

Διατριβή Διπλώματος Ειδίκευσης  
Απομόνωσης και Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων  
με Βιολογική Δραστηριότητα

Ποσοτικός προσδιορισμός Διγλυκεριδίων, Στερολών και  
Ταυτοποίηση Λιπαρών Οξέων στο Γαλακτικό Λίπος με τη  
φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$  &  $^{13}\text{C}$  NMR

Φλώρα Μιχαλοπούλου

**Πανεπιστήμιο Κρήτης**  
**Τμήμα Χημείας**  
**Εργαστήριο Φασματοσκοπίας**  
**NMR**

**Ιούνιος 2003**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.</b>	<b>ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ .....</b>	<b>10</b>
1.1	Εισαγωγή.....	10
1.2	Διάφοροι τύποι γάλακτος υγρής μορφής .....	11
1.2.1	Παστεριωμένο γάλα .....	14
1.2.2	Γάλα μακράς διάρκειας (UHT).....	16
1.2.3	Συμπυκνωμένο γάλα.....	17
1.3	Χημική σύσταση του γάλακτος.....	18
1.3.1	Πρωτεΐνες.....	19
1.3.2	Λακτόζη και ιχνοστοιχεία.....	20
1.3.3	Στερόλες.....	22
1.3.4	Λίπος.....	22
1.3.5	Το γαλακτικό λίπος στη διατροφή του ανθρώπου.....	26
1.3.6	Επιπτώσεις της διατροφής των βοοειδών στην σύσταση του γάλακτος.....	27
1.3.7	Χημικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του γαλακτικού λίπους.....	28
1.3.8	Διγλυκερίδια.....	29
<b>2.</b>	<b>ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR) .....</b>	<b>31</b>
2.1	Χημική Μετατόπιση .....	31
2.2	Κλίμακα δ.....	32
2.3	Ιδιότητες του πυρήνα $^{31}\text{P}$ σε σχέση με το $^1\text{H}$ και τον $^{13}\text{C}$ .....	33
2.4	Εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στο γάλα και στα γαλακτομικά προϊόντα.....	34
2.4.1	Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.....	36
2.4.2	Παρακολούθηση αντιδράσεων ‘in vivo’ <sup>25</sup> .....	37
2.4.3	Προσδιορισμός φυσικών χαρακτηριστικών του λίπους του γάλακτος.....	37
<b>3.</b>	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>39</b>
3.1	Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες.....	39

3.1.1	Παρασκευή αντιδραστηρίου .....	39
3.1.2	Παρασκευή πρότυπου διαλύματος.....	40
<b>3.2</b>	<b>Δείγματα γάλακτος.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Απομόνωση του λίπους από το γάλα .....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Μέθοδος Roesse-Gotlieb .....	42
3.3.2	Τροποποιημένη μέθοδος Bligh and Dyer .....	45
3.3.3	Υπολογισμός του ποσοστού ανάκτησης του λίπους με τη τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer. ....	46
3.3.4	Έλεγχος επαναληψιμότητας της μεθόδου απομόνωσης του λίπους. 48	
<b>3.4</b>	<b>Αντίδραση φωσφυτιλίωσης για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5</b>	<b>Μονοδιάστατα φάσματα NMR .....</b>	<b>51</b>
3.5.1	Μονοδιάστατα φάσματα <sup>1</sup> H NMR .....	51
3.5.2	Μονοδιάστατα φάσματα <sup>13</sup> C NMR.....	51
3.5.3	Μονοδιάστατα φάσματά <sup>31</sup> P NMR .....	52
<b>3.6</b>	<b>Ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA).....</b>	<b>55</b>
<b>3.7</b>	<b>Αποτελέσματα –Συζήτηση .....</b>	<b>58</b>
3.7.1	Παρατηρήσεις κατά την διαδικασία απομόνωσης του λίπους. 58	
3.7.2	Φάσματα <sup>31</sup> P NMR γαλακτικού λίπους. ....	58
3.7.3	Περιεκτικότητα διγλυκεριδίων στους διάφορους τύπους γάλακτος.....	61
3.7.4	Επεξεργασία αποτελεσμάτων ANOVA.....	65
3.7.5	Φάσματα <sup>1</sup> H-NMR του γαλακτικού λίπους. ....	66
3.7.6	Φάσματα <sup>13</sup> C- NMR του γαλακτικού λίπους. ....	71
3.7.7	Συμπεράσματα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στο γαλακτικό λίπος. ....	91
<b>3.8</b>	<b>Γενικά συμπεράσματα. ....</b>	<b>92</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1-1: Προδιαγραφές περιεκτικότητας σε λίπος στους διάφορους τύπους γάλακτος .....	12
Πίνακας 1-2: Μέση σύσταση του αγελαδινού γάλακτος .....	19
Πίνακας 1-3: Λιπιδική σύσταση του αγελαδινού γάλακτος.....	23
Πίνακας 1-4: Κυριότερα λιπαρά οξέα συστατικά του αγελαδινού λίπους... 25	
Πίνακας 3-1 Εμπορικά διαθέσιμα δείγματα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν .....	41
Πίνακας 3-2: Ποσοστά ανάκτησης του λίπους με τη τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer .....	47
Πίνακας 3-3: Επαναληψιμότητα απομόνωσης αγελαδινού γαλακτικού λίπους με την τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer.....	48
Πίνακας 3-4: Χημικές μετατοπίσεις πρότυπων διγλυκεριδίων και β-σιτοστερόλης στο φάσμα $^{31}\text{P}$ -NMR.....	59
Πίνακας 3-5 Πίνακας πειραματικών αποτελεσμάτων. ....	63
Πίνακας 3-6 Πίνακας αποτελεσμάτων της ANOVA.....	65
Πίνακας 3-7 Κυριότερα λιπαρά οξέα του λίπους του γάλακτος αγελάδας. . 67	
Πίνακας 3-8 Χημική μετατόπιση και ανάθεση των κυρίων κορυφών του φάσματος $^1\text{H}$ NMR γαλακτικού λίπους.....	68
Πίνακας 3-9 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR του σχήματος στην περιοχή δ 172-174. ....	75
Πίνακας 3-10 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή 129-131 ppm. ....	77
Πίνακας 3-11 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR του στην περιοχή δ 60-70.....	79
Πίνακας 3-12 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή δ 33–36. ....	80
Πίνακας 3-13 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή δ 30.5-32.5.....	83
Πίνακας 3-14 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή δ 25-27.5.....	85

Πίνακας 3-15 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή δ 24-26.....	86
Πίνακας 3-16 Χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή δ 22-23. ....	88
Πίνακας 3-17 Χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή 13-14.5 ppm. ....	90

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1: Περιοχή φάσματος $^{31}\text{P}$ -NMR γαλακτικού λίπους, στην οποία απορροφούν τα διγλυκερίδια (1.2-DG και 1.3-DG) και οι στερόλες...	53
Σχήμα 3.2 (α) Φάσμα $^{31}\text{P}$ -NMR από δείγμα λίπους που ανακτήθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer, (β) Φάσμα $^{31}\text{P}$ -NMR από δείγμα λίπους που ανακτήθηκε με την μέθοδο Roese-Gottlieb, (γ) Φάσμα $^{31}\text{P}$ -NMR από δείγμα λίπους που ανακτήθηκε με την μέθοδο Roese-Gottlieb και στο οποίο έχει προστεθεί πρότυπη λακτόζη. . Και στα τρία φάσματα παρουσιάζεται η περιοχή απορρόφησης των διγλυκεριδίων και στερολών.....	60
Σχήμα 3.3 Φάσμα $^1\text{H}$ -NMR γαλακτικού λίπους αγελάδας. ....	69
Σχήμα 3.4 Περιοχή φάσματος $^1\text{H}$ -NMR (0-3 ppm) στα 500MHz, δείγματος γαλακτικού λίπους. ....	69
Σχήμα 3.5 Φάσμα $^1\text{H}$ -NMR στα 500 MHz δείγματος γαλακτικού λίπους. (α) Περιοχή απορρόφησης πρωτονίων της γλυκερόλης των τριγλυκεριδίων (φάσμα ABX). (β) Περιοχή απορρόφησης ακόρεστων πρωτονίων των λιπαρών οξέων. ....	71
Σχήμα 3.6 Συντακτικά ισομερή των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λίπος του γάλακτος. ....	73
Σχήμα 3.7 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι καρβοξυλικοί άνθρακες. ....	74
Σχήμα 3.8 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι ολεφινικοί άνθρακες. ....	76
Σχήμα 3.9 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι άνθρακες της γλυκερόλης. ....	78
Σχήμα 3.10 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι άνθρακες C-2 των λιπαρών οξέων.....	80
Σχήμα 3.11 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται τα άτομα $\omega_3$ των λιπαρών οξέων.....	82
Σχήμα 3.12 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι εσωτερικοί άνθρακες των αλειφατικών αλυσίδων. ....	83
Σχήμα 3.13 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι αλλυλικοί άνθρακες. ....	84

Σχήμα 3.14 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ που συντονίζονται οι C-3 των λιπαρών οξέων .....	87
Σχήμα 3.15 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ που συντονίζονται τα άτομα άνθρακα $\omega_2$ των λιπαρών οξέων.....	89
Σχήμα 3.16 Περιοχή του φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ που συντονίζονται τα άτομα άνθρακα $\omega_1$ των λιπαρών οξέων.....	90

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται μια νέα μέθοδος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των διγλυκεριδίων και στερολών που βρίσκονται στο λίπος του γάλακτος, η οποία έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον ίδιο σκοπό στα εδώδιμα έλαια. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη φωσφιτυλίωση των ελεύθερων υδροξυλομάδων των διγλυκεριδίων με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμέθυλοδιοξαφωσφολάνιο και την ολοκλήρωση των συγκεκριμένων κορυφών στο φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR. Παράλληλα, δίνονται οι πρώτες πληροφορίες στη βιβλιογραφία για τη συγκέντρωση των διγλυκεριδίων και στερολών σε σχέση με διάφορους τύπους γάλακτος. Τέλος, η παρούσα εργασία αναφέρεται στην ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων που βρίσκονται στο λίπος του γάλακτος υπό μορφή τριγλυκεριδίων με τη φασματοσκοπία  $^{13}\text{C}$ -NMR.



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τον καθ. κ. Φώτη Νταή για την ανάθεση της εργασίας αυτής και την αμέριστη συμπαράσταση, υποστήριξη και βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της.
- Το Τμήμα Χημείας και ιδιαίτερα το ΕΠΕΑΕΚ Απομόνωσης και Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα.
- Τον Δρ. Απόστολο Σπύρο για τις πολύτιμες συμβουλές και συζητήσεις για τα πειράματα NMR.

# 1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

## 1.1 Εισαγωγή

Γάλα ονομάζεται το λευκό – υποκίτρινο υγρό, που βγαίνει από το μαστό των θηλέων θηλαστικών μετά από τον τοκετό. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία<sup>1</sup> «Γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή, αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης...». Ακόμη, η νομοθεσία ορίζει ότι: «Με τον όρο γάλα απλά, χωρίς να συνοδεύεται από κάποιο επίθετο, νοείται αποκλειστικά και μόνο το γάλα που:

- α) προέρχεται από αγελάδα
- β) είναι νωπό
- γ) είναι πλήρες
- δ) δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση και
- ε) δεν περιέχει άλλες ύλες, που να έχουν προστεθεί εξωτερικά».

Για τα νεαρά θηλαστικά, περιλαμβανομένου και του ανθρώπινου είδους, το γάλα είναι η πρώτη, και για ένα σημαντικό χρονικό διάστημα, η μοναδική τροφή τους. Για το μεγαλύτερο μέρος του κόσμου, και κυρίως για τη Δύση, το αγελαδινό γάλα αποτελεί την κύρια πηγή για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο.

Το γάλα είναι ένα πολύπλοκο βιολογικό υγρό, η σύσταση και τα φυσικά χαρακτηριστικά του οποίου ποικίλουν από είδος σε είδος, αντικατοπτρίζοντας έτσι τις διαφορετικές διατροφικές ανάγκες των νεαρών θηλαστικών. Το κύριο συστατικό του γάλακτος είναι το νερό, αλλά ανάλογα

με το είδος του θηλαστικού το γάλα περιέχει ποικίλες ποσότητες πρωτεϊνών, λίπους και υδρογονανθράκων. Σε μικρότερη ποσότητα παρατηρούνται ιχνοστοιχεία και άλλα υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά συστατικά, που προέρχονται απευθείας από το πλάσμα του αίματος.

Η εξημέρωση των γαλακτοπαραγωγών ζώων, όπως η αγελάδα, και η διαθεσιμότητα του γάλακτος σε ποσότητες μεγαλύτερες από αυτές που απαιτούνται για την τροφή των μικρών τους συνέβαλε στην εισαγωγή του ζωικού γάλακτος στην διατροφή των ενηλίκων. Πολλά ζώα έχουν επιστρατευτεί για την παραγωγή γάλακτος που προορίζεται για κατανάλωση από τον άνθρωπο: αγελάδες, κατσίκες, πρόβατα, βόδια, καμήλες, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και τις κλιματολογικές συνθήκες. Σε πολλά μέρη του κόσμου η αγελάδα είναι το κυρίως χρησιμοποιούμενο ζώο για την παραγωγή γάλακτος. Σε μερικές χώρες, περιλαμβανομένου και του Ηνωμένου Βασιλείου, γάλα που προέρχεται από διαφορετικά ζώα δεν νομιμοποιείτε τον όρο "γάλα".

## 1.2 Διάφοροι τύποι γάλακτος υγρής μορφής

Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει έντονη διαφοροποίηση ανάμεσα στους διάφορους τύπους γάλακτος που είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Το αποβουτυρωμένο και ημι-αποβουτυρωμένο γάλα, τα οποία βάσει νόμου καθορίζονται από την περιεκτικότητά τους σε λίπος (**Πίνακας 1.2**), μπορούν να θεωρηθούν ως τα "λιγότερο ανθυγιεινά" γάλατα, καθώς η ανάπτυξη προϊόντων εμπλουτισμένων με θρεπτικά συστατικά όπως οι βιταμίνες, αποσκοπούν στην προώθηση μιας θετικής υγιεινής εικόνας.

**Πίνακας 1-1: Προδιαγραφές περιεκτικότητας σε λίπος στους διάφορους τύπους γάλακτος**

Περιεκτικότητα λίπους (%)	
Μη προ-τυποποιημένα πλήρες γάλατα	>3,0
Προ-τυποποιημένο πλήρες γάλα	>3,83*
Ημι-αποβουτυρωμένο γάλα	1,5 έως 1,8
Αποβουτυρωμένο γάλα	<0,3

*\*προ-τυποποιημένο πλήρες γάλα ορίζεται το γάλα που εισάγεται από άλλες χώρες της Ε.Ε. και έχει περιεκτικότητα σε λίπος όχι λιγότερη από αυτή που ορίζει ο νόμος. Η τιμή της περιεκτικότητας καθορίζεται κάθε χρόνο βάσει του μέσου όρου περιεκτικότητας σε λίπος του ενδοχώριου γάλακτος που παράχθηκε και διοχετεύτηκε στην αγορά την προηγούμενη χρονιά.*

Επειδή το γάλα που παράγεται ακόμη και από τα υγιέστερα ζώα είναι δυνατόν να περιέχει επικίνδυνους για τη Δημόσια Υγεία μικροοργανισμούς, είναι ανάγκη να εξυγιαίνεται προτού δοθεί στην κατανάλωση. Ο πιο ικανοποιητικός τρόπος για να γίνει αυτό, όπως απέδειξε η πείρα του παρελθόντος, είναι η ορισμένου βαθμού θερμική επεξεργασία του, η οποία είναι γνωστή ως *παστερίωση*.

Στις βιομηχανοποιημένες χώρες η μεγαλύτερη ποσότητα γάλακτος σε υγρή μορφή υφίσταται θερμική επεξεργασία για λόγους ασφαλείας. Ωστόσο σε ορισμένες χώρες επιτρέπεται μια μικρή ποσότητα νωπού γάλακτος. Η κατανάλωση νωπού γάλακτος φέρει ένα δυσανάλογα υψηλό κίνδυνο μόλυνσης από παθογένης μικροοργανισμούς, μεταξύ των οποίων η Σαλμονέλα και το Καμπυλοβακτήριο είναι τα πιο διαδεδομένα.

Ο διεθνής οργανισμός γαλακτοκομικών προϊόντων (International Dairy Federation) ορίζει ως παστερίωση<sup>2</sup>: “Μία διαδικασία που εφαρμόζεται σε ένα προϊόν, με αντικειμενικό σκοπό την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας να προκληθεί κίνδυνος για την υγεία προερχόμενος από παθογόνο

μικροοργανισμό σχετιζόμενο με το γάλα, μέσω θερμικής επεξεργασίας, που συνοδεύεται από τις ελάχιστες δυνατές χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές, αλλαγές στο προϊόν”. Παράλληλα μειώνεται και ο πληθυσμός της κοινής μικροβιακής χλωρίδας και αυτό βοηθάει στην επιμήκυνση του χρόνου συντηρήσεως. Στη πράξη, η διαδικασία αυτή καταστρέφει παθογόνα μικρόβια, αλλά όχι και τα ενδοσπόρια.

Η κυριότερη επεξεργασία του γαλακτος που πρόκειται να διατεθεί στην κατανάλωση ή να μετατραπεί σε ορισμένα άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, είναι η παστερίωση. Παράλληλα όμως υφίσταται και ορισμένους άλλους χειρισμούς, όπως διήθηση, τυποποίηση ως προς το λίπος και, ενίοτε, ομογενοποίηση. Κατά τη διήθηση επιτυγχάνεται απομάκρυνση ξένων στοιχείων από το γάλα (κυττάρων, φυτικών ινών, χόματος, βακτηρίων κ.α.), ενώ ταυτόχρονα το λίπος σε πρώτη φάση διαχωρίζεται και κατόπιν αναμιγνύεται και πάλι με το αποβουτυρωμένο γάλα. Η ανάμιξη είναι δυνατόν να ρυθμίζεται, ώστε το γάλα να έχει πάντα σταθερή αναλογία λίπους.

Η ελάχιστη επιτρεπόμενη θερμική επεξεργασία ορίζεται από το νόμο και είναι α) η χαμηλή παστερίωση, που πραγματοποιείται στους 62,8 °C για 30min, δηλαδή σε χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα (LTLT:low temperature-long time) και β) η υψηλή παστερίωση με θέρμανση στους 71,7 °C για 15 s, δηλαδή υψηλή θερμοκρασία για μικρό χρονικό διάστημα (HTST:high temperature-short time). Τα τελευταία χρόνια όμως, η ανησυχία για την πιθανότητα επιβίωσης του παθογόνου μικροοργανισμού, *Λιστέρια* έχει οδηγήσει πολλές βιομηχανίες στην αύξηση της θερμοκρασίας παστερίωσης πάνω από τα νόμιμα ελάχιστα όρια.

Το παστεριωμένο γάλα, εκτός από τη διήθηση, υποβάλλεται συνήθως και σε άλλες επεξεργασίες που αποσκοπούν στη βελτίωση της ποιότητας του. Οι κυριότεροι πρόσθετες επεξεργασίες αναφέρονται στην τυποποίηση και την ομογενοποίηση του λίπους, καθώς και τη βακτηριοκάθαρση.

Κατά την τυποποίηση του λίπους, γίνεται ρύθμιση της λιποπεριεκτικότητας του γάλατος σε ορισμένη αναλογία με προσθήκη ή αφαίρεση κρέμας. Συνήθως, γίνεται αφαίρεση μέρους της κρέμας, επειδή η μέση λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος είναι μεγαλύτερη από εκείνη που προβλέπεται από την αντίστοιχη νομοθεσία κάθε χώρας. Παράλληλα, γίνεται καλύτερη οικονομική εκμετάλλευση του γάλακτος.

Τα λιποσφαίρια του γάλακτος έχουν την τάση να ανέρχονται προς την επιφάνεια και να σχηματίζουν στρώμα κρέμας. Η ιδιότητα αυτή μπορεί να είναι επιθυμητή για τη λήψη κρέμας με φυσικό τρόπο, αλλά δεν είναι επιθυμητή για ορισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το σοκολατούχο γάλα, το γάλα UHT, το συμπυκνωμένο και σε μερικές χώρες το παστεριωμένο γάλα. Η τάση που έχει το λίπος να κορυφώνεται παρεμποδίζεται με την ομοιογενοποίηση

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 χρόνων, ένα νέο είδος γάλακτος γνωστό ως γάλα μακράς διάρκειας υψηλής παστερίωσης- ultra high temperature(UHT)-έχει κάνει την εμφάνιση του στα ράφια των super market. Το προϊόν αυτό, το οποίο είναι αποστειρωμένο και μπορεί να διακινηθεί και να διοχετευτεί στην αγορά εκτός ψυγείου, δεν έχει ακόμα κερδίσει την αποδοχή του κόσμου στη Δύση και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Ωστόσο, αντιπροσωπεύει ένα πολύ μεγάλο ποσοστό στην αγορά γάλακτος σε υγρή μορφή σε πολλές άλλες χώρες, όπως στη Γαλλία.

### **1.2.1 Παστεριωμένο γάλα<sup>3</sup>**

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η παστερίωση του γάλατος αποσκοπεί στην εξυγίανση του με την καταστροφή των επικίνδυνων για τον άνθρωπο μικροοργανισμών. Συγχρόνως, επιδιώκεται μείωση όσο το δυνατόν περισσότερο του αριθμού των μη παθογόνων βακτηρίων, καθώς και η αδρανοποίηση των περισσότερων ενζυμικών συστημάτων του.

Με τον τρόπο αυτό, το γάλα δεν θα είναι μόνο υγιεινό, αλλά θα συντηρείται και περισσότερο χρόνο, επειδή αυτό αλλοιώνεται από τη δράση της σαπρόφυτης κυρίως χλωρίδας του. Παράλληλα, πρέπει να διαφυλαχθούν η θρεπτική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Η παραπάνω επιδίωξη επιτυγχάνεται σήμερα στην πράξη, όπως αναφέρθηκε, με τις δύο διεθνώς παραδεκτές μεθόδους παστερίωσης, δηλαδή τη χαμηλή και την υψηλή παστερίωση.

#### **A. Χαμηλή παστερίωση ή παστερίωση LTLT (Low Temperature Long Time)**

Πρόκειται για την αρχαιότερη χρονολογικά μέθοδο, η οποία έχει εφαρμογή ακόμη και σήμερα, γιατί παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα.

Το γάλα θερμαίνεται χωρίς διακοπή στους 62-65 °C/30 min. Η ελληνική νομοθεσία (Υπουργ. Αποφ. 1980) προβλέπει θέρμανση στους 63 °C/30 min.

Η θέρμανση γίνεται σε ειδικούς λέβητες με διπλά τοιχώματα, στα οποία κυκλοφορεί θερμό νερό ή ατμός. Ο κάθε λέβητας είναι εφοδιασμένος με θερμορυθμιστικούς και καταγραφικούς μηχανισμούς για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και του χρόνου θερμάνσεως. Η μέθοδος έχει σχεδόν αντικατασταθεί από την υψηλή παστερίωση, η οποία πλεονεκτεί συγκριτικά σε πολλά σημεία. Η χαμηλή παστερίωση, όμως, προσφέρεται για επεξεργασία μικρών ποσοτήτων γάλατος από μικρές μονάδες, οι οποίες πρέπει να παστερίωσουν το γάλα προκειμένου να το χρησιμοποιήσουν στην παραγωγή διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων.

## **B. Υψηλή παστερίωση ή παστερίωση HTST (High Temperature Short Time)**

Είναι η επικρατέστερη μέχρι σήμερα μέθοδος παστερίωσης και χρησιμοποιείται για την εξυγίανση όλης σχεδόν της ποσότητας γάλακτος που καταναλώνεται σε όλο τον κόσμο ως *παστεριωμένο*. Το γάλα πρέπει να θερμανθεί, τουλάχιστον τους 72 °C για χρόνο τουλάχιστον 15s. Η καταστροφή των επικίνδυνων για τη Δημόσια Υγεία μικροοργανισμών δεν είναι αποτέλεσμα μόνο του παραπάνω συνδυασμού χρόνου και θερμοκρασίας, αλλά επιτυγχάνεται κυρίως με το θερμικό σοκ που καταφέρεται στα βακτήρια διότι:

- το γάλα από 4 °C περίπου θερμαίνεται εντός δευτερολέπτων στους 72 °C.
- παραμένει στη θερμοκρασία 72 °C για 15 τουλάχιστον sec και ψύχεται και πάλι σε θερμοκρασία κάτω των 7 °C εντός δευτερολέπτου.

Οι απότομες αυτές μεταβολές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με ειδικά συστήματα ανταλλαγής θερμότητας, στα οποία το γάλα ρέει με ορισμένη ταχύτητα και σε πολύ λεπτό στρώμα κατά μήκος των κυψελίδων του εναλλακτήρα (παστεριωτήρα), οπού προθερμαίνεται, θερμαίνεται και ψύχεται διαδοχικά.

### **1.2.2 Γάλα μακράς διάρκειας (UHT).**

Το γάλα μακράς διάρκειας θεωρείται ως αποστειρωμένο και υπέρ-παστεριωμένο γάλα και μπορεί να συντηρηθεί χωρίς να αλλοιώνεται για το χρονικό διάστημα που επιτρέπεται η εμπορία του. Ο κανονισμός περί παστεριωμένου γάλατος στις ΗΠΑ του 1978 ορίζει ως υπέρ-παστεριωμένο γάλα αυτό που έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία 137,8 °C για χρόνο τουλάχιστον 2s και κατά συνέπεια πρέπει να χαρακτηριστεί ως αποστειρωμένο. Η ελληνική νομοθεσία χαρακτηρίζει το γάλα UHT ως υπέρ-παστεριωμένο, αλλά δεν διασαφηνίζει τον τρόπο συντηρήσεως ούτε τις μικροβιολογικές προδιαγραφές.



Το γάλα που προορίζεται να αποστειρωθεί πρέπει να είναι πολύ καλής ποιότητας.

Μέχρι σήμερα έχουν εφαρμοστεί από διάφορες γαλακτοβιομηχανίες ή εταιρείες κατασκευής μηχανολογικού εξοπλισμού στον τομέα των γαλακτοκομικών πολλά συστήματα αποστειρώσεως UHT. Η κύρια διαφορά αυτών των συστημάτων είναι ο τρόπος θερμάνσεως του γάλατος, ο οποίος είναι είτε άμεσος είτε έμμεσος. Σε όλα τα συστήματα το γάλα προθερμαίνεται στους 65-80 °C, ομογενοποιείται σε 150-250 kg/cm<sup>2</sup> και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 135-140 °C για χρόνο 2-4 s, ψύχεται αρχικά στους 70-80 °C και στη συνέχεια στους 20 °C οπότε και συσκευάζεται σε άσηπτες συνθήκες.

### 1.2.3 Συμπυκνωμένο γάλα.

Συμφωνά με την ελληνική νομοθεσία, ως «γάλα εβαπορέ χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται από το νωπό γάλα κατόπιν συμπυκνώσεως μέχρι το ήμισυ του αρχικού του όγκου».

Τα στάδια παράγωγής που ακολουθούνται είναι τα εξής:

α) *ποιοτικός έλεγχος*, η ποιότητα του νωπού γάλακτος που προορίζεται για συμπύκνωση πρέπει να υπερέχει από αυτού που προορίζεται να καταναλωθεί ως παστεριωμένο στα εξής: να περιέχει μικρό αριθμό θερμοανθεκτικών σπόρων βακτηρίων, να ανέχεται θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες για πολύ χρόνο χωρίς αποσταθεροποίηση των συστατικών του και κυρίως των πρωτεϊνών. Η ικανότητα αυτή του γάλατος συνδέεται άμεσα με την οξύτητα του και την αναλογία των αλάτων του.

β) *τυποποίηση*, το συμπυκνωμένο γάλα κυκλοφορεί σε τύπους με ορισμένη τελική αναλογία λίπους και στερεών συστατικών γεγονός το οποίο επιτυγχάνεται με την τυποποίηση.

γ) *προθέρμανση*, το γάλα προθερμαίνεται, έτσι ώστε να καταστραφούν τα παθογόνα βακτήρια, να σταθεροποιηθούν τα λευκώματα, ώστε κατά την αποστείρωση να αποφεύγεται η πήξη και να αυξηθεί το ιξώδες του. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιτυγχάνονται με διάφορους συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας, όπως 90-100 °C/25-10 min, 100-120 °C/3-1 min, ή πάνω από 120 °C για λιγότερο από 30 s.

δ) *συμπύκνωση*, γίνεται με εξάτμιση μέρους του ύδατος σε ειδικές συσκευές εξατμίσεως (evaporators), οι οποίες λειτουργούν σε τέτοιο κενό, ώστε το γάλα να βράζει στους 50-60 °C. Η συμπύκνωση θεωρείται ικανοποιητική, για τον απλό τύπο του εβαπορέ, όταν το συνολικό στερεό υπόλειμμα υπερβεί το 25% με αντίστοιχη πυκνότητα 1,07.

ε) *ομογενοποίηση*, είναι απαραίτητη, γιατί σταθεροποιεί τη λιπαρή φάση, λόγω μείωσης της διαμέτρου του λιποσφαιρίου. Γίνεται σε θερμοκρασία 40-50 °C και σε πίεση 125-250 kg/cm<sup>2</sup>. Το μέγεθος των λιποσφαιρίων δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 2 μm.

στ) *ψύξη –δοκιμαστική αποστείρωση*, μετά από την ομογενοποίηση το συμπύκνωμα ψύχεται στους 15 °C περίπου, εάν πρόκειται να εγκυτωθεί και να αποστειρωθεί αμέσως, ή στους 5-8 °C, εάν πρόκειται να γίνει αποστείρωση δοκιμαστικού δείγματος.

ε) *κονσερβοποίηση-αποστείρωση*, η κονσερβοποίηση γίνεται σε λευκοσιδηρές κονσέρβες. Η αποστείρωση των κονσερβών γίνεται σε ειδικά αυτόκαυστα συνεχούς ή διακοπτόμενης λειτουργίας. Η αποστείρωση του γάλατος εβαπορέ αποσκοπεί στη θανάτωση όλων των μικροοργανισμών και των σπόρων τους, στην αδρανοποίηση των ενζύμων του γάλατος και ιδιαίτερα των λιπολυτικών και τέλος στη βελτίωση του ιξώδους του προϊόντος.

### 1.3 Χημική σύσταση του γάλακτος<sup>4</sup>

Η σύσταση του γάλακτος αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι αποτελεί τη μοναδική πηγή τροφής για τα πολύ νεαρά θηλαστικά. Κατά συνέπεια αποτελείται από ένα πολύπλοκο μίγμα λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδρογονανθράκων, βιταμινών, και ιχνοστοιχείων. Επιπλέον, το γάλα περιέχει μικροθρεπτικά συστατικά που προέρχονται από τον κυτταρικό συνθετικό μηχανισμό. Ο παρακάτω Πίνακας 1.2 παρουσιάζει τη μέση σύσταση του αγελαδινού γάλακτος όπως δίνεται από τη βιβλιογραφία.

**Πίνακας 1-2: Μέση σύσταση του αγελαδινού γάλακτος<sup>5</sup>**

Συστατικά	Μέσος όρος (%)	Διακύμανση
Νερό	87,5	82 – 91
Λίπος	3,7	2,5 - 6,0
Στερεά –μη λιπαρά	8,8	6,7 - 11,7
Ολικά στερεά	12,5	9 – 18
Πρωτεΐνες	3,2	2,6 - 4,9
Λακτόζη	4,9	3,5 - 6,0
Ιχνοστοιχεία	0,7	0,6 - 0,8

### 1.3.1 Πρωτεΐνες.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται σε δύο κυρίως τύπους, τις πρωτεΐνες του ορού και τις καζεΐνες. Οι καζεΐνες αποτελούν ποσοστό πάνω από 80% των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος, ωστόσο η σχετική αναλογία των δύο ειδών πρωτεϊνών ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο γαλακτισμού.

Οι καζεΐνες του γάλακτος μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε κύριες κατηγορίες,  $\alpha_{1s}$ -,  $\alpha_{2s}$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, και  $\kappa$ -καζεΐνες. Οι παραπάνω εμφανίζονται στο γάλα με τη μορφή σφαιρικών μικκυλίων και εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη

σταθερότητα σε θερμοκρασίες έως 140 °C. Αντίθετα οι πρωτεΐνες του ορού είναι σχετικά ασταθής σε υψηλές θερμοκρασίες αφού παρατηρείται πλήρη αποδιάταξη αυτών στους 80 °C.

### 1.3.2 Λακτόζη και ιχνοστοιχεία.

Η λακτόζη είναι το χαρακτηριστικό σάκχαρο του γάλακτος των θηλαστικών και μάλιστα δεν ανευρίσκεται αλλού στη φύση<sup>6</sup>. Αποτελεί το κυριότερο συστατικό του γάλακτος και η συγκέντρωση αυτού κυμαίνεται μεταξύ 4.2 και 5%<sup>7</sup>. Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο β-D-γαλακτόζης και ένα μόριο α-D-γλυκόζης. Στο γάλα βρίσκεται σε ίσες αναλογίες και στις δύο δυνατές διαμορφώσεις της ( α- και β-λακτόζη) και αποτελεί ένα από τα λιγότερα υδατοδιαλυτά σάκχαρα με διαλυτότητα 17.8% στους 25°C. Αυτή η μικρή διαλυτότητα έχει συνέπειες τόσο στη παραγωγή συμπυκνωμένου γάλακτος όσο και στις φυσικές ιδιότητες του γάλακτος γενικά (οσμωτική πίεση, σημείο ζέσεως και ψύξεως). Ένα τελευταίο χαρακτηριστικό που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στη βιομηχανία τροφίμων είναι η ικανότητα της να απορροφά οσμές και φυσικά χρώματα<sup>8</sup>.

Το γάλα διαθέτει επίσης έναν μεγάλο αριθμό ιχνοστοιχείων, μερικά από τα οποία είναι υψηλής βιολογικής και χημικής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα να συμβάλουν σημαντικά στις ιδιότητες αυτού. Για παράδειγμα το γάλα διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων –περίπου 50. Η παρουσία κάποιων από αυτά έστω και σε πολύ μικρό βαθμό είναι ιδιαίτερα καθοριστική για τη σταθερότητα της ποιότητας του γάλακτος κατά την αποθήκευση του. Από αυτά, οι πρωτεάσες και οι λιπάσες μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών του γάλακτος, ενώ ταυτόχρονα οι οξειδοαναγωγάσες ασκούν σημαντική επίδραση στη γεύση κυρίως του λιπαρού κλάσματος. Η λιποπρωτεϊνική λιπάση είναι το κυριότερο λιπολυτικό ένζυμο στο γάλα. Εμφανίζεται σε μεγάλα ποσοστά κυρίως στο νωπό γάλα,

αλλά η προστατευτική δράση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων περιορίζει κατά πολύ τη λιπόλυση που οφείλεται στο ένζυμο αυτό.

Τέλος το γάλα αποτελεί πηγή πολλών λιποδιαλυτών βιταμινών όπως της Α, πρόδρομο μόριο του β-καροτένιου, της D και της Ε καθώς και αρκετών υδατοδιαλυτών όπως των C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, και B<sub>12</sub>.

### 1.3.3 Στερόλες.

Το κλάσμα των στερολών (0.3-0.4% του λίπους) αποτελείται αποκλειστικά σχεδόν από τη χοληστερόλη, εστεροποιημένη ή μη. Έχει διαπιστωθεί, σε ελάχιστη ποσότητα, η παρουσία δύο άλλων στερολών, της λανοστερόλης και της διϋδρολανοστερόλης και σε ίχνη της β-σιτοστερόλης. Το 70% της χοληστερόλης βρίσκεται στον πυρήνα του λιποσφαιρίου, το 10% στη μεμβράνη και το υπόλοιπο στην υδάτινη φάση. Τα ίδια ποσά χοληστερόλης έχει και το γάλα προβάτου ή κατσίκας<sup>3</sup>. Υπάρχουν επίσης αξιόλογα ποσά της 7-διϋδροχοληστερόλης (προβιταμίνης D) γιατί με ακτινοβολία του γάλακτος παράγονται έως 2000 I.U. βιταμίνης D<sub>3</sub> ανά λίτρο γάλακτος. Η χοληστερόλη συντίθεται βιοχημικά με τη βοήθεια ενζύμων στο αδενικό επιθήλιο του μαστικού αδένου.

Οι μέχρι σήμερα παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των στερολών απαιτούν τη χρήση της χρωματογραφίας<sup>9</sup> – GLC, reversed phase HPLC. Είναι γνωστό ότι για να εφαρμοστούν αυτές οι μέθοδοι απαιτείται η απομόνωση των στερολών από το δείγμα, ή οποία είναι μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία, καθώς και η χρήση πρότυπων ουσιών. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μια νέα μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού των στερολών με τη χρήση φασματοσκοπίας <sup>31</sup>P-NMR, η οποία είναι γρήγορη και δεν απαιτεί τίποτα από τα παραπάνω.

### 1.3.4 Λίπος.<sup>10</sup>

Το αγελαδινό γάλα περιέχει τα πιο πολύπλοκα γνωστά λιπίδια. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπιδίων και προσεγγίζουν το 95-98% του ολικού λίπους (Πίνακας 1.3). Στο γάλα, τα τριγλυκερίδια βρίσκονται με τη μορφή λιποσφαιρίδιων διαμέτρου 2-6 μm και

περιβάλλονται από μεμβρανικό υλικό προερχόμενο από την κυτταρική μεμβράνη. Οι συγκεντρώσεις των διάφορων συστατικών του λίπους στο φρέσκο αγελαδινό γάλα φαίνονται στον πίνακα 1.3. Μερική λιπόλυση παρατηρείται συνήθως κατά την αποθήκευση, δίνοντας έτσι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελεύθερων λιπαρών οξέων, μόνο- και διγλυκεριδίων.

**Πίνακας 1-3:Λιπιδική σύσταση του αγελαδινού γάλακτος**

Συστατικά	Μέσος όρος(%)	Διακύμανση (%)
Τριγλυκερίδια	96,5	95 – 98
Διγλυκερίδια	1,1	0,3 – 2,2
Μονογλυκερίδια	0,05	0,02 –0,08
Ελεύθερα λιπαρά οξέα	0,25	0,1 – 0,4
Φωσφολιπίδια	0,7	0,2 – 1,2
Χοληστερόλη	0,35	0,2 – 0,5
Υδρογονάνθρακες	Ίχνη	

Κατά την ομογενοποίηση τα λιποσφαίρια θραύονται και σχηματίζονται έτσι μικρότερα λιποσφαίρια με μέγεθος έως 2µm. Παράλληλα αυξάνεται ο αριθμός των λιποσφαιρίων κατά  $10^4$  περίπου φορές με αποτέλεσμα η συνολική επιφάνεια τους να αυξάνεται κατά 10 φορές. Αυτό υπονοεί ότι ορισμένος αριθμός από τα νέα μικρά λιποσφαίρια δεν περιβάλλεται από την αρχική μεμβράνη, αλλά από νέα, που σχηματίζεται κυρίως από τις πρωτεΐνες του ορού.

Η ομογενοποίηση προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα όπως η μείωση της τάσης του λίπους να οξειδώνεται και η ομοιόμορφη κατανομή της λιπαρής φάσεως στο γάλα. Εμφανίζει, όμως, και ορισμένα μειονεκτήματα όπως το ότι δεν μπορεί να διαχωριστεί αποτελεσματικά το λίπος, εάν χρειαστεί. Επίσης λόγω της βλάβης της μεμβράνης των λιποσφαιρίων κατά τον τεμαχισμό τους

καθώς και της μείωσης της<sup>11</sup> έκτασης της, δρουν ευκολότερα τα λιπολυτικά ένζυμα (λιπάσες). Η γεύση ταγγίλας στο γάλα προκαλείται από την υδρόλυση των λιπαρών οξέων από το ένζυμο λιποπρωτεϊνική λιπάση<sup>12</sup> (lipoprotein lipase-LPL) το οποίο είναι το κυριότερο λιπολυτικό ένζυμο στο γάλα. Η γεύση αυτή οφείλεται κυρίως στο βουτυρικό οξύ. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο πρόσφατης αμέλξεως γάλα, αλλά ο προστατευτικός ρόλος της μεμβράνης των λιποσφαιρίων του γάλακτος εμποδίζει την δράση του. Η λιπάση αυτή είναι ένα θερμό-ευαίσθητο ένζυμο και απενεργοποιείται στους 55-60 °C. Προκειμένου λοιπόν να αποφευχθεί η ραγδαία λιπόλυση που προκαλείται από το ένζυμο αυτό, με αποτέλεσμα τη γεύση και την οσμή ταγκίλας, το γάλα ομογενοποιείται ακριβώς πριν ή ακριβώς μετά την παστερίωση<sup>13</sup> του.

Τα λιπαρά μόρια στο γάλα ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγάλα σφαιρικά συσσωματώματα, τα λιποσφαίρια, που περιβάλλονται από μια πλούσια σε φωσφολιπίδια στοιβάδα, τη λιπιδική μεμβράνη. Τα λιποσφαίρια ποικίλουν σε διάμετρο ξεκινώντας από 1 μm έως 12 μm, με μέσο όρο διαμέτρου 3 μm, η οποία σχετίζεται με την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος και αυξάνεται ανάλογα με αυτήν.

Η μεμβράνη των λιποσφαιρίων σταθεροποιεί το υδρόφοβα λιπίδια στο υδατικό περιβάλλον του γάλακτος. Τα κλάσματα των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης στο λίπος του γάλακτος βρίσκονται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων, η οποία επίσης περιέχει ένζυμα του γάλακτος, όπως η αλκαλική φωσφατάση και η ξανθίνη της οξειδάσης σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Τα λίπη των λιποσφαιρίων του γάλακτος, που είναι όμοια με αυτά της κυταταροπλασματικής μεμβράνης του πλάσματος, αποτελούνται από περισσότερο από 20% φωσφολιπίδια, εκ των οποίων τα κυριότερα είναι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη.



Περισσότερα από 400 διαφορετικά λιπαρά οξέα έχουν ταυτοποιηθεί στο αγελαδινό λίπος, όμως μόνο 13 φαίνεται να είναι παρούσα σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν το 1% ( w/w) (Πίνακας 1.4)

**Πίνακας 1-4: Κυριότερα λιπαρά οξέα συστατικά του αγελαδινού λίπους<sup>14</sup>**

Λιπαρά οξέα	% w/w	Λιπαρά οξέα	% w/w
4:0	3,8	15:0	1,1
6:0	2,4	16:0	43,7
8:0	1,4	18:0	11,3
10:0	3,5	14:1	1,6
12:0	4,6	16:1	2,6
14:0	12,8	18:1	11,3
		18:2	1,5

### 1.3.5 Το γαλακτικό λίπος στη διατροφή του ανθρώπου.

Η παρουσία του λίπους στις τροφές αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη γευστικότητα τους. Τα γαλακτοκομικά λίπη είναι ιδιαίτερα εύγευστα εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε λίπη με μικρό μοριακό μέγεθος, λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας και των παραγώγων τους, που συνεισφέρουν στη γεύση το άρωμα και την μεστότητα της γεύσης.

Το γαλακτικό λίπος περιέχει υπολογίσιμες ποσότητες βιταμίνης Α, πρόδρομο μόριο του β-καροτένιου, ενώ παράλληλα αποτελεί σημαντική πηγή της βιταμίνης D.

Ασχέτως με την θρεπτική αξία του γαλακτικού λίπους στη διατροφή του ανθρώπου, τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά θεωρούνται πλέον στις εξελιγμένες χώρες ως ανθυγιεινά. Στον αναπτυσσόμενο κόσμο, το κυριότερο πρόβλημα είναι η έλλειψη της διατροφικής ενέργειας, η οποία μπορεί τουλάχιστον να περιοριστεί με την αύξηση του λίπους που προσλαμβάνεται από τη διατροφή. Αντίθετα, αυτό που απασχολεί κυρίως τον αναπτυγμένο κόσμο είναι η μεγάλη πρόσληψη λιπαρών από τη διατροφή και ο ρόλος τους, κυρίως στην περίπτωση του γαλακτικού λίπους, στα καρδιακά προβλήματα. Η ανθυγιεινότητα των γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται σε τρεις κυρίως παράγοντες: την υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, την περιεκτικότητα σε χοληστερόλη και την κορεσμένη φύση των λιπαρών οξέων τους

Εξαιτίας της συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ της χοληστερόλης και της αρτηριοσκλήρωσης, η περιεκτικότητα αυτής της στερόλης στα τρόφιμα χαίρει ιδιαίτερας σημασίας. Το γάλα περιέχει σχετικά μικρή ποσότητα χοληστερόλης, για παράδειγμα ένα ποτήρι γάλα περιέχει 27 mg χοληστερόλης, σε αντίθεση με ένα αυγό που περιέχει περίπου 275 mg. Επειδή η χοληστερόλη βρίσκεται στη μεμβράνη των λιποσφαιρίων, η

συγκέντρωση της σε ένα γαλακτομικό προϊόν σχετίζεται με το ποσοστό λίπους αυτού

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη γαλακτομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη. Παρ' όλα αυτά, είναι αδύνατον να παραχθεί γάλα με μηδενική περιεκτικότητα σε χοληστερόλη, αφού το αποβουτυρωμένο γάλα περιέχει πολύ μικρού μεγέθους λιποσφαίρια δυσανάλογα πλούσια σε χοληστερόλη.

### **1.3.6 Επιπτώσεις της διατροφής των βοοειδών στην σύσταση του γάλακτος.<sup>15</sup>**

Η ικανότητα να τροποποιούμε τη σύσταση και, κατά συνέπεια, τις ιδιότητες του λίπους του γάλακτος, μας δίνει μεγίστης σημασίας δυνατότητες. Η τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων επιτρέπει στις βιομηχανίες την παραγωγή προϊόντων, όπως τα μαλακά βούτυρα, που παρασκευάζονται αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε ολεϊκό οξύ και μειώνοντας αυτή του παλμιτικού και του μηρυκαστικού, ελαχιστοποιείται η αύξηση του επιπέδου της χοληστερόλης στο αίμα, η οποία σχετίζεται με την κατανάλωση λίπους προερχόμενου από γαλακτομικά προϊόντα.

Η τροποποίηση της διατροφικής αξίας του λίπους του γάλακτος απαιτεί το τάισμα των ζώων να γίνεται με υποκατάστατα<sup>16</sup> και όχι με γρασίδι, γεγονός που διευκολύνει και τις βιομηχανίες εκτροφής βοοειδών. Για παράδειγμα, η προσθήκη σόγιας στη διατροφή τους προκαλεί αύξηση της τάξεως του 60% οξέων C<sub>18</sub>, με έμφαση στα cis και trans 18:1. Γαλακτικό λίπος που περιέχει υψηλές αναλογίες σε ακόρεστα C<sub>18</sub> λιπαρά οξέα μπορεί να παράγει βούτυρο με υφή παρόμοια με αυτή της μαργαρίνης.

### 1.3.7 Χημικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του γαλακτικού λίπους.

Η σπουδαιότητα της λιπιδιακής φάσης στο καθορισμό της γεύσης πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων οφείλεται στο γεγονός ότι το μέγεθος και η επίδραση των χημικών μεταβολών που υφίσταται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, είναι μέγιστης σημασίας για τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

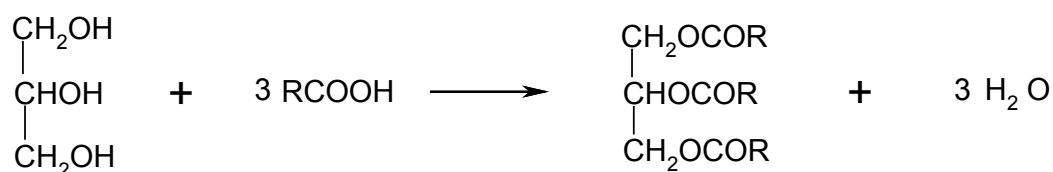
Η οξείδωση είναι η κυριότερη χημική μεταβολή και, κατά συνέπεια, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη διάρκεια ζωής πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο σχηματισμός υπεροξειδίων οφείλεται στην αντίδραση μεταξύ ακόρεστων εστέρων των λιπαρών οξέων και του οξυγόνου. Τα υπεροξείδια δεν επηρεάζουν τη γεύση, αλλά σταδιακά αποσυντίθενται προς σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων, στις οποίες οφείλεται η ξινή γεύση του γάλακτος. Ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, κυρίως σε προϊόντα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά με όχι έντονη γεύση, όπως είναι μερικές κρέμες και βούτυρα.

Το λίπος του γάλακτος είναι σχετικά σταθερό ως προς την οξείδωση, εξαιτίας της υψηλής του περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και την παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως οι τοκοφερόλες. Η επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες, που λαμβάνει χώρα στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως π.χ κατά την παραγωγή γάλακτος μακράς διάρκειας (UHT), ενισχύει αυτή τη σταθερότητα.

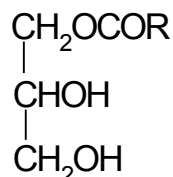
Το λιπολυτικό τάγγισμα<sup>4</sup>, δηλαδή η απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων ακολουθούμενη από υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, είναι μικρότερης αλλά υπολογίσιμης σημασίας πρόβλημα. Υπεύθυνες γι' αυτό είναι οι λιπάσες που μπορεί να προέρχονται από το γάλα, ή να παραχθούν από ένα μολυσματικό μικροοργανισμό.

### 1.3.8 Διγλυκερίδια

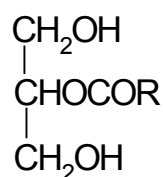
Οι διακυλογλυκερόλες ή διγλυκερίδια (DGs) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό από τα συστατικά του λίπους στα τρόφιμα, καθώς και σε άλλους ιστούς. Παράγονται με την εστεροποίηση της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα (κορεσμένα ή ακόρεστα), συνήθως μακράς αλυσίδας, και σχηματίζονται έτσι οι αντίστοιχοι εστέρες της γλυκερόλης κατά την αντίδραση:



