηρίζονται ως "απαραίτητα" λιπαρά οξέα, καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει από μόνος του και τα λαμβάνει μέσω της διατροφής. Η διατροφική πηγή των ω-6 λιπαρών οξέων είναι κυρίως τα έλαια φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων της σόγιας, του καλαμποκιού, του ηλιόσπορου, των σπόρων βαμβακιού. Πηγές πλούσιες σε ω-3 λιπαρά οξέα είναι κυρίως ο λιναρόσπορος και το λάδι canola.

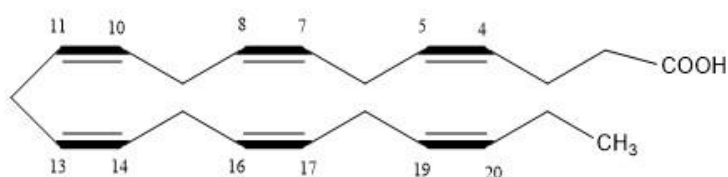
Μια πολύπλοκη σειρά από αντιδράσεις αφυδρογόνωσης και ανοικοδόμησης της ανθρακικής αλυσίδας που πραγματοποιούνται στο μόριο του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος, έχουν ως αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό τους σε παράγωγα τα οποία έχουν υψηλότερο βαθμό ακορεστότητας. Αυτά είναι το αραχιδονικό οξύ (20:4 n-6) το οποίο προκύπτει από το λινελαϊκό οξύ, και τα οξέα εικοσιπεντανοϊκό (Eicosapentanoic Acid, EPA, 20:5 n-3) και εικοσαδυοεξαενοϊκό οξύ (Docosahexaenoic Acid, DHA, 22:6 n-3), τα οποία προκύπτουν από το α-λινολενικό οξύ (Σχήμα 3.4.2.2).



**Arachidonic Acid 20:4 (w-6)**



**Eicosapentanoic Acid 20:5 (EPA, w-3)**



**Docosahexanoic Acid 22:6 (DHA, w-3)**

**Σχήμα 1.4.2.2:** Παράγωγα ωμέγα λιπαρών οξέων που προκύπτουν από το λινελαϊκό οξύ (αραχιδονικό οξύ), και από το λινολενικό οξύ (EPA και DHA).

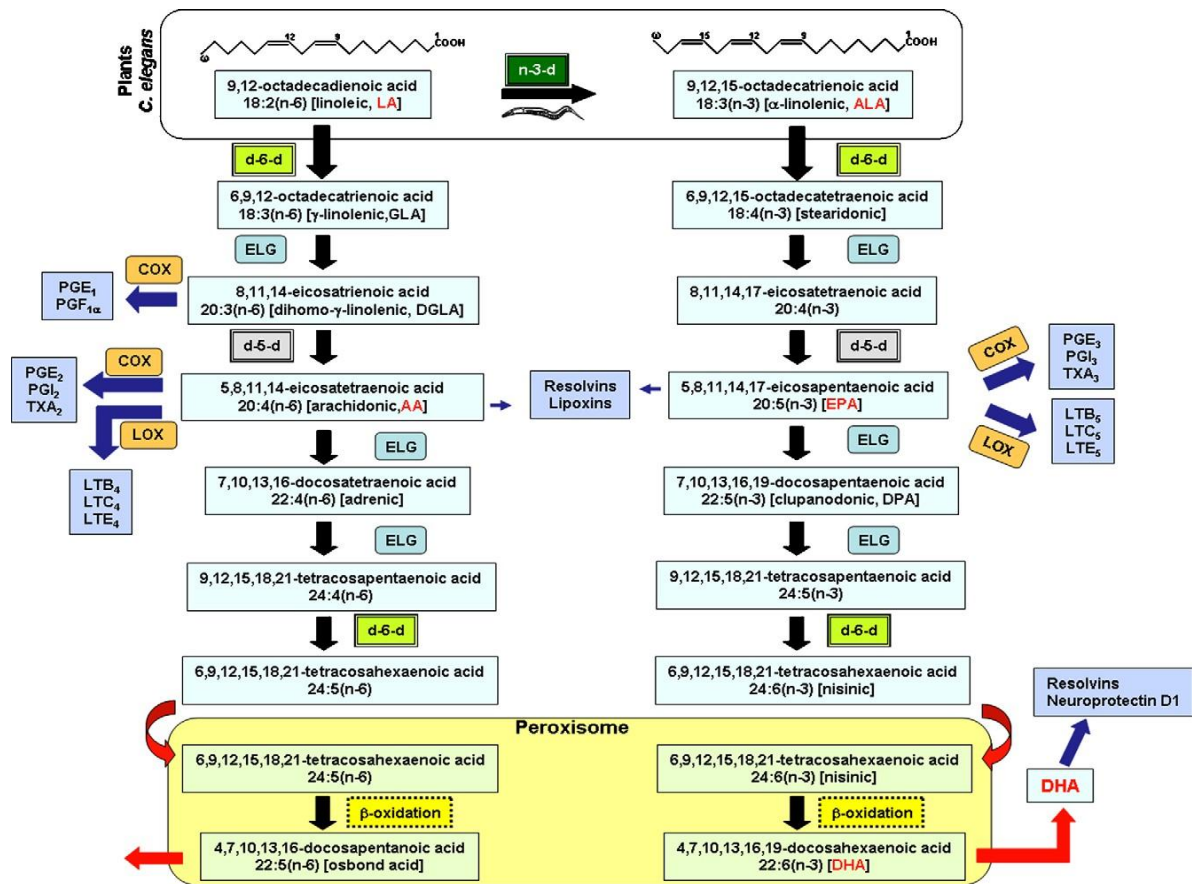
Τα οξέα αυτά, βρίσκονται κυρίως στα ψάρια και στα οστρακοειδή, ιδιαίτερα όμως στο σολομό, την πέστροφα και την ρέγκα. Είναι γεγονός ότι τα συμπληρώματα διατροφής που παρασκευάζονται από έλαια των θαλασσινών αυτών, περιέχουν περίπου 30-50% ω-3 λιπαρά οξέα. Το αραχιδονικό οξύ και το EPA αποτελούν

πρόδρομα μόρια διαφόρων ομάδων προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών εικοσανοειδών, των οποίων η βιολογική δράση έχει χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει τα οφέλη και μη της κατανάλωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

#### **1.4.2.1 Βιοχημεία των Ωμέγα Λιπαρών Οξέων**

Η σύνθεση του αραχιδονικού οξέος γίνεται από το λινελαϊκό οξύ, με διαδοχικές αφυδρογονώσεις με τη δράση των ενζύμων Δ-6 αφυδρογονάσης και Δ-5 αφυδρογονάσης. Ακολουθούν αντιδράσεις ανοικοδόμησης της ανθρακικής αλυσίδας, προς σχηματισμό του τελικού μορίου. Με τον ίδιο τρόπο συντίθεται το EPA από το α-λινολενικό οξύ.

Στα θηλαστικά, πραγματοποιούνται δύο κύκλοι αντιδράσεων ανοικοδόμησης της ανθρακικής αλυσίδας και μια αντίδραση αφυδρογόνωσης, από το ένζυμο Δ-6 αφυδρογονάση, προς σχηματισμό του εικοσιτετραεξανοϊκού οξέος (24:6, n-3) και του εικοσιτετραπεντανοϊκού οξέος (24:5, n-6). Αυτά τα δύο πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεταφέρονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στα υπεροξεισώματα, όπου υφίστανται β-οξειδωση, προς σχηματισμό DHA και εικοσιδυοπεντανοϊκού οξέος (22:5, n-6), τα οποία επιστρέφουν στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα θηλαστικά μπορούν επίσης να μετατρέπουν το DHA σε EPA, αλλά το ανθρώπινο σώμα δεν διαθέτει όλους τους απαραίτητους μηχανισμούς, γεγονός που κάνει τη διαδικασία αυτή δύσκολη (Σχήμα 1.4.2.3).



Σχήμα 1.4.2.3: Βιοχημικές Πορείες Βιοσύνθεσης των Πολυακόρεστων Λιπαρών Οξέων.<sup>65</sup>

### 1.4.3 Δράση των Ωμέγα Λιπαρών Οξέων στην Υγεία

Σε πολλές περιπτώσεις, τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα έχουν αντισταθμιστική λειτουργία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συμβολή τους στη βελτίωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως η καθυστέρηση στην ανάπτυξη. Σε άλλες περιπτώσεις, η βιολογική δράση των ω-3 είναι πιο συγκεκριμένη. Για παράδειγμα, το DHA είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του νευρικού συστήματος και, κυρίως, για την βέλτιστη λειτουργία των νευρώνων και του αμφιβληστροειδούς. Επίσης, συμμετέχει σε διάφορες πορείες σηματοδότησης οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος.<sup>45</sup>

Γενικά, οι ωφέλιμες δράσεις των ω-3 στην υγεία και συγκεκριμένα στο καρδιαγγειακό σύστημα, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Η πρώτη υπόθεση ότι τα ω-3 είναι ωφέλιμα για την υγεία, έγινε πριν από 50 χρόνια όταν ερευνητές παρατήρησαν πως η διατροφή των Εσκιμών, η οποία είναι πλούσια σε ω-3 λιπαρά οξέα, οδήγησε στη μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες, οι οποίες βασίστηκαν κυρίως στη σύγκριση της διατροφής των Εσκιμών με αυτή άλλων λαών. Το συμπέρασμα στο οποίο

κατέληξαν ήταν ακριβώς το ίδιο.<sup>38,66</sup> Παρόμοιες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση ψαριών οδήγησε στη μείωση της απόφραξης του μυοκαρδίου, της αρτηριοσκλήρυνσης και των ισχαιμικών επεισοδίων.<sup>67</sup>

Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν τα ω-3 βασίζονται κυρίως στην ικανότητα που έχουν να μειώνουν το ποσοστό των τριγλυκεριδίων και της VLDL (Very Low Density Lipoprotein), ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν την HDL. Απεναντίας, τα ω-6 λιπαρά οξέα δεν έχουν αυτή την ικανότητα<sup>38,68,69</sup>. Τα ω-3 μπορούν επίσης να αποτρέπουν αρρυθμίες που μπορούν να γίνουν αρκετά επικίνδυνες.<sup>70,71</sup>

Έχει βρεθεί ότι το λινελαϊκό οξύ βελτιώνει το λιπιδικό προφίλ με τη μείωση της συνολικής χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης, ενώ αυξάνει την HDL χοληστερόλη.<sup>72</sup> Η ικανότητα των ω-6 λιπαρών οξέων στην αύξηση της ευαισθησίας ως προς την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών LDL και VLDL, έχει αναφερθεί ως πιθανός μηχανισμός των θετικών επιδράσεων που μπορεί να έχει μια δίαιτα πλούσια σε ω-6 λιπαρά οξέα. Η σημασία των ω-6 στη διατροφή του ανθρώπου είναι πολύ μεγάλη, καθώς αποτελούν πρόδρομα μόρια των εικοσανοειδών, γνωστών ως προσταγλανδίνες. Οι προσταγλανδίνες είναι μια ομάδα βιολογικά δραστικών ακόρεστων λιπαρών οξέων. Είναι τοπικές ορμόνες που αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές της φλεγμονής. Οι προσταγλανδίνες επηρεάζουν ένα ευρύ αριθμό βιολογικών διαδικασιών. Τέτοιες είναι η αγγειοδιαστολή και η συγκόλληση των αιμοπεταλίων.

#### 1.4.4 Ο Λόγος ω6 /ω3

Η σημασία του λόγου ω-6/ω-3 έχει προκαλέσει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, όχι μόνο επειδή σχετίζεται με την πρόκληση καρδιαγγειακών παθήσεων, αλλά διότι σχετίζεται με τον καρκίνο, αλλά και με διάφορες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες. Γενικά, αν ο λόγος ω-6/ω-3 είναι πολύ μεγάλος, θεωρείται αρκετά επιβλαβής για την υγεία. Από την άλλη πλευρά, όσο πιο κοντά είναι στην τιμή 2, τόσο πιο προστατευτικός θεωρείται έναντι διαφόρων παθήσεων.

Διαχρονικά, η τιμή του λόγου ω-6/ω-3 έχει μεταβληθεί σημαντικά, καθώς έχουν υπάρξει αλλαγές στη διατροφή του ανθρώπου.<sup>73</sup> Τα τελευταία 150 χρόνια, με την βιομηχανική και γεωργική επανάσταση, έχουν συμβεί δραματικές αλλαγές στη διατροφή. Για παράδειγμα, έχουν προστεθεί πολλά δημητριακά τα οποία είναι πλούσια πηγή ω-6 λιπαρών οξέων. Επίσης, ο γήινος πληθυσμός γνώρισε μεγάλη αύξηση στην κατανάλωση ελαίων από λαχανικά, τα οποία επίσης είναι πλούσια σε ω-6 λιπαρά οξέα ενώ, παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση στην πρόσληψη των ω-3 λιπαρών οξέων. Ως αποτέλεσμα, ο λόγος ω-6 /ω-3 στις Δυτικές Χώρες, κυμαίνεται πλέον μεταξύ 15:1 και 2:1.<sup>74,75</sup>

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είναι πολύ σημαντικός ο υπολογισμός της τιμής του λόγου ω-6 /ω-3. Αυτό πρέπει να γίνεται γιατί, για παράδειγμα, αν ο λόγος είναι αρκετά μεγάλος, το αραχιδονικό οξύ που επάγει τη σύνθεση των εικοσανοειδών

υπάρχει σε μεγάλη συγκέντρωση. Τα εικοσανοειδή, όταν σχηματίζονται σε μεγάλες ποσότητες ευθύνονται για τον σχηματισμό θρόμβων, διαφόρων αλλεργικών και φλεγμονικών δυσλειτουργιών καθώς και για τον ανεξέλεγκτο σχηματισμό κυττάρων.<sup>74</sup> Από την άλλη πλευρά, όσο πιο μικρός είναι ο λόγος, τόσο πιο ωφέλιμος είναι για την υγεία.<sup>74,75</sup> Για το λόγο αυτό έγιναν προσπάθειες μείωσης του λόγου  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, με αντικατάσταση κάποιων τροφίμων από άλλα τρόφιμα. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη, αντικαταστάθηκε στη διατροφή το έλαιο καλαμποκιού, το οποίο είναι πλούσιο σε λινελαϊκό οξύ ( $\omega$ -6), με λάδι canola, το οποίο είναι πλούσιο σε λινολενικό οξύ ( $\omega$ -3), σε αναλογία 4:1. Όταν η διατροφή αυτή δοκιμάστηκε σε ποντίκια, παρατηρήθηκε μείωση της θνησιμότητας τους κατά 70%. Τα πειράματα και οι μελέτες που γίνονται πάνω σε αυτό το θέμα τα τελευταία χρόνια, αποδεικνύουν την βελτίωση που προκαλεί στην υγεία η μείωση του λόγου  $\omega$ -6 / $\omega$ -3, σε τιμές πιο κοντά στο 2.<sup>76</sup>

Παρόλα αυτά είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μεγάλης κλίμακας έρευνες, προκειμένου να πιστοποιήσουν κατά πόσο ο λόγος  $\omega$ -6 / $\omega$ -3 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την πρόληψη του κινδύνου καρδιοπαθειών.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Eckles, C.; Combs, W.; Macy, H. Milk and Milk Products. *Milk milk Prod.* **1951**, 237–269.
- (2) Crichton, G. E. Bryan, J.; Murphy, K. J.; Buckley, J. Review of Dairy Consumption and Cognitive Performance in Adults: Findings and Methodological Issues. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2010**, *30*, 352–361.
- (3) Tunick, M. H.; Van Hekken, D. L. Dairy Products and Health: Recent Insights. *J. Agric. Food Chem.* **2014**.
- (4) Ha, E.; Zemel, M. B. Functional Properties of Whey, Whey Components, and Essential Amino Acids: Mechanisms Underlying Health Benefits for Active People (Review). *J. Nutr. Biochem.* **2003**, *14*, 251–258.
- (5) Crichton, G. E.; Elias, M. F.; Dore, G. A.; Robbins, M. A. Relation between Dairy Food Intake and Cognitive Function: The Maine-Syracuse Longitudinal Study. *Int. Dairy J.* **2012**, *22*, 15–23.
- (6) Park, K. M.; Cifelli, C. J. Dairy and Blood Pressure: A Fresh Look at the Evidence. *Nutr. Revs.* **2013**, *71*, 149–157.
- (7) McGregor, R. A.; Poppitt, S. D. Milk Protein for Improved Metabolic Health: A Review of the Evidence. *Nutr. Metab.* **2013**, *10*, 46.
- (8) Moughan, P. J.; Gilani, S.; Rutherfurd, S. M.; Tomé, D. True Ileal Amino Acid Digestibility Coefficients for Application in the Calculation of Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) in Human Nutrition. Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on Protein Quality Evaluation in Human Nutr. <http://www.fao.org/ag/humannutrition/36216-04a2f02ec02eafd4f457dd2c9851b4c45.pdf> (Accessed July 14, 2014).
- (9) Mills, S.; Ross, R. P.; Hill, C.; Fitzgerald, G. F.; Stanton, C. Milk Intelligence: Mining Milk for Bioactive Substances Associated with Human Health. *Int. Dairy J.* **2011**, *21*, 377–401.
- (10) National Institutes of Health. Fact Sheets for Health Professionals. [Http://ods.od.nih.gov/factsheets](http://ods.od.nih.gov/factsheets). Accessed Aug. 1, 2014.
- (11) Higdon, J. No Title. *Micronutr. Inf. center.* <http://ipi.oregonstate.edu/infocenter>. Accessed Aug. 1, 2014.
- (12) Sunyecz, J. A. The Use of Calcium and Vitamin D in the Management of Osteoporosis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 827–836.
- (13) Ervin, R. B.; Wang, C. Y.; Wright, J. D.; Kennedy- Stephenson, J. Dietary Intake of Selected Minerals for the United States Population: 1999–2000. Advance

Data from Vital and Health Statistics. *Hyattsville, MD Natl. Cent. Heal. Stat. 2004.*

- (14) Caroli, A.; Poli, A.; Ricotta, D.; Banfi, G.; Cocchi, D. Invited Review: Dairy Intake and Bone Health: A Viewpoint from the State of the Art. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 5249–5262.
- (15) Soares, M. J.; Murhadi, L. L.; Kurpad, A. V.; Chan She Ping-Delfos, W. L.; Piers, L. S. Mechanistic Roles for Calcium and Vitamin D in the Regulation of Body Weight. *Obes. Rev.* **2012**, *13*, 592–605.
- (16) Lorenzon, J. K.; Jensen, S. K.; Astrup, A. Milk Minerals Modify the Effect of Fat Intake on Serum Lipid Profile: Results from an Animal and a Human Short-Term Study. *Brit. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1412–1420.
- (17) Ditscheid, B.; Keller, S.; Jahreis, G. Cholesterol Metabolism Is Affected by Calcium Phosphate Supplementation in Humans. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1678–1682.
- (18) Huth, P. J.; DiRienzo, D. B.; Miller, G. D. Major Scientific Advances with Dairy Foods in Nutrition and Health. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 1207–1221.
- (19) Chowdhury, R.; Warnakula, S.; Kunutsor, S.; Crowe, F.; Ward, H. A.; Johnson, L.; Franco, O. H.; Butterworth, A. S.; Forouhi, N. G.; Thompson, S. G.; Khaw, K.-T.; Mozaffarian, D.; Danesh, J.; Di Angelantonio, E. Association of Dietary, Circulating, and Supplement Fatty Acids with Coronary Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann. Intern. Med.* **2014**, *160*, 398–406.
- (20) Sadeghi, M.; Khosravi-Boroujeni, H.; Sarrafzadegan, N.; Asgary, S.; Roohafza, H.; Gharipour, M.; Sajjadi, F.; Khalesi, S.; Rafieian-Kopaei, M. Cheese Consumption in Relation to Cardiovascular Risk Factors among Iranian Adults-IHHP Study. *Nutr. Res. Pr.* **2014**, *8*, 336–341.
- (21) National Academy of Sciences. Carcinogens and Anticarcinogens in the Human Diet: A Comparison of Naturally Occurring and Synthetic Substances. *Natl. Acad. Press Washington, DC* **1996**, 85.
- (22) Ward, L. Increasing Awareness of the Health Benefits of Dairy Products. *Food Manuf.* **2013**, *26* (9), 38.
- (23) Miller, P. E.; Alexander, D. D.; Perez, V. Effects of Whey Protein and Resistance Exercise on Body Composition: A Meta- Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Am. Coll. Nutr.* **2014**, *33*, 163–175.
- (24) Katsanos, C. S.; Chinkes, D. L.; Paddon-Jones, D.; Zhang, X.-J.; Aarsland, A.; Wolfe, R. R. Whey Protein Ingestion in Elderly Persons Results in Greater Muscle Protein Accrual than Ingestion of Its Constituent Essential Amino Acid Content. *Nutr. Res.* **2008**, *28* (651-658).

- (25) Hartman, J. W.; Tang, J. E.; Wilkinson, S. B.; Tarnopolsky, M. A.; Lawrence, R. L.; Fullerton, A. V.; Phillips, S. M. Consumption of Fat-Free Fluid Milk after Resistance Exercise Promotes Greater Lean Mass Accretion than Does Consumption of Soy or Carbohydrate in Young, Novice, Male Weightlifters. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 373–381.
- (26) McGrane, M. M.; Essery, E.; Obbagy, J.; Lyon, J.; MacNeil, P.; Spahn, J.; Van Horn, L. Dairy Consumption, Blood Pressure, and Risk of Hypertension: An Evidence-Based Review of Recent Literature. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* **2011**, *5*, 287–298.
- (27) Ricci, I.; Artacho, R.; Olalla, M. Milk Protein Peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory (ACEI) Activity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 390–402.
- (28) Livingstone, K. M.; Lovegrove, J. A.; Cockcroft, J. R.; Elwood, P. C.; Pickering, J. E.; Givens, D. I. Does Dairy Food Intake Predict Arterial Stiffness and Blood Pressure in Men? Evidence from the Caerphilly Prospective Study. *Hypertension* **2013**, *61*, 42–47.
- (29) Engberink, M. F.; Hendriksen, M. A.; Schouten, E. G.; van Rooij, F. J.; Hofman, A.; Witteman, J. C.; Geleijnse, J. M. Inverse Association between Dairy Intake and Hypertension: The Rotterdam Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1877–1883.
- (30) Llana, C.; Forner, L.; Baca, P. Anticariogenicity of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate: A Review of the Literature. *J. Contemp. Dent. Pr.* **2009**, *10*, 1–9.
- (31) Merritt, J.; Qi, F.; Shi, W. Milk Helps Build Strong Teeth and Promotes Oral Health. *J. Calif. Dent. Assoc.* **2006**, *34*, 361–366.
- (32) Sakaguchi, M.; Koseki, M.; Wakamatsu, M.; Matsumura, E. Effects of Systemic Administration of B-Casomorphin-5 on Learning and Memory in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *530*, 81–87.
- (33) Kost, N. V.; Sokolov, O. Y.; Kurasova, O. B.; Dmitriev, A. D.; Tarakanova, J. N.; Gabaeva, M. V.; Zolotarev, Yu. A.; Dadayan, A. K.; Grachev, S. A.; Korneeva, E. V.; Mikheeva, I. G.; Zozulya, A. Kost, N. V.; Sokolov, O. Y.; Kurasova, O. B.; Dmitriev, A. D. B-Casomorphins-7 in Infants on Different Type of Feeding and Different Levels of Psychomotor Development. *Peptides* **2009**, *30*, 1854–1860.
- (34) Tung, Y.-T.; Chen, H.-L.; Yen, C.-C.; Lee, P.-Y.; Tsai, H.-C.; Lin, M.-F.; Chen, C.-M. Bovine Lactoferrin Inhibits Lung Cancer Growth through Suppression of Both Inflammation and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 2095–2106.



- (35) Duarte, D. C.; Nicolau, A.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R. The Effect of Bovine Milk Lactoferrin on Human Breast Cancer Cell Lines. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94*, 66–76.
- (36) Freiburghaus, C.; Lindmark-Månsson, H.; Paulsson, M.; Oredsson, S. Reduction of Ultraviolet Light-Induced DNA Damage in Human Colon Cancer Cells Treated with a Lactoferrin-Derived Peptide. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 5552–5556.
- (37) Renye, J. A., Jr.; Somkuti, G. A. Cloning of Milk-Derived Bioactive Peptides in *Streptococcus Thermophilus*. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 723–730.
- (38) Lee, K. W.; Lee, H. J.; Cho, H. Y.; Kim, Y. J. Role of the Conjugated Linoleic Acid in the Prevention of Cancer. *Crit. Revs. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45*, 135–144.
- (39) Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M. W. Dietary Sources of Conjugated Dienoic Isomers of Linoleic Acid, a Newly Recognized Class of Anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* **1992**, *5*, 185–197.
- (40) Bauman, D.E., Barbano, D.M., Dwyer, D.A. and Griinari, J. M. Production of Butter with Enhanced Conjugated Linoleic Acid for Use in Biomedical Studies with Animal Models. *J. Dairy Sci.* **2000**, *83*, 2422–2425.
- (41) Parodi, P. W. Cow's Milk Fat Components as Potential Anticarcinogenic Agents. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1055–1060.
- (42) Cunningham, D.C., Harrison, L.Y. and Shultz, T. D. Proliferative Responses of Normal Human Mammary and MCF- 7 Breast Cancer Cells to Linoleic Acid, Conjugated Linoleic Acid and Eicosanoid Synthesis Inhibitors in Culture. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 197–204.
- (43) Pariza, M.W., Ha, Y.L., Benjamin, H., Sword, J.T., Gruter, A., Chin, S.F., Storkson, J., Faith, N. and Albright, K. Formation and Action of Anticarcinogenic Fatty Acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**, *289*, 269–272.
- (44) Schonberg, S. and Krokan, H. E. The Inhibitory Effect of Conjugated Dienoic Derivatives (CLA) of Linoleic Acid on the Growth of Human Tumor Cell Lines Is in Part due to Increased Lipid Peroxidation. *Anticancer Res.* **1995**, *15*, 1241–1246.
- (45) Kim HY. Novel Metabolism of Docosahexaenoic Acid in Neural Cells. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 18661–18665.
- (46) Fukuda, S., Furuya, H., Suzuki, Y., Asanuma, N. and Tino, T. A New Strain of *Butyrivibrio Fibrisolvens* That Has High Ability to Isomerize Linoleic Acid to Conjugated Linoleic Acid. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2005**, *51*, 105–113.

- (47) Corl, B.A., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Phillips, B.S. and Bauman, D. E. The Role of "9-Desaturase in Theproduction of Cis-9,trans- 11 CLA. *J. Nutr. Biochem.* **2001**, *12*, 622–630.
- (48) Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J. and Tove, S. B. Intermediates and Products of the Biohydrogenation of Linoleic Acid by *Butyrivibrio Fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* **1966**, *6*, 1350–1354.
- (49) Verhulst, A., Janssen, G., Parmentier, G. and Eyssen, H. Isomerization of Polyunsaturated Fatty Acids by Propionibacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **1987**, *9*, 12–15.
- (50) Kim, Y.Z., Lui, R.H., Bond, D.R. and Russel, J. B. Effect of Linoleic Acid Concentration on Conjugated Linoleic Acid Produced by *Butyrivibrio Fibrisolvens* A38. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 5226–5230.
- (51) Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, D. and Stanton, C. Conjugated Linoleic Acid Biosynthesis by Human-Derived Bifidobacterium Species. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 138–145.
- (52) Cawood, P., Wickens, D.G., Iverson, S.A., Braganza, J.M. and Dormandy, T. L. The Nature of Diene Conjugation in Human Serum, Bile and Duodenal Juice. *FEMS Lett.* **1983**, *162*, 239–243.
- (53) Harrison, K., Cawood, P., Iverson, A. and Dormandy, T. L. Diene Conjugation Patterns in Normal Serum. *Life Chem. Reports* **1985**, *3*, 41–44.
- (54) Briggs, S.P., Haegele, A.D., Thompson, H.J., Storkson, J. and Scimeca, J. The Efficacy of Conjugated Linoleic Acid in Mammary Cancer Prevention Is Independent of the Level or Type of Fat in the Diet. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1045–1050.
- (55) Belury, M.A., Bird, C., Nickel, K.P. and Wu, B. Inhibition of Mouse Skin Tumor Promotion by Dietary Conjugated Linoleate. *Nutr. Cancer* **1996**, *26*, 149–157.
- (56) Cesano, A., Visonneau, S., Scimeca, J.A., Kritchevsky, D. and Santoli, D. Opposite Effects of Linoleic Acid and Conjugated Linoleic Acid on Human Prostatic Cancer in SCID Mice. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 1429–1434.
- (57) Shultz, T.D., Chew, B.P. and Seaman, W. R. Differential Stimulatory and Inhibitory Responses of Human MCF-7 Breast Cancer Cells to Linoleic Acid and Conjugated Linoleic Acid in Culture. *Anticancer Res.* **1992**, *12*, 2143–2146.
- (58) Zu, H.X. and Schut, H. A. J. Inhibition of 2-Amino-3- methylimidazo[4,5-F]quinoline (IQ)-DNA Adduct Formation in CDF1 Mice by Heataltered Derivatives of Linoleic Acid. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30*, 9–16.

- (59) Pariza, M.W., Park, Y. and Cook, M. E. Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid: Evidence and Speculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **2000**, *223*, 8–13.
- (60) Wonsil, B.J., Herbein, J.H. and Watkins, B. A. Dietary and Ruminally Derived Trans-18:1 Fatty Acids Alter Bovine Milk Lipids. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 556–565.
- (61) Chouinard, P.Y., Corneau, L., Barbano, D.M., Metzger, LE. and Bauman, D. Conjugated Linoleic Acids Alter Milk Fatty Acid Composition and Inhibit Milk Fat Secretion in Dairy Cows. *J. Nutr. Biochem.* **1999**, *129*, 1579–1584.
- (62) Lee, K.N., Kritchevsky, D. and Pariza, M. W. Conjugated Linoleic Acid and Atherosclerosis in Rabbits. *Atherosclerosis* **1994**, *108*, 19–25.
- (63) Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A. and Huth, P. J. Dietary Conjugated Linoleic Acid Reduces Plasma Lipoproteins and Early Aortic Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Hamsters. *Artery* **1997**, *22*, 266–277.
- (64) Rainer, L. and Heiss, C. J. Conjugated Linoleic Acid: Health Implications and Effects on Body Composition. *J. Am. Diet. Assoc.* **2004**, *104*, 963–968.
- (65) Russo, G. L. Dietary N - 6 and N - 3 Polyunsaturated Fatty Acids: From Biochemistry to Clinical Implications in Cardiovascular Prevention. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77* (6), 937–946.
- (66) Dyerberg J, Bang HO, H. N. Fatty Acid Composition of the Plasma Lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* **1975**, *28*, 958–966.
- (67) Menotti A, Kromhout D, Blackburn H, Fidanza F, Buzina R, N. A. Food Intake Patterns and 25-Year Mortality from Coronary Heart Disease: Cross-Cultural Correlations in the Seven Countries Study. The Seven Countries Study Research Group. *Eur J Epidemiol* **1999**, *15*, 507–515.
- (68) Benatti P, Peluso G, Nicolai R, C. M. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J Am Coll Nutr* **2004**, *23*, 281–302.
- (69) Das UN. Beneficial Effect(s) of N-3 Fatty Acids in Cardiovascular Diseases: But, Why and How? Prostaglandins. *Leukot Essent Fat. Acids* **2000**, *63*, 351–362.
- (70) Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, et al. Effects of Changes in Fat, Fish, and Fibre Intakes on Death and Myocardial Reinfarction: Diet and Reinfarction Trial (DART). *Lancet* **1989**, *62*, 757–761.
- (71) Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, et al. Early Protection against Sudden Death by N -3 Polyunsaturated Fatty Acids after Myocardial Infarction: Time-Course Analysis of the Results of the Gruppo Italiano per Lo Studio Della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* **2002**, *105*, 1897–1903.

- (72) Hu FB, Manson JE, W. W. Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. *200120*, 5–19.
- (73) AP., S. Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development. *Am J Clin Nutr* **1991**, *54*, 438–463.
- (74) AP., S. The Importance of the Ratio of Omega-6/ Omega-3 Essential Fatty Acids. *Biomed Pharmacother* **2002**, *56*, 365–379.
- (75) AP., S. Evolutionary Aspects of Diet, the Omega-6/ Omega-3 Ratio and Genetic Variation: Nutritional Implications for Chronic Diseases. *Biomed Pharmacother* **2006**, *60*, 502–507.
- (76) Kang JX, Wang J, Wu L, K. Z. Transgenic Mice: Fat-1 Mice Convert N- 6to N- 3 Fatty Acids. *Nature* **2004**, *427*, 504.

## 2. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

### 2.1 Εισαγωγή

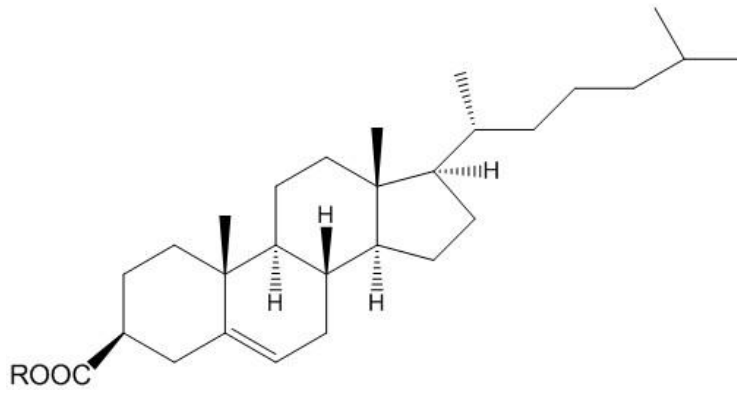
Τα λιπίδια αποτελούν τα κύρια συστατικά των τροφίμων, τόσο φυτικής όσο και ζωικής προέλευσης. Δεν υπάρχει ακριβής ορισμός για τον όρο λιπίδια. Παρόλα αυτά συνήθως περιλαμβάνει μια ευρεία κατηγορία συστατικών, τα οποία διακρίνονται από κοινές ιδιότητες και ομοιότητες στη σύστασή τους. Τα λιπίδια αποτελούν μόρια τα οποία είναι ελάχιστα διαλυτά ή αδιάλυτα στο νερό, αλλά διαλυτά σε επιλεγμένους οργανικούς διαλύτες, όπως είναι το βενζόλιο, το χλωροφόρμιο, ο διαιθυλαιθέρας, το εξάνιο και η μεθανόλη. Μαζί με τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια σχηματίζουν την βασική δομή των ιστών. Παρόλα αυτά, τα κοινά και μοναδικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων βασίζονται στην διαλυτότητά τους περισσότερο, παρά στα δομικά χαρακτηριστικά τους.<sup>1</sup>

Έχουν προταθεί αρκετές ομάδες διάκρισης των λιπιδίων. Από την πλευρά της διατροφικής αξίας και σημασίας, σύμφωνα με το National Academy of Sciences, τα λίπη και τα έλαια ορίζονται ως πολύπλοκα οργανικά μόρια, τα οποία σχηματίζονται με τη σύνδεση τριών λιπαρών οξέων σε ένα μόριο γλυκερόλης.<sup>2</sup> Τα λιπίδια μπορούν να ταξινομηθούν γενικά ως απλά συστατικά<sup>3-5</sup>, ή ως παράγωγα, σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Bloor<sup>3</sup> (Πίνακας 2.1, Σχήμα 2.1).

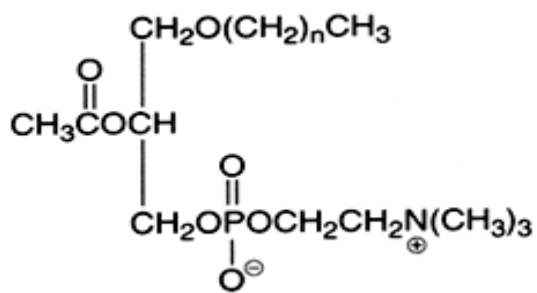
<b>ΓΕΝΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ</b>	
<b>Απλά Λιπίδια: Μόρια αποτελούμενα από δύο τύπους επιμέρους μορίων</b>	
Γλυκερυλεστέρες	Εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα (π.χ. τριγλυκερίδια)
Χοληστερολεστέρες	Εστέρες της χοληστερόλης με λιπαρά οξέα
Κηροί	Εστέρες που σχηματίζονται από αλκοόλες και λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας. Περιλαμβάνονται εστέρες των βιταμινών Α και D
Κηραμίδια (Ceramides)	Αμίδια που σχηματίζονται από λιπαρά οξέα με βάσεις μακριάς αλυσίδας με δι ή τριδροξυ ομάδες, οι οποίες περιέχουν 12-22 άτομα άνθρακα στην αλειφατική αλυσίδα (π.χ. σφιγγοσίνη)
<b>Σύνθετα Λιπίδια: Μόρια αποτελούμενα από περισσότερα από δύο επιμέρους μόρια</b>	
Φωσφολιπίδια	Εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα, φωσφορικό οξύ και άλλες αζωτούχες ομάδες
Φωσφατιδικό οξύ	Διγλυκερίδιο εστεροποιημένο με φωσφορικό οξύ
Φωσφατιδυλοχολίνη	Φωσφατιδικό οξύ μαζί με χολίνη

Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	Φωσφατιδικό οξύ μαζί με αιθανολαμίνη
Φωσφατιδυλοσερίνη	Φωσφατιδικό οξύ μαζί με σερίνη
Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη	Φωσφατιδικό οξύ μαζί με ινοσιτόλη
Φωσφατιδυλο ακυλογλυκερόλη	Μόρια γλυκερόλης εστεροποιημένα με φωσφορικό οξύ (π.χ. καρδιολιπίνη, διφωσφατιδυλο ακυλογλυκερόλη)
Γλυκογλυκερολιπίδια	1,2-διακυλογλυκερόλη, ενωμένη με έναν γλυκοσιδικό υποκατάσταση στη θέση sn-3 με ένα μόριο υδατάνθρακα (π.χ. μοναγαλακτόσυλ διακυλογλυκερόλη, διγαλακτόσυλο μονοάκυλογλυκερόλη)
Γαγγλιοζίτες	Γλυκολιπίδια τα οποία είναι δομικά όμοια με τα ceramidepolyhexoside. Έχουν επίσης 1-3 σιαλικά υποκατάστατα, τα περισσότερα από τα οποία έχουν ένα αμινοσάκχαρο, μαζί με τα άλλα σάκχαρα
Σφιγγολιπίδια	Παράγωγα των κηραμιδίων
Σφιγγομυελίνη	Κηραμίδιο φωσφορυλοχολίνης
Κερεβροσίτες	Κηραμίδιο ενωμένο με ένα απλό σάκχαρο στο τελικό υδροξυλικό άκρο της βάσης
Κεραμίδια διεξοξειδίου	Κηραμίδιο ενωμένο με ένα δισακχαρίτη
Κηραμίδια Πολυεξοξειδίου	Κηραμίδιο ενωμένο με τρι ή ολιγοσακχαρίτη
Σουλφίδιο κερεβροσίτη	Μονοεξοσίδιο κηραμιδίου εστεροποιημένο με μία σουλφονική ομάδα
<b>Παράγωγα λιπιδίων: Μόρια, τα οποία προκύπτουν αυτούσια ή αποικοδομούνται από απλούστερα ή πολύπλοκα λιπίδια, με υδρόλυση (π.χ. λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E, K, υδατάνθρακες, στερόλες)</b>	

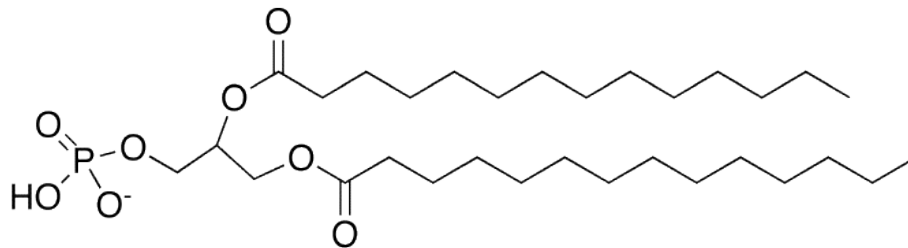
**Πίνακας 2.1:** Σημαντικότερες Ομάδες Λιπιδίων



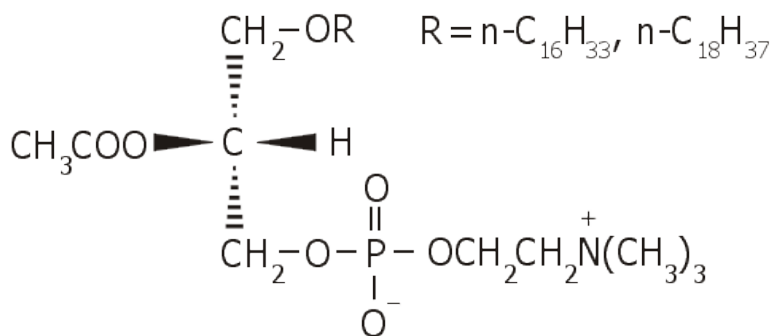
Εστέρας της Χοληστερόλης



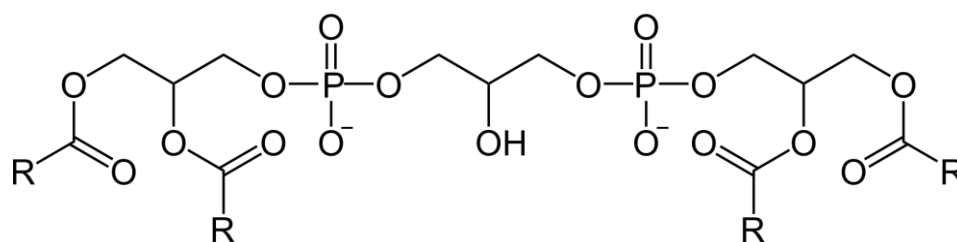
Φωσφολιπίδιο



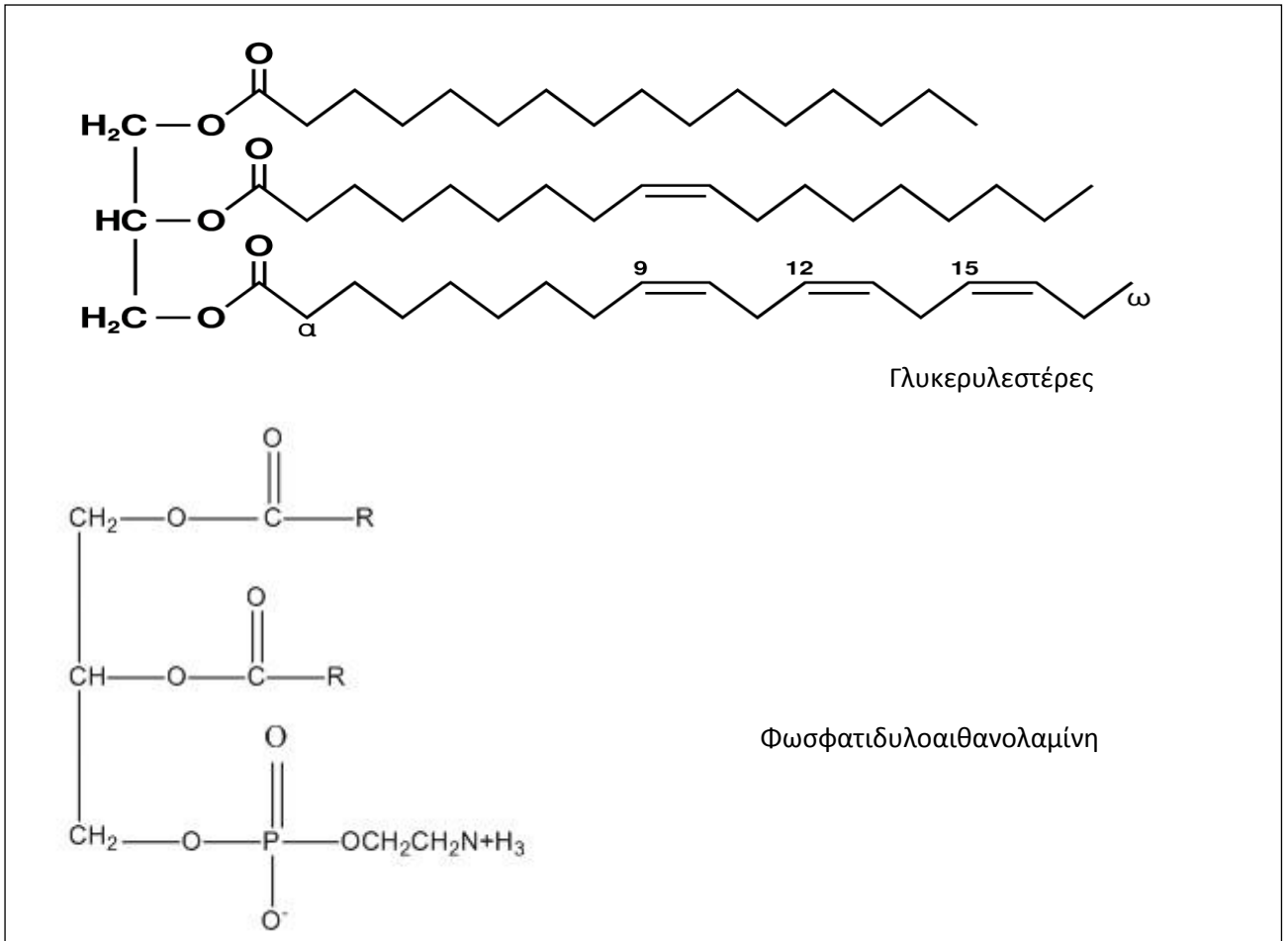
Φωσφατιδικό Οξύ



Φωσφατιδυλοχολίνη



Καρδιολιπίνη



**Σχήμα 2.1:** Γενικές Ομάδες Λιπιδίων.



Τα τρόφιμα είναι δυνατόν να περιέχουν μία ή όλες από τις παραπάνω λιπιδικές ομάδες. Από αυτές τα τριγλυκερίδια (TAG) και τα φωσφολιπίδια (PL) βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό και είναι τα πιο σημαντικά συστατικά. Τα TAG που βρίσκονται σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία δωματίου, είναι γνωστά ως έλαια, και προέρχονται κυρίως από τα φυτά ή φύκη (π.χ. λαχανικά και ιχθυέλαια). Τα TAG που βρίσκονται σε στερεή μορφή σε θερμοκρασία δωματίου, ορίζονται ως λίπη, και είναι κυρίως ζωικής προέλευσης (π.χ. ζωικό λίπος).

Η λεπτομερής και ακριβής ανάλυση των λιπιδίων στα τρόφιμα είναι μια πάρα πολύ σημαντική διαδικασία, καθώς συμβάλλει: (1) στον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών και στη διατροφική αξία που αυτά επιφέρουν στο τρόφιμο και (2) στην ακριβή ταυτοποίηση τους, έτσι ώστε να είναι σε θέση οι ερευνητές να κατανοούν και να μελετούν τις δράσεις, αρνητικές και θετικές, των λιπών και ελαίων στην βιομηχανία τροφίμων. Επίσης, η ενδεδειγμένη μελέτη των δομικών χαρακτηριστικών των λιπιδίων είναι δυνατόν να συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη προϊόντων, κατάλληλα σχεδιασμένων για μια συγκεκριμένη λειτουργία ή εφαρμογή (χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη των λειτουργικών τροφίμων).

## **2.2 Εκχύλιση Λιπιδίων από Τρόφιμα και Βιολογικά Υλικά**

Τα λιπίδια στην φύση συνδέονται με άλλα μόρια μέσω (α) αλληλεπιδράσεων van der Waals, π.χ., αλληλεπιδράσεων ορισμένων λιπιδίων με πρωτεΐνες, (β) ηλεκτροστατικών δεσμών και δεσμών υδρογόνου κυρίως μεταξύ λιπιδίων και πρωτεϊνών και (γ) ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ λιπιδίων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών. Επομένως, για τον διαχωρισμό και την απομόνωση λιπιδίων από ένα πολύπλοκο κυτταρικό υπόστρωμα, χρησιμοποιούνται διαφορετικές χημικές και φυσικές μέθοδοι. Η βασική ιδιότητα, πάνω στην οποία βασίζεται ο διαχωρισμός των λιπιδίων από άλλα συστατικά των κυττάρων, είναι η δυσδιαλυτότητά τους στο νερό. Η πλήρης εκχύλιση είναι δυνατόν να απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο εκχύλισης ή μια σειρά από συνδυασμό διαλυτών έτσι ώστε τα λιπίδια να διαλυτοποιούνται.

## **2.3 Έμμεσες Μέθοδοι Προσδιορισμού των Συνολικών Λιπιδίων**

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές οργανοληπτικές μέθοδοι προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για σαφή και γρήγορο προσδιορισμό του λιπαρού κλάσματος διαφόρων δειγμάτων. Οι μέθοδοι αυτοί δεν αποτελούν εκχύλιση, αλλά κερδίζουν το ενδιαφέρον καθώς είναι γρήγοροι και μη καταστροφικοί για το δείγμα. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους στηρίζονται στην χρήση ενός προτύπου αναφοράς, και για το λόγο αυτό πρέπει να βαθμονομούνται σε σχέση με μια συγκεκριμένη μεθοδολογία, ώστε τα αποτελέσματά τους να είναι ακριβή.

### 2.3.A. Μέτρηση Πυκνότητας

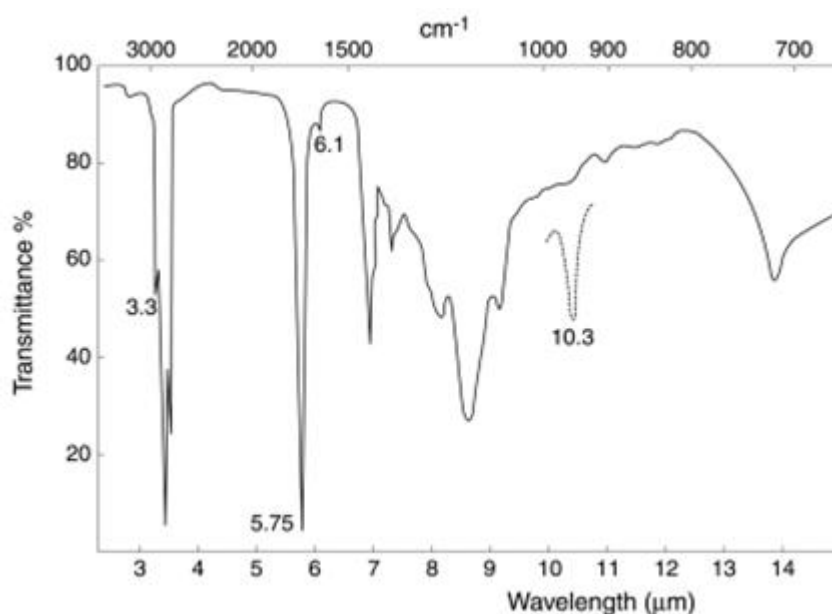
Έχει αναφερθεί ότι η πυκνότητα του λιναρόσπορου συσχετίζεται ιδιαίτερα με την περιεκτικότητά του σε έλαιο ( $r=0.96$ ).<sup>6</sup> Έτσι, η μέτρηση της πυκνότητας των σπόρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μέσο διαλογής γενετικών γραμμών λιναριού, οι οποίοι έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι.

### 2.3.B. Διηλεκτρική Μέθοδος

Η διηλεκτρική σταθερά ενός επιλεγμένου διαλύτη αλλάζει όταν σε αυτόν διαλύεται το λίπος. Για παράδειγμα, όταν ένα δείγμα ελαιούχων σπόρων διαλύεται σε ένα συγκεκριμένο διαλύτη και μετρείται η διηλεκτρική σταθερά του μίγματος, τότε το λιπιδικό περιεχόμενο προσδιορίζεται από πρότυπα διαγράμματα τα οποία δείχνουν το πώς μεταβάλλεται η διηλεκτρική σταθερά όταν διαλύονται διαφορετικές συγκεντρώσεις λιπιδίων στον ίδιο διαλύτη.<sup>5</sup>

### 2.3.Γ. Φασματοσκοπία Υπέρυθρου

Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου (near- infrared reflectance- NIR), η απορρόφηση των λιπιδίων μελετάται στην περιοχή των  $14.300-4000\text{ cm}^{-1}$  (700-2500 nm), κυρίως εξαιτίας της παρουσίας των δεσμών C-H, O-H, και N-H. Η φασματοσκοπία NIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του λιπαρού κλάσματος στο πετρέλαιο, στις πρωτεΐνες και στην υγρασία. Επίσης, αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση των ελαιούχων σπόρων (Σχήμα 2.3.1).



**Σχήμα 2.3.1:** Φάσμα IR σογιέλαιου.

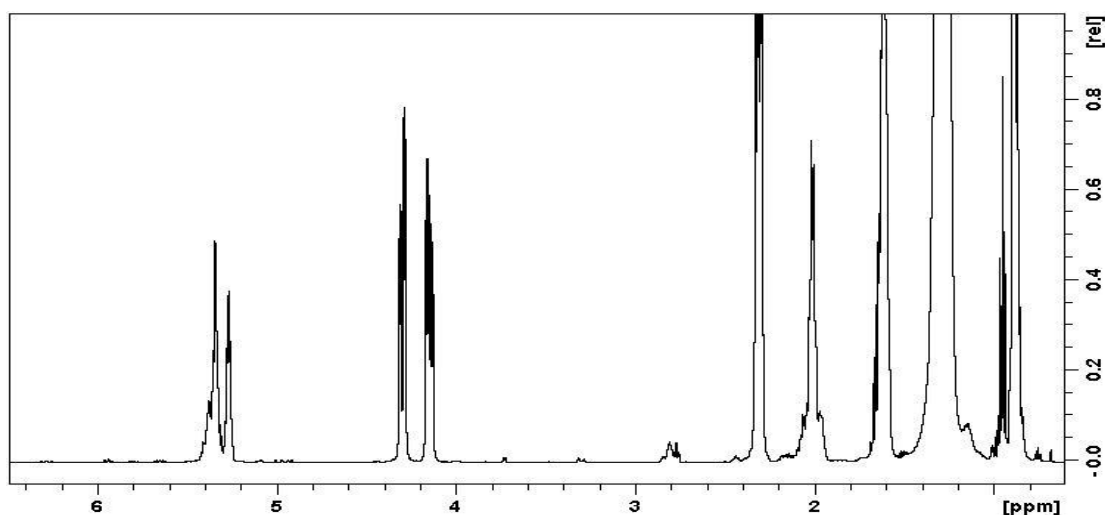
Αρκετοί επιστήμονες χρησιμοποιούν την φασματοσκοπία υπέρυθρου για τη μελέτη διαφόρων ειδών δειγμάτων. Για παράδειγμα, οι Rodriguez- Otero et al<sup>7</sup>, χρησιμοποίησαν την φασματοσκοπία NIR για τη μελέτη του λίπους, των πρωτεϊνών και του στερεού υπολείμματος στο τυρί. Οι Lee et al<sup>8</sup> χρησιμοποίησαν τη φασματοσκοπία NIR σε μικρό μήκος κύματος (700-1100 nm) με υποδοχέα οπτικής

ίνας, ώστε να μελετήσουν το ακατέργαστο λιπιδικό κομμάτι σε δείγματα από πέστροφα.

Για τη μελέτη της λιπιδικής φάσης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων έχει χρησιμοποιηθεί η φασματοσκοπία mid- NIR και έχει ερευνηθεί από τον Biggs.<sup>9</sup> Τα λιπίδια παρουσιάζουν απορρόφηση σε μήκος κύματος 5730 nm και η ενέργεια που απορροφάται εξαρτάται από το λιπιδικό περιεχόμενο του δείγματος. Η ποσοτικοποίηση της λιπιδικής φάσης μετράται με βάση την πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από την απορρόφηση στο IR, και η συγκέντρωση του λιπιδικού περιεχομένου υπολογίζεται με βάση αναλυτικές τεχνικές.<sup>10</sup>

### **2.3.Δ. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Χαμηλής Ανάλυσης**

Μία άλλη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την ανάλυση του λιπιδικού περιεχομένου στα τρόφιμα είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού χαμηλής ανάλυσης (NMR) η οποία βασίζεται στα διαφορετικά σήματα που παρουσιάζουν οι πυρήνες πρωτονίου των διαφορετικών συστατικών των τροφίμων. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα πρωτόνια αυτά διακρίνονται από διαφορετικές ταχύτητες πυρηνικών πορειών αποδιέγερσης και πυρηνικών αλληλεπιδράσεων εξαιτίας των γειτονικών ομάδων που έχουν. Στα πρωτόνια συστατικών που βρίσκονται σε στερεή φάση το σήμα τείνει να εξαφανίζεται γρήγορα, ενώ στα πρωτόνια ενώσεων που βρίσκονται στην υγρή φάση, το σήμα διαρκεί περισσότερο. Σε ένα δείγμα το σήμα των πρωτονίων του νερού διαρκεί λιγότερο από αυτό των λιπιδίων. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη του αριθμού των πρωτονίων και, ως εκ τούτου, της συγκέντρωσης των υδρογόνων. Έτσι, η ένταση του σήματος στο NMR μπορεί να εκφραστεί σε λιπιδικό περιεχόμενο χρησιμοποιώντας κανονικοποιημένες κορυφές.<sup>11-14</sup> Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των συστατικών του νερού, του λαδιού, καθώς και της αναλογίας στερεού- λίπους και στερεού- υγρού του δείγματος. Η τεχνική αυτή του NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του λιπιδικού περιεχομένου τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του βουτύρου, της μαργαρίνης, της σοκολάτας, του κρέατος, του γάλακτος, της σκόνης γάλακτος και του τυριού<sup>15-17</sup> (Σχήμα 2.3.2).



**Σχήμα 2.3.2:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της λιπιδικής φάσης γάλακτος.

Άλλη τεχνική NMR που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση των συστατικών των τροφίμων είναι αυτή της υψηλής διακριτικής ικανότητας. Στην περίπτωση αυτή τα διάφορα συστατικά διακρίνονται από τη διαφορετική συχνότητα συντονισμού, η οποία εκφράζεται με τη χημική μετατόπιση, των κορυφών στο φάσμα.<sup>10,15</sup> Η μεθοδολογία αυτή θα αναλυθεί λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 3.

### 2.3.Ε. Θολωσιμετρικές και Χρωματομετρικές Μέθοδοι

Η λιπιδική φάση του γάλακτος έχει μελετηθεί επίσης με θολωσιμετρικές μεθόδους από τους Haugard και Pettinati.<sup>18</sup> Για να επιτευχθεί αυτό το λίπος του γάλακτος ομογενοποιείται ώστε να ληφθούν ομοιόμορφα σφαιρίδια. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διατηρούνται μέσω σχηματισμού χηλικών συμπλόκων αυτών με αντιδραστήρια όπως είναι το EDTA. Στην περίπτωση αυτή μετρείται η μετάδοση του φωτός, η οποία μετατρέπεται στο αντίστοιχο λιπιδικό περιεχόμενο, με τη χρήση διαγράμματος μετατροπής.

Άλλη τεχνική μελέτης της λιπιδικής φάσης του γάλακτος είναι η χρωματομετρική μέθοδος.<sup>19</sup> Για να γίνει αυτό, η λιπιδική φάση του γάλακτος αφήνεται να αντιδράσει με ένα αλκαλικό διάλυμα του υδροξαιμικού οξέος για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατόπιν οξίνισης και προσθήκης χλωριούχου σιδήρου σχηματίζεται ένα σχετικά σταθερό χρωμοφόρο, το οποίο έχει απορρόφηση στα 540 nm.

### 2.3.ΣΤ. Μέθοδος Υπερήχων

Οι Fitzgerald et al<sup>20</sup> βασίστηκαν στη μέθοδο των υπερήχων προκειμένου να προσδιορίσουν το ποσοστό των λιπιδίων και του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους στο γάλα. Η ταχύτητα του ήχου αυξάνεται ή μειώνεται αναλογικά ως προς το λιπιδικό περιεχόμενο σε υψηλότερη ή χαμηλότερη τιμή συγκεκριμένης θερμοκρασίας. Αυτή η μέθοδος προσδιορισμού του λίπους βασίζεται κυρίως στην διάδοση της ταχύτητας του ήχου στο γάλα η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία.

### **2.3.Z. Απορρόφηση Ακτινών- Χ**

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη μελέτη του λίπους του κρέατος, καθώς έχει βρεθεί ότι το άπαχο κρέας απορροφά μεγαλύτερο ποσοστό ακτινών Χ από ότι το πλήρες κρέας. Ο προσδιορισμός αυτός γίνεται χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της απορρόφησης των ακτινών -Χ και του λιπιδικού περιεχομένου που λαμβάνεται με τις συνήθεις μεθόδους εκχύλισης.<sup>5</sup>

### **2.4 Ανάλυση του Λιπιδικού Κλάσματος**

Η ανάλυση των λιπιδίων συνήθως απαιτείται για τον προσδιορισμό της σύνθεσης και της δομής των λιπιδίων που εκχυλίζονται από το δείγμα. Τα τρόφιμα πρέπει να αναλύονται έτσι ώστε να γίνεται γνωστή η σύσταση και το είδος των κορεσμένων και ακόρεστων λιπιδίων, όπως επίσης και το επίπεδο της χοληστερόλης. Η ανάλυση όλων των παραπάνω παρέχει πληροφορίες σχετικά με την θερμιδομετρική αξία του τροφίμου, όπως επίσης παρέχει πληροφορίες και για άλλες ιδιότητες του τροφίμου, όπως είναι η διατροφική αξία του και το κατά πόσο ωφέλιμο είναι για την υγεία, όσον αφορά την περιεκτικότητά του σε χοληστερόλη, και σε κορεσμένα λιπαρά οξέα. Επίσης, είναι σημαντικό να μελετάται και να ποσοτικοποιείται η ποιότητα χαρακτηριστικών, όπως είναι ο βαθμός ακορεστότητας, ο βαθμός σαπωνοποίησης, ο δείκτης διάθλασης, η σύσταση σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και η σταθερότητά τους στο φαινόμενο της οξειδωσης. Όλα τα παραπάνω αποτελούν δείκτες ποιότητας, οι οποίοι απαιτούνται για τον προσδιορισμό της αξίας του τροφίμου, καθώς και το πόσο ωφέλιμο είναι για την υγεία του ανθρώπου.

#### **2.4.A. Φυσικοχημικές Ιδιότητες της Λιπιδικής Φάσης**

Η ανάλυση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των λιπιδίων είναι αρκετά σημαντική για να πιστοποιηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των ελαίων και του λίπους που βρίσκεται στα τρόφιμα. Παρακάτω παρατίθενται οι πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες του λιπιδικού κλάσματος των τροφίμων:

##### **1. Βαθμός Ακορεστότητας**

Ο αριθμός ιωδίου (Α.Ι.) υπολογίζει τον βαθμό ακορεστότητας ενός λιπιδίου και ορίζεται ως ο αριθμός των γραμμαρίων ιωδίου που αντιδρούν με 100g λίπους.

Ο προσδιορισμός του αριθμού ιωδίου δίνει μια σαφή ποσοτικοποίηση της ακορεστότητας των λιπιδίων, αν οι διπλοί δεσμοί δεν είναι συζευγμένοι μεταξύ τους ή με καρβονυλικό οξυγόνο. Ο προσδιορισμός αυτός πρέπει να γίνεται απουσία φωτός, για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, με την προσθήκη περίσσειας συγκέντρωσης αντιδραστηρίου αλογόνου.<sup>21</sup>

Η χρήση μεθόδων υδρογόνωσης, για τον προσδιορισμό του βαθμού ακορεστότητας ξεπερνά τα όρια που δίνουν οι μέθοδοι αλογόνωσης. Η υδρογόνωση πραγματοποιείται για τη μέτρηση του βαθμού ακορεστότητας των ακετυλενικών δεσμών ή των συζυγών διπλών δεσμών. Τέτοια λίπη δεν αντιδρούν εύκολα με αλογόνο. Παρόλα αυτά η προσθήκη υδρογόνου σε αυτά θεωρείται πως είναι ποσοτική. Αυτή η μέθοδος είναι ουσιαστικά μια καταλυτική αντίδραση, θερμαινόμενων λιπιδίων. Η ποσότητα του υδρογόνου που αντιδρά προσδιορίζεται κάτω από τις πρότυπες συνθήκες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται είτε ποσοτικά, εκφραζόμενα σε moles είτε βάσει του αριθμού ιωδίου.<sup>5</sup>

Οι απομονωμένοι διπλοί δεσμοί μπορούν να παρατηρηθούν με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας IR σε μήκη κύματος 1500- 900  $\text{cm}^{-1}$ . Η απορρόφηση που εμφανίζεται στην περιοχή αυτή οφείλεται στο δεσμό  $\text{CH}=\text{CH}$ . Εκτός από τους απομονωμένους trans δεσμούς, ισχυρή απορρόφηση μπορούν να δώσουν και οι cis δεσμοί. Ο συνδυασμός των απορροφήσεων που προκύπτουν από τους cis και trans δεσμούς, παρέχει τη συνολική ακορεστότητα του βαθμού ιωδίου.<sup>22-24</sup>

## **2. Περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα**

Η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων στο λάδι είναι ένδειξη είτε ανεπαρκούς επεξεργασίας, είτε δραστηριότητας λιπάσης, είτε προέρχεται από άλλες υδρολυτικές δραστηριότητες.

Η περιεκτικότητα ενός δείγματος σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφράζεται με τον βαθμό οξείδωσης. Ο βαθμός οξείδωσης, ορίζεται ως ο αριθμός mg KOH, ο οποίος απαιτείται για την εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών σε 1g δείγματος. Ο βαθμός οξείδωσης μπορεί να προσδιοριστεί και με χημικές μεθόδους ανάλυσης αλλά και τη φασματοσκοπία FTIR (Fourier transform IR).<sup>25,26</sup>

## **3. Οξειδωτική Σταθερότητα και Προϊόντα Οξείδωσης**

Ανάλογα με τον βαθμό ακορεστότητας τους, τα λιπίδια είναι πολύ ευαίσθητα στην αυτοοξείδωση. Η αυτοοξείδωση πραγματοποιείται μέσω μηχανισμού σχηματισμού ελεύθερων ριζών, μέσω παραγωγής υδροϋπεροξειδίων, τα οποία είναι τα κύρια προϊόντα και τα οποία με τη σειρά τους υφίστανται σχάση προς σχηματισμό διαφόρων αλδεϋδών, κετονών, αλκοολών και υδρογονανθράκων (δευτερογενών προϊόντων). Η παρουσία των δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης υποδεικνύει την συνολική ποιότητα του λίπους.

## **4. Δείκτης Διάθλασης**

Ο δείκτης διάθλασης ενός ελαίου ορίζεται ως ο λόγος της ταχύτητας του φωτός στο κενό (πρακτικά στον αέρα), ως προς την ταχύτητα του φωτός στο έλαιο, σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Αυτός ο λόγος παρέχει έναν δείκτη καθαρότητας των ελαίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο ταυτοποίησής τους. Ο δείκτης διάθλασης μετρείται με διαθλασίμετρο, συνήθως στους 20-25°C για τα έλαια και 40°C για τα στερεά λίπη τα οποία γενικά υγροποιούνται στους

40°C. Ο δείκτης διάθλασης μειώνεται γραμμικά με τη μείωση του αριθμού ωδίου. Έτσι, χρησιμοποιείται επίσης ως ένδειξη για τον έλεγχο του βαθμού υδρογόνωσης στο λάδι.<sup>5</sup>

## **5. Βαθμός Σαπωνοποίησης**

Ο βαθμός σαπωνοποίησης παρέχει μία ένδειξη του συνολικού μοριακού βάρους των λιπιδίων. Ορίζεται ως η ποσότητα KOH, εκφρασμένη σε mg, που απαιτείται για τη σαπωνοποίηση 1g λίπους, δηλαδή, για την εξουδετέρωση των υπαρχόντων ελεύθερων λιπαρών οξέων καθώς και αυτών που προκύπτουν από τα TAG.<sup>5</sup>

## **6. Δείκτης Στερεού Λίπους**

Ο δείκτης στερεού λίπους, ο οποίος είναι τυπικά μία εμπειρική έκφραση του λόγου των λιπιδίων στο λίπος σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, υπολογίζεται με βάση την αλλαγή σε έναν συγκεκριμένο όγκο, σε σχέση με τη θερμοκρασία. Καθώς το στερεό λίπος λιώνει, ο όγκος του δείγματος αυξάνεται και αυτή η αλλαγή μετρείται με εκτατομετρία. Επίσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί και ανίχνευση της ανάλυσης μετατροπής φάσης του λίπους, επειδή τα λιπίδια μπορούν να διασταλούν κατά την τήξη και να μετατραπούν σε μια πιο σταθερή δομή.<sup>5</sup>

### **2.4.B. Χαρακτηρισμός της Λιπιδικής Φάσης, με Χρωματογραφικές Μεθόδους**

Τα λιπιδικά εκχυλίσματα είναι πολύπλοκα μίγματα των επιμέρους κατηγοριών ενώσεων και απαιτούν περαιτέρω διαχωρισμό σε καθαρά συστατικά, όταν αυτό είναι απαραίτητο. Η ανάλυση των χημικών συστατικών του λίπους (π.χ. κατηγορίες λιπιδίων, λιπαρών οξέων, trans λιπαρών οξέων, στερολών, τοκοφερολών, χρωστικών ουσιών κ.α.), περιλαμβάνει κυρίως χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους. Συνήθως, για να επιτευχθεί ένας βέλτιστος διαχωρισμός καθαρών συστατικών των λιπιδίων χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός από τεχνικές διαχωρισμού.

Το πρώτο βήμα της ανάλυσης περιλαμβάνει το διαχωρισμό των λιπιδίων στα διάφορα συστατικά τους με βάση τη διαφορά στην πολικότητα τους. Στο στάδιο αυτό, διαχωρίζονται τα λιπίδια σε πολικό και μη πολικό κλάσμα το οποίο συνεπάγεται ανάλυση των τριγλυκεριδίων (TAG), ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA), των στερολών, των στερυλ-εστέρων, των γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον για τον διαχωρισμό, των καθαρισμό και τον προσδιορισμό των λιπιδικών εκχυλισμάτων είναι: η εκχύλιση υγρού- υγρού (liquid- liquid extraction), η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin- layer chromatography, TLC) και η χρωματογραφία στήλης υγρού-στερεού (liquid – solid column chromatography).

Οι πιο ευρύτατα χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές τεχνικές για την ανάλυση των λιπιδίων είναι η χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία αερίου (GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC) καθώς και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Παρακάτω περιγράφονται οι εφαρμογές των τεχνικών αυτών στην ανάλυση των λιπιδίων που λαμβάνονται από τα τρόφιμα.

### **1) Χρωματογραφία Στήλης**

Τα λιπιδικά εκχυλίσματα συνήθως κλασματοποιούνται με χρωματογραφία στήλης, σε μια παρασκευαστική κλίμακα, πριν από τη λεπτομερή ανάλυσή τους. Οι πιο διαδεδομένες χρωματογραφικές μέθοδοι για την κλασματοποίηση των λιπιδίων είναι η χρωματογραφία στερεού-υγρού (χρωματογραφία προσρόφησης), η χρωματογραφία υγρού-υγρού και χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Στη χρωματογραφία στερεού-υγρού, ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαχωρισμό και στην προσρόφηση των συστατικών της λιπιδικής φάσης ανάμεσα στη στερεή και την υγρή (κινούμενη) φάση. Η έκλυση της επιθυμητής λιπιδικής ομάδας, επιτυγχάνεται με την αλλαγή της πολικότητάς της στην κινητή φάση. Στη χρωματογραφία στήλης, οι πιο γνωστές στατικές φάσεις είναι η síλικα, η αλουμίνα και ρητίνες ανταλλαγής ιόντων, ενώ για την ανάλυση των λιπιδίων, τα πιο επιθυμητά υλικά είναι το πυριτικό οξύ και το πυριτικό μαγνήσιο.

Για τον διαχωρισμό διαφορετικών λιπιδικών ομάδων έχει χρησιμοποιηθεί η χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης με τη χρήση 50 έως 500 προσροφητικών μέσων. Οι κυριότερες παράμετροι είναι το μοριακό βάρος του προσροφητικού, η υγρασία του προσροφητικού και το μέγεθος της στήλης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μεγάλοι μήκους και μικρής διαμέτρου στήλες έχουν την καλύτερη απόκριση, αλλά οι στήλες μεγάλης διαμέτρου αυξάνουν την χωρητικότητα του δείγματος.<sup>4,27</sup>

Στη χρωματογραφία προσρόφησης, τα συστατικά συνδέονται με το στερεό προσροφητικό με πολικούς και ιοντικούς δεσμούς καθώς και με μη πολικούς δεσμούς ή με δυνάμεις van der Waals. Επομένως, ο διαχωρισμός των συστατικών των λιπιδίων γίνεται με βάση τις σχετικές πολικότητες των επιμέρους συστατικών, οι οποίες προσδιορίζονται με τον αριθμό και το είδος των μη πολικών υδρόφοβων ομάδων. Γενικά, η έκλυση από τη στήλη με διαλύτες με αυξημένη πολικότητα, διαχωρίζει το λιπιδικό μείγμα σύμφωνα με την αύξουσα πολικότητα των συστατικών με την ακόλουθη σειρά: κορεσμένοι υδρογονάνθρακες, ακόρεστοι υδρογονάνθρακες, κηροί (εστέρες), στερυλ-εστέρες, αλδεΐδες μακριάς αλυσίδας, τριγλυκερίδια, αλκοόλες μακριάς αλυσίδας, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κινόνες, σουλφολιπίδια, όξινα γλυκεροφωσφατίδια, φωσφατίδυλοαιθυνολαμίνη, λυσοφωσφατιδοαιθυνολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, σφιγγομυελίνη και



λισοφωσφατιδυλοχολίνη.<sup>28</sup> Αυτή η διαδικασία εφαρμόζεται στα περισσότερα λιπιδικά μίγματα και περιλαμβάνει την έκλυση σε στήλη από πυριτικό οξύ, με διαλύτες χλωροφόρμιο, ακετόνη και μεθανόλη. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ουδέτερων λιπιδίων, των γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων αντίστοιχα.<sup>4,28</sup>

Οι στήλες ανταλλαγής ιόντων έχουν ιονικές ομάδες οι οποίες συνδέονται με το αντίθετο φορτίο της ιονικής ομάδας των λιπιδίων. Έτσι, ένα πολυμερές με θετικό φορτίο θα αλληλεπιδράσει με τα ανιονικά λιπίδια του μίγματος, δεδομένου ότι το pH του μίγματος των διαλυτών επιτρέπει τον ιονισμό των ανιονικών ομάδων. Από την άλλη πλευρά, η συγκέντρωση των μη λιπιδικών ανιόντων του μίγματος των διαλυτών δεν πρέπει να δρα ανταγωνιστικά έναντι των άλλων ιόντων.<sup>29</sup>

Ιονίζουσες ομάδες	Κατηγοριοποίηση	Αναλυτική Χρήση
$-(CH_2)_2N^+(C_2H_5)_2$ (diethylaminoethyl)	DEAE (ανταλλάκτης ανιόντων)	Ανιονικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, σουλφολιπίδια, σιαλογλυκολιπίδια, λιπαρά οξέα)
$(CH_2)_2N^+(C_2H_5)_3$ (triethylaminoethyl)	TEAE (ανταλλάκτης ανιόντων)	Ανιονικά λιπίδια
$-CH_2COO^-$ (carboxymethyl)	CM (ανταλλάκτης κατιόντων)	Μίγματα φωσφολιπιδίων

**Πίνακας 2.4.2:** Υλικά που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, για την ανάλυση των λιπιδίων.

Η διαιθυλαμινοαιθύλ-κυτταρίνη (DEAE), χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των λιπιδικών ομάδων, ενώ η τριαιθυλάμινοαιθύλ-κυτταρίνη (TEAE) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό λιπιδίων που έχουν μόνο ιονικές καρβοξυλικές ομάδες (π.χ. λιπαρά οξέα, χολικά οξέα, γαγγλιοζίτες), ή για το διαχωρισμό των φωσφατιδυλοαιθανολαμινών από πολυεξιναμίδια κεραμιδίου. Στην ανάλυση των πολικών λιπιδίων, η DEAE στην όξινη μορφή της, είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό για την ανταλλαγή ιόντων. Είναι πιο αποτελεσματικό σε τιμές pH 3-6 και συχνά ο διαχωρισμός των πολικών λιπιδίων επιτυγχάνεται με σταδιακή έκλυση με διάλυμα buffer οξικού αμμωνίου σε νερό-αιθανόλη. Ο ανταλλάκτης κατιόντων CMC και το άλας νατρίου του χρησιμοποιούνται συχνά για τις ίδιες τιμές pH για τον διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων.<sup>29</sup>

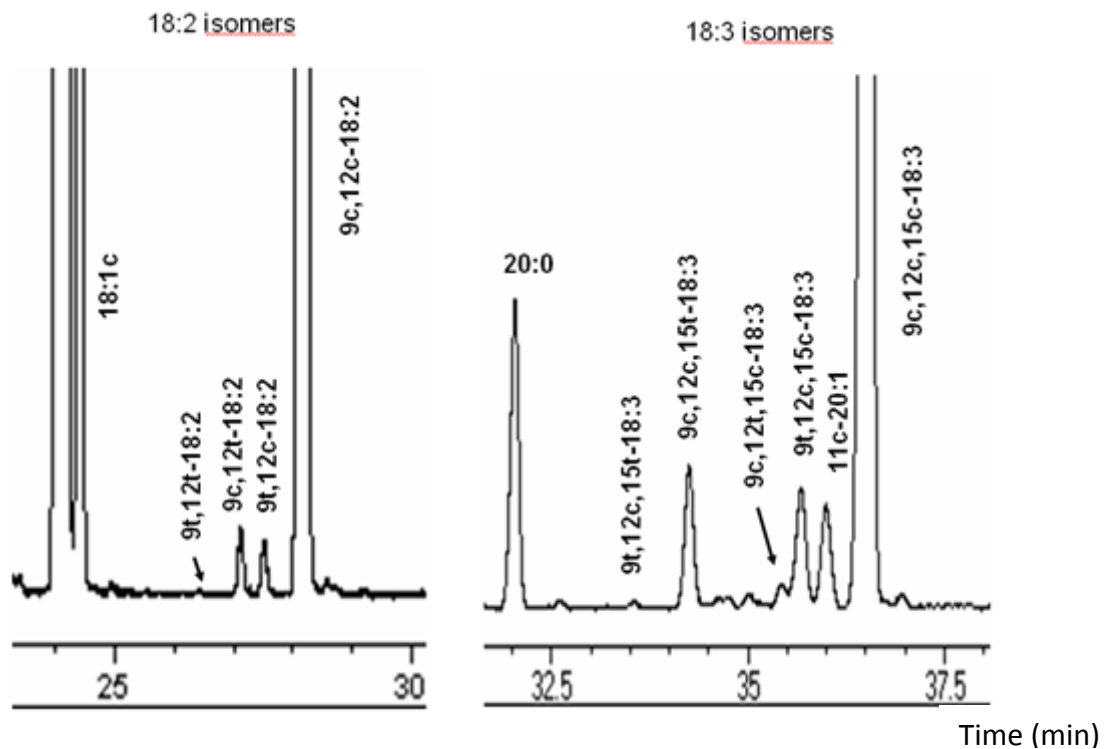
Η συμπλοκοποίηση του προσροφητικού υλικού με νιτρικό άργυρο καθιστά δυνατό το διαχωρισμό των λιπιδικών μιγμάτων με βάση τον αριθμό, τη θέση και την ισομέρεια των cis και trans των διπλών δεσμών των ακόρεστων λιπαρών οξέων και των παραγώγων τους. Η επεξεργασία του υλικού της στήλης με την χρήση βορικού, συμπλέκει τις ενώσεις που περιέχουν

υδροξυλικές ομάδες, με τα γειτονικά τους άτομα άνθρακα και βοηθά στον διαχωρισμό των γλυκολιπιδίων.<sup>29</sup>

## 2) Αέρια Χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία έχει μελετηθεί εκτενέστερα στη βιβλιογραφία. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος λιπιδίων στην αέρια κατάσταση, μεταξύ μιας κινητής αέριας φάσης και μιας στατικής, μη πτητικής, υγρής φάσης, οι οποίες είναι διασκορπισμένες στο εσωτερικό μιας στήλης.

Η ανάλυση των συστατικών των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία, συνήθως απαιτεί τη δημιουργία παραγώγων των λιπαρών οξέων, με σκοπό την αύξηση της πτητικότητας τους. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAME), μπορούν να παρασκευαστούν με διάφορες τεχνικές εστεροποίησης και μετά να διαχωριστούν σε χρωματογραφικές στήλες και να ανιχνευτούν με την χρήση ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID) (Σχήμα 2.2.1).



**Σχήμα 2.2.1:** GC χρωματογράφημα των περιοχών των 18:2 (αριστερά) και 18:3 (δεξιά) μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων ελαίου canola.

Στην αέρια χρωματογραφία, η αέρια φάση είναι συνήθως N<sub>2</sub> ή He για τις πακεταρισμένες στήλες, και He ή H<sub>2</sub> για τις τριχοειδείς στήλες. Ο προσδιορισμός των χρωματογραφικών κορυφών βασίζεται στη σύγκριση των χρόνων ανάκτησής τους με αυτών των πρότυπων ενώσεων.

Η μελέτη με GC των TAG που εκχυλίζονται από το λίπος τροφίμων μπορεί επίσης να δώσει πληροφορίες σχετικά με την θέση των λιπαρών οξέων στα μόρια.

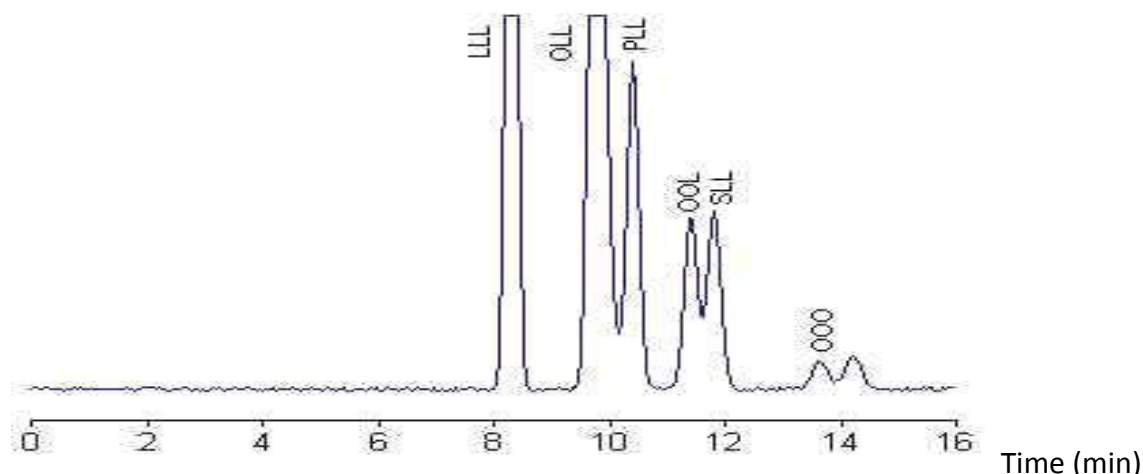
Τα φυσικά απαντώμενα TAG, τα οποία υφίστανται καθαρισμό με TLC, μπορούν να αναλυθούν χωρίς επεξεργασία, με βάση τον αριθμό των ανθράκων τους ή το μοριακό τους βάρος, χρησιμοποιώντας τριχοειδείς στήλες μήκους 8-15 m, επιστρωμένες με μέθυλφαινυλ- ή διμέθυλο σιλικόνη (μη πολικές τριχοειδείς στήλες).

Η χρήση του He ή του H<sub>2</sub> ως αέριο μεταφοράς για τον διαχωρισμό των TAG σε τέτοιες στήλες απαιτεί υψηλότερες θερμοκρασίες από αυτές που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των μεθυλεστέρων. Τα μόνο και διγλυκερίδια πρέπει να μετατραπούν σε τριμεθυλοσιλυλ (TMS) ή tert- βουτυλ διμέθυλοσιλυλ αιθέρες (TBDMS) για ολοκληρωμένη ανάλυση.

Για πιο επιτυχή ανάλυση και διάκριση των γλυκεριδίων, χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός από τις τεχνικές GC και φασματομετρία μάζας.

### **3) Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης**

Η HPLC είναι μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές καθαρισμού και διαχωρισμού των διαφόρων μιγμάτων στα επιμέρους συστατικά τους. Και σε αυτή την τεχνική το δείγμα υφίσταται επεξεργασία πριν την ανάλυσή του. Ο συνδυασμός της τεχνικής HPLC με άλλες τεχνικές όπως είναι η φασματοσκοπία UV ή η φασματομετρία μαζών, ή ακόμη και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, έχει συμβάλει στον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση διαφόρων ομάδων των λιπιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα μονο-, δι- και τριγλυκερίδια καθώς και τα λιπαρά οξέα που έχουν στην αλυσίδα τους υδροξυλομάδα και είναι ενωμένα πάνω σε τριγλυκερίδια. Επίσης, καθιστά δυνατό τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των εστέρων της χοληστερόλης, των ελεύθερων λιπαρών οξέων, καθώς και των ελεύθερων στερολών. Ο συνδυασμός αυτών των τεχνικών επιτρέπει επίσης το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των εναντιομερών γλυκεριδίων, με την κατάλληλη επεξεργασία. Με την HPLC μπορούν επίσης να διαχωριστούν μη πολικά και πολικά λιπίδια, όπως επίσης μπορεί να γίνει και διαχωρισμός μεταξύ των TAG και των μη πολικών λιπιδίων (Σχήμα 2.3.1).



**Σχήμα 2.3.1:** Διάγραμμα HPLC που δείχνει το διαχωρισμό των τριγλυκεριδίων του ελαιόλαδου.

#### 4) Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Ρευστού

Όταν το CO<sub>2</sub> συμπιέζεται σε θερμοκρασία και πίεση μεγαλύτερη από το κρίσιμο σημείο του δεν υγροποιείται αλλά σχηματίζει ένα πυκνό αέριο. Αυτό το αέριο διακρίνεται από αρκετές ιδιότητες όπως είναι οι σχετικά υψηλές πυκνότητες και συντελεστές διάχυσης, οι οποίες το καθιστούν κατάλληλο για αέριο της κινητής φάσης στη χρωματογραφία LC. Η SFC λειτουργεί ως υποκατάστατο της GC, αλλά με αρκετά χαμηλότερη ανάλυση σχετικά με αυτή της GC.

Η θερμοκρασία και η πίεση που απαιτούνται για την SFC είναι πολύ πιο χαμηλές από αυτές της HPLC. Καθώς το CO<sub>2</sub> είναι μη πολικό, μπορεί να διαλύσει λιγότερο πολικά μόρια και για το λόγο αυτό είναι κατάλληλο για την ανάλυση λιγότερο πολικών μορίων.

Η τριχοειδής SFC, σε συνδυασμό με FID ή με UV, χρησιμοποιείται για την ανάλυση των TAG, των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των παραγώγων τους.<sup>30-32</sup>

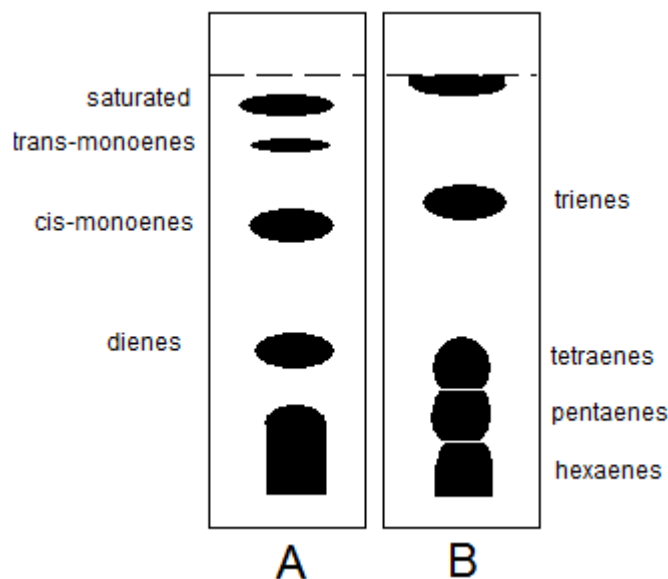
Η χρωματογραφία SFC αργύρου έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των TAG σύμφωνα με τον αριθμό των διπλών δεσμών τους, το μήκος της αλυσίδας και τη φύση των διπλών δεσμών.<sup>33,34</sup> Γενικά η χρωματογραφία SFC αποτελεί μια πολύ καλή εναλλακτική λύση ως προς τη χρήση λιγότερων διαλυτών στην εκχύλιση λιπιδίων και στην ανάλυση. Επίσης, έχει επιδειχθεί αρκετά μεγάλο ενδιαφέρον για περαιτέρω ανάπτυξη στο μέλλον.

#### 5) Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αποτελεί ένα από τα κυριότερα εργαλεία που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των λιπιδίων. Η TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλασματοποίηση των πολύπλοκων λιπιδικών μιγμάτων, για την εξασφάλιση της καθαρότητας, για την ταυτοποίηση της δομής καθώς και για το διαχωρισμό των

μιγμάτων στα συστατικά τους. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στη διαφορά της συγγένειας ενός συστατικού μεταξύ αυτού και της στατικής φάσης της στήλης. Τα κυριότερα μέρη της TLC είναι η στατική φάση, η κινητή φάση, η διαδικασία ανίχνευσης και η ποσοτικοποίηση.<sup>4</sup>

Η TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των TAG, ή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, με βάση τον αριθμό των διπλών δεσμών, καθώς και με την γεωμετρία τους (π.χ. cis ή trans), όπως επίσης και με τη θέση των διπλών δεσμών στην ανθρακική αλυσίδα (Σχήμα 2.5.1).



**Σχήμα 2.5.1:** Διάγραμμα TLC των εστέρων ακόρεστων λιπαρών οξέων.

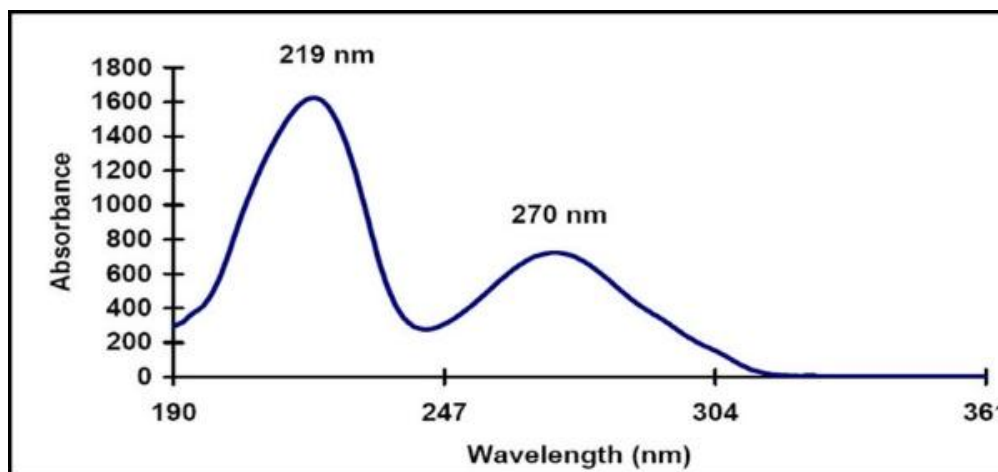
Η χρωματογραφία TLC μπορεί να συνδυαστεί με άλλες μεθόδους, με σκοπό την σαφέστερη ανίχνευση και ποσοτική ταυτοποίηση των λιπιδίων που έχουν διαχωριστεί. Τέτοιες τεχνικές περιλαμβάνουν τη σύζευξη με HPLC (HPLC/ TLC), Fourier transform infrared (TLC/ FTIR), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (TLC/ NMR), καθώς και φασματοσκοπία Raman (TLC/ Raman).<sup>35</sup>

#### 2.4.Γ) Φασματοσκοπικές Τεχνικές Ανάλυσης των Λιπιδίων

Η φασματοσκοπία UV και ορατού χρησιμοποιούνται ελάχιστα, παρόλα αυτά έχουν συγκεκριμένες εφαρμογές για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των λιπιδίων. Η πρώτη φασματοσκοπική μέθοδος που εφαρμόστηκε για την ανάλυση των λιπιδίων είναι η φασματοσκοπία IR. Οι φασματοσκοπίες NMR και MS έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό της δομής των λιπιδίων. Παρόλα αυτά, έχουν αναπτυχθεί και άλλες εφαρμογές πέραν αυτών. Οι φασματοσκοπίες IR, UV και NMR πλεονεκτούν ως προς το γεγονός ότι, ως μέθοδοι ανάλυσης, είναι μη καταστρεπτικές για το δείγμα.

##### 1) Φασματοσκοπία UV- Visible

Τα φάσματα UV και ορατού των οργανικών μορίων λαμβάνονται εξαιτίας των ηλεκτρονιακών διεγέρσεων ή μεταπτώσεων. Λειτουργικές ομάδες που έχουν μεγάλη ηλεκτρονιακή πυκνότητα, όπως είναι οι καρβονυλικές και οι νιτρο ομάδες με διπλούς, τριπλούς ή συζυγείς διπλούς δεσμούς, παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στο υπεριώδες ή ορατό φάσμα, σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος ( $\lambda_{\max}$ ) και με χαρακτηριστικούς συντελεστές μοριακής απόσβεσης ( $E_{\max}$ ) (Σχήμα 2.1.1).



Σχήμα 2.1.1: Φάσμα UV από έλαιο canola.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται μερικές απορροφήσεις που δίνουν τα λιπίδια στο UV. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι τιμές των μηκών κύματος μεταβάλλονται ανάλογα με τον εκάστοτε διαλύτη.<sup>28,29</sup>

Χρωμοφόρο	Ομάδα	$\lambda_{\max}$ (nm)	$E_{\max}$	Διαλύτης
-C=C-	Οκτένιο	177	12.600	Επτάνιο
-C=C-	Οκτύνιο	178	10.000	Επτάνιο
		196	2.100	
-C=C-C=C-	Βουταδιένιο	217	20.900	Εξάνιο
-(C=C) <sub>n</sub> -	Συζυγή πολυένια	217 +30 (n-2)	20.000-100.000	Εξάνιο
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	Βενζόλιο	184	47.000	Κυκλοεξάνιο
		202	7.000	
		255	230	
-(C=C-C=C) <sub>n</sub> -	β- καροτένιο	452	139.000	Εξάνιο
		478	12.200	
HC=O	Ακεταλδεύδη	290	17	Εξάνιο
C=O	Ακετόνη	275	17	Αιθανόλη
-COOH	Οξικό οξύ σε παλμιτικό	208-210	32-50	Αιθανόλη

Πίνακας 2.3: Μερικές απορροφήσεις που δίνουν τα λιπίδια στο UV. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι τιμές των μηκών κύματος μεταβάλλονται ανάλογα με τον εκάστοτε διαλύτη.<sup>28,29</sup>

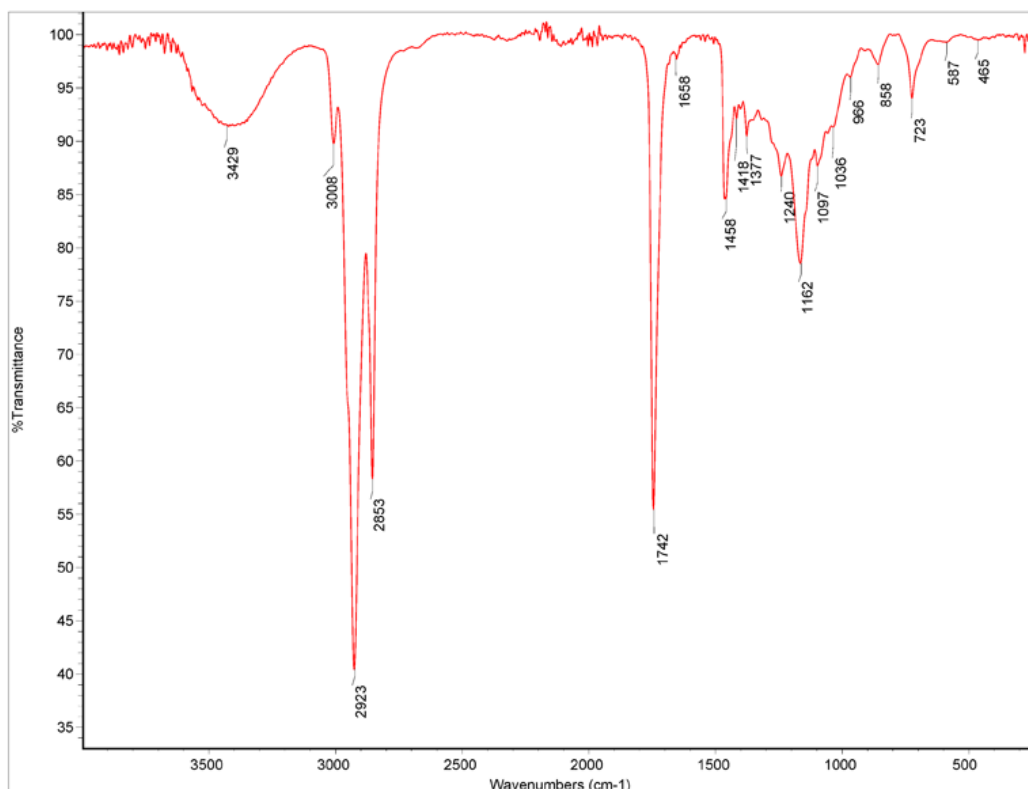
## 2) Φασματοσκοπία Υπέρυθρης Απορρόφησης

Το φάσμα IR ενός ελαίου παρέχει ουσιώδεις πληροφορίες για τη δομή και τις λειτουργικές ομάδες των λιπιδίων, καθώς επίσης και των προσμείξεων που εμπεριέχονται σε αυτά. Οι πληροφορίες αυτές παρουσιάζονται ως κορυφές ή ως ώμοι στο φάσμα.

Το σήμα που λαμβάνεται από την απορρόφηση στο IR, δίνει στους ερευνητές τη δυνατότητα να αναλύσουν και να επεξεργαστούν πληροφορίες σχετικά με τις δομικές και τις λειτουργικές ομάδες των λιπιδίων. Επίσης, καθώς η ένταση των κορυφών στο IR παρουσιάζει γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση των μορίων που απορροφούν, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες και για την ποσότητα των περιεχόμενων λιπιδίων.<sup>36</sup>

Η φασματοσκοπία IR έχει εφαρμοστεί κυρίως για στερεά λιπίδια, με σκοπό να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τον πολυμορφισμό, την κρυσταλλική δομή, τη διαμόρφωση και το μήκος της αλυσίδας. Στα έλαια, το IR συνήθως χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των trans λιπαρών οξέων. Οι απλοί trans δεσμοί παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική απορρόφηση στα  $968\text{ cm}^{-1}$  και η συχνότητα αυτή δεν αλλάζει για επιπρόσθετους διπλούς δεσμούς, εκτός αν αυτοί είναι συζευγμένοι. Δεν υπάρχει κάποια απορρόφηση που να δείχνει την παρουσία των cis δεσμών. Παρόλα αυτά, τα φάσματα Raman δείχνουν ισχυρή απορρόφηση στα  $1665\pm 1\text{ cm}^{-1}$  (cis ολεφινικοί διπλοί δεσμοί), στα  $1670\pm 1\text{ cm}^{-1}$  (trans ολεφινικοί διπλοί δεσμοί), στα  $2230\pm 1\text{ cm}^{-1}$  και  $2291\pm 2\text{ cm}^{-1}$  (ακετυλένιο) για τον τύπο της ακορεστότητας.<sup>37</sup>

Ερευνητές<sup>28</sup> έχουν παρουσιάσει τις χαρακτηριστικές συχνότητες απορρόφησης στο IR οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των κύριων ομάδων των λιπιδίων (Σχήμα 2.2.1). Επίσης έχουν αναφερθεί και οι συχνότητες των απορροφήσεων που οφείλονται στα φωσφολιπίδια.<sup>28</sup>



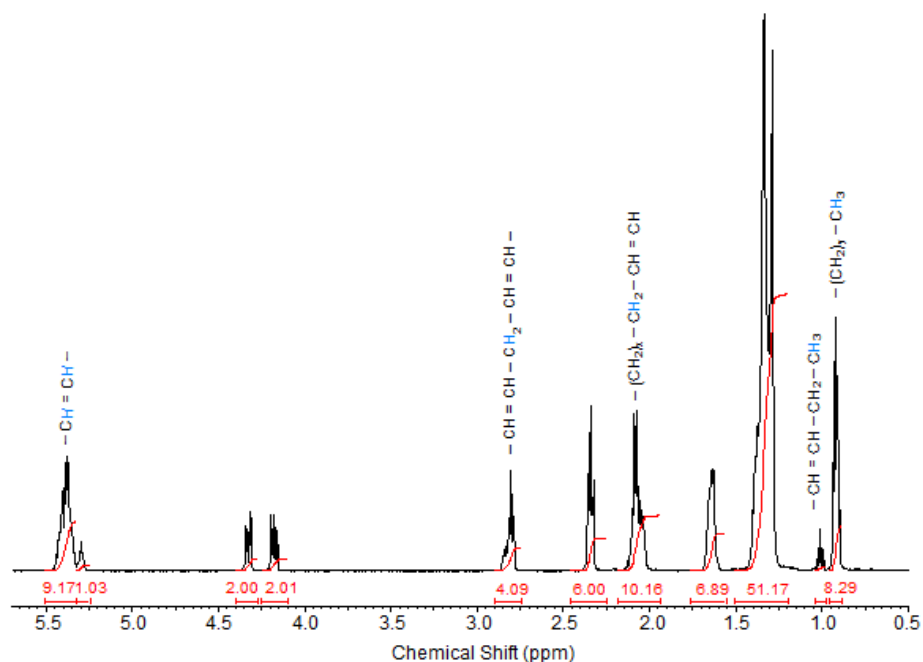
**Σχήμα 2.2.1:** Φάσμα IR του καστορέλαιου.

Η φασματοσκοπία FTIR έχει τη δυνατότητα μέτρησης του αριθμού ιωδίου, του βαθμού σαπωνοποίησης καθώς και του αριθμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων.<sup>38</sup> Ακόμη, με το FTIR είναι δυνατή η μελέτη και η οξειδωτική σταθερότητα των λιπιδίων, καθώς μπορούν να ληφθούν κορυφές που προκαλούνται από το σχηματισμό υπεροξειδίων και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης.<sup>36,39</sup>

### 3) Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η μέθοδος <sup>1</sup>H NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας, η οποία εφαρμόζεται σε έλαια φυτικής προέλευσης, δίνει αρκετά σήματα με καθορισμένες χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης (τύπος και περιοχή σχάσης). Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη και τον προσδιορισμό της δομής και της ποσότητας των λιπιδίων (Σχήμα 2.3.1). Η μέθοδος αυτή έχει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τη μέθοδο <sup>1</sup>H NMR χαμηλής διακριτικής ικανότητας, η οποία εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό των στερεών συστατικών του λίπους (βλέπετε ενότητα 2.3.A).





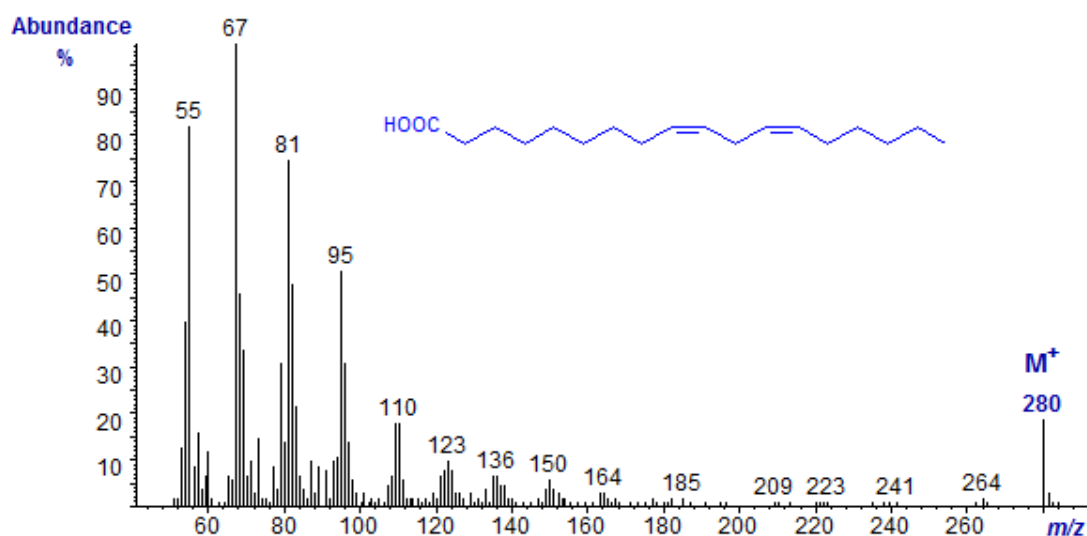
**Σχήμα 2.3.1:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR λιπιδικής φάσης του σογιέλαιου.

Τα φάσματα  $\text{NMR-}^{13}\text{C}$  είναι λιγότερο περίπλοκα από τα πρωτονιακά, παρέχουν περισσότερες πληροφορίες για τη δομή, έχουν όμως το μειονέκτημα ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ευρέως για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Η φασματοσκοπία  $\text{NMR-}^{13}\text{C}$  παρέχει επίσης τη δυνατότητα ταυτοποίησης των λειτουργικών ομάδων όπως είναι οι υδροξυ, οι εποξυ, καθώς και των ομάδων  $(\text{CH}_2)_n$  των αλυσίδων τους στα μόρια. Η εφαρμογή  $\text{NMR-}^{13}\text{C}$  στα TAG, για παράδειγμα, επιτρέπει τον προσδιορισμό της θέσης των λιπαρών οξέων στο σκελετό της γλυκερόλης.<sup>40,41</sup> Ο συντονισμός  $\text{NMR-}^{13}\text{C}$  της καρβονυλικής ομάδας στις θέσεις sn1 και sn3 μπορεί να διακριθεί αποτελεσματικά από αυτόν που είναι οφείλεται σε εστεροποίηση στη θέση sn2. Τα περισσότερα μη κορεσμένα λιπαρά οξέα στην sn2 θέση μπορούν να ταυτοποιηθούν σχετικά εύκολα. Η μέθοδος  $\text{NMR-}^{13}\text{C}$  έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό της θέσης των λιπαρών οξέων στα TAG, σε δείγματα όπως εκχυλίσματα φυτικής προέλευσης<sup>42-44</sup> και ιχθυέλαια.<sup>45,46</sup>

Η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας  $\text{NMR}$  βασίζεται στη δυνατότητα διαφοροποίησης κάθε πυρήνα ανάλογα με το χημικό του περιβάλλον. Αυτό σημαίνει ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα επηρεάζεται από την κατανομή των ηλεκτρονίων στους χημικούς δεσμούς του μορίου. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονιακή προστασία που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα του υδρογόνου (βλέπετε Κεφάλαιο 3).

#### 4) Φασματομετρία Μάζας

Στη φασματομετρία μάζας, τα μόρια βρίσκονται στην αέρια κατάσταση και ιονίζονται με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων σε θάλαμο ιονισμού. Το φάσμα μάζας που προκύπτει αποτελείται από χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες αντιπροσωπεύουν μοριακά θραύσματα με διαφορετικό λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ). Κάποιες από αυτές τις κορυφές αντιστοιχούν σε θραύσματα του μητρικού μορίου. Η μητρική κορυφή που προκύπτει από το μη θραυσατοποιημένο κλάσμα έχει τον υψηλότερο λόγο  $m/z$ , αλλά δεν υπάρχει πάντα, καθώς εξαρτάται από την πτητικότητα και τη θερμική σταθερότητα του κατιόντος του μορίου (Σχήμα 2.4.1).



Σχήμα 2.4.1: Φάσμα MS του λινολεϊκού οξέος (18:2).

Έτσι, τα λιπίδια που περιέχουν πολικές ομάδες, όπως είναι τα φωσφολιπίδια με χαμηλή θερμική σταθερότητα και πτητικότητα και με μεγάλο μοριακό βάρος, δεν μπορούν να αναλυθούν με την απλή εφαρμογή της φασματομετρίας μαζών. Για την ανάλυση αυτών των λιπιδίων απαιτείται γρήγορος βομβαρδισμός των ατόμων μέσω χημικού ιονισμού, πεδίου εκρόφησης ή φασματομετρίας μαζών δευτερογενούς ιόντος.

Η φασματοσκοπία MS συνδυάζεται κυρίως με τις χρωματογραφίες GC και HPLC, γεγονός που αποτελεί σημαντικό οδηγό για τον προσδιορισμό της δομής μεμονωμένων μορίων λιπιδίων. Με τη βοήθεια αυτού του συνδυασμού, οι ερευνητές έχουν αναπτύξει μεθόδους για την ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών των λιπαρών οξέων.<sup>47,48</sup>

#### 5) Ενζυμικές Μέθοδοι

Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ορισμένων κατάλληλων ενζύμων αποτελεί τρόπο ανάλυσης και προσδιορισμού των συστατικών των λιπιδικών εκχυλισμάτων.

Ερευνητές έχουν καταφέρει να αναπτύξουν μια ενζυμική μέθοδο<sup>49</sup> η οποία είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του περιεχομένου των δειγμάτων σε τριγλυκερίδια (TAG). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την αντίδραση των TAG με το ένζυμο λιπάση με σκοπό να ληφθούν γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη που παράγεται, μετατρέπεται στη συνέχεια σε α- γλυκεροφωσφορικό οξύ, με τη δράση της κινάσης της γλυκερόλης.

Το ένζυμο δεϋδρογονάση του α- γλυκεροφωσφορικού οξέος χρησιμοποιείται για την αναγωγή του νικοτινάμιδο αδένινο διφωσφατιδίου (NAD), σε NADH. Το NADH που παράγεται μπορεί να μετρηθεί στη συνέχεια με μια χρωματομετρική αντίδραση.

Η οξειδάση της χοληστερόλης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), με τις cis- μεθυλενικές ομάδες ανάμεσα στους διπλούς δεσμούς τους, όπως είναι το λινολενικό οξύ, το λιγνολαϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ, μπορούν να μελετηθούν ποσοτικά με την απορρόφηση UV των συζυγών διενό- υδροπεροξειδίων που παράγονται από την αντίδραση κατάλυσης με το ένζυμο λιποξειδάση. Στο φάσμα UV, η κορυφή η οποία εμφανίζεται στα 238 nm, δηλώνει την ύπαρξη των διενο- υδροπεροξειδίων. Η κορυφή αυτή είναι η ίδια για όλα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Οι Brockerhoff και Yukowski<sup>50</sup>, ανέπτυξαν μια μέθοδο στερεοειδικής ανάλυσης των TAG, η οποία χρησιμοποιεί το ένζυμο παγκρεατική λιπάση για την απομάκρυνση των λιπαρών οξέων από τις θέσεις sn-1 και sn-3 των TAG. Αυτή η διαδικασία έχει πρόσφατα εφαρμοστεί στον προσδιορισμό των διαφορών στη δομή των ιχθυελαίων και του ελαίου της φώκιας. Το ένζυμο φωσφολιπάση A2 χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των λιπαρών οξέων από τη θέση sn-2 του φωσφατιδίου που συντίθεται κατά την διαδικασία.

Ο Lands<sup>51</sup> ανέπτυξε μια διαφορετική προσέγγιση για τον προσδιορισμό των εστερικών θέσεων των λιπαρών οξέων. Το TAG υδρολύεται με τη δράση της λιπάσης και τα προϊόντα που παράγονται, διαχωρίζονται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Το sn-3 υδροξύλιο της γλυκερόλης φωσφορυλιώνεται με τη δράση της κινάσης της διγλυκερόλης, με σκοπό την παραγωγή 3- φωσφορυλο μονοακυλογλυκερόλης. Στο επόμενο στάδιο της ανάλυσης, η φωσφολιπάση A2 χρησιμοποιείται για να απομακρύνει τα λιπαρά οξέα, μόνο από τη θέση sn-2. Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στη θέση sn-1 μπορούν να απομακρυνθούν με σαπωνοποίηση του προκύπτοντος 1- ακυλο, λυσοφωσφατιδικού οξέος. Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στις θέσεις 1 και 2 ταυτοποιούνται με ανάλυσή τους με χρωματογραφία GC. Η σύσταση των λιπαρών οξέων που βρίσκονται στην θέση 3, είναι δυνατόν να υπολογιστεί με σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που λαμβάνονται από τον προσδιορισμό της σύστασης όλων των λιπαρών οξέων στα TAG.

## 6) Ανοσοχημικές Μέθοδοι

Γενικά, τα λιπίδια δεν είναι ιδιαίτερα ανοσογενή. Παρόλα αυτά τα περισσότερα γλυκολιπίδια, εκτός από την καθαρή τους μορφή, έχουν αντισώματα υψηλής δραστηριότητας και ειδικότητας. Ως εκ τούτου, τα γλυκολιπίδια χορηγούνται στο ζώο με σύζευξη με ομοιοπολικό δεσμό πάνω σε μια ξένη πρωτεΐνη ή χρησιμοποιούνται ως μέρος της διπλοστιβάδας ενός λιποσώματος, με σκοπό να διεγείρουν την παραγωγή ειδικών αντισωμάτων.<sup>9,11</sup>

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί επίσης για τον έλεγχο των φωσφολιπιδίων και των TAG.<sup>9</sup> Οι στεροειδείς ορμόνες, όταν συζεύγνυνται με αλβουμίνη ορού, είναι επαρκώς ανοσογενείς και μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή αντισωμάτων με υψηλή δραστηριότητα γεγονός που επιτρέπει την ανίχνευσή τους.

Η ανοσοχρώση των πλακών TLC για την ανίχνευση και τον έλεγχο των γλυκοπρωτεϊνών είναι μία μέθοδος που εφαρμόζεται αρκετά συχνά. Το χρωματογράφημα που προκύπτει από την TLC περιέχει διαχωριζόμενα γλυκολιπίδια και υφίσταται επεξεργασία με ένα ραδιοσημασμένο ειδικό αντίσωμα (συνήθως <sup>125</sup>I), ώστε να χρωματιστεί μόνο το αντιγόνο του γλυκολιπιδίου, ακόμη και παρουσία πολλών γλυκολιπιδίων που δεν μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Η ανίχνευση του <sup>125</sup>I μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας αυτοραδιογραφία. Η χρωματογραφική κινητικότητα και η χρώση του αντισώματος, μπορεί να βοηθήσει την ταυτοποίηση του γλυκολιπιδίου.<sup>29,52</sup>

Για να ξεπεραστεί η χαμηλή ευαισθησία που έχει η ραδιοεπισημασμένη ανίχνευση των γλυκολιπιδίων, αναπτύχθηκε η μέθοδος ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay). Στην τεχνική αυτή, το λιπίδιο είναι συνήθως ενωμένο με μια στερεή φάση και το αντίσωμα μετράται είτε μέσω του ίδιου μεταφέροντος ενζύμου, είτε χρησιμοποιώντας ένα δεύτερο αντίσωμα, το οποίο φέρει το ένζυμο.<sup>29</sup>

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Belitz, . H. D. and W. Grosch. *Food Chemistry*. Springer-Verlag, New York **1987**.
- (2) D. E. Carpenter, J. N. Ngvainti, and S. L. Lipid Analysis. *Methods Anal. Nutr. Labeling (D. M. Sullivan D. E. Carpenter, eds.)*. AOAC Press. Arlington, VA **1993**, 85–104.
- (3) W. R. Bloor. Outline of a Classification of the Lipids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1920**, *17*, 138–140.
- (4) W. W. Christie. *Lipid Analysis*. Pergamon Press. Oxford, **1982**.
- (5) Y. Pomeranz and C. L. Meloan. *Food Analysis; Theory and Practice, 4th Ed.* AVI, Westport, CT,; **1994**.
- (6) D. C. Zimmerman. The Relationship between Seed Density and Oil Content in Flax. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1962**, *39*, 77–78.
- (7) J. L. Rodrigneuz-Otero-, M. Hermida, and A. C. Determination of Fat Protein and Total Solids in Cheese by near IR Reflectance Spectroscopy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **1995**, *78*, 802–807.
- (8) M. H. Lee, A. G. Carinato, D. M. Mayod, and B. A. R. Noninvasive Short Wave-Length Neon IR Spectroscopic Method to Exhibit the Crude Lipid Content in the Muscle of Intact Rainbow Trout. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2176–2179.
- (9) D. A. Biggs. Milk Analysis with the Infrared Milk Analyzer. *J. Dairy Sci.* **1967**, *50*, 799–803.
- (10) T. M. Eads and W. R. Croasmun. NMR Application to Fats and Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65*, 78–83.
- (11) Earle, T. F. C. and F. R. Nuclear Magnetic Resonance for Determining Oil Content of Seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1963**, *44*, 265–268.
- (12) D. E. Alexander, L. Silvela, I. Collins, and R. C. R. Analysis of Oil Content of Maize by Wide-Line NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1967**, No. 44, 555–558.
- (13) I. Collins, D. E. Alexander, R. C. Rodgers, and L. S. Analysis of Oil Content of Soybean by Wide-Line NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1967**, *44*, 708–710.
- (14) J. A. Robertson and W. R. Windham. Comparative Study of Methods of Determining Oil Content of Sunflower Seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 993–996.

- (15) D. B. Min. Crude Fat Analysis. *Introd. to Chem. Anal. Foods* (S. S. Neilson, ed.). Jones Bartlett, London, **1994**, 81–192.
- (16) C. Beauvallet and J.-P. Renou. Application of NMR Spectroscopy in Meat Research. *Trends Food Sci. Technol.* **1992**, *3*, 197–199.
- (17) M. J. Gidley. High-Resolution Solid State NMR of Food Materials. *Trends Food Sci. Technol.* **1992**, *3*, 231–236.
- (18) G. Haugaard and J. D. Pettinati. Photometric Milk Fat Determination. *J. Dairy Sci.* **1959**, *42*, 1255–1275.
- (19) I. Katz, M. Keeney, and R. B. Caloric Determination of Fat in Milk and Saponification Number of a Fat by the Hydroxamic Acid Reaction. *J. Dairy Sci.* **1959**, *42*, 903–906.
- (20) J. W. Fitzgerald, G. R. Rings, and W. C. W. Ultrasonic Method for Measurement of Fluid Non-Fat and Milk Fat in Fluid Milk. *J. Dairy Sci.* **1961**, *44*, 1165.
- (21) R. R. Allen. Determination of Unsaturation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1955**, *32*, 671–674.
- (22) F. R. van de Voort, J. Sedman, G. Emo, and A. A. I. Rapid and Direct Iodine Value and Saponification Number Determination of Fats and Oils by Attenuated Total reflectance/Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 1118–1123.
- (23) Y. B. Che Man, G. Setiowatry, and F. R. van de V. Determination of Iodine Value of Palm Oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**, 693–699.
- (24) H. Li, F. R. van de Voort, A. A. Ismail, J. Sedman, R. Cox, C. Simard, and H. B. Discrimination of Edible Oil Products and Quantitative Determination of Their Iodine Value by Fourier Transform–neon Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 29–36.
- (25) Y. B. Che Man, N. H. Moh, and F. R. van de V. Determination of Free Fatty Acids in Crude Palm Oil and Refined Bleached Deodorized Palm Olein Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**, 485–490.
- (26) A. A. Ismail, F. R. van de Voort, and J. S. Rapid Quantitation and Determination of Free Fatty Acids in Fats and Oils by FTIR Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 335–341.
- (27) M. P. Purdon. Application of HPLC to Lipid Separation and Analysis: Sample Preparation. *Anal. Fats, Oils, Lipoproteins* (E. G. Perkins, ed.). AOCS Press. Champaign, IL, **1991**, 166–192.

- (28) M. Kates. *Techniques of Lipidology*, 2nd Ed. Elsevier, New York.
- (29) Hawthorne, F. W. H. and J. N. *Lipid Analysis*. BIOS Scientific, Oxford; **1986**.
- (30) R. Huopalahti, P. Laakso, J. Saaristo, R. Linko, and H. K. Preliminary Studies on Triacylglycerols of Fats and Oils by Capillary SFC. *J. High Resolut. Chromatogr. Chro- matogr. Commun* **1988**, *11*, 899–902.
- (31) F. O. Geiser, S. G. Yocklovich, S. M. Lurcott, J. W. Guthrie, and E. J. L. Water as a Stationary Phase Modified in Packed-Column Supercritical Fluid Chromatography I. Separation of Free Fatty Acids. *J. Chromatogr.* **1988**, *459*, 173–181.
- (32) A. Nomura, J. Yamada, K. Tsunoda, K. Sakaki, and T. Y. Supercritical Fluid Chromatographic Determination of Fatty Acids and Their Esters on an ODS-Silica Gel Column. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2076–2078.
- (33) M. Demirbaker and G. Blomberg. Group Separation of Triacylglycerols on Micropacked Argentation Columns Using Supercritical Media as Mobile Phases. *J. Chromatogr. Sci.* **1990**, *28*, 67–72.
- (34) M. Demirbaker and G. Blomberg. Separation of Triacylglycerols: Supercritical Fluid Argentation Chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, *550*, 765–774.
- (35) N. C. Shantha and G. E. Napolitano. *Lipid Analysis Using Thin Layer Chromatography and Iatroscan*; **1998**.
- (36) Sedman, F. R. van de V. and J. FTIR Spectroscopy: The next Generation of Oil Analysis Methodologies? *Inform* **2000**, *11*, 614–620.
- (37) Gunstone, F. D. *Fatty Acid and Lipid Chemistry* Blackie, London, UK,. **1996**.
- (38) F. R. van de Voort. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Applied to Food Analysis. *Food Res. Int.* **1992**, *25*, 397–403.
- (39) J. Sedman, A. A. Ismail, A. Nicodemo, S. Kubow, and F. van de V. Application of FTIR/ATR Differential Spectroscopy for Monitoring Oil Oxidation and Antioxidant Efficiency. *Nat. Antioxidants Chem. Heal. Appl.* (F. Shahidi, ed.). AOCS Press. Champaign, IL, **1996**, No. 358-378.
- (40) J. N. Schoolery. Some Quantitative Applications of Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectros.* **1977**, *11*, 79–93.
- (41) Shiao, T. Y. S. and M. S. Determination of Fatty Acid Composition of Triacylglycerols by High Resolution NMR Spectroscopy. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **1989**, *30*, 191–199.

- (42) Ng., S. N. and W. L.  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopic Analysis of Fatty Acid Composition of Palm Oil. *J. Am. Chem. Soc* **1983**, *60*, 266–268.
- (43) K. F. Wallenberg. Quantitative high resolution.  $^{13}\text{C}$  NMR of the Olefinic and Carbonyl Carbons of Edible Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990**, *67*, 487–494.
- (44) F. D. Gunstone. The C-13 NMR Spectra of Oils Containing  $\Gamma$ -Linolenic Acid. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *56*, 201–207.
- (45) Gunstone, F. D. High Resolution NMR Studies of Fish Oils. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *59*, 83–89.
- (46) M. Aursand, L. Jørgensen, and H. G. Positional Distribution of  $\omega$ 3 Fatty Acids in Marine Lipid Triacylglycerols by High Resolution  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 293–297.
- (47) J.-L. Le Quere, E. Semon, B. Lanher, and J. L. S. On-Line Hydrogenation in GC-MS Analysis of Cyclic Fatty Acid Monomers Isolated from Heated Linseed Oil. *Lipids* **1989**, *24*, 347–350.
- (48) J.-L. Le Quere. Gas Chromatography Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *New Trends Lipids Lipoprotein Anal. (J.-L. Sebedio E. G. Park. eds.)*. AOCS Press. Champaign, IL, **1995**.
- (49) Higgins, T. Evaluation of a Colorimetric Triglyceride Method on the KDA Analyzer. *J. Clin. Lab. Autom.* **1984**, *4*, 162–165.
- (50) Yurkowski, H. B. and M. Stereospecific Analysis of Several Vegetable Fats. *J. Lipid Res.* **1966**, *7*, 62–64.
- (51) Lands, W. E. M. Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **1965**, *34*, 313–346.
- (52) P. Alaupovic and E. Koren. Immunoaffinity Chromatography of Plasma Lipoprotein Particles. *Anal. Fats, Oils, Lipoproteins (E. G. Perkins, ed.)*. AOCS Press. Champaign, IL, **1991**, 599–622.



### **3. ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ-ΒΑΣΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ**

#### **3.1 Χημική Μετατόπιση**

Η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας NMR βασίζεται στη δυνατότητα διαφοροποίησης κάθε πυρήνα ανάλογα με το χημικό του περιβάλλον. Αυτό σημαίνει ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα επηρεάζεται από την κατανομή των ηλεκτρονίων στους χημικούς δεσμούς του μορίου. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονική προστασία που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα του υδρογόνου.<sup>1</sup>

Στην περίπτωση σφαιρικής κατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας, όπως για παράδειγμα στο άτομο του υδρογόνου, το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο ( $B_0$ ) προκαλεί κίνηση φορτίου με αποτέλεσμα τη δημιουργία μαγνητικής συνιστώσας αντίθετης φοράς του  $B_0$  (διαμαγνητική προστασία). Ο πυρήνας υφίσταται μαγνητικό πεδίο ίσο με  $B=B_0(1-\sigma)$ , όπου η σταθερά προστασίας  $\sigma$ , μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο του Lamb με βάση την ηλεκτρονική πυκνότητα  $\rho(r)$  που περιβάλλει τον πυρήνα:

$$\sigma = (\mu_0 e^2 / 3m_e) \int_0^\infty r \rho(r) dr \quad [3.1]$$

όπου  $\mu_0$  είναι η μαγνητική ροπή στην κατάσταση ισορροπίας,

$e$  το φορτίο του ηλεκτρονίου,

$m_e$  η μάζα του ηλεκτρονίου και

$\rho(r)$ , είναι μια παράμετρος που περιγράφει την ηλεκτρονική πυκνότητα ως συνάρτηση της απόστασης  $r$  από τον πυρήνα.

Στα περισσότερα μόρια η ηλεκτρονική κατανομή γύρω από τον πυρήνα δεν είναι σφαιρική και η κυκλοποίηση των ηλεκτρονίων, λόγω της επίδρασης του μαγνητικού πεδίου  $B_0$ , είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη. Ως συνέπεια, προκαλείται μείωση του διαμαγνητικού αποτελέσματος. Αυτή η μείωση μπορεί να περιγραφεί με μια μαγνητική ροπή που ενισχύει την ένταση του εξωτερικού πεδίου  $B_0$ . Με άλλα λόγια το μαγνητικό πεδίο προκαλεί την ανάμιξη της βασικής και της διεγερμένης ενεργειακής κατάστασης του ηλεκτρονίου, που εκδηλώνεται με τη δημιουργία μαγνητικής ροπής με κατεύθυνση ίδια με εκείνης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (παραμαγνητικό αποτέλεσμα). Η σταθερά  $\sigma$  είναι το άθροισμα της διαμαγνητικής και της παραμαγνητικής συνιστώσας που προκύπτουν από την κίνηση των ηλεκτρονίων,

$$\sigma = \sigma_d(\text{διαμαγνητική}) + \sigma_p(\text{παραμαγνητική}) \quad [3.2]$$

Σημειώνεται, πως ο παραμαγνητικός όρος αναφέρεται σε παραμαγνητισμό ανεξάρτητο της θερμοκρασίας, ο οποίος είναι εντελώς διαφορετικός στην προέλευση από τον εξαρτημένο από τη θερμοκρασία παραμαγνητισμό του spin του

ηλεκτρονίου. Η παράμετρος  $\sigma_p$  έχει ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση ετεροπυρήνων όπως  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$  κλπ. όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Για την καλύτερη μελέτη της σταθεράς προστασίας ενός πυρήνα είναι χρήσιμος ο διαχωρισμός της σε τέσσερις παράγοντες<sup>2</sup>:

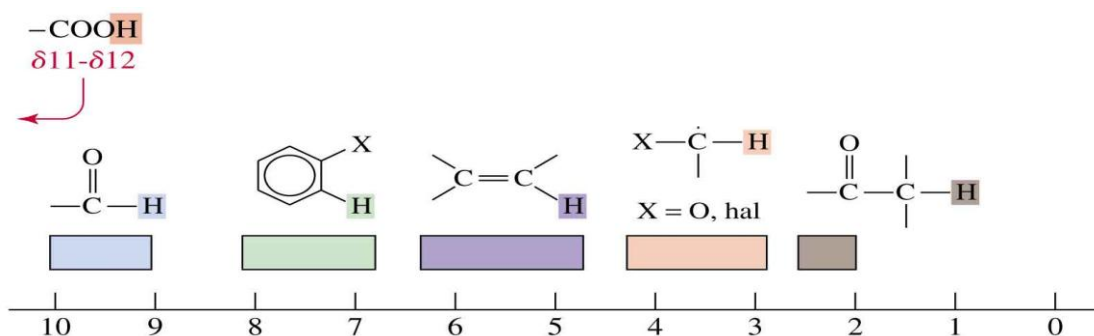
- (i) τοπική διαμαγνητική προστασία,
- (ii) τοπική παραμαγνητική προστασία,
- (iii) μαγνητική ανισοτροπία,
- (iv) επίδραση διαλύτη και δεσμών υδρογόνου.

Οι παράγοντες αυτοί αναλύονται διεξοδικά παρακάτω:

### 3.2 Τοπική Διαμαγνητική Προστασία

Η συνεισφορά των τοπικών διαμαγνητικών ρευμάτων στην τιμή της χημικής μετατόπισης εξαρτάται από την ηλεκτρονική πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα: όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονική πυκνότητα, τόσο μεγαλύτερη είναι η προστασία.<sup>1</sup> Ο παράγοντας αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία στην κλίμακα χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου.

Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων του  $^1\text{H}$  εκτείνεται σε μια περιοχή  $\approx 20$  ppm που μπορεί να χωριστεί σε μικρότερα τμήματα όπως αυτά των αλειφατικών πρωτονίων, των ολεφινικών, των ακετυλενικών, των πρωτονίων αρωματικών δακτυλίων και, τέλος, των πρωτονίων της καρβοξυλομάδας και της αλδεϋδομάδας. Για τα αλειφατικά πρωτόνια (C-H) η σταθερά προστασίας μειώνεται κατά τη σειρά  $\text{CH}_3 > \text{CH}_2 > \text{CH}$ . Η συχνότητα συντονισμού των ολεφινικών, ακετυλενικών και αρωματικών πρωτονίων ακολουθεί τη σειρά  $\text{C}_6\text{H}_6 > \text{CH}_2=\text{CH}_2 > \text{CH}\equiv\text{CH}$ , η οποία δεν συμφωνεί με τη σειρά «οξύτητας» των υδρογόνων, εξηγείται όμως με βάση την ανισοτροπία των χημικών δεσμών. Υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων προκαλούν μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε υψηλότερες συχνότητες, όπως η σειρά F-CH, Cl-CH και I-CH (Σχήμα 3.1). Κατ'επέκταση, σε υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων, το πρωτόνιο συντονίζεται σε χαμηλότερες τιμές συχνότητας. Τέλος, τα σήματα των πρωτονίων των ομάδων -OH, -NH, -COOH χρήζουν ιδιαίτερης μελέτης, διότι εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του δείγματος, το διαλύτη και τη θερμοκρασία. Το μεγάλο εύρος των μεταβολών στη χημική μετατόπιση των σημάτων των παραπάνω ομάδων οφείλεται στην ικανότητα των πρωτονίων αυτών των ομάδων να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου και σε φαινόμενα ανταλλαγής.



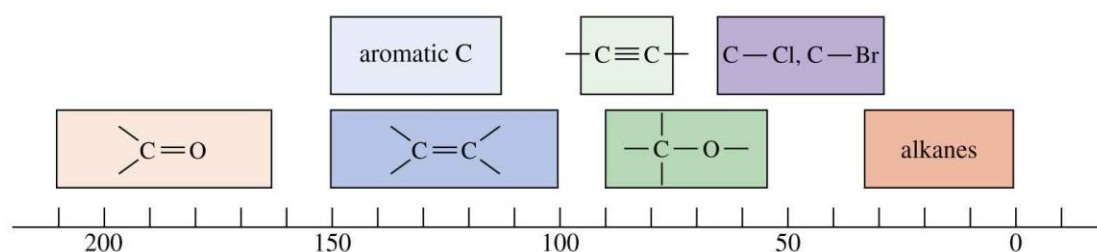
**Σχήμα 3.1:** Εύρος των χημικών μετατοπίσεων πρωτονίου διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων.<sup>3</sup>

### 3.3 Τοπική Παραμαγνητική Προστασία

Η τοπική παραμαγνητική προστασία εξαρτάται από το αντίστροφο του κύβου της ακτίνας των τοπικών ηλεκτρονίων σθένους, δηλαδή τον όρο  $\langle 1/r^3 \rangle$ , όπου  $r$  η ακτίνα του Bohr, τη μέση ενέργεια διέγερσης των ηλεκτρονίων  $\Delta E$ , και τους παράγοντες πυκνότητας φορτίου ( $Q_{AA}$ ) και κλάσματος δεσμού των τροχιακών  $p$  (ή  $d$ ) ( $\Sigma Q_{AB}$ ) (Εξίσωση [3.3]).

$$\sigma_p = (e^2 h / 8\pi^2 m_e c^2) \times (1/\Delta E) \times (1/\langle r^3 \rangle) \times 2p [Q_{AA} + \Sigma_{A \neq B} Q_{AB}] \quad [3.3]$$

Συγκεκριμένα, μεγάλες τιμές του όρου  $\langle 1/r^3 \rangle$ , προκαλούν μεγάλες μεταβολές στην πυρηνική προστασία.<sup>4</sup> Δεδομένου ότι η παραμαγνητική προστασία οφείλεται και στην ανάμιξη της βασικής και της διεγερμένης ενεργειακής κατάστασης του ηλεκτρονίου είναι προφανές ότι χαμηλές ενέργειες διέγερσης οδηγούν σε μεγάλες τιμές της παραμαγνητικής αποπροστασίας. Τέλος είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό ότι η πολλαπλότητα του δεσμού [ $Q_{AA} + \Sigma Q_{AB}$ ] είναι ανάλογη της συνεισφοράς της παραμαγνητικής προστασίας στη χημική μετατόπιση. Ο παράγοντας αυτός έχει καθοριστική σημασία στις χημικές μετατοπίσεις ετεροπυρήνων όπως του άνθρακα-13 (Σχήμα 3.2).



**Σχήμα 3.2:** Εύρος των χημικών μετατοπίσεων άνθρακα-13 διαφόρων οργανικών λειτουργικών ομάδων.<sup>3</sup>

Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων  $^{13}\text{C}$  είναι περίπου 200 ppm για τις συμβατικές οργανικές ενώσεις. Είναι, συνεπώς, σε σχέση με την κλίμακα χημικών μετατοπίσεων

<sup>1</sup>H περίπου 10-15 φορές μεγαλύτερη. Γενικά, η συχνότητα συντονισμού εμφανίζεται σε μικρότερες τιμές σε άνθρακα υβριδισμού sp<sup>3</sup> σε σχέση με άνθρακα υβριδισμού sp<sup>2</sup>.<sup>3</sup>

$$Csp^2 < Csp < Csp^3 \quad (\delta_{TMS} = 0)$$

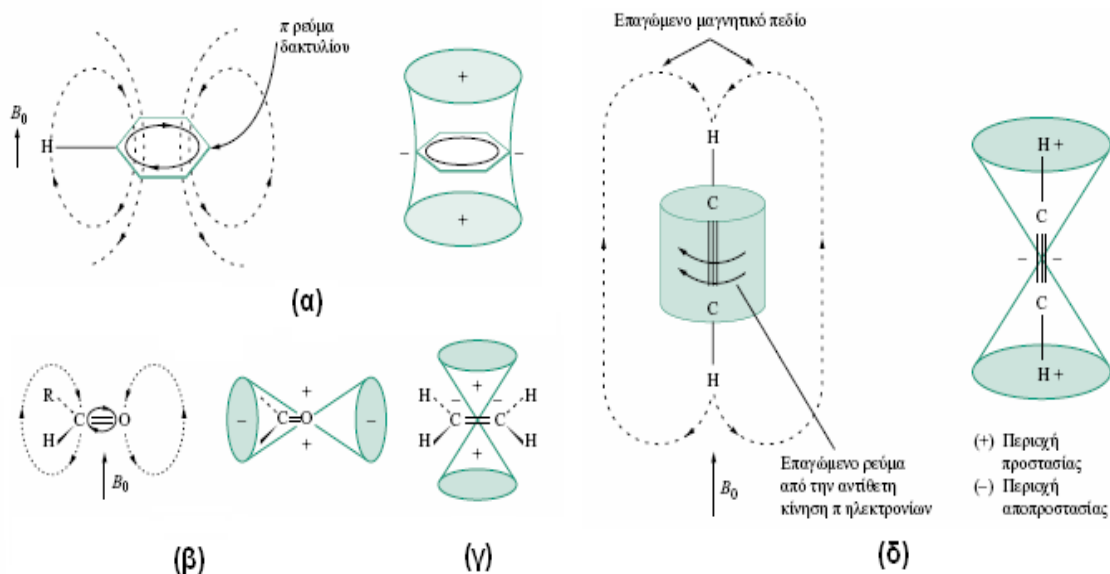
Υποκαταστάτες X δέκτες ηλεκτρονίων προκαλούν σημαντική αποπροστασία (μεγαλύτερες τιμές δ) στον α-C και σε μικρότερο βαθμό στον β-C (Πίνακας 3.1).

X	A	B	γ
CH <sub>3</sub>	+9	+10	-2
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	+23	+9	-2
OCH <sub>3</sub>	+58	+8	-4
COCH <sub>3</sub>	+30	+1	-2
NH <sub>2</sub>	+29	+11	-5
NO <sub>2</sub>	+63	+4	-
CN	+4	+3	-3
F	+68	+9	-4
Cl	+31	+11	-4

**Πίνακας 3.1:** Μετατοπίσεις <sup>13</sup>C σε ppm λόγω της ομάδας X στην αλληλουχία X – Cα – Cβ – Cγ<sup>3</sup>.

### 3.4 Μαγνητική Ανισοτροπία

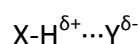
Σημαντικός παράγοντας της σταθεράς προστασίας, που έχει ιδιαίτερη σημασία σε πυρήνες <sup>1</sup>H, περιλαμβάνει την επίδραση των ηλεκτρονιακών νεφών πολλαπλών δεσμών στα γειτονικά πρωτόνια. Με την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα π ηλεκτρόνια πολλαπλών δεσμών δημιουργούν επαγόμενα μαγνητικά πεδία, τα οποία έχουν ανισότροπη κατανομή σε σχέση με τον άξονα του δεσμού και είναι, συνεπώς, κατά περιοχές διαμαγνητικά ή παραμαγνητικά. Η μαγνητική ανισοτροπία που παρουσιάζει το μόριο του βενζολίου και γενικότερα τα αρωματικά συστήματα είναι ίσως το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα. Αναλυτικότερα υπό την επίδραση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B<sub>0</sub>, δημιουργείται από την κίνηση των π ηλεκτρονίων, επαγωγικό ρεύμα, το λεγόμενο «π ρεύμα δακτυλίου». Η κατεύθυνση του ρεύματος αυτού είναι τέτοια ώστε το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο B' να έχει φορά αντιπαράλληλη ως προς το B<sub>0</sub>. Λόγω των μαγνητικών γραμμών του δευτερογενούς μαγνητικού πεδίου B', το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο επί των πρωτονίων βενζολικού δακτυλίου έχει παράλληλη φορά ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B<sub>0</sub> με συνέπεια τα πρωτόνια να αποπροστατεύονται και να συντονίζονται σε μεγαλύτερες συχνότητες. Παρόμοια φαινόμενα μαγνητικής ανισοτροπίας παρουσιάζουν ο τριπλός και ο διπλός δεσμός μεταξύ ατόμων άνθρακα, και ο καρβονυλικός δεσμός όπως εικονίζονται στο Σχήμα 3.3.



**Σχήμα 3.3:** Μαγνητική ανισοτροπία (α) βενζολικού δακτυλίου, (β) καρβονυλικού δεσμού (C=O), (γ) διπλού δεσμού μεταξύ δύο ανθράκων (C=C), (δ) τριπλού δεσμού μεταξύ ανθράκων (C≡C).<sup>3</sup>

### 3.5 Επίδραση του Διαλύτη και των Δεσμών Υδρογόνου

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερά προστασίας, περιλαμβάνει επιδράσεις του διαλύτη, φαινόμενα ηλεκτρικού πεδίου, δεσμούς υδρογόνου κτλ. Ο σχηματισμός ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου ασκεί μεγάλη επίδραση στις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων και, ειδικότερα, στην περίπτωση πυρήνων πρωτονίου, προκαλεί σημαντική μείωση της σταθεράς προστασίας των. Ας θεωρήσουμε για παράδειγμα το δεσμό  $O-H \cdots O$ , στον οποίο το πρωτόνιο βρίσκεται ανάμεσα στο ηλεκτρονικό νέφος των δύο ατόμων οξυγόνου, αφού η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων οξυγόνου είναι συνήθως μικρότερη από το άθροισμα των ακτίνων van der Waals των ατόμων οξυγόνου. Θα μπορούσε λοιπόν να υποθεθεί ότι επέρχεται αύξηση στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πυρήνα υδρογόνου που αναμένεται να προκαλέσει αύξηση του διαμαγνητικού όρου της σταθεράς προστασίας.<sup>2</sup> Προφανώς, η πειραματικά παρατηρούμενη αποπροστασία του εμπλεκόμενου σε δεσμό υδρογόνου πρωτονίου οφείλεται σε άλλους παράγοντες, όπως η διατάραξη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του ομοιοπολικού δεσμού X-H από την παρουσία του δότη Y:



Σύμφωνα με μία διαφορετική θεώρηση, το ηλεκτροστατικό πεδίο του δεσμού υδρογόνου τείνει να έλξει το υδρογόνο προς το Y και να απομακρύνει τα δεσμικά ηλεκτρόνια του δεσμού X-H προς το X, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του υδρογόνου και επομένως αύξηση της αποπροστασίας του.<sup>2</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ενδομοριακοί δεσμοί

υδρογόνου που μπορούν να σχηματιστούν όταν η διαμόρφωση του μορίου είναι τέτοια, ώστε τα άτομα που αλληλεπιδρούν να βρεθούν στην κατάλληλη, για τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου, γεωμετρία. Οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό σε στερεά φάση και σε κατάσταση διαλύματος τόσο σε πρωτικούς όσο και σε μη πρωτικούς διαλύτες. Η ύπαρξη ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου σε φυσικά προϊόντα έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία NMR-<sup>1</sup>H, όπως στην περίπτωση των ανιόντων δικαρβοξυλικών οξέων, μηλεϊνικού και διμεθυλομηλονικού, όπου το πρωτόνιο που συμμετέχει στον ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου συντονίζεται στα 20 και 19 ppm αντίστοιχα.<sup>5</sup>

### 3.6 Σταθερές Σύζευξης

Τα σήματα συντονισμού πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλα πρωτόνια ή άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών, τα οποία έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται σύζευξη spin - spin και οφείλεται στη μέσω δεσμών αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών είναι ότι ισαπέχουν μεταξύ τους κατά μια σταθερά  $J$  που καλείται σταθερά σύζευξης και είναι ανεξάρτητη από την ένταση του πεδίου  $B_0$ . Η σταθερά σύζευξης ( $J$  coupling) εξαρτάται από τους γυρομαγνητικούς λόγους των πυρήνων που βρίσκονται σε σύζευξη, τη δομή και τη γεωμετρία του μορίου. Για το λόγο αυτό η τιμή της σταθεράς σύζευξης ποικίλει. Η σταθερά σύζευξης έχει τόσο μεγαλύτερη τιμή όσο πλησιέστερα βρίσκονται οι πυρήνες που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών. Η σταθερά  $J$  διακρίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεσμών που χωρίζουν τους πυρήνες που συζευγνύονται ( $^nJ$ , όπου  $n$  ο αριθμός των δεσμών).<sup>6,7</sup>

### 3.7 Ομοπυρηνική Σύζευξη Spin-Spin <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (Spin-Spin Coupling)

Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων που γειτνιάζουν με άλλους πυρήνες πρωτονίων εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών. Η πολλαπλότητα των σημάτων συντονισμού (λεπτή υφή του φάσματος) εξηγείται θεωρητικά με την παραδοχή της αλληλεπίδρασης των πυρηνικών μαγνητικών διπόλων με ενδιάμεση σύζευξη με τα μαγνητικά ηλεκτρονικά δίπολα των ηλεκτρονίων του δεσμού. Οι διάφοροι προσανατολισμοί spin ενός πυρήνα αντιπροσωπεύουν ασθενή μαγνητικά πεδία, που μεταφέρονται μέσω των ηλεκτρονίων σθένους στο γειτονικό πυρήνα τροποποιώντας έτσι το εξωτερικό πεδίο, με αποτέλεσμα την πολλαπλότητα ενός σήματος συντονισμού. Οι μεγαλύτερες τιμές στη σταθερά σύζευξης παρατηρούνται μεταξύ πρωτονίων που απέχουν δύο ( $^2J$ ) έως τρεις ( $^3J$ ) δεσμούς. Όταν η πληροφορία της σύζευξης μεταδίδεται μέσα από μια σειρά  $\sigma$  δεσμών μειώνεται τουλάχιστον κατά μια τάξη μεγέθους για κάθε ενδιάμεσο δεσμό. Σε ορισμένα άκαμπτα συστήματα η σύζευξη πρωτονίου-πρωτονίου έχει σχετικά μεγάλη τιμή ακόμη και όταν παρεμβαίνουν τέσσερις ( $^4J$ ) δεσμοί. Η πληροφορία της σύζευξης μπορεί να μεταφερθεί διαμέσου τεσσάρων ή πέντε δεσμών στα αρωματικά συστήματα όπου τα  $\pi$  ηλεκτρόνια έχουν σαφώς σημαντικό ρόλο. Συζεύξεις μακράς αλυσίδας γίνονται

εμφανείς όταν μεταφέρονται μέσα από μια σειρά πολλαπλών δεσμών (πχ. αλληλικά συστήματα).<sup>2</sup>

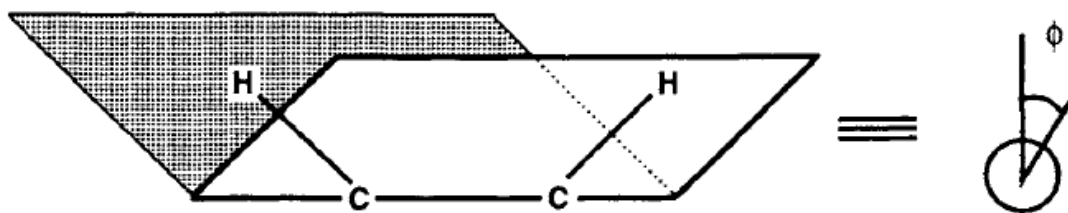
Η τιμή της σταθεράς σύζευξης που παρατηρείται μεταξύ πρωτονίων που απέχουν μεταξύ τους τρεις δεσμούς ( ${}^3J_{HH}$ ), εξαρτάται από τη διαμόρφωση και ειδικότερα από τη δίεδρη γωνία ( $\varphi$ ) (Σχήμα 3.4 Β), που σχηματίζουν τα υπό σύζευξη πρωτόνια σύμφωνα με την εξίσωση Karplus:

$$J = A + B\cos\varphi + C\cos 2\varphi \quad [3.4]$$

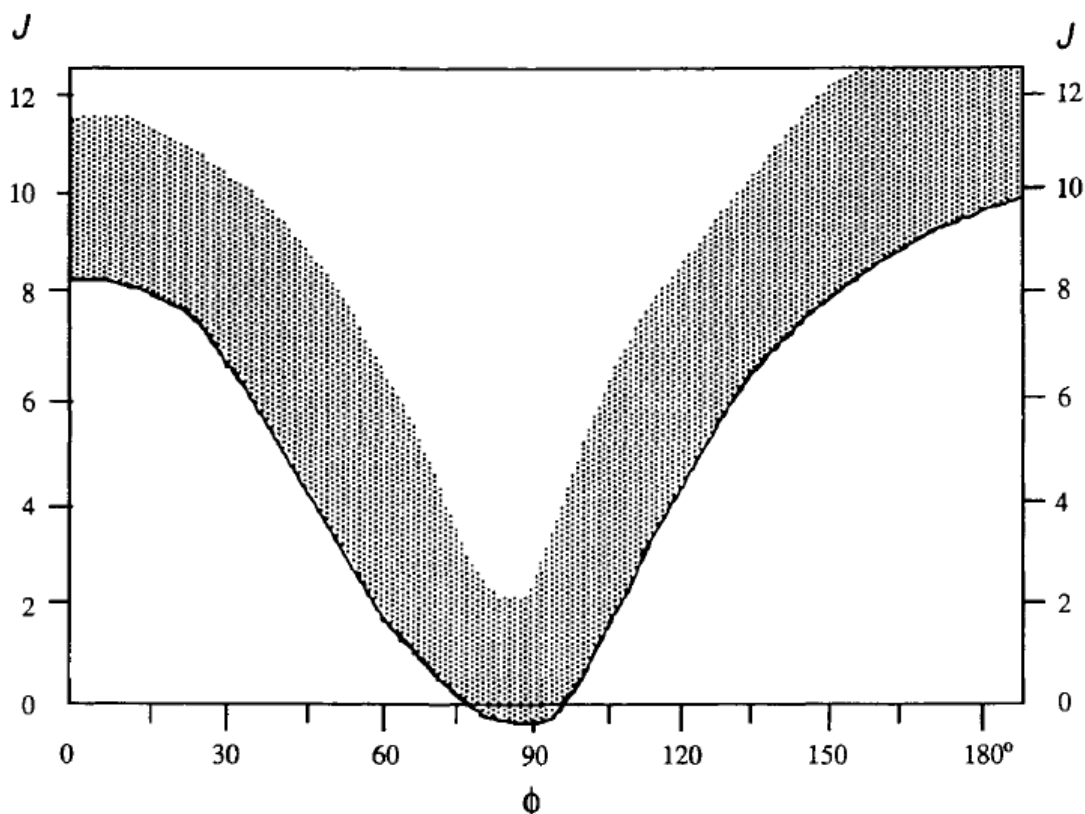
όπου A, B και C είναι σταθερές με τιμές περίπου +7, -1, και +5 Hz, αντίστοιχα. Συνεπώς η τιμή της J μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διαμόρφωσης ενός μορίου. Από τη θεωρητική σχέση του Karplus αλλά και τα πειραματικά δεδομένα για μια σειρά ενώσεων προέκυψαν οι παρακάτω εξισώσεις που συνδέουν την  ${}^3J_{HH}$  με τη δίεδρη γωνία  $\varphi$ :

$${}^1J_{HH} = 8.5\cos^2\varphi - 0.28 \text{ (Hz)}, \quad 0^\circ \leq \varphi \leq 90^\circ \quad [3.5]$$

$${}^1J_{HH} = 9.5\cos^2\varphi - 0.28 \text{ (Hz)}, \quad 90^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ \quad [3.6]$$



(A)



(B)

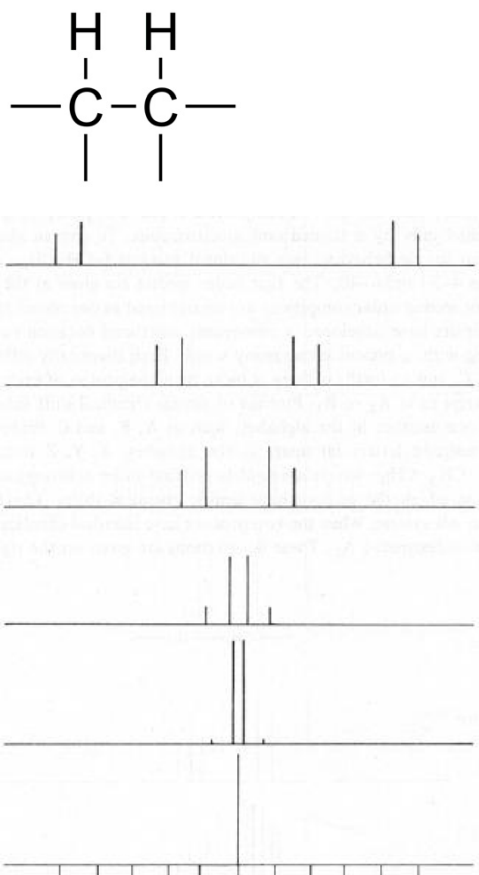
**Σχήμα 3.4:** (A) Εξάρτηση της  ${}^3J_{HH}$  από τη δίεδρη γωνία  $\varphi$ , σύμφωνα με την εξίσωση Karplus, (B) Σχηματική αναπαράσταση της δίεδρης γωνίας  $\varphi$ .<sup>8</sup>

Από τις παραπάνω εξισώσεις προκύπτει ότι για  $\varphi = 90^\circ$ ,  ${}^5J_{HH} = -0.3$ , ενώ για  $\varphi = 0^\circ$  και για  $\varphi = 180^\circ$  προκύπτουν αντίστοιχα οι τιμές  ${}^3J_{HH} = 8.2$  και  ${}^3J_{HH} = 9.2$  Hz. Οι παραπάνω εξισώσεις μπορούν να εφαρμοστούν και στα αιθυλενικά παράγωγα, για τα οποία προβλέπεται ότι η  ${}^3J_{trans}$  ( $\varphi = 180^\circ$ ) είναι μεγαλύτερη από τη  ${}^3J_{cis}$  ( $\varphi = 90^\circ$ ).

Ο τύπος του φάσματος είναι συνάρτηση της διαφοράς της συχνότητας συντονισμού  $\Delta\nu$ , μεταξύ των δύο πυρήνων που συζεύγγονται και του μεγέθους της σταθεράς  $J$ . Οι πυρήνες που διαφέρουν σημαντικά στη χημική μετατόπιση σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης  $J$ , συμβολίζονται, με ακραία γράμματα του λατινικού αλφάβητου AMX ή AX ( $\Delta\nu \gg J$ ). Οι πυρήνες που δεν διαφέρουν σημαντικά στη χημική μετατόπιση σε σχέση με τη σταθερά σύζευξης,  $J$ , συμβολίζονται με γειτονικά γράμματα του λατινικού αλφάβητου ABC ή AC ( $\Delta\nu \geq J$ ). Στο παρακάτω σχήμα εικονίζονται τυπικά



φάσματα που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων ως συνάρτηση του λόγου  $\Delta\nu/J$ .



**Σχήμα 3.5:** Τύποι φασμάτων NMR που προκύπτουν από τη σύζευξη δύο πρωτονίων ως συνάρτηση του λόγου  $\Delta\nu/J$ .<sup>8</sup>

### 3.8 Ετεροπυρηνική Σύζευξη Spin- Spin<sup>1</sup>H- <sup>13</sup>C (Spin- Spin Coupling)

Οι σταθερές σύζευξης <sup>13</sup>C- <sup>1</sup>H ενός δεσμού ποικίλουν από 120 μέχρι 320 Hz. Οι σταθερές σύζευξης <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> αυξάνουν κατά τη μεταβολή του υβριδισμού από sp<sup>3</sup> σε sp σύμφωνα με την αύξηση του ποσοστού συμμετοχής του s τροχιακού στον υβριδισμό. Τυπικές τιμές είναι: CH<sub>4</sub> (sp<sup>3</sup>) <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 125 Hz, H<sub>2</sub>C=CH<sub>2</sub> (sp<sup>2</sup>) <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 157 Hz και HC =CH (sp) <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 250 Hz<sup>3,9</sup>.

Η παρουσία ηλεκτραρνητικών υποκαταστατών αυξάνει τη σύζευξη. Για παράδειγμα, στην ομάδα -O-CH<sub>3</sub> <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 140 Hz και στην ομάδα Cl-CH<sub>3</sub> <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> = 150 Hz.

Οι σταθερές σύζευξης <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> και <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> είναι μικρότερες και έχουν τιμές μεταξύ 1-10 Hz. Η σύζευξη δύο δεσμών <sup>2</sup>J<sub>CH</sub> είναι πολύ μικρότερη από αυτήν του ενός δεσμού. Το μέγεθος της (1-12 Hz) είναι περίπου το μισό της δίδυμης σύζευξης πρωτονίων και ο προσδιορισμός της από τα φάσματα είναι αρκετά δύσκολος. Όπως και στην περίπτωση των πρωτονίων, η σύζευξη τριών δεσμών <sup>3</sup>J<sub>CH</sub> έχει περισσότερο ενδιαφέρον, γιατί εξαρτάται από το μήκος του δεσμού και τη δίεδρο γωνία (Εξίσωση Karplus).

$${}^3J_{CH} = 4.26 - \cos\varphi + 3.56\cos 2\varphi \quad [3.7]$$

Ως σύζευξη μακράς εμβέλειας, θεωρείται η σύζευξη μεταξύ πυρήνων οι οποίοι βρίσκονται σε απόσταση τεσσάρων ή περισσότερων δεσμών ( ${}^nJ$  ( $n \geq 4$ )). Επειδή η αλληλεπίδραση των πυρήνων εξασθενεί με την αύξηση του αριθμού των δεσμών, η σταθερά σύζευξης μακράς εμβέλειας αναμένεται να είναι πολύ μικρή σε σχέση με τη δίδυμη και γειτονική σύζευξη (συνήθως 0.1 -3 Hz).

### 3.9 Φαινόμενο Ανταλλαγής Πρωτονίων-Επίδραση Δεσμού Υδρογόνου και pH

#### Επίδραση Διαμοριακών και Ενδομοριακών Δεσμών Υδρογόνου

Μερικά από τα λιγότερα προστατευμένα πρωτόνια, είναι αυτά των καρβοξυλικών οξέων (RCOOH) τα οποία απορροφούν στην περιοχή 10 έως 12 ppm. Τόσο το φαινόμενο του συντονισμού όσο και η ηλεκτραρνητικότητα του ατόμου του καρβονυλικού οξυγόνου έλκουν το ζεύγος ηλεκτρονίων του δεσμού του OH με συνέπεια την αυξημένη οξύτητα και την αποπροστασία του πρωτονίου της -COOH.

Πρωτόνια τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (π.χ. πρωτόνια καρβοξυλικών ομάδων, φαινολικών υδροξυλίων, υδροξυλίων αλκοολών ή αμινοομάδων) εμφανίζουν ευρεία κλίμακα απορρόφησης (Πίνακας 3.2). Όσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός υδρογόνου, τόσο πιο αποπροστατευμένο είναι το πρωτόνιο που συμμετέχει στο δεσμό.

Οξέα	RCOOH	10.5 – 12.0 ppm
Φαινόλες	ArOH	4.0 – 7.0
Αλκοόλες	ROH	0.5 – 5.0
Αμίνες	RNH <sub>2</sub>	0.5 – 5.0
Αμίδια	RCONH <sub>2</sub>	5.0- 8.0
Ενόλες	CH=CH-OH	> 15

**Πίνακας 3.2:** Εύρη απορρόφησης πρωτονίων χαρακτηριστικών ομάδων.<sup>10</sup>

Η πιθανότητα σχηματισμού διαμοριακών δεσμών υδρογόνου είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας. Όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση του διαλύματος, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Ενώ όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία, τόσο μικρότερη είναι αυτή η πιθανότητα. Ο σχηματισμός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου εξαρτάται σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σχέση με τους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου, τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τη συγκέντρωση. Η διαφορετική αυτή συμπεριφορά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία για τη διάκριση ενδο-και δια-μοριακών δεσμών υδρογόνου.<sup>11</sup>

Διαμοριακή ανταλλαγή πρωτονίων συχνά οδηγεί σε διεύρυνση των κορυφών. Οι κορυφές αντί να εμφανιστούν ως οξείες σε εύρος, πολλές φορές διευρύνονται και υπολείπονται σε ένταση. Μία κορυφή που οφείλεται, για παράδειγμα, σε απορρόφηση  $-O-H$  μπορεί να διακριθεί από τις υπόλοιπες απλές κορυφές, σε αρκετές περιπτώσεις, και μόνο από τη μορφή της. Η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, σημειώνουμε μόνο την εξάρτηση από τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία.<sup>5,12</sup>

### **Επίδραση του Διαλύτη και της Συγκέντρωσης**

Κατά τη λήψη φασμάτων NMR χρησιμοποιούνται διαλύτες, οι οποίοι πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές. Πρέπει να είναι φθινοί, να διαλύουν ένα ευρύ φάσμα ενώσεων και να περιέχουν κυρίως το δευτεριωμένο ισότοπο. Το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$ ) είναι ένας συχνά χρησιμοποιούμενος διαλύτης που πληροί αυτές τις προδιαγραφές. Ένας άλλος χρήσιμος διαλύτης είναι το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $DMSO-d_6$ ). Βασικό πλεονέκτημα του  $DMSO-d_6$  αποτελεί η υψηλή διαλυτική του ικανότητα, αλλά έχει ως μειονέκτημα το υψηλό σημείο πήξεως ( $\sim 18^\circ C$ ), γεγονός που το καθιστά δύσχρηστο για πειράματα χαμηλής θερμοκρασίας.

Η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση, εξαρτάται όχι μόνο από τη δομή της ένωσης που μελετάται (αναλύτης), αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης αυτής και των μορίων διαλύτη που την περιβάλλουν. Εάν ο διαλύτης είναι μη πολικός, όπως οι υδρογονάνθρακες, τότε υφίστανται ασθενείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικού αναλύτη και διαλύτη (αλληλεπιδράσεις Van der Waals) και ως εκ τούτου ο διαλύτης επηρεάζει ελάχιστα τη παρατηρούμενη χημική μετατόπιση.<sup>12</sup>

Εάν ο διαλύτης που θα επιλεγεί είναι πολικός (π.χ. ακετόνη, χλωροφόρμιο ή διμεθυλοσουλφοξείδιο), υφίστανται ισχυρές αλληλεπιδράσεις διπόλου –διπόλου μεταξύ αναλύτη και διαλύτη, ιδίως ένας ο αναλύτης περιέχει πολικούς δεσμούς. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολικού διαλύτη και πολικού αναλύτη είναι πιθανόν ισχυρότερες από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλύτη και τετραμεθυλοσιλανίου (TMS) ως ένωσης αναφοράς, το οποίο είναι μη πολικό. Ως αποτέλεσμα, η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση του αναλύτη θα είναι μετατοπισμένη σε σύγκριση με την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση σε μη πολικό διαλύτη.

Εάν ο διαλύτης έχει ισχυρή μαγνητική ανισοτροπία (π.χ. βενζόλιο, πυριδίνη, ακετονιτρίλιο), τότε οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και του ανισοτροπικού πεδίου του διαλύτη θα επηρεάσουν σημαντικά τη χημική μετατόπιση. Και σε αυτήν την περίπτωση ο διαλύτης θα αλληλεπιδράσει πιο ισχυρά με τον αναλύτη από ότι με το TMS. Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση του αναλύτη θα είναι μετατοπισμένη σημαντικά ως προς την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση του TMS. Διαλύτες όπως το βενζόλιο και η πυριδίνη προκαλούν μετατόπιση της απορρόφησης ενός πρωτονίου σε μικρότερες τιμές ppm, ενώ οι άλλοι διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο, προκαλούν μετατόπιση προς την αντίθετη κατεύθυνση. Αυτή η διαφορά φαίνεται να εξαρτάται από τη διευθέτηση στο χώρο

των μορίων του διαλύτη. Αρωματικοί διαλύτες όπως βενζόλιο και πυριδίνη, έχουν επίπεδη διευθέτηση, ενώ το ακετονιτρίλιο έχει ραβδοειδή διάταξη. Η διάταξη των μορίων του διαλύτη επηρεάζει την φύση του συμπλόκου αναλύτη –διαλύτη που σχηματίζεται στο διάλυμα.

Η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποσαφηνιστούν πολύπλοκα φάσματα που εμφανίζουν αλληλεπικαλύψεις πολλαπλών κορυφών. Με την προσθήκη μιας μικρής ποσότητας (< 20%) βενζολίου- $d_6$  ή πυριδίνης- $d_5$  σε διάλυμα  $CDCl_3$  μιας άγνωστης ένωσης, παρατηρείται σημαντική μεταβολή στο φάσμα. Οι αλλαγές στις σταθερές προάσπισης στο πρωτονιακό φάσμα μπορούν να προκαλέσουν μετατόπιση μέχρι και 1 ppm, με αποτέλεσμα οι αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές να διαχωριστούν μεταξύ τους ικανοποιητικά, ώστε να μπορεί να γίνει ανάλυση του φάσματος. Η χρήση αυτής της “τεχνικής του βενζολίου” είναι ένας εύκολος τρόπος απλοποίησης πολύπλοκων φασμάτων.

Το μέγεθος της παρατηρούμενης μετατόπισης λόγω του διαλύτη μπορεί να είναι της τάξης μερικών δέκατων ενός ppm έως αρκετών ppm στην κλίμακα ενός πρωτονιακού φάσματος και εξαρτάται κυρίως από τη λειτουργική ομάδα στην οποία ανήκει το πρωτόνιο.

### **Επίδραση της Θερμοκρασίας**

Γενικά, η θερμοκρασία δεν επηρεάζει αισθητά τη χημική μετατόπιση. Ωστόσο, εάν πραγματοποιούνται δυναμικές διεργασίες όπως περιστροφή μέσω δεσμών, αναστροφή δακτυλίου και ισομερείωση, καθώς και σχάση δεσμών υδρογόνου, τότε η θερμοκρασία μπορεί να έχει σημαντική επίπτωση στη χημική μετατόπιση.

### **3.10 Μελέτη Δυναμικών και Θερμοδυναμικών Ισορροπιών με τη Φασματοσκοπία NMR**

Η μελέτη χημικών συστημάτων που είναι σε δυναμική ισορροπία, όπως ταυτομερών, διαμορφομερών, ισομερών κ.λ.π., αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR. Ας θεωρήσουμε ένα πρωτόνιο που ανταλλάσσεται μεταξύ δύο καταστάσεων A και B με χημικές μετατοπίσεις  $\delta_{HA}$  και  $\delta_{HB}$  αντίστοιχα. Εάν ο χρόνος ζωής,  $t$ , του πρωτονίου σε κάθε κατάσταση είναι μεγαλύτερος του αντίστροφου της διαφοράς των δύο συχνοτήτων συντονισμού  $\nu_{HA}$  και  $\nu_{HB}$  ( $\nu_{HA} > \nu_{HB}$ )

$$t > 1 / (|\nu_{HA} - \nu_{HB}|) = 1 / \Delta\nu \quad [3.8]$$

τότε παρατηρούνται δύο κορυφές, οι εντάσεις των οποίων εξαρτώνται από το σημείο ισορροπίας του συστήματος.

Εάν ο χρόνος  $t$  είναι μικρότερος του αντίστροφου της διαφοράς των δύο συχνοτήτων συντονισμού:  $t < 1 / (\nu_{HA} - \nu_{HB}) = 1/\Delta\nu$ , τότε παρατηρείται μία απλή

κορυφή, η θέση της οποίας καθορίζεται από το σημείο ισορροπίας του χημικού συστήματος.

Εάν ο χρόνος,  $t$ , είναι του ίδιου μεγέθους με το αντίστροφο της διαφοράς των δύο συχνοτήτων συντονισμού:  $t = 1/\Delta\nu$ , τότε παρατηρείται μία ευρεία καμπύλη, από το εύρος  $\Delta\nu$  της οποίας είναι δυνατό να βρεθεί ο χρόνος αλληλομετατροπής με βάση την αρχή της απροσδιοριστίας:  $\Delta t \Delta E = h/2\pi$  ή  $\Delta t = 1/2\pi\Delta\nu$

Στην πράξη η τελευταία προϋπόθεση επιτυγχάνεται με μεταβολή της θερμοκρασίας,  $T$ , μέχρις ότου συνενωθούν οι δύο χωριστές κορυφές. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε συστήματα ισορροπίας με συστατικά των οποίων η διάρκεια ζωής είναι της τάξης ακόμη και των  $10 \times 10^{-6}$  s. Η χρονική αυτή κλίμακα καλύπτει τα περισσότερα μοριακά συστήματα που ενδιαφέρουν την Οργανική Χημεία.

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια σημαντική τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη της μετατροπής ενός μορίου από μία μορφή A σε μία άλλη B, και παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικών θερμοδυναμικών και κινητικών μελετών. Οι μελέτες επικεντρώνονται στην επίδραση του διαλύτη, της θερμοκρασίας και του pH.

Η μετατροπή  $A \rightarrow B$  μπορεί να περιγραφεί από τη σταθερά ισορροπίας  $K_{eq}$  σύμφωνα με την εξίσωση:  $K_{eq} = [B]/[A]$ , η οποία σχετίζεται άμεσα με την ενέργεια Gibbs,  $\Delta G^\circ$ , μέσω της εξίσωσης:  $\Delta G^\circ = RT \ln K_{eq}$

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι μετατροπής του A προς B μπορούν να εξαχθούν από πειράματα NMR μεταβλητής θερμοκρασίας, υπό την προϋπόθεση ότι οι σχετικές συγκεντρώσεις των δύο μορφών μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια. Όταν η σταθερά ισορροπίας, για τη συγκεκριμένη διεργασία, υπολογιστεί για μια σειρά θερμοκρασιών, τότε σύμφωνα με την Εξίσωση Van'tHoff,

$$\ln K_{eq} = - (\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R) \quad [3.9]$$

με καταχώρηση των τιμών  $\ln K_{eq}$  έναντι των τιμών  $1/T$ , σε σύστημα ορθογωνίων αξόνων, προκύπτουν οι τιμές μεταβολής της ενθαλπίας  $\Delta H^\circ$  και της εντροπίας  $\Delta S^\circ$ .

Αυτό το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της φασματοσκοπίας NMR βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στις μελέτες cis – trans ισομερισμού αμιδίων και πεπτιδίων.<sup>13</sup>

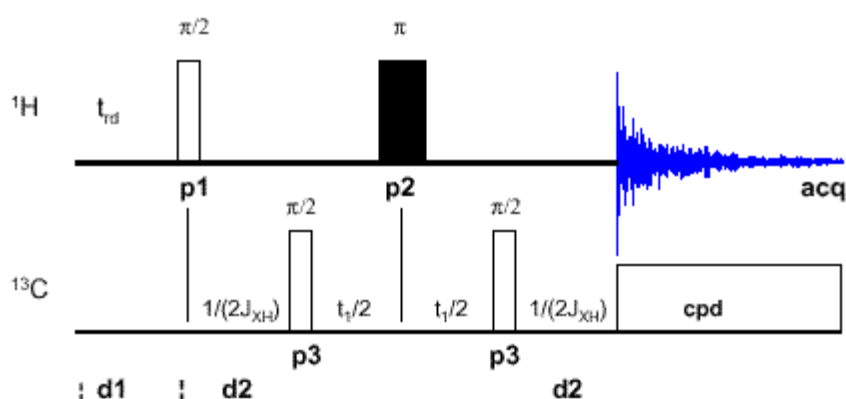
### 3.11 Φασματοσκοπία NMR Δύο Διαστάσεων

#### Τεχνική Ετεροπυρηνικής Φασματοσκοπίας Συσχέτισης Πολλαπλού Κβάντου $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ )<sup>14</sup>

Με τη χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ μαγνητικών πυρήνων (π.χ.  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ). Το μειονέκτημα της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  είναι η πολύ μικρή περιεκτικότητα του άνθρακα -13 στο φυσικό στοιχείο (~ 1.11 %) και η μικρή τιμή του γυρομαγνητικού του λόγου, που έχουν ως συνέπεια τη μειωμένη ευαισθησία του (σχετική ευαισθησία ως προς το  $^1\text{H}$  1/400).<sup>9</sup> Αύξηση της ευαισθησίας του πυρήνα

$^{13}\text{C}$  επιτυγχάνεται, όταν η παρατήρηση της συμπεριφοράς του γίνεται διαμέσου της επίδρασης που ασκεί στον, μεγαλύτερης ευαισθησίας, πυρήνα του πρωτονίου. Με τον τρόπο αυτό ο πυρήνας του πρωτονίου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και καταγραφή του σήματος. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται τόσο στην τεχνική HMQC όσο και στην τεχνική HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Heteronuclear Multiple Bond Coherence  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), όπως θα αναλυθεί παρακάτω.<sup>14</sup>

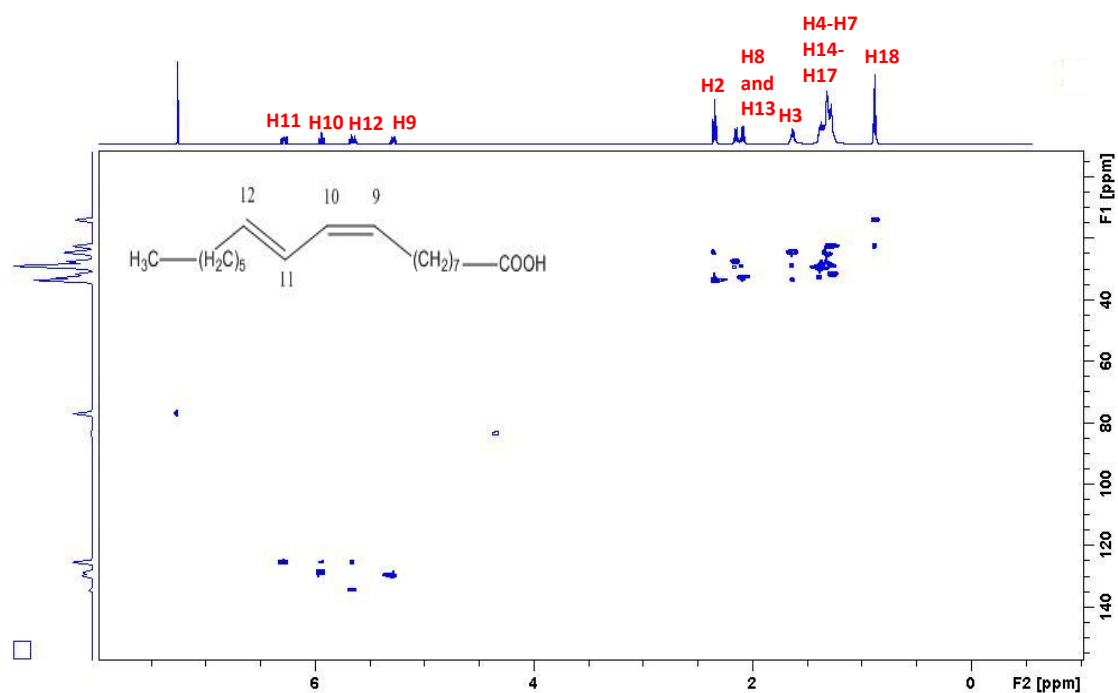
Η φασματοσκοπία HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  συσχετίζει πυρήνας άνθρακα -13 που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με πυρήνες πρωτονίου ( $^1J_{\text{HC}}$ ). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Σχήμα 3.6) μπορεί, περιγραφικά, να διακριθεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο (A) επιτυγχάνεται η μεταφορά μαγνήτισης από τον πυρήνα του πρωτονίου στον πυρήνα του άνθρακα-13, μέσω της εφαρμογής παλμών  $90^\circ$  και στους δύο πυρήνες. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται και η καταστολή των σημάτων συντονισμού των πυρήνων πρωτονίου που δε συζεύγνυνται με πυρήνες άνθρακα-13. Στο δεύτερο στάδιο (B) η μαγνήτιση μεταφέρεται από τον  $^{13}\text{C}$  στον πυρήνα  $^1\text{H}$  και στη συνέχεια ανιχνεύεται. Η παλμική ακολουθία έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δισδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από διασταυρούμενες κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε πυρήνες  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω σταθεράς σύζευξης  $^1J_{\text{CH}}$ .<sup>15</sup>



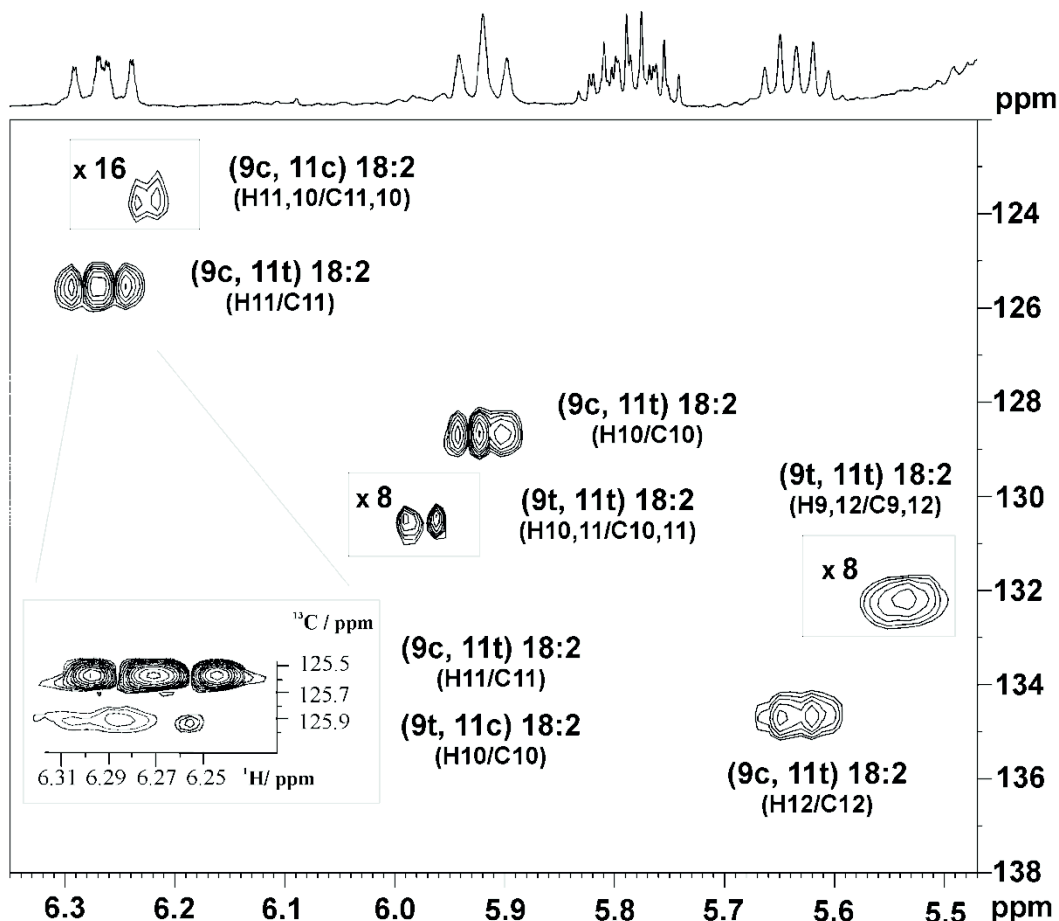
**Σχήμα 3.6:** Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

Τροποποίηση των παλμικών ακολουθιών των δύο τελευταίων τεχνικών που αναφέρθηκαν οδηγούν σε διάφορους τύπους πειραμάτων ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Έτσι, εναλλακτικά της τεχνικής HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης απλού κβάντου  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , (Heteronuclear Single Quantum Coherence, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), στην οποία εμφανίζονται τελικά μόνο οι μεταπτώσεις απλού κβάντου. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται συνήθως σε συνδυασμό με την τεχνική βαθμίδωσης πεδίου (Gradient-enhanced Heteronuclear Single Quantum Coherence,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , GE-HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) με αποτέλεσμα την εμφάνιση διασταυρούμενων κορυφών που οφείλονται σε απευθείας συζεύξεις.<sup>14</sup>

Τα αποτελέσματα της παραπάνω διαδικασίας, δηλαδή η εμφάνιση της άμεσης συσχέτισης των πυρήνων  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  μέσω σύζευξης  $^1J_{\text{CH}}$  απεικονίζονται στο σχήμα 3.7.



**Σχήμα 3.7α:** Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  του πρότυπου ισομερούς 18:2 (9-cis, 11-trans) CLA σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ .



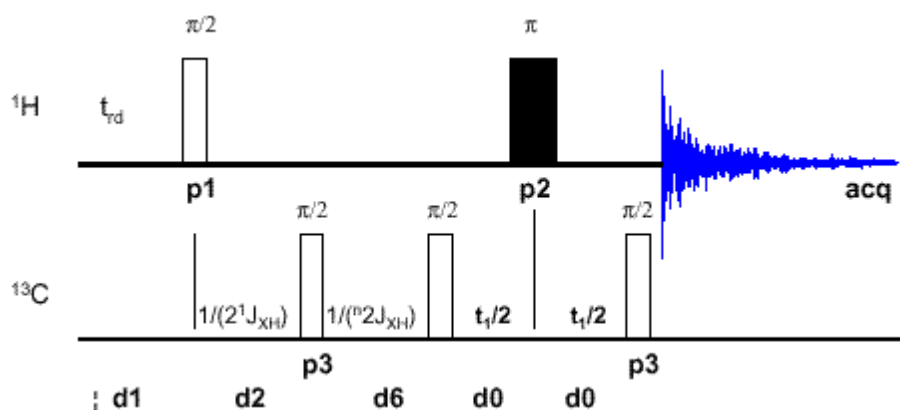
**Σχήμα 3.7β:** Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  μίγματος πρότυπων ισομερών 18:2 (9-cis,11-trans, 9-cis,11-cis, 9-trans,11-trans και 9-trans,11-cis) CLA σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ , όπου, οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στη σύζευξη  $^1J_{\text{HC}}$  μεταξύ των πυρήνων  $^1\text{H}$  - $^{13}\text{C}$  για κάθε ισομερές ξεχωριστά: [9-cis,11-trans: (H11/C11, H10/C10, H12/C12), 9-cis,11-cis: (H11,10/C11,10), 9-trans,11-trans (H10,11/C10,11, H9,12/C9,12), 9-trans,11-cis (H10/C10)]. Το ένθετο απεικονίζει τη σημαντική αύξηση της διακριτικής ικανότητας της κλίμακας  $^{13}\text{C}$  λόγω χρήσης της περιοχής χημικών μετατοπίσεων 120-140 ppm αντί της περιοχής 0-200 ppm.<sup>16</sup>

### Τεχνική Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ (Heteronuclear Multiple Bond Coherence HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )<sup>14</sup>

Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , η τεχνική HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων άνθρακα-13 που συζεύγνυνται με πυρήνες πρωτονίου οι οποίοι απέχουν πλέον του ενός δεσμού, συνήθως δύο έως τέσσερις δεσμούς ( $^{2-4}J_{\text{CH}}$ ).<sup>14</sup> Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Σχήμα 3.8) περιλαμβάνει αρχικά ένα παλμό  $90^\circ$  με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες συζεύξεις  $^1J_{\text{CH}}$ , έτσι ώστε οι διασταυρούμενες κορυφές, που τελικά θα προκύπτουν, να αντιστοιχούν σε συζεύξεις  $^nJ_{\text{CH}}$  (όπου  $n > 1$ ). Ο δεύτερος παλμός  $90^\circ$   $^{13}\text{C}$  δημιουργεί μεταπτώσεις

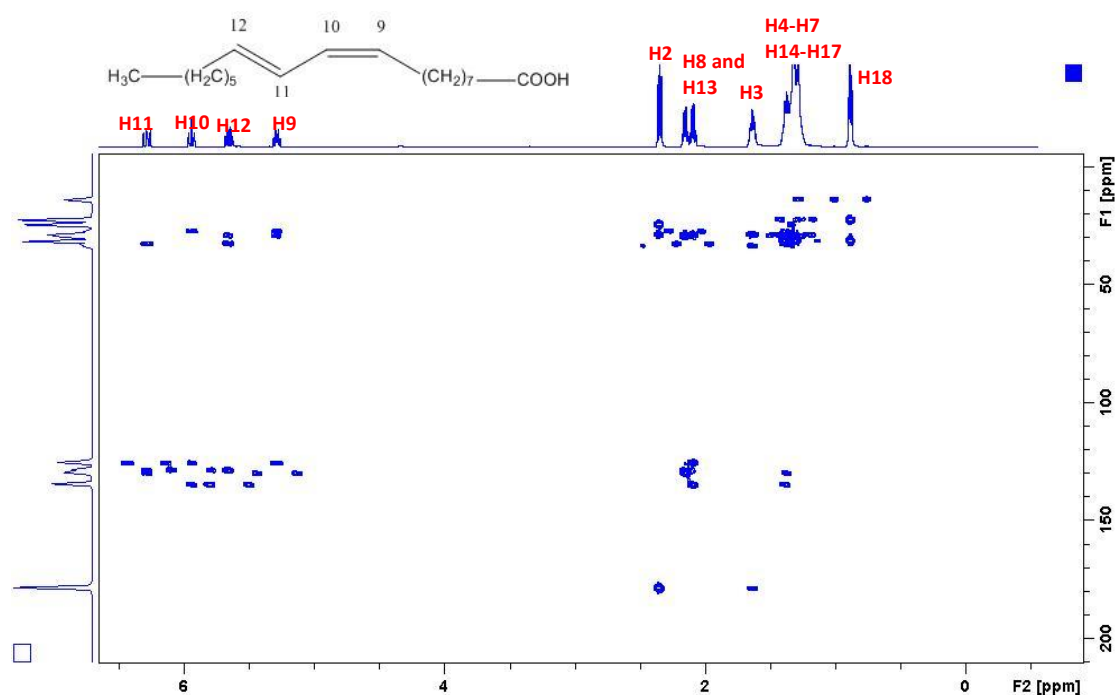


μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται με την επίδραση του παλμού  $^1\text{H}$   $180^\circ$  που ακολουθεί.



**Σχήμα 3.8:** Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

Τέλος, με την εφαρμογή του παλμού  $^{13}\text{C}$   $90^\circ$  και την καταγραφή του φάσματος, προκύπτει ο δισδιάστατος χάρτης της τεχνικής HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Σχήμα 3.9).<sup>17</sup>

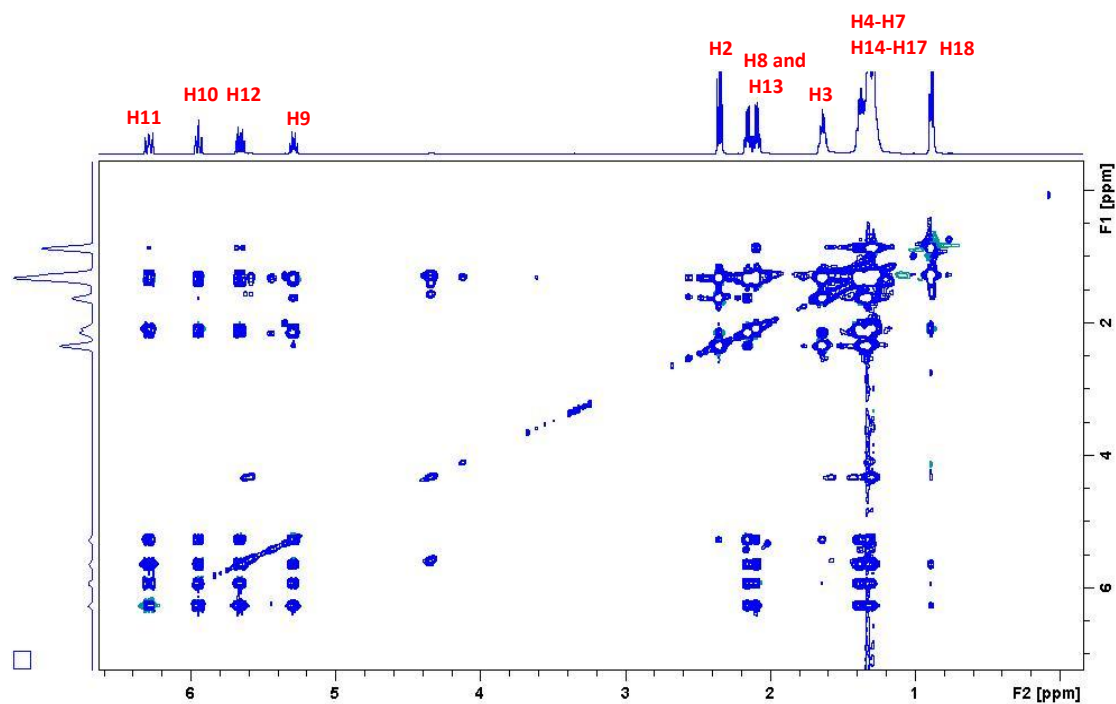


**Σχήμα 3.9:** Δισδιάστατος χάρτης HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  του πρότυπου ισομερούς 18:2 CLA (9-cis,11-trans) σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ .

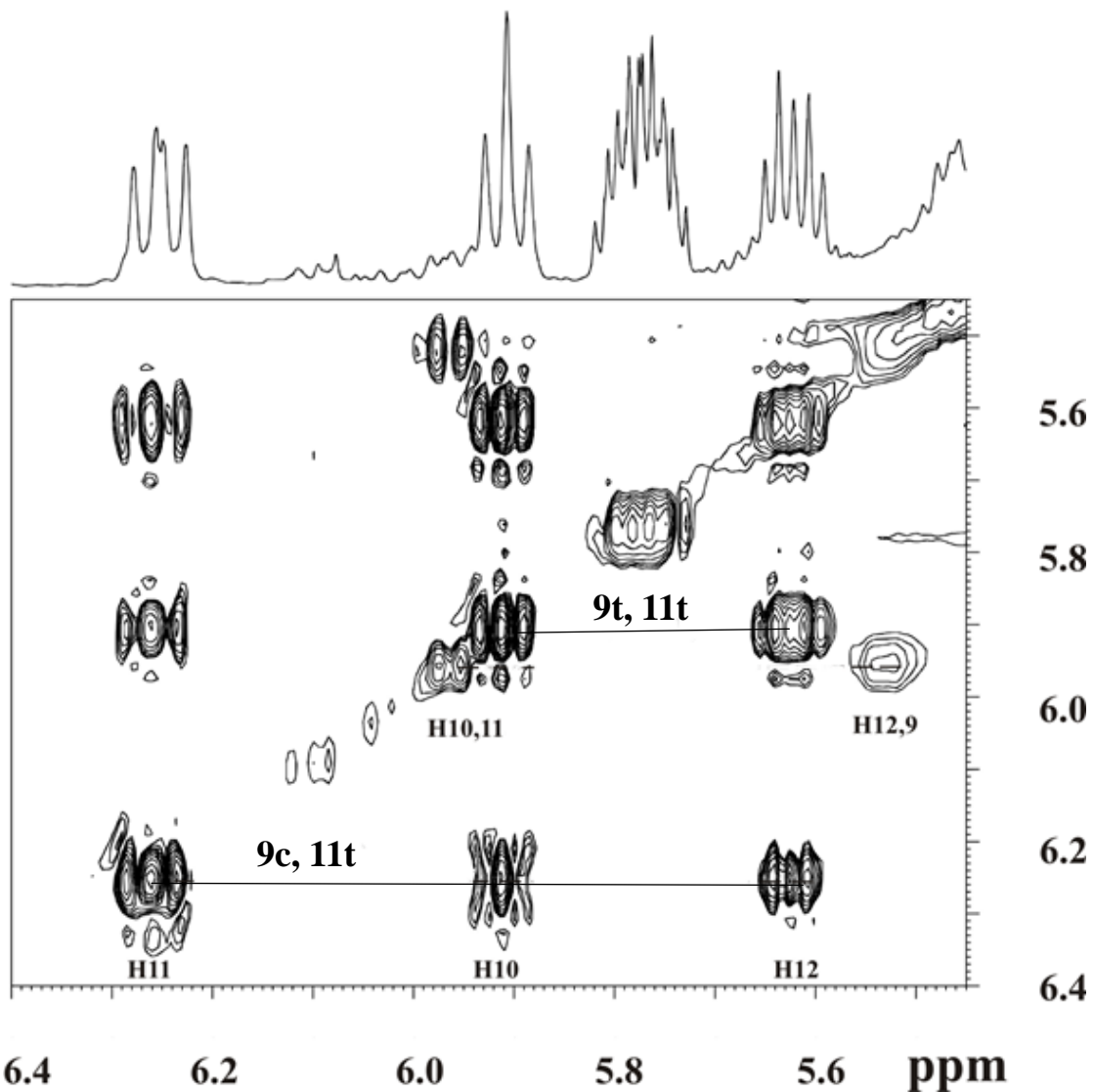
### Τεχνική της Ομοπυρηνικής Φασματοσκοπίας Ολικής Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Total Correlated Spectroscopy, 2D TOCSY, $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )<sup>14</sup>

Με την χρήση της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας ολικής συσχέτισης, είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ ομοειδών μαγνητικών πυρήνων ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ). Η

φασματοσκοπία αυτή είναι χρήσιμη για τη διαίρεση των σημάτων πρωτονίου σε ομάδες ή δίκτυα σύζευξης, ειδικά όταν πολλαπλές κορυφές του φάσματος αλληλεπικαλύπτονται, λόγω παρόμοιων χημικών μετατοπίσεων, ή όταν υπάρχει εκτεταμένο σύστημα σύζευξης. Ένα φάσμα TOCSY παρουσιάζει συσχετίσεις που δημιουργούνται μέσω σύζευξης spin – spin. Οι συσχετίσεις εκτείνονται σε όλο το δίκτυο σύζευξης αν και η ένταση δεν σχετίζεται με απλό τρόπο με τον αριθμό των δεσμών που συνδέουν τα πρωτόνια. Ως εκ τούτου, μία κορυφή συσχέτισης πέντε δεσμών μπορεί να είναι ισχυρότερη ή όχι, σε σχέση με μια συσχέτιση τριών δεσμών διότι εξαρτάται και από τον πειραματικό χρόνο ανάμειξης,  $\tau_m$ . Η φασματοσκοπία 2D TOCSY χρησιμοποιείται συνήθως σε μόρια μεγάλου μοριακού βάρους, στα οποία δημιουργούνται πολλαπλά συστήματα σύζευξης μέσω διαδοχικών δεσμών. Τέτοια μόρια είναι τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, οι ολιγοσακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες. Η φασματοσκοπία TOCSY, σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία COSY, παρέχουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης του αριθμού των δεσμών που συνδέουν τα πρωτόνια, σε συνδυασμό με την αλληλουχία με την οποία αυτά συνδέονται (Σχήμα 3.10).



**Σχήμα 3.10α:** Δισδιάστατος χάρτης 2D TOCSY <sup>1</sup>H- <sup>1</sup>H του πρότυπου ισομερούς 18:2 CLA (9-cis,11-trans) 18:2 CLA, σε διαλύτη CDCl<sub>3</sub>.



**Σχήμα 3.10β:** Δισδιάστατος χάρτης του φάσματος 2D TOCSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  μίγματος πρότυπων ισομερών (9-cis,11-trans και 9-trans,11-trans) 18:2 CLA σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ , όπου, οι διασταυρούμενες κορυφές αντιστοιχούν στη σύζευξη  $^1J_{\text{HH}}$  μεταξύ των πυρήνων  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  για κάθε ισομερές ξεχωριστά: [9-cis,11-trans: (H11/H10/H12), 9-trans,11-trans (H10,11/H9,12)].<sup>16</sup>

### **3.12 ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR**

Η λιπιδική φάση του γάλακτος αποτελείται από μεγάλο ποσοστό τριγλυκεριδίων (περίπου 98%) και από ένα μικρό ποσοστό αρκετών μεταβολιτών, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου.

<b>Ομάδα Λιπιδίου</b>	<b>Ποσοστό (%)</b>
Τριγλυκερίδια	98
Διγλυκερίδια	0.3
Μονογλυκερίδια	0.03
Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα	0.1
Φωσφολιπίδια	0.8
Στερόλες	0.3
Καροτενοειδή	Trace
Λιποδιαλυτές Βιταμίνες	Trace
Συστατικά γεύσης	Trace

**Πίνακας 3.3:** Σύσταση λιπιδικής φάσης του γάλακτος

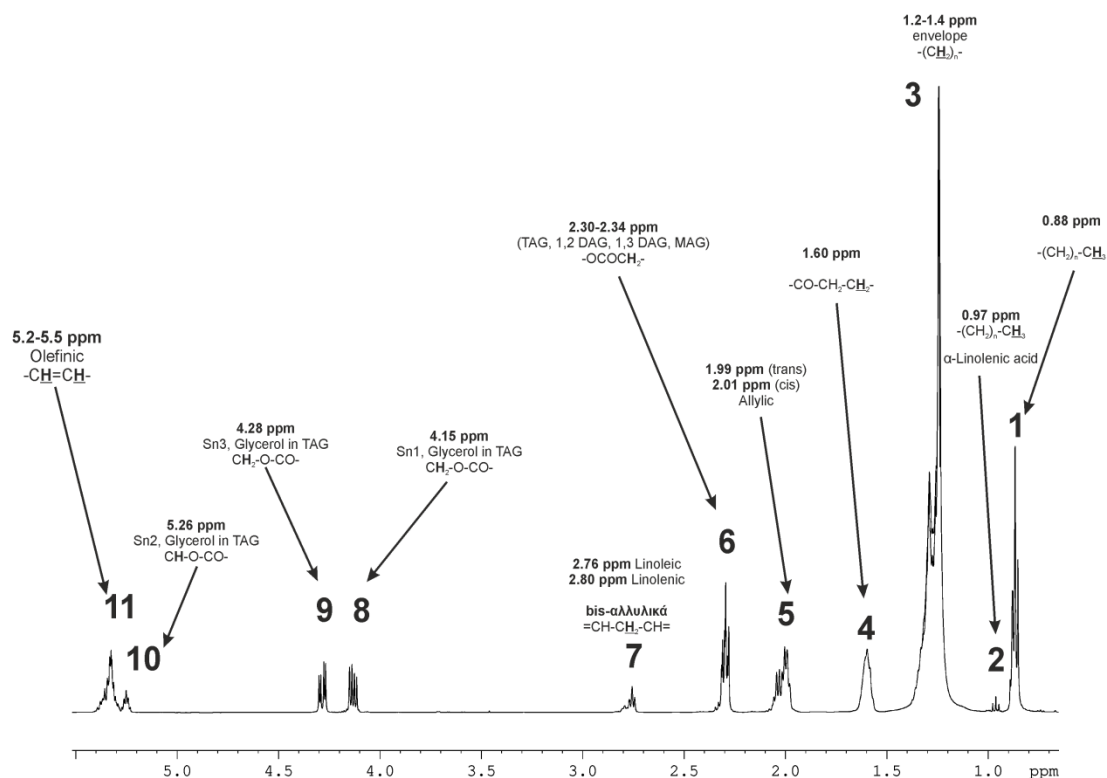
Η ομάδα των λιπαρών οξέων του γάλακτος αποτελείται από περίπου 400 λιπαρά οξέα, από τα οποία ορισμένα βρίσκονται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό και άλλα σε πολύ μικρό ποσοστό. Από αυτά, σε μεγάλο ποσοστό απαντώνται κυρίως κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ σε μικρό ποσοστό τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου, για αυτό και χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα λιπαρά οξέα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν κυρίως το λινελαϊκό οξύ (18:2, ω6), το συζυγές λινελαϊκό οξύ (18:2, CLA) και τα ισομερή του, καθώς και το λινολενικό οξύ (18:3, ω3).

<b>Λιπαρά Οξέα Γάλακτος</b>		
<b>Κορεσμένα</b>	<b>Μονοακόρεστα</b>	<b>Πολυακόρεστα</b>
Βουτυρικό (4:0)	Μυριστελαϊκό (14:1, ω-5)	Λινελαϊκό (18:2, ω-6)
Καπροϊκό (6:0)	Παλμιτελαϊκό (16:1, ω-7)	Συζυγές Λινελαϊκό (18:2, CLA)
Καπρυλικό (8:0)	Ελαϊκό (trans, 18:1)	α-Λινολενικό (18:3, ω-3)
Καπρικό (10:0)	Ελαϊδικό (cis, 18:1)	
Λαυρικό (12:0)		
Μυριστικό (14:0)		
Πενταδεκανοϊκό (15:0)		
Παλμιτικό (16:0)		
Στεατικό (18:0)		

**Πίνακας 3.4:** Σημαντικότερα Λιπαρά Οξέα του Γάλακτος

Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR δεν έχει εφαρμοστεί γενικά απευθείας σε δείγματα γάλακτος, για δύο κυρίως λόγους: (i) το σήμα του νερού, το οποίο αποτελεί κυρίαρχο συστατικό του γάλακτος είναι εξαιρετικά έντονο με αποτέλεσμα να δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στη λήψη φασμάτων και (ii) το γάλα ως ετερογενές σύστημα έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση των κορυφών. Ως αποτέλεσμα η μεγάλη πλειοψηφία πειραμάτων NMR του γάλακτος έγιναν με τη χρήση φασματοσκοπίας  $^{13}\text{C}$  NMR και  $^{31}\text{P}$  NMR. Οι μελέτες  $^{31}\text{P}$  NMR βοήθησαν στη μελέτη της σύστασης του γάλακτος σε φωσφογλυκερίδια, κάτω από διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης του γάλακτος. Από την άλλη πλευρά, οι μελέτες  $^{13}\text{C}$  NMR, κατέστησαν δυνατή τη διάκριση του είδους του ζώου από το οποίο προέρχεται το γάλα μέσω μελέτης κυρίως της σύστασης των λιπαρών οξέων.

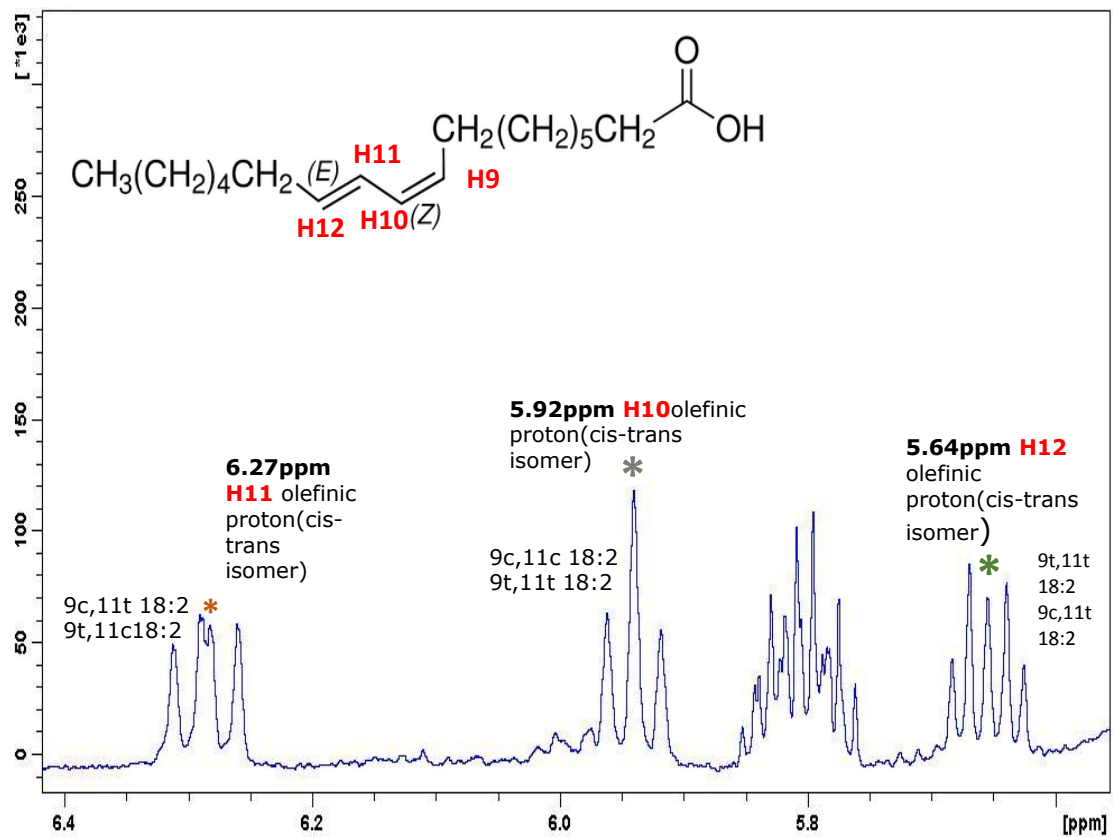
Με τη φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  είναι δυνατή η ανάλυση της λιπιδικής φάσης του γάλακτος, όπως φαίνεται στο ακόλουθο πρωτονιακό φάσμα:



**Σχήμα 3.11:** Πρωτονιακό φάσμα NMR της λιπιδικής φάσης δείγματος σκόνης βρεφικού γάλακτος.

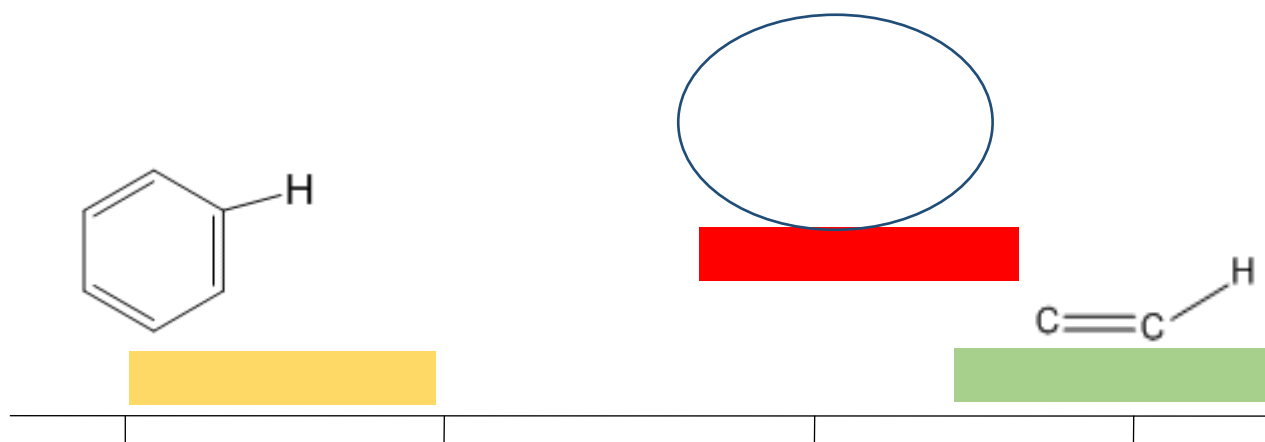
Όπως φαίνεται στο παραπάνω φάσμα, απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις του κύριου συστατικού του γάλακτος όπως είναι κυρίως τα τριγλυκερίδια.

Τα ισομερή του 18:2 συζυγούς λινελαϊκού οξέος (CLA), δεν απεικονίζονται σε αυτή την ανάλυση του φάσματος, λόγω του μικρού ποσοστού στο οποίο βρίσκονται. Με μεγέθυνση του φάσματος κατά ένα παράγοντα x512 μπορούν να εμφανιστούν οι κορυφές των CLA όπως απεικονίζονται στο Σχήμα 3.12.



**Σχήμα 3.12:** Φάσμα NMR <sup>1</sup>H της λιπιδικής φάσης του γάλακτος, στην περιοχή των ολεφινικών προϊόντων των CLA.

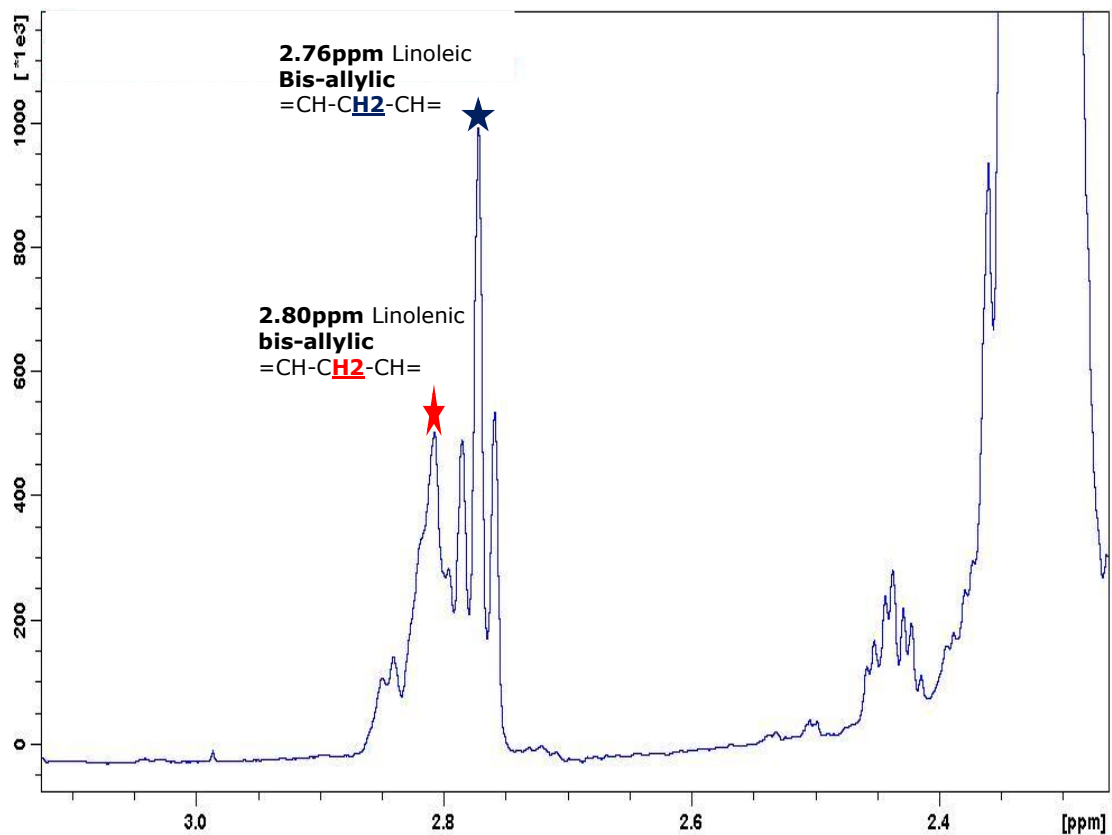
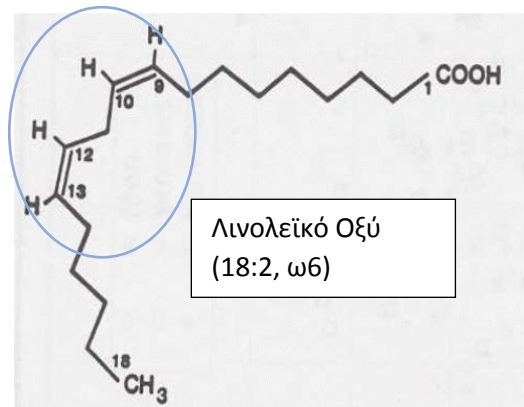
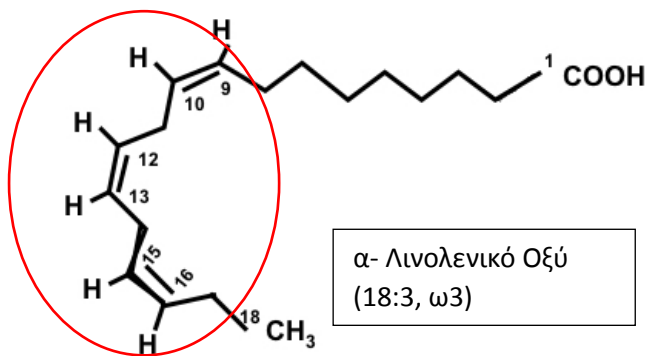
Ο λόγος για τον οποίο όλα τα ισομερή CLA παρουσιάζουν συντονισμούς στην συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος NMR, 5.5-6.3 ppm (Σχήμα 3.13), οφείλεται στην παρουσία συζυγιακού συστήματος που οδηγεί σε περαιτέρω αποπροστασία σε σχέση με τα πρωτόνια μεμονωμένου διπλού δεσμού, η οποία όμως είναι μικρότερη σε σχέση με την αποπροστασία των αρωματικών πρωτονίων.



**Σχήμα 3.13:** Κλίμακα χημικών μετατοπίσεων NMR  $^1\text{H}$  των ολεφινικών πρωτονίων των CLA σε σχέση με τις κύριες κλίμακες ολεφινικών πρωτονίων μεμονωμένων διπλών δεσμών και αρωματικών πρωτονίων.

Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην απεικόνιση των κορυφών των αλλυλικών πρωτονίων των  $\omega$  λιπαρών οξέων, λινελαϊκού οξέος ( $\omega 6$ ) και  $\alpha$ -λινολενικού οξέος ( $\omega 3$ ), τα οποία βρίσκονται επίσης σε μικρό ποσοστό. Η ιδιαιτερότητα του συστήματος  $-\text{HC}=\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}=\text{CH}-$  στα μόρια αυτά έγκειται στο γεγονός ότι τα αλλυλικά πρωτόνια υφίστανται σημαντική αποπροστασία λόγω της παρουσίας δύο διπλών δεσμών σε γειτνίαση με αποτέλεσμα να εμφανίζουν συντονισμούς στα 2.76 ppm (για το λινελαϊκό οξύ) και στα 2.80 ppm (για το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ) (Σχήμα 3.14).

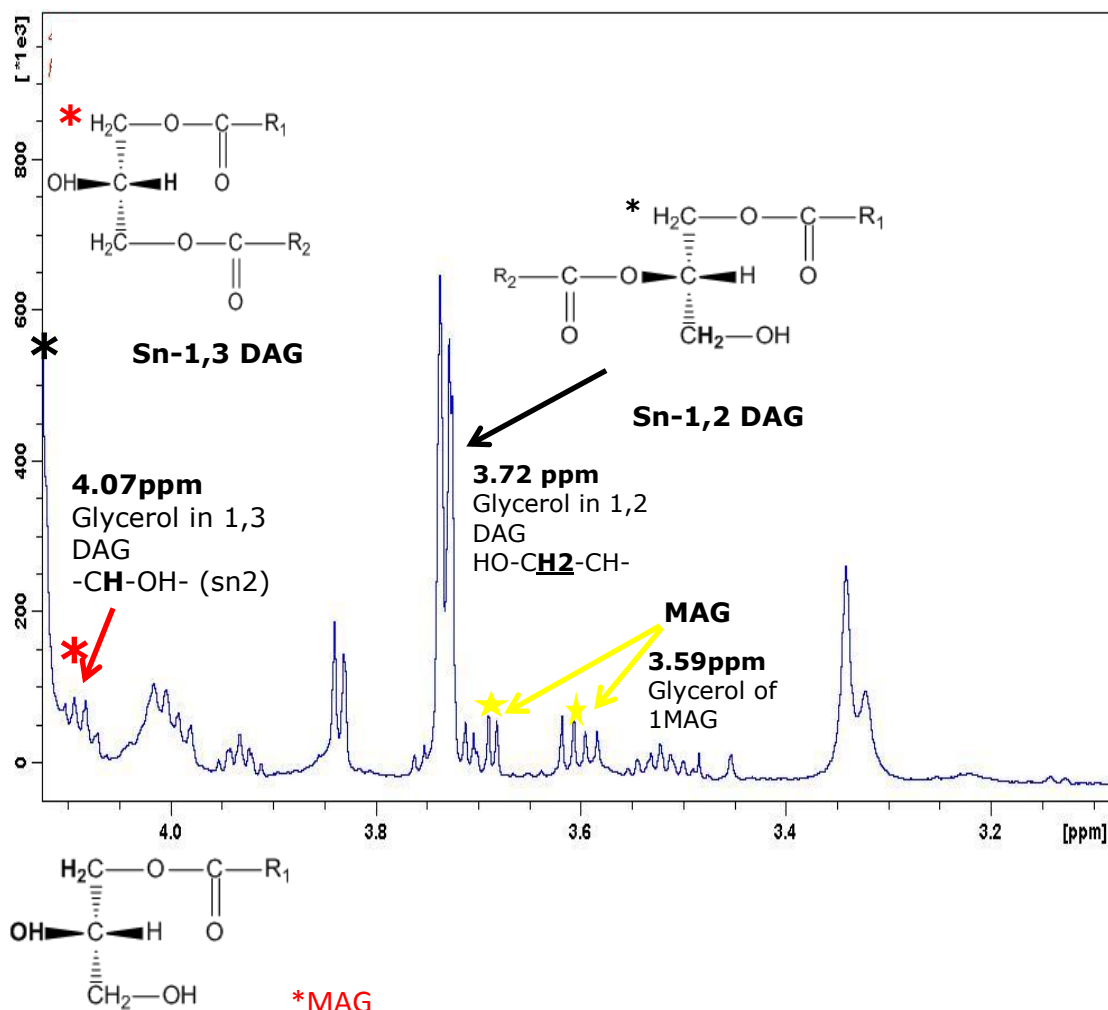




**Σχήμα 3.14:** Φάσμα NMR  $^1\text{H}$  της λιπιδικής φάσης του γάλακτος, στην περιοχή των αλληλικών πρωτονίων των  $\omega$  λιπαρών οξέων.

Αξιοσημείωτο είναι συνεπώς το γεγονός ότι με τη φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  είναι δυνατή η μελέτη όχι μόνο των συστατικών που βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό, όπως είναι τα τριγλυκερίδια, αλλά και αυτών που βρίσκονται σε αρκετά μικρό ποσοστό, δεδομένου ότι ορισμένες κορυφές συντονισμών τους δεν αλληλεπικαλύπτονται από τις έντονες κορυφές των κύριων συστατικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των DAG και των MAG, τα οποία

είναι εμφανή σε ένα πρωτονιακό φάσμα NMR, παρόλο που βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στη λιπιδική φάση του γάλακτος (Σχήμα 3.15).



**Σχήμα 3.15:** Φάσμα NMR  $^1\text{H}$  της λιπιδικής φάσης του γάλακτος, στην περιοχή των 1,2 DAG και MAG.

Για παράδειγμα η κορυφή στα 4.07 ppm αντιστοιχεί στο sn2 πρωτόνιο της γλυκερόλης του 1,3 διγλυκεριδίου (1,3 DAG), και η κορυφή στα 3.72 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της γλυκερόλης του 1,2 διγλυκεριδίου (1,2 DAG). Επίσης, είναι δυνατή η διάκριση του μονογλυκεριδίου (MAG), με βάση την πολλαπλή κορυφή στα 3.59 ppm, παρόλο που είναι σχετικά μικρής έντασης.

Σε επόμενο κεφάλαιο, θα αναλυθεί λεπτομερώς μία πρωτότυπη μεθοδολογία φασματοσκοπίας NMR, η οποία οδηγεί στην εύκολη και γρήγορη μελέτη και ανάλυση των συστατικών της λιπιδικής φάσης του γάλακτος, ανεξάρτητα με το ποσοστό, στο οποίο υπάρχουν στο γάλα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Gerothanassis I.P., K. C. G. ., NMR Shielding and the Periodic Table. *J. Chem. Educ.* **1996**, 73 (8), 801–804.
- (2) Bovey F.A. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *2nd ed., Acad. Press. Calif.* **1998**.
- (3) Γεροθανάσης Ι.Π. *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων, Εκδόσεις Ελληνικό Πανεπιστήμιο, Πάτρα; 1998.*
- (4) Jameson C.J., G. H. S. Calculation of Chemical Shifts. I. General Formulation and the Z Dependence. *J. Chem. Phys.* **1964**, 40 (6), 1714–1724.
- (5) Charisiadis, P.; Kontogianni, V.; Tsiafoulis, C.; Tzakos, A.; Siskos, M.; Gerothanassis, I. <sup>1</sup>H-NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. *Molecules* **2014**, 19 (9), 13643–13682.
- (6) Βαλαβανίδης Α.Π. *Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων, Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα; 2006.*
- (7) Αλεξάνδρου Ν.Ε. *Γενική Οργανική Χημεία, Δομή- Φάσματα- Μηχανισμοί, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη; 1992.*
- (8) Balci M. Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy. *Elsevier* **2005**.
- (9) Breitmaier E., V. W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution, Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry. *VCH, New York* **1990**.
- (10) Pavia D., Lampman G.M., K. G. S. Introduction to Spectroscopy. *Thomson Learn. Inc., Washington, USA* **2001**.
- (11) Jeffrey G.A., S. W. Hydrogen Bonding in Biological Structures. *Springer- Verlag, Pittsburgh, USA* **1991**.

- (12) Tatsis, E. C.; Exarchou, V.; Troganis, A. N.; Gerothanassis, I. P. <sup>1</sup>H NMR Determination of Hypericin and Pseudohypericin in Complex Natural Mixtures by the Use of Strongly Deshielded OH Groups. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *607* (2), 219–226.
- (13) Troganis A.N, Sicilia E., Barbarossou K., Gerothanassis I.P, R. N. Solvation Properties of N-Substituted Cis and Trans Amides Are Not Identical: Significant Enthalpy and Entropy Changes Are Revealed by the Use of Variable Temperature <sup>1</sup>H NMR in Aqueous and Chloroform Solutions and Ab Initio Calculations. . *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 11878–11884.
- (14) Loss, Sandra;Kühn, T. Basic 1D and 2D Experiments Introduction to 1- and 2-Dimensional NMR Spectroscopy. *Spectroscopy* **2005**, 190.
- (15) H., G. NMR Spectroscopy. Basic Principle, Concepts, and Applications in Chemistry. *John Wiley Sons, Chichester* **1995**.
- (16) Tsiafoulis, C. G.; Skarlas, T.; Tzamaloukas, O.; Miltiadou, D.; Gerothanassis, I. P. Direct Nuclear Magnetic Resonance Identification and Quantification of Geometric Isomers of Conjugated Linoleic Acid in Milk Lipid Fraction without Derivatization Steps: Overcoming Sensitivity and Resolution Barriers. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *821*, 62–71.
- (17) Rahman A., C. M. I. Solving Problems with NMR Spectroscopy. *Acad. Press. San Diego, California, USA* **1996**.

## **4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΩΤΟΤΥΠΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ NMR ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΤΩΝ SPIN**

### **4.1 Εισαγωγή**

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων έχει πλέον κεντρικό ρόλο στον κλάδο των φυσικών προϊόντων και στην έρευνα της χημείας τροφίμων. Το κλασικό πρωτόκολλο για την μελέτη πολύπλοκων μιγμάτων αποτελεί εφαρμογή ποικίλων χρωματογραφικών τεχνικών, προκειμένου να απομονωθεί ένα ποσοστό καθαρού μεταβολίτη και να ταυτοποιηθεί η δομή του, με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών<sup>1</sup> και/ ή εξειδικευμένων συζευγμένων φασματοσκοπικών τεχνικών.<sup>2,3</sup> Από την άλλη πλευρά, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο, ως εργαλείο ανάλυσης για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους σε βιολογικά υγρά που δεν έχουν υποστεί κλασμάτωση, σε εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων και σε δείγματα τροφίμων. Παρόλα αυτά, η μέθοδος περιορίζεται συνήθως στα κύρια συστατικά των δειγμάτων.<sup>1,4-12</sup>

Τα λιπίδια του γάλακτος είναι πολύ σημαντικά καθώς προσδίνουν διακριτή υφή και διατροφικές και οργανοληπτικές ιδιότητες στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 1, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι συνδεδεμένη με τον αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, ενώ η κατανάλωση των συζυγών λινελαϊκών οξέων (CLA) του γάλακτος έχει ωφέλιμες διατροφικές και ιατρικές δράσεις θέμα το οποίο αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων μελετών.<sup>13</sup> Η ακριβής ανάλυση των λιπιδίων που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της διατροφικής αξίας και την προετοιμασία διατροφικών υλικών που προορίζονται για συγκεκριμένη λειτουργία και εφαρμογή. Η ανάλυση των λιπιδίων αυτών όμως αποτελεί μεγάλη πρόκληση διότι είναι αρκετά περίπλοκη, μπορεί να απαιτεί ειδική προετοιμασία και πολλά βήματα ανάλυσης.<sup>14</sup>

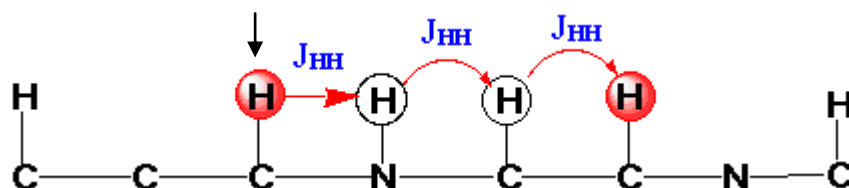
Το πείραμα επιλεκτικό TOCSY μιας διάστασης (selective 1D TOCSY) αποτελεί μια σημαντική τεχνική NMR για τη διερεύνηση της αλληλουχίας  $^1\text{H}-^1\text{H}$  μέσω σταθερών σύζευξης  $J$  σε μόρια μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους.<sup>15,16</sup> Επίσης, έχει εφαρμοστεί στην ανάλυση μιγμάτων και στον προσδιορισμό συστατικών σε μικρή αναλογία.<sup>17</sup> Παρόλα αυτά, η μέθοδος έχει περιορισμένη εφαρμογή στη διεθνή βιβλιογραφία σε υποστρώματα τροφίμων. Μετά από ενδελεχή βιβλιογραφική αναζήτηση προέκυψαν μόνον δύο δημοσιεύσεις που σχετίζονται με μεταβονομική ανάλυση αμινοξέων στο μέλι<sup>18</sup> και στο χυμό μάνγκο.<sup>19</sup> Στην παρούσα μελέτη επιτυγχάνεται, για πρώτη φορά, η απευθείας ταυτοποίηση έξι λιπαρών οξέων που απαντώνται σε μικρό ποσοστό: (9-cis, 11-trans) 18:2 και (9-trans, 11-trans) 18:2 ισομερών του συζυγούς λινολεϊκού οξέος (CLA), καπρολεϊκού οξέος, γλυκερόλης στο 1,2 διγλυκερίδιο (1,2 DAG), στο 1 μονογλυκερίδιο (1-MAG), και στο 2 μονογλυκερίδιο (2- MAG) στο λιπιδικό κλάσμα γάλακτος και χαλουμιού, χωρίς

κάποιο παράγωγο βήμα, με τη χρήση της διαδικασίας χρωματογραφίας των spin (spin – chromatography).

#### 4.2 Θεωρητικό Υπόβαθρο της Μεθοδολογίας Επιλεκτικού TOCSY μιας Διάστασης (Selective 1D TOCSY)

Το πείραμα επιλεκτικό TOCSY μιας διάστασης (selective 1D TOCSY) έχει γίνει μία από τις πιο ενδιαφέρουσες τεχνικές NMR για τη διερεύνηση της αλληλουχίας  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  μέσω σταθερών σύζευξης σε μόρια μικρού και μεσαίου μοριακού βάρους.<sup>15,16</sup> Η εφαρμογή του βασίζεται στην εκλεκτική διέγερση πυρήνων πρωτονίων, με σκοπό τη μελέτη της μεταφοράς μαγνήτισης κατά μήκος ενός μορίου, ανεξαρτήτου μοριακού βάρους. Η μαγνήτιση μπορεί να μεταφερθεί σταδιακά κατά μήκος όλου του εξεταζόμενου μορίου με την χρήση διαφορετικού χρόνου ανάμειξης (mixing time,  $\tau_m$ ). Η εκλεκτικότητα που παρουσιάζει η μεταφορά μαγνήτισης στα επιλεγμένα πρωτόνια, κάνει τη μεθοδολογία αυτή αρκετά χρήσιμη για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων.

Στο Σχήμα 4.1 η μεθοδολογία του πειράματος επιλεκτικού TOCSY μιας διάστασης (selective 1D TOCSY) βασίζεται στην επιλεκτική διέγερση του πυρήνα (υποδεικνύεται με το βέλος) και την διάχυση του μαγνητισμού στα γειτονικά spin.



**Σχήμα 4.1:** Γραφική απεικόνιση της μεταφοράς μαγνήτισης σε επιλεγμένους διεγερμένους πυρήνες πρωτονίων, με το πείραμα επιλεκτικό TOCSY μιας διάστασης (selective 1D TOCSY). Το βέλος απεικονίζει τον πυρήνα  $^1\text{H}$  που έχει διεγερθεί.

Ο επιλεκτικός παλμός, χρονικής διάρκειας 20 ms, ακολουθείται είτε από ακολουθία κλειδώματος των spin (MLEV-17 TOCSY spin lock)<sup>18</sup> ή εφαρμόζοντας την παλμοσειρά DIPSI-2 με την χρήση φίλτρου  $z^{20}$  (Σχήμα 4.2).



**Σχήμα 4.2:** Παλμική ακολουθία του πειράματος επιλεκτικό TOCSY μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY).

Στο σχήμα 4.3 χρησιμοποιήθηκε επίσης και μια σειρά από φάσματα επιλεκτικού 1D TOCSY του ισομερούς (9-trans, 11-trans) εφαρμόζοντας ένα φίλτρο z, πριν την καταγραφή του σήματος, για την καταστολή των κορυφών.<sup>20</sup> Το spin lock

ρυθμίστηκε στα 7.1 kHz, το οποίο αντιστοιχεί σε παλμό 90° των 35 μs. Αυτό επιτρέπει την ασφαλή λήψη φασμάτων του δείγματος, με τιμές spin lock μέχρι 400 ms, στο όργανο NMR, χωρίς τον κίνδυνο υπερθέρμανσης και επακόλουθης καταστροφής του δείγματος.

#### **4.3 Υλικά και Μέθοδοι**

**ΥΛΙΚΑ:** Συζευγμένο (9-cis, 11-trans) 18:2 λιγνελικό οξύ, καθαρότητας  $\geq 96\%$  (HPLC), συζευγμένο (9-trans, 11-trans) 18:2 λιγνελικό οξύ, καθαρότητας  $\geq 98\%$  (HPLC) αγοράστηκαν από την εταιρία Fluka. Καπρολεϊκό οξύ (Caproic acid), καθαρότητας  $\geq 96\%$  αγοράστηκε από την εταιρία Sigma- Aldrich. Χλωροφόρμιο και μεθανόλη (analytical grade) αγοράστηκαν από την εταιρία Fisher Scientific (U. K.),  $\text{CDCl}_3$  (99.8%) αγοράστηκε από την εταιρία Deutero (Kastellaum, Germany) και το μίγμα των 37 FAME από την εταιρία Sigma- Aldrich.

**ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ:** Τα λιπιδικά κλάσματα των δειγμάτων γάλακτος προετοιμάστηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης Bligh & Dyer<sup>21</sup> ως εξής: Σε 200mg δείγματος προστέθηκαν αρχικά 1ml  $\text{CHCl}_3$  και 1ml MeOH και 0,1ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος αυτού σε vortex για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησε σπάσιμο των μικκυλίων με υπερήχους (sonication) για 10 min. Μετά το sonication, στο μίγμα προστέθηκαν άλλα 1ml  $\text{CHCl}_3$  και 0,5ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C στις 3200 στροφές). Μετά τη φυγοκέντρηση ακολουθεί διαχωρισμός της λιπιδικής από την υδατική φάση. Η λιπιδική φάση υφίσταται μια μικροδιήθηση με πιπέτα Pasteur και υαλοβάμβακα προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του στερεού υποστρώματος που έχει σχηματιστεί εξαιτίας της καταβύθισης των πρωτεϊνών του γάλακτος κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Η υδατική φάση λυοφιλοποιείται και φυλάσσεται στην κατάψυξη. Η λιπιδική φάση υφίσταται εξάτμιση του διαλύτη, σε θερμοκρασία μέχρι 35-40°C, και ακολουθεί εξάτμιση υπό υψηλό κενό (high vacuum). Στη συνέχεια φυλάσσεται στην κατάψυξη ή υποβάλλεται σε μετρήσεις NMR.

Τα λιπιδικά κλάσματα του χαλουμιού προετοιμάστηκαν ως εξής: τα δείγματα χαλουμιού ψύχθηκαν σε υγρό  $\text{N}_2$  και κονιορτοποιήθηκαν σε κεραμικό γουδί. Ακολούθησε λυοφιλίωση για δύο μέρες. Μετά τη λυοφιλίωση ζυγίστηκαν 300mg τυριού τα οποία υπέστησαν εκχύλιση για την παραλαβή της λιπιδικής του φάσης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εκχύλισης Bligh- Dyer, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.<sup>21</sup>

**ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ NMR:** Τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματομέτρο Bruker AV500 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) χρησιμοποιώντας τη σουίτα Topspin 2.1. Τα πειράματα 1D TOCSY πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό Bruker (pulseprogram- selmlgr).

**ΑΝΑΛΥΣΗ GC-MS:** Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAME's) προετοιμάστηκαν με μετεστεροποίηση με μεθανολικό διάλυμα KOH σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 15885: 2002.<sup>22,23</sup> Τα προφίλ των λιπαρών οξέων δημιουργήθηκαν με την ανάλυση

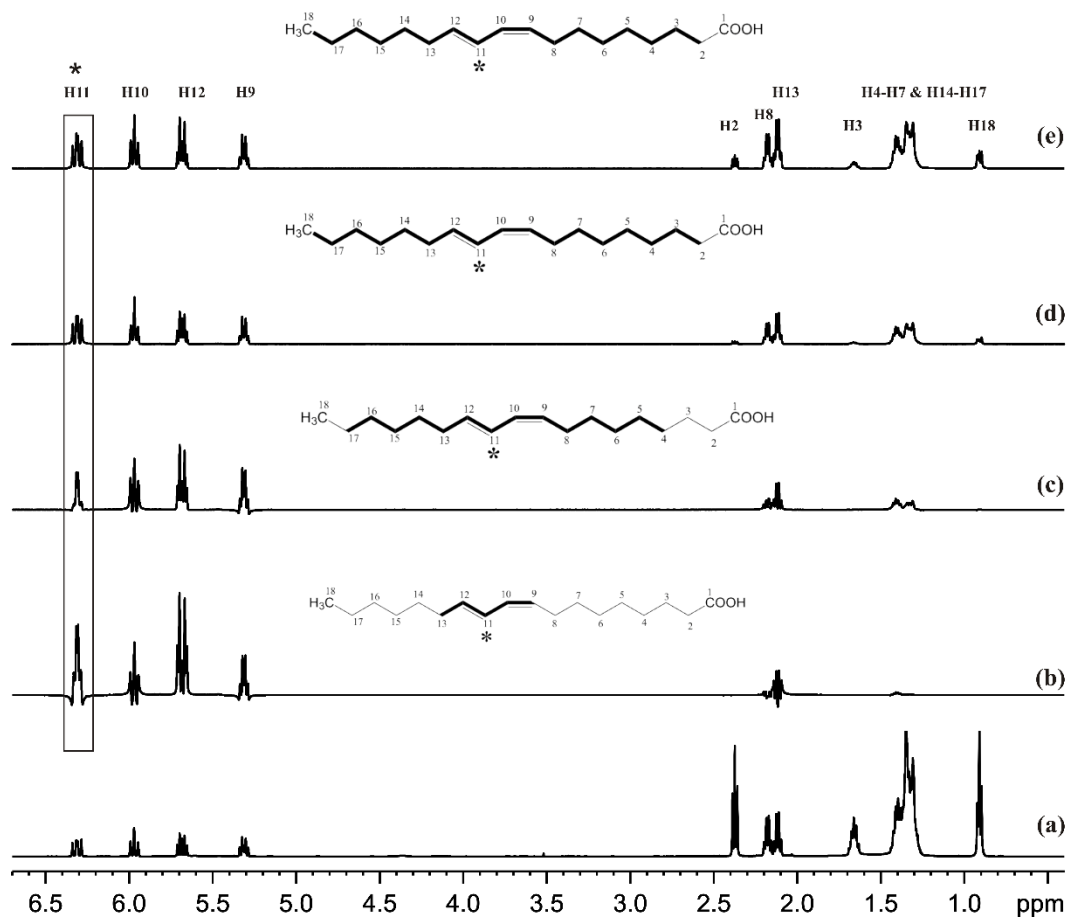
δειγμάτων FAME σε φασματόμετρο GC-MS-QP 2010 Plusgaschromatographymassspectrometer (Shimadzu, Duisburg, Germany), εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη HT 280 T (HTA, Brescia, Italy) του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου της Κύπρου (Λεμεσός).<sup>21,23</sup>

#### **4.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση:**

##### **4.4.1 Πειράματα επιλεκτικού 1D TOCSY πρότυπων ενώσεων – Επίδραση του χρόνου ανάμειξης (Mixing Time)**

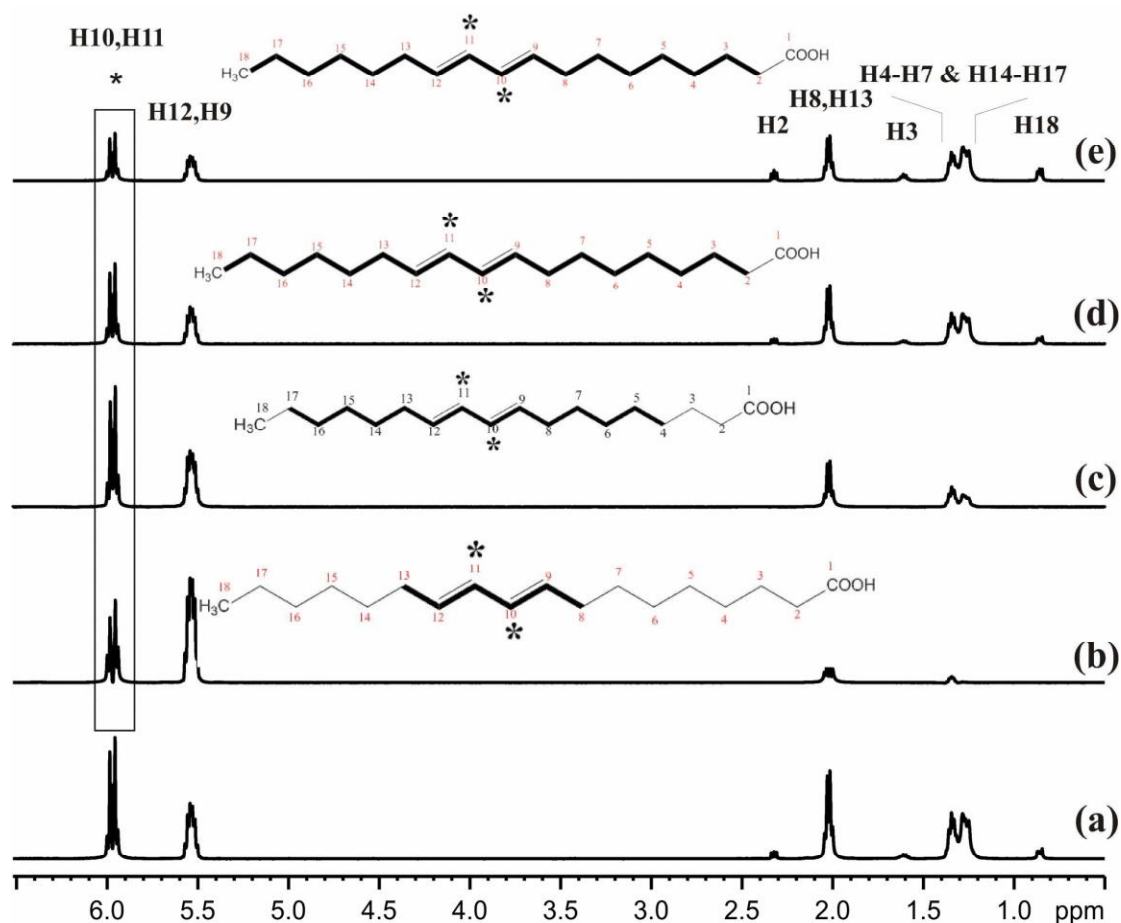
Στο Σχήμα 4.3 απεικονίζεται μια σειρά φασμάτων επιλεκτικού 1D TOCSY του πρότυπου ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA (λινελαϊκού οξέος), όπου το ολεφινικό πρωτόνιο H11 ( $\delta = 6.27$  ppm)<sup>21,24,25</sup> έχει επιλεγθεί για διέγερση, χρησιμοποιώντας μια σειρά αυξανόμενου χρόνου ανάμειξης (mixing time). Με τον τρόπο αυτό επηρεάζονται η ένταση και η έκταση μέσω δεσμών της μεταφοράς μαγνήτισης εντός του συστήματος-σπιν.<sup>26</sup>





**Σχήμα 4.3:** (α) Πρωτονιακό φάσμα μιας διάστασης (1D NMR) 500 MHz διαλύματος του ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA, συγκέντρωσης 20 mM, σε  $\text{CDCl}_3$  (T:298K, χρόνος καταγραφής σήματος (acquisition time):4.3s, χρόνος προς αποδιέγερση των spin (relaxation delay):5s, αριθμός παλμών: 256, και συνολικός πειραματικός χρόνος: ~25min). (b-e) Φάσματα επιλεκτικού 1D TOCSY του ίδιου διαλύματος, σε διάφορους χρόνους ανάμειξης (mixing time):  $\tau_m$ = (b) 33ms, (c) 70ms, (d) 200ms, και (e) 400ms. Ο αστερίσκος δηλώνει το επιλεγμένο πρωτόνιο H11, το οποίο έχει διεγερθεί. Στα τμήματα b-e παρουσιάζεται η μεταφορά της μαγνήτισης κατά μήκος όλου του μορίου.

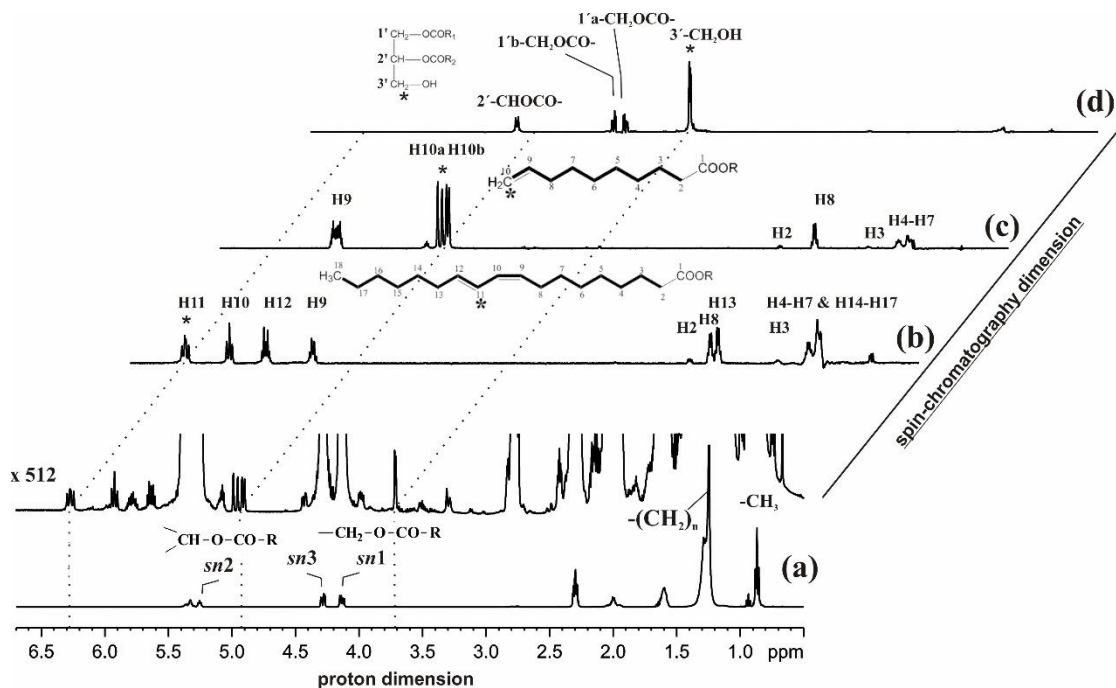
Για χρόνο ανάμειξης  $\tau_m = 33 \text{ ms}$ , κατά το πείραμα επιλεκτικού 1D TOCSY μεταφέρεται η μαγνήτιση στα J- συζευγμένα ζεύγη των συζυγών ολεφινικών πρωτονίων και των  $\text{C}(13)\text{H}_2$  πρωτονίων (Σχήμα 4.3(b)). Με τη χρήση μεγαλύτερων χρόνων ανάμειξης, παρατηρούνται περισσότερο εκτεταμένες μεταφορές μαγνήτισης, οι οποίες, για τιμές  $\tau_m$  200 και 400 ms, έχουν ως αποτέλεσμα την ολοκληρωμένη ανάλυση και διευκρίνιση της δομής του (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA (Σχήμα 4.3(d), (e)). Στο Σχήμα 4.4 απεικονίζεται μια παρόμοια σειρά φασμάτων επιλεκτικού 1D TOCSY του ισομερούς (9-trans, 11-trans) 18:2 CLA, όπου έχει επιλεγεί για διέγερση τα πρωτόνια H10, H11 ( $\delta = 5.97 \text{ ppm}$ ). Αποδεικνύεται με αυτό τον τρόπο, ότι το πείραμα 1D TOCSY επιτρέπει την “άντληση” πληροφοριών δομής σε αποτελεσματικό χρόνο και, κυρίως, με υψηλή διακριτική ανάλυση.



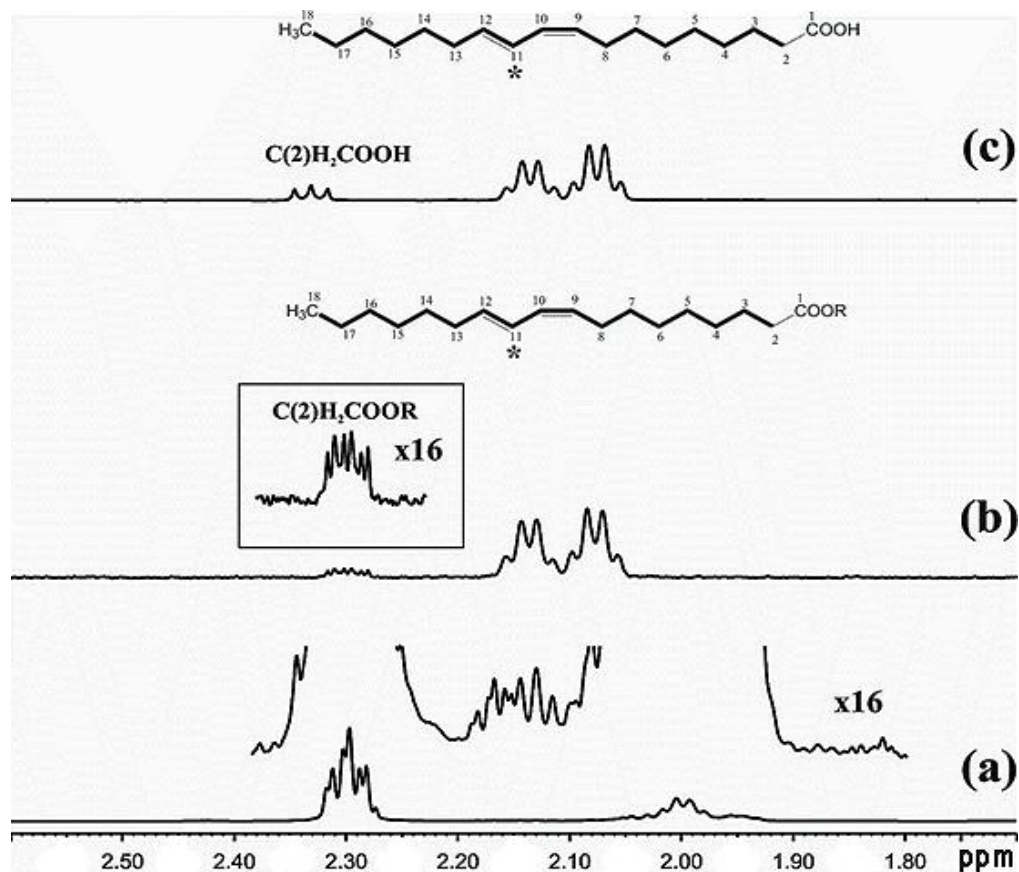
**Σχήμα 4.4:** (α) Πρωτονιακό φάσμα (1D NMR) 500 MHz διαλύματος του ισομερούς (9-trans, 11-trans) 18:2 CLA, συγκέντρωσης 20 mM, σε  $\text{CDCl}_3$  (T:298K, χρόνος καταγραφής σήματος (acquisition time):4.3s, χρόνος αποδιέγερσης (relaxation delay):5s, αριθμός παλμών: 256, και ολικός πειραματικός χρόνος: ~25min). (b-e) Φάσματα επιλεκτικού 1D TOCSY του ίδιου διαλύματος, σε διάφορους χρόνους ανάμειξης:  $\tau_m =$  (b) 33ms, (c) 70ms, (d) 200ms, and (e) 400ms. Ο αστερίσκος δηλώνει το επιλεγμένο πρωτόνιο H11, το οποίο έχει διεγερθεί. Στα τμήματα b-e παρουσιάζεται η μεταφορά της μαγνήτισης κατά μήκος όλου του μορίου.

#### 4.4.2 Εφαρμογή της μεθόδου στο λιπιδικό κλάσμα γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων

Μία σημαντική εφαρμογή του πειράματος 1D TOCSY είναι η επιλεκτική διέγερση κορυφής ενός πρωτονιακού φάσματος που ανήκει σε ένα συγκεκριμένο χημικό συστατικό που περιέχεται σε ένα περίπλοκο μίγμα, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο μια μορφή χρωματογραφίας των spin.

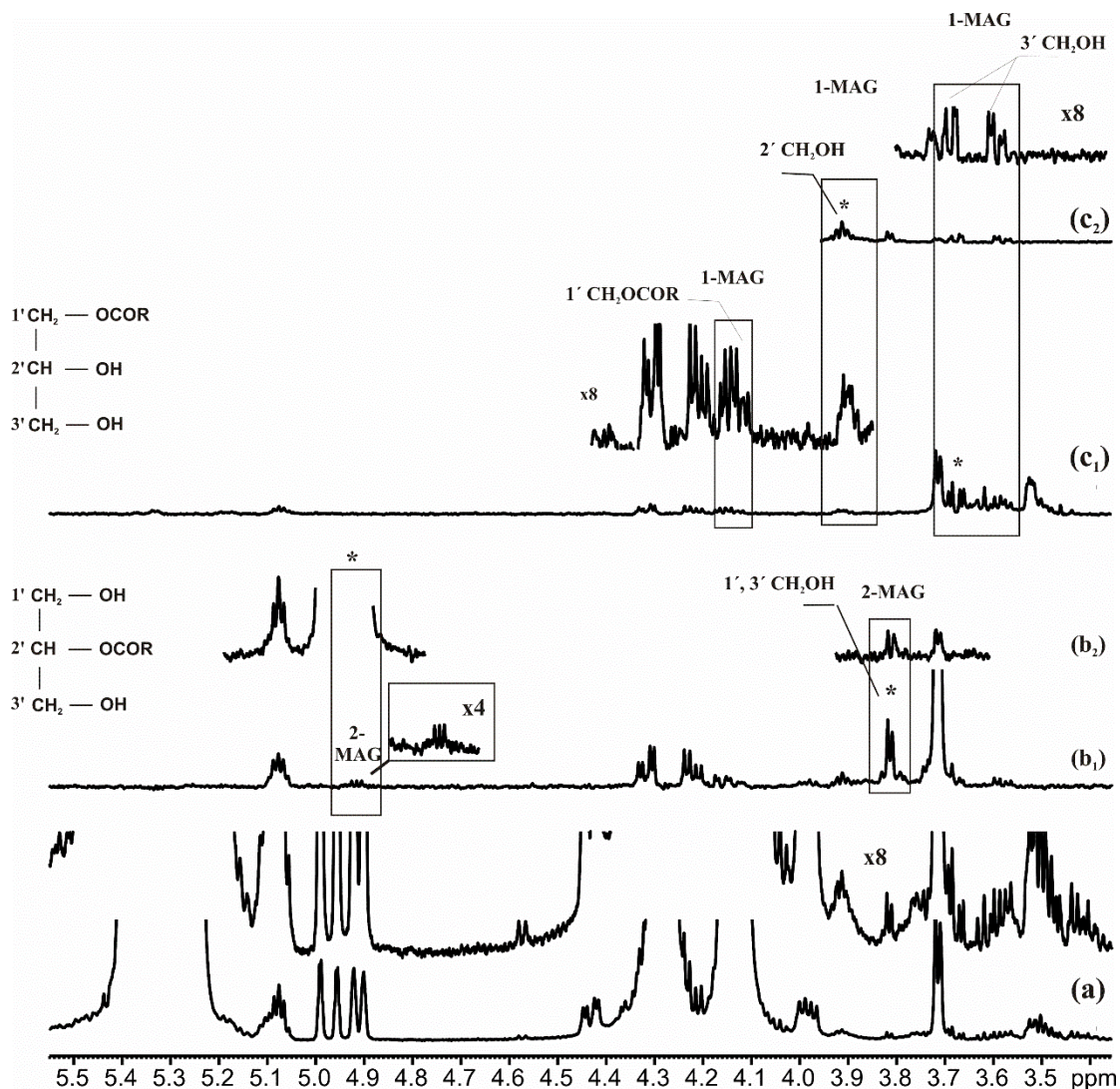


**Σχήμα 4.5:** Χρωματογράφημα spin της λιπιδικής φάσης λυοφιλοποιημένου δείγματος τυριού, διαλυμένου σε CDCl<sub>3</sub>. (a) Πρωτονιακό φάσμα (<sup>1</sup>H NMR 500 MHz), της λιπιδικής φάσης λυοφιλοποιημένου δείγματος τυριού, διαλυμένου σε CDCl<sub>3</sub> (T: 298 K, αριθμός παλμών:256, χρόνος καταγραφής του σήματος (acquisition time): 4.3 s, χρόνος προς αποδιέγερσης των spin (relaxation delay):5 s, ολικός πειραματικός χρόνος: ~25 min). Επισημαίνεται η ταυτοποίηση των κορυφών των λιπιδίων που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό (sn1, sn2 και sn3, δείχνουν την στερεοεκλεκτικότητα θέσης της εστεροποιημένης γλυκερόλης στα τριγλυκερίδια). Στο 4.5 (a) παρουσιάζεται επίσης το ίδιο φάσμα σε μεγέθυνση x512, έτσι ώστε να διακρίνονται οι κορυφές των ισομερών 18:2 CLA και των συστατικών που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό. (b-d) Φάσματα 1D TOCSY του (a) με τ<sub>m</sub>= 400 ms (αριθμός παλμών: 256, ολικός πειραματικός χρόνος: ~25 min). Οι αστερίσκοι δείχνουν την επιλεκτική διέγερσή των συγκεκριμένων πρωτονίων.



**Σχήμα 4.6:** (a)Επιλεγμένη περιοχή του Σχήματος 4.5 (a), (b) το φάσμα 1D TOCSY του σχήματος 4.5 (a), και (c) φάσμα 1D TOCSY του πρότυπου ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA. Στα φάσματα (b) και (c), η διέγερση έγινε στο πρωτόνιο H11 ( $\delta=4.92$  ppm). Στο ένθετο παρουσιάζεται σε μεγέθυνση x16, το φάσμα (b), ώστε να εμφανιστούν σαφώς οι συντονισμοί των C(2)H<sub>2</sub>COOR.

Η επιλεκτική διέγερση μιας κατάλληλης κορυφής συντονισμού “στόχου” του συστατικού που μελετάται μπορεί να αποκαλύψει ολόκληρο το σύστημα spin, ακόμη και αν στο κλασικό φάσμα 1D <sup>1</sup>H NMR, αλληλεπικαλύπτεται σε πολύ μεγάλο βαθμό με κορυφές άλλων μεταβολιτών που είναι σε (2-10)×10<sup>2</sup> μεγαλύτερη συγκέντρωση. Το Σχήμα 4.6 (a) απεικονίζει ένα τυπικό πείραμα 500 MHz NMR <sup>1</sup>H από λιπιδικό κλάσμα λυοφιλοποιημένου δείγματος χαλουμιού, διαλυμένο σε CDCl<sub>3</sub>. Διέγερση με επιλεκτικό TOCSY, χρόνου ανάμειξης 400 ms, του πρωτονίου H11 του ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA (Σχήμα 4.6 (b)), έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική μεταφορά της μαγνήτισης από το H11 στο H2 και από το H11 στο H18. Επομένως, η συνολική δομή του μορίου αποκαλύπτεται με υψηλή διακριτική ανάλυση, παρόλο που τα σήματα των πρωτονίων H2 έως H8 και των πρωτονίων H12 έως H18 “καλύπτονται” εντελώς σε ένα συμβατικό φάσμα 1D <sup>1</sup>H NMR, λόγω των σημάτων συστατικών που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό και με μεγαλύτερες εντάσεις κορυφών, της τάξης 4×10<sup>2</sup> έως 3×10<sup>3</sup>.



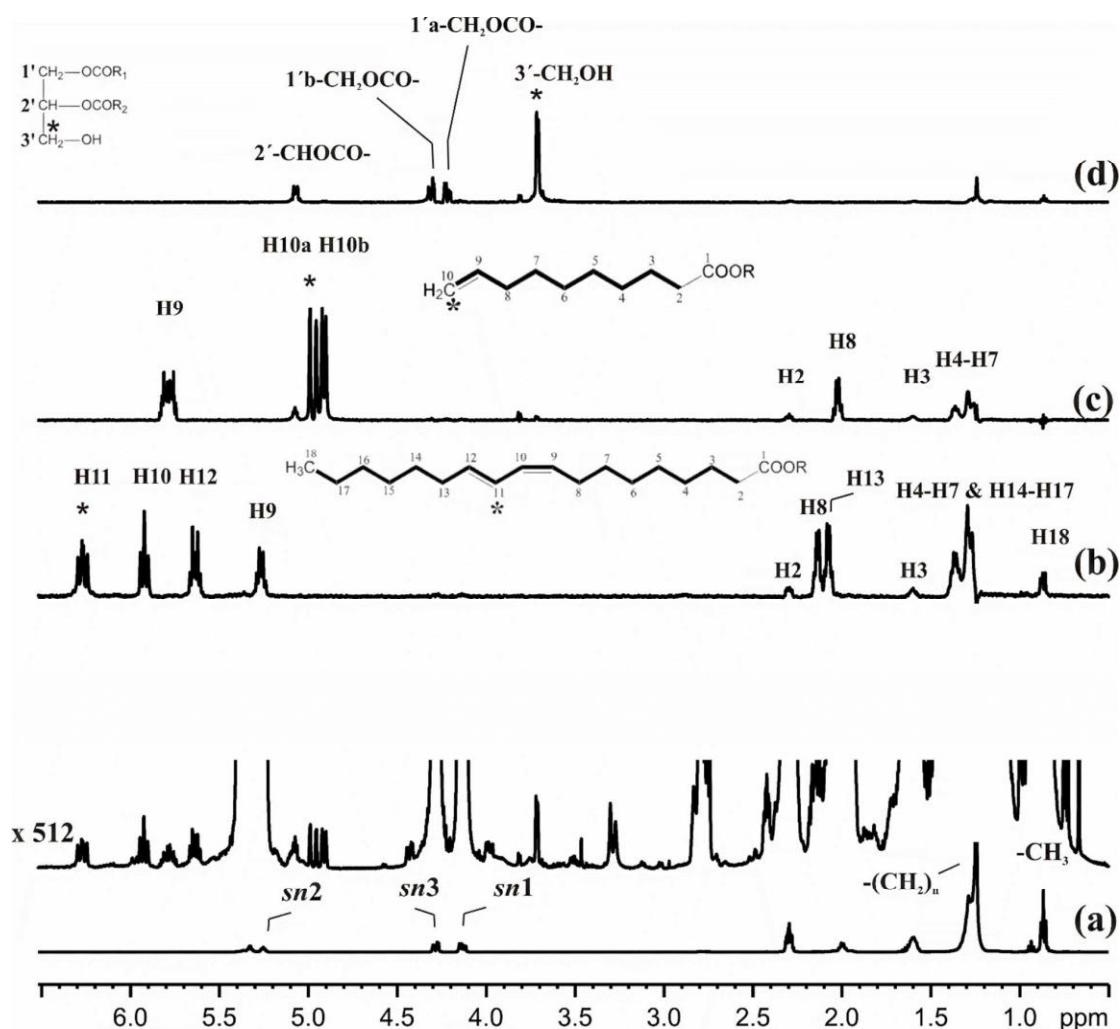
**Σχήμα 4.7:** Επιλεγμένες περιοχές του Σχήματος 4.5 (a), (b) Φάσμα 1D TOCSY, το οποίο δείχνει το σύστημα –spin του μορίου της γλυκερόλης στα 2-MAG (στα τμήματα  $b_1$  και  $b_2$ , η διέγερση πραγματοποιήθηκε στις κορυφές των  $1', 3'-CH_2OH$  ( $\delta = 3.82$  ppm) και  $2'-CHOCOR$  ( $\delta = 4.92$  ppm) του 2-MAG αντίστοιχα), και (c) 1D TOCSY φάσμα του συστήματος spin της γλυκερόλης στο 1-MAG (στα τμήματα  $c_1$  και  $c_2$ , η διέγερση πραγματοποιήθηκε στις κορυφές των  $3'-CH_2OH$  ( $\delta = 3.67$  ppm) και  $2'-CH_2OH$  ( $\delta = 3.92$  ppm) του 1-MAG αντίστοιχα).

Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν με το καπρολεϊκό οξύ (Σχήμα 4.5 (c)). Η επιλεκτική διέγερση TOCSY των πρωτονίων H10a στα 4.97 ppm με χρόνο ανάμειξης  $\tau_m = 400$  ms, έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική μεταφορά της μαγνήτισης σε ολόκληρο το πρωτονιακό spin σύστημα, παρόλο που τα σήματα των πρωτονίων H8 έως H2 είναι εντελώς κρυμμένα στο συμβατικό φάσμα 1D  $^1H$  NMR. Η επιλεκτική διέγερση TOCSY της διπλής κορυφής στα 3.72 ppm, αποκαλύπτει ολόκληρο το σύστημα της γλυκερόλης στο 1,2-DAG στα 5.20 ppm ( $2'-CHOCO$ ), 4.28 ppm και 4.13 ppm ( $1'b$ ,  $1'a-CH_2OCO$ , αντίστοιχα) (Σχήμα 4.5(d)).

Το Σχήμα 4.8 απεικονίζει μια παρόμοια σειρά φασμάτων επιλεκτικού 1D TOCSY του λιπιδικού κλάσματος ενός λυοφιλοποιημένου δείγματος γάλακτος. Επιβεβαιώνεται πως η μέθοδος 1D TOCSY επιτρέπει την ανάλυση και τη διεκρίνιση της δομής των



συστατικών που βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό, σε σύντομο σχετικά χρόνο και με υψηλή φασματική διακριτική ανάλυση.



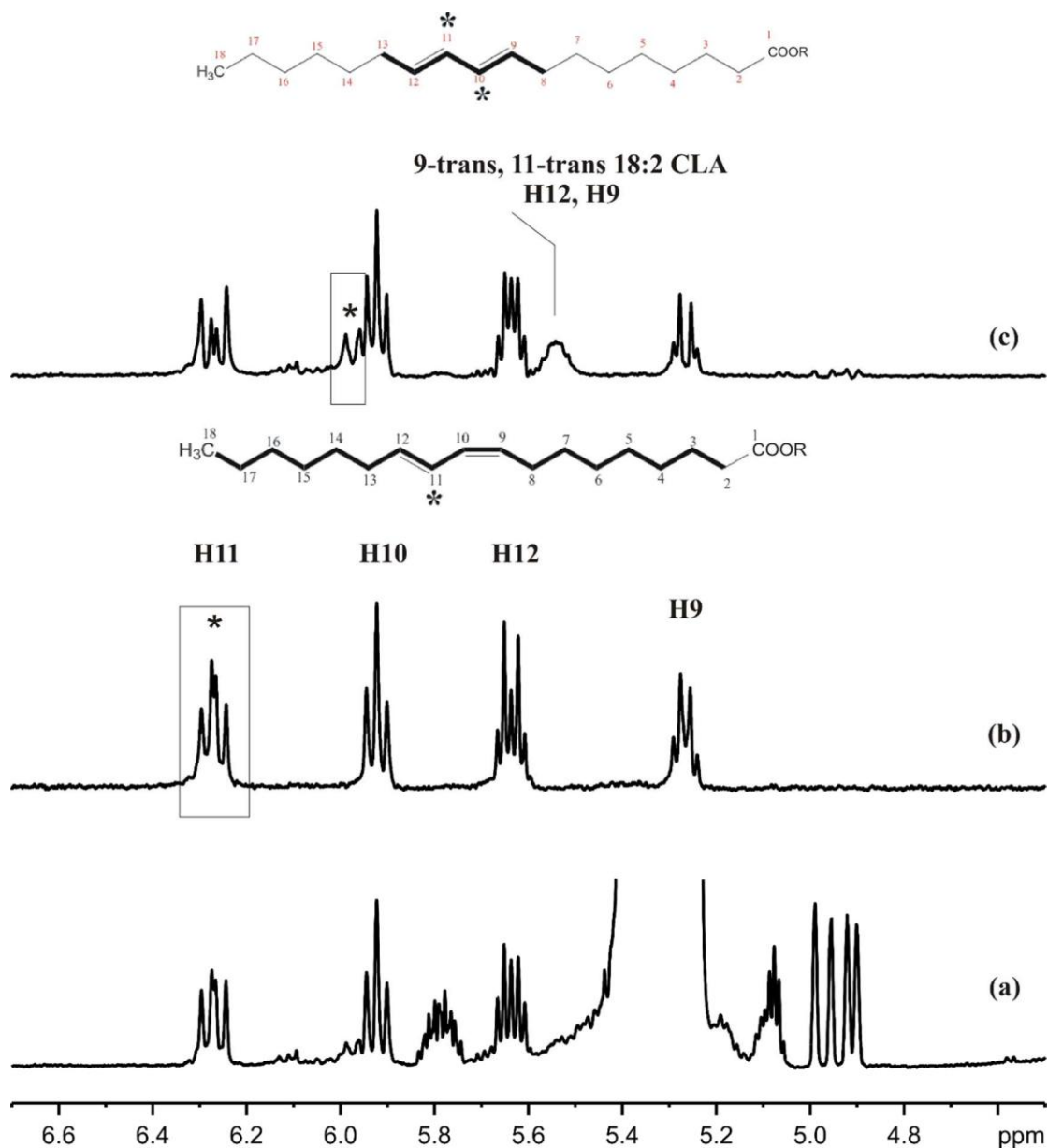
**Σχήμα4.8:** (a) Πρωτονιακό φάσμα ( $^1\text{H}$  NMR) 500 MHz της λιπιδικής φάσης λυοφιλοποιημένου γάλακτος, σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  ( $T= 298$  K, αριθμός παλμών= 256, χρόνος καταγραφής σήματος (acquisition time)= 4.3s, χρόνος προς αποδιέγερση των spin (relaxation delay)= 5 s, ολικός πειραματικός χρόνος: ~ 25 min). Το φάσμα (a) επιδεικνύεται και σε μεγέθυνση x512, προκειμένου να εμφανιστούν οι συντονισμοί του 18:2 CLA και άλλων μεταβολιτών που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό. (b)- (d) Φάσματα 1D TOCSY του παραπάνω διαλύματος με  $\tau_m= 400\text{ms}$  (ολικός πειραματικός χρόνος ~ 25 min). Οι αστερίσκοι δηλώνουν την επιλεγμένη κορυφή που έχει διεγερθεί.

Η σύγκριση μεταξύ ενός φάσματος του πρότυπου ισομερούς (9- cis, 11-trans) 18:2 CLA με αυτό που έχει ληφθεί από το λιπιδικό κλάσμα λυοφιλοποιημένου δείγματος χαλουμιού, απεικονίζει μια σημαντική διαφορά του συστήματος spin του  $\text{C}(2)\text{H}_2$  (Σχήμα 4.6). Στο μόριο της πρότυπης ένωσης αυτό εμφανίζεται ως μια τριπλή κορυφή ( $\delta= 2.33$  ppm,  $^3J= 7.2$  Hz) εξαιτίας της σύζευξης με τα πρωτόνια  $\text{C}(3)\text{H}_2$ , ενώ στο φάσμα του εκχυλίσματος εμφανίζεται στα  $\delta=2.30$  ppm με πολύπλοκη πολλαπλή σχάση. Αυτό αποδεικνύει σαφώς ότι το ισομερές (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA στο εκχύλισμα υπάρχει με τη μορφή εστέρα και όχι με τη μορφή ελεύθερου λιπαρού οξέος. Εξαιτίας της ασυμμετρίας του άνθρακα που βρίσκεται στη θέση sn2 του μορίου της γλυκερόλης, τα πρωτόνια  $\text{C}(3)\text{H}_2$  γίνονται μαγνητικά μη ισοδύναμα,

έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολλαπλού συστήματος σπιν. Πιθανόν όμως και να οφείλεται στη διαφορετική κατανομή εντός του τμήματος της γλυκερόλης των μορίων CLA με ελαφρώς διαφορετική χημική μετατόπιση των C(2)H<sub>2</sub>. Αυτό το αποτέλεσμα είναι πολύ σημαντικό στην μελέτη των προϊόντων υδρόλυσης εστερικού δεσμού μεταξύ μιας ακυλομάδας και του μορίου της γλυκερόλης. Τα προκύπτοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα προϊόντα του καταβολισμού τους έχει βρεθεί πως βρίσκονται μεταξύ των πρωτογενών παραγόντων για το άρωμα των σκληρών τυριών, όπου η λιπόλυση φτάνει σε υψηλά επίπεδα.<sup>24</sup>

Το Σχήμα 4.7 απεικονίζει τις μεγάλες δυνατότητες των επιλεκτικών πειραμάτων 1D TOCSY, όσον αφορά τα συστατικά που βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό και τα σήματά τους βρίσκονται περιοχές του 1D <sup>1</sup>H NMR φάσματος με μεγάλο βαθμό επικάλυψης. Το σύστημα σπιν των μορίων της γλυκερόλης τόσο στο 2-MAG (Σχήμα 4.7 (b<sub>1</sub>), (b<sub>2</sub>)), όσο και στο 1-MAG (Σχήμα 4.7 (c<sub>1</sub>), (c<sub>2</sub>)) επιλύθηκε ξεκάθαρα μέσω “δικτύου” συσχετίσεων spin παρότι, για παράδειγμα, τα σήματα του 1-MAG αλληλεπικαλύπτονται σε πολύ μεγάλο βαθμό με άλλες κορυφές στην περιοχή από τα 3.75 έως τα 3.55 ppm (Σχήμα 4.7a).

Η εξαιρετική εκλεκτικότητα του 1D TOCSY αποδεικνύεται επίσης στην περίπτωση των ισχυρά αλληλεπικαλυπτόμενων σημάτων των 18:2 γεωμετρικών ισομερών. Στο Σχήμα 4.9 απεικονίζεται επιλεγμένη περιοχή <sup>1</sup>H NMR των σημάτων του ισομερούς (9,11) 18:2 CLA του λιπιδικού κλάσματος από δείγμα λυοφιλοποιημένου χαλουμιού. Η φαινομενική τριπλή κορυφή στα 5.92 ppm (<sup>3</sup>J=10.9 Hz) έχει ταυτοποιηθεί ως το ολεφινικό πρωτόνιο H10 του ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA. Από την άλλη, η ισχυρά αλληλεπικαλυπτόμενη ασθενής κορυφή στα 5.97 ppm έχει ταυτοποιηθεί ως το κοινό σήμα των πρωτονίων H10 και H11 του ισομερούς (9-trans, 11-trans) 18:2 CLA. Η εφαρμογή του πειράματος επιλεκτικού 1D TOCSY του σήματος στα 5.97 ppm απεικονίζει με ξεκάθαρο τρόπο τη μεταφορά της μαγνήτισης στα πρωτόνια H9 και H12 στα 5.54 ppm τα οποία δεν αλληλεπικαλύπτονται ισχυρώς με άλλα σήματα του λιπιδικού κλάσματος (Σχήμα 4.9 (c)), και, με αυτόν τον τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του ισομερούς (9-trans, 11-trans) 18:2 CLA. Παρόλα αυτά, ένας περιορισμός της μεθόδου αυτής, είναι το γεγονός ότι επειδή η ταυτοποίηση βασίζεται στις χημικές μετατοπίσεις, το μέγεθος της αλυσίδας του λιπαρού οξέος και η θέση του διπλού δεσμού δεν μπορούν να προσδιοριστούν με σαφήνεια. Για παράδειγμα, το πρωτονιακό φάσμα NMR του ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 έχει σχεδόν παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις και J-συζεύξεις με αυτές των ενώσεων (9-cis, 11-trans) 20:2 και (11-cis, 13-trans) 20:2.

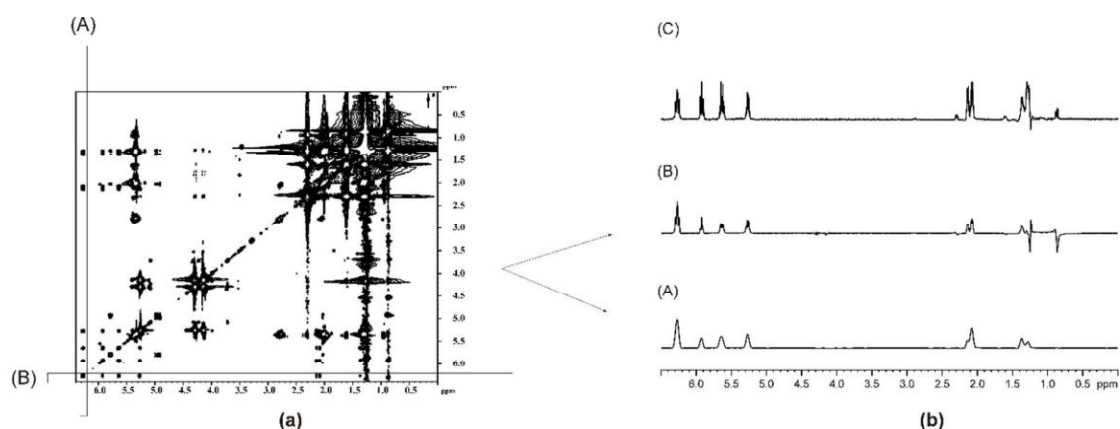


**Σχήμα 4.9:** (a) Επιλεγμένη περιοχή του πρωτονιακού φάσματος ( $1D\ ^1H\ NMR$ ), του διαλύματος του Σχήματος 4.5(a). Οι αστερίσκοι δείχνουν τη θέση των επιλεγμένων σημάτων που έχουν διεγερθεί. (b) και (c) Φάσμα επιλεκτικού  $1D\ TOCSY$  του παραπάνω διαλύματος. Στο (b) και με χρόνο ανάμειξης  $\tau_m = 400\ ms$  επιτεύχθηκε μεταφορά της μαγνήτισης από το H11 στο H9 του (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA. Στο (c) και με χρόνο ανάμειξης  $\tau_m = 70\ ms$  επιτεύχθηκε βελτιστοποίηση του χρόνου μεταφοράς μαγνήτισης από το H10, 11 στο H9,12 του (9-trans, 11-trans) 18:2 CLA.

Στο Σχήμα 4.10 απεικονίζονται συγκριτικά το φάσμα που προέκυψε από το πείραμα  $1D\ TOCSY$  του σχήματος 4.5 (b) με το αντίστοιχο φάσμα του πειράματος  $2D\ TOCSY$ . Είναι προφανές ότι το πείραμα  $1D\ TOCSY$ : (i) αυξάνει σημαντικά τη διακριτική ανάλυση, αφού στο πείραμα  $2D\ TOCSY$  αυτή είναι περιορισμένη από τον αριθμό των σημείων που λαμβάνονται στην έμμεση διάσταση, (ii) δεν υφίστανται προβλήματα δυναμικού εύρους (dynamic range) του φάσματος λόγω της παρουσίας ισχυρότατων απορροφήσεων των ομάδων  $(CH_2)_n$  (iii) το σύστημα σπιν μπορεί να εμφανιστεί, ακόμη και στην περιοχή όπου υπάρχει εντονότατη αλληλοεπικάλυψη με



κορυφές που προκύπτουν από τα συστατικά που βρίσκονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό, και (iv) μειώνει τον χρόνο διεξαγωγής του πειράματος.



**Σχήμα 4.10:** Επιλεγμένες περιοχές φασμάτων NMR (500 MHz) (a) 2D TOCSY του λιπιδικού κλάσματος λυοφιλοποιημένου δείγματος τυριού σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (32 επαναλήψεις, συνολικός πειραματικός χρόνος 5 ώρες και 5 λεπτά) (b) Τα (A) και (B) δείχνουν την περιοχή σπιν-συσχετίσεων του πρωτονίου H11 του ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA του φάσματος 2D TOCSY, του (a). (C) Φάσμα 1D TOCSY του ίδιου διαλύματος όπως στο (a) με διέγερση του πρωτονίου H22 του ισομερούς (9-cis, 11-trans) 18:2 CLA. Η σημαντική αύξηση της διακριτικής ικανότητας σε σχέση με το 2D TOCSY είναι προφανής ( $T = 298 \text{ K}$ , αριθμός παλμών=256, χρόνος καταγραφής σήματος (acquisition time)= 4.3 s, χρόνος προς αποδιέγερση των spin (relaxation delay):5 s, ολικός πειραματικός χρόνος  $\sim 25 \text{ min}$ ).

#### 4.5 Ποσοτικοποίηση Λιπιδίων με τη χρήση του Πειράματος 1D TOCSY- Σύγκριση με την Κλασική Μέθοδο 1D NMR και τη Μέθοδο Ανάλυσης GC-MS

Η μεγάλη ευαισθησία και η εξαιρετική διακριτική ανάλυση του πειράματος επιλεκτικού 1D TOCSY επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των συστατικών που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό. Η ποσοτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο προσθήκης προτύπου (standard addition). Στο δείγμα προστέθηκαν γνωστές ποσότητες του καπρολεϊκού οξέος και λήφθηκαν τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα spin, στα οποία έγινε επιλεκτική διέγερση του πρωτονίου H9 του καπρολεϊκού οξέος. Ο χρόνος επανάληψης παλμών (acquisition time + relaxation delay) ρυθμίστηκε στα  $5T_1$  ( $\sim 16 \text{ s}$ ). Το μεγάλο αυτό χρονικό διάστημα κρίθηκε απαραίτητο για την πλήρη χαλάρωση των πρωτονίων H9 και H10 ( $\sim 3.2 \text{ s}$ ) του καπρολεϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συγκρίθηκαν με αυτά που λήφθηκαν με τη χρήση της κλασικής ποσοτικοποίησης 1D  $^1\text{H}$  NMR.

Η επίδραση του χρόνου ανάμειξης (mixing time) και του χρόνου προς αποδιέγερση (relaxation delay) στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση, μελετήθηκαν λεπτομερώς. Χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί χρόνοι ανάμειξης, και πιο συγκεκριμένα 33, 100 και 200 ms (το mixing time  $\tau_m = 33 \text{ ms}$

αντιστοιχεί στην τιμή της σταθεράς σύζευξης  $\frac{1}{2} J$ , όπου,<sup>3</sup> είναι η σταθερά σύζευξης των πρωτονίων H9 και H10).

Η ευαισθησία της μεθόδου 1D TOCSY παρατηρήθηκε πως ήταν μεγαλύτερη, όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες τιμές χρόνου ανάμειξης, αλλά σε βάρος της ακρίβειας ποσοτικοποίησης. Η χρήση μεγαλύτερων τιμών χρόνου ανάμειξης είχε ως αποτέλεσμα να πραγματοποιηθεί μια μέτρια μείωση της ευαισθησίας, περίπου κατά ένα παράγοντα δύο αλλά, από την άλλη πλευρά, έχει επιτευχθεί μια σημαντική βελτίωση της ακρίβειας της μεθόδου (το σχετικό σφάλμα υπολογίστηκε περίπου στο 31% για  $\tau_m = 33 \text{ ms}$ <sup>27</sup>, ενώ για  $\tau_m = 200 \text{ ms}$ , το σχετικό σφάλμα περιορίστηκε περίπου στο 2%). Θα πρέπει να τονιστεί ότι για  $\tau_m = 200 \text{ ms}$ , η ευαισθησία και η ακρίβεια της μεθόδου δεν παρουσίασε διαφορά είτε χρησιμοποιώντας το σήμα του πρωτονίου H9 είτε του H10. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι ένα από τα πλεονεκτήματα της διαδικασίας της χρωματογραφίας των spin είναι η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του προς μελέτη αναλύτη, είτε χρησιμοποιώντας το διεγερμένο πρωτόνιο, είτε χρησιμοποιώντας ένα “γειτονικό” πρωτόνιο, στο οποίο έχει μεταφερθεί η μαγνήτιση.

Η ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο 1D TOCSY επιτεύχθηκε, ακολουθώντας τη μέθοδο που εφαρμόστηκε από τον Sandusky και τους συνεργάτες του.<sup>28</sup> Ο Πίνακας 4.4.1 δείχνει τα ποσοτικά δεδομένα που έχουν ληφθεί από δείγματα γάλακτος, χρησιμοποιώντας το πείραμα 1D TOCSY. Η συγκέντρωση του δείγματος (στο σωληνάριο NMR) υπολογίστηκε με βάση την ολοκλήρωση του πρωτονίου H9 χρησιμοποιώντας το πείραμα 1D TOCSY. Η τιμή του καπρολεϊκού οξέος βρέθηκε ίση με  $1.02 \pm 0.03 \text{ mmolL}^{-1}$  σε σύγκριση με την τιμή  $0.97 \pm 0.02 \text{ mmolL}^{-1}$  με τη χρήση της κλασικής μεθόδου 1D NMR. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.4.1, επαληθεύουν την συμφωνία των δύο μεθόδων: της απλής μεθόδου <sup>1</sup>H-NMR και της τεχνικής επιλεκτικού 1D TOCSY.

**Πίνακας 4.4.1. Αποτελέσματα των μεθόδων 1D TOCSY NMR, κλασικού 1D <sup>1</sup>H NMR, και GC- MS για τον προσδιορισμό του καπρολεϊκού οξέος (CA) σε δύο δείγματα γάλακτος**

Δείγμα	αναλύτης (μονάδες)	1D TOCSY <sup>α</sup>	<sup>1</sup> H NMR <sup>α</sup>	σχετική απόκλιση <sup>β</sup> (%)	GC-MS	σχετική απόκλιση <sup>γ</sup> (%)
1	CA (mM)	1.02 ± 0.03	0.97 ± 0.02 <sup>α</sup>	5.15		
	CA (% του λιπιδικού κλάσματος)		0.26 ± 0.01		0.28	-7.14
2	CA (mM)	1.92 ± 0.06	1.83 ± 0.06 <sup>α</sup>	1.75		
	CA (% του λιπιδικού κλάσματος)		0.74 ± 0.01		0.68	8.82

<sup>α</sup> Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε  $\text{mmolL}^{-1}$  του καπρολεϊκού οξέος (στο σωληνάριο NMR, σχετική απόκλιση ( $n = 3$ )). <sup>β</sup> Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $100[(1\text{D TOCSY}_{\text{value}}) - (1\text{D}^1\text{HNMR}_{\text{value}})] / (1\text{D}^1\text{HNMR}_{\text{value}})$ . <sup>γ</sup> Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως  $100[(1\text{D}^1\text{HNMR}_{\text{value}}) - (\text{GC} - \text{MS}_{\text{value}})] / (\text{GC} - \text{MS}_{\text{value}})$ .

Το όριο ανίχνευσης (LOD) για την ποσοτικοποίηση του καπρολεϊκού οξέος με το πείραμα επιλεκτικού 1D TOCSY, υπολογίστηκε για τα δύο δείγματα γάλακτος του Πίνακα 4.4.1, με τη χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων, της βαθμονόμησης<sup>29</sup>, και της μεθόδου SNR.<sup>30,31</sup> Με τη χρήση της μεθόδου βαθμονόμησης<sup>28</sup> σχεδιάστηκε μια πρότυπη καμπύλη, με την προσθήκη σταθερής ποσότητας του αναλύτη καπρολεϊκού οξέος. Το LOD βρέθηκε ίσο με  $0.07 \pm 0.01 \text{ mmolL}^{-1}$  (στο σωληνάριο NMR),  $0.01 \text{ mg}^{-1}$  για το δείγμα γάλακτος. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο SNR, το LOD υπολογίστηκε εφαρμόζοντας την εξίσωση  $3\text{xC} / (\text{S/N})$  σε ένα πρότυπο δείγμα καπρολεϊκού οξέος, όπου ο συντελεστής C αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αναλύτη, όπως αυτή έχει υπολογιστεί με τη χρήση  $^1\text{H}$  NMR (η επεξεργασία των δεδομένων έγινε χωρίς τη χρήση εκθετικής συνάρτησης διεύρυνσης των κορυφών (linebroadening exponential function)). Επίσης, υπολογίστηκε η τιμή του λόγου σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio, S/N), του αντίστοιχου φάσματος 1D TOCSY. Για τιμές συγκέντρωσης 0.97, 2.04 και  $2.98 \text{ mmolL}^{-1}$  του καπρολεϊκού οξέος (στο σωληνάριο NMR) η τιμή  $3\text{xC} / (\text{S/N})$  βρέθηκε ίση με 0.10, 0.11 και  $0.008 \text{ mmolL}^{-1}$ , αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τα φάσματα 1D TOCSY, και ίση με 0.004, 0.007 και  $0.010 \text{ mmolL}^{-1}$ , χρησιμοποιώντας τα φάσματα 1D  $^1\text{H}$  NMR, αντίστοιχα. Συνεπώς, η τιμή LOD του καπρολεϊκού οξέος είναι  $0.10 \text{ mmolL}^{-1}$  (στο σωληνάριο NMR) ή  $0.01 \pm 0.0001 \text{ mg}^{-1}$  για το δείγμα γάλακτος, και  $0.010 \text{ mmolL}^{-1}$  (στο σωληνάριο NMR) ή  $0.001 \pm 0.0001 \text{ mg}^{-1}$  για τις μεθόδους 1D TOCSY και  $^1\text{H}$  NMR αντίστοιχα.

Τα ποσοτικά αποτελέσματα των μεθόδων της χρωματογραφίας των spin και  $^1\text{H}$  NMR μιας διάστασης συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν με τη χρήση της αναλυτικής μεθόδου GC-MS (ISO 15884:2002).<sup>22</sup> Η τιμή του καπρολεϊκού οξέος υπολογίστηκε ίση με 0.28% και 0.68% των συνολικών λιπιδίων, όταν υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα GC-MS και ίση με 0.26% και 0.74% των συνολικών λιπιδίων όταν υπολογίστηκε με τη μέθοδο  $^1\text{H}$  NMR για το πρώτο και το δεύτερο δείγμα γάλακτος, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα NMR συνεπώς, βρίσκονται σε συμφωνία με την αναλυτική μέθοδο GC-MS.

#### 4.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προτεινόμενη μέθοδος επιλεκτικής χρωματογραφίας των spin 1D-TOCSY (selective 1D TOCSY spin-chromatography) που ουσιαστικά αποτελεί μια διαδικασία διαχωρισμού των spin σε μοριακό επίπεδο, είναι μία τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία ακόμη και στην ανάλυση συστατικών που βρίσκονται σε αρκετά μικρό ποσοστό μέσα σε ένα πολύπλοκο μίγμα. Αυτή η μέθοδος, επομένως, αναμένεται να έχει σημαντικές εφαρμογές στην έρευνα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης και της στοχευμένης μεταβολομικής (targeting metabolomics)<sup>32</sup>, καθώς: (i) είναι γρήγορη, εκλεκτική και μη καταστρεπτική, (ii) επιτρέπει την ταυτοποίηση μεταβολιτών που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό, ακόμη και σε περιοχές που είναι ισχυρά επικαλυπτόμενες από άλλα σήματα μεταβολιτών που βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη περιεκτικότητα, (iii) δεν απαιτεί παράγωγα βήματα επεξεργασίας και (iv) επιτρέπει την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών που παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον από διατροφική και ιατρική άποψη. Εφαρμογή της επιλεκτικής χρωματογραφίας 1D-TOCSY στη διάκριση οργανικού και συμβατικού γάλακτος και διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων βρίσκεται σε εξέλιξη. Επίσης περαιτέρω μελέτες θα κάνουν χρήση της μεθοδολογίας ευρέος φάσματος ομοιο-αποσύζευξης  $^1\text{H}$  (broadband  $^1\text{H}$  homodecoupled) NMR με στόχο την περαιτέρω αύξηση της διακριτικής ικανότητας.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- (1) Novoa-Carballal, R.; Fernandez-Megia, E.; Jimenez, C.; Riguera, R. NMR Methods for Unravelling the Spectra of Complex Mixtures. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 78–98.
- (2) Albert, K. *On-Line LC-NMR and Related Techniques*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ; **2002**.
- (3) Wolfender, J. L.; Marti, G.; Thomas, A.; Bertrand, S. Current Approaches and Challenges for the Metabolite Profiling of Complex Natural Extracts. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1382*, 136–164.
- (4) Lewis, I. A.; Schommer, S. C.; Hodis, B.; Robb, K. A.; Tonelli, M.; Westler, W. M.; Sussman, M. R.; Markley, J. L. Method for Determining Molar Concentrations of Metabolites in Complex Solutions from Two-Dimensional 1H–13C NMR Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9385–9390.
- (5) Spyros, A.; Dais, P. <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy in Food Analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54*, 195–207.
- (6) Charisiadis, P.; Exarchou, V.; Troganis, A. N.; Gerothanassis, I. P. Exploring the “forgotten” –OH NMR Spectral Region in Natural Products. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3589–3591.
- (7) Manjunatha Reddy, G. N.; Caldarelli, S. Maximum-Quantum (maxQ) NMR for the Speciation of Mixtures of Phenolic Molecules. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4297–4299.
- (8) Charisiadis, P.; Primikyri, A.; Exarchou, V.; Tzakos, A.; Gerothanassis, I. P. Unprecedented Ultra-High-Resolution Hydroxy Group <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Analysis of Plant Extracts. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2462–2466.
- (9) Charisiadis, P.; Tsiafoulis, C. G.; Exarchou, V.; Tzakos, A.; Gerothanassis, I. P. Rapid and Direct Low Micromolar NMR Method for the Simultaneous Detection of Hydrogen Peroxide and Phenolics in Plant Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4508–4513.
- (10) Robinette, S. L.; Brüschweiler, R.; Schroeder, F. C.; Edison, A. S. NMR in Metabolomics and Natural Products Research: Two Sides of the Same Coin. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 288–297.
- (11) Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Viel, S. Liquid State <sup>1</sup>H High Field NMR in Food Analysis. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *66*, 1–39.
- (12) Martin-Pastor, M. Experiments for the Editing of Singlet Peaks and Simplification of <sup>1</sup>H NMR Spectra of Complex Mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 1190–1197.
- (13) Dilzer, A.; Park, Y. Implication of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Human Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2012**, *52*, 488–513.
- (14) Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. J. P. D. *In Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology*; Akoh, C. C., Min, D. B., Eds.; Marcel Decker, Inc.: New York; **2012**.
- (15) Dalvit, C.; Bovermann, G. Pulsed Field Gradient One-Dimensional NMR Selective ROE and TOCSY Experiments. *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 156–159.
- (16) Parella, T. High-Quality 1D Spectra by Implementing Pulsed-Field Gradients as the Coherence Pathway Selection Procedure. *Magn. Reson. Chem.* **1996**, *34*, 329–347.

- (17) Sharman, G. J. Development of a Selective TOCSY Experiment and Its Use in Analysis of a Mixture of Related Compounds. *Chem. Commun.* **1999**, *14*, 1319–1320.
- (18) Sandusky, P.; Raftery, D. Use of Semiselective TOCSY NMR Experiments for Quantifying Minor Components in Complex Mixtures: Application to the Metabonomics of Amino Acids in Honey. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2455–2463.
- (19) Koda, M.; Furihara, K.; Wei, F.; Moyakawa, T. Metabolic Discrimination of Mango Juice from Various Cultivars by Band-Selective NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1158–1166.
- (20) Cavanagh, J.; Rance, M. Suppression of Cross-Relaxation Effects in TOCSY Spectra via a Modified DIPSI- Mixing Sequence. **1992**, 670–678.
- (21) Tsiafoulis, C. G.; Skarlas, T.; Tzamaloukas, O.; Miltiadou, D.; Gerothanassis, I. P. Direct Nuclear Magnetic Resonance Identification and Quantification of Geometric Isomers of Conjugated Linoleic Acid in Milk Lipid Fraction without Derivatization Steps: Overcoming Sensitivity and Resolution Barriers. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *821*, 62–71.
- (22) International Organization of Standardization (ISO). ISO 15884:2002 (IDF 182:2002). Milk Fat? Preparation of Fatty Acid Methyl Esters; ISO: Geneva, Switzerland. **2002**, 6.
- (23) Tzamaloukas, O.; Orford, M.; Miltiadou, D.; Papachristoforou, C. Partial Suckling of Lambs Reduced the Linoleic and Conjugated Linoleic Acid Contents of Marketable Milk in Chios Ewes. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 1739–1749.
- (24) Scano, P.; Anedda, R.; Melis, M. P.; Dessi, M. A.; Lai, A.; Roggio, T. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Characterization of the Molecular Components of the Lipid Fraction of Pecorino Sardo Cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1305–1316.
- (25) Prema, D.; Pilfold, J. L.; Krauchi, J.; Church, J. S.; Donkor, K. K.; Cinel, B. Rapid Determination of Total Conjugated Linoleic Acid Content in Select Canadian Cheeses by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 9915–9921.
- (26) Sachleben, J. R.; Yi, R.; Volden, P. A.; Conzen, S. D. Aliphatic Chain Length by Isotropic Mixing (ALCHIM): Determining Composition of Complex Lipid Samples by <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2014**, *59*, 161–173.
- (27) An effective elimination of the twisted lineshapes (anti-phase components, ZQ artifacts) for short  $\tau_m$  values can be achieved with the use of the ZQ-filter experiment Thrippleton, J. M.; Keeler, J. Elimination of Zero-Quantum Interference in Two-Dimensional NMR Spectra. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938–3941.
- (28) Sandusky, P.; Amponsah, E. A.; Raftery, D. Use of Optimized 1D TOCSY NMR for Improved Quantitation and Metabolomic Analysis of Biofluids. *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 281–290.
- (29) Danzer, K. *Analytical Chemistry, Theoretical and Metrological Fundamentals*; Springer-Verlag: Berlin, Germany; **2007**.
- (30) Tsiafoulis, C. G.; Exarchou, V.; Tziouva, P. P.; Bairaktari, E.; Gerothanassis, I. P.; Troganis, A. N. A New Method for the Determination of Free L-Carnitine in Serum Samples Based on High Field Single Quantum Coherence Filtering <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2285–2294.
- (31) Maniara, G.; Rajamoorthi, K.; Rajan, S.; Stockton, G. Method Performance and Validation for Quantitative Analysis by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy.

- Applications to Analytical Standards and Agricultural Chemicals. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4291–4928.
- (32) Sundekilde, U. K.; Larsen, L. B.; Bertram, H. C. NMR-Based Milk Metabolomics. *Metabolites* **2013**, *3*, 204–222.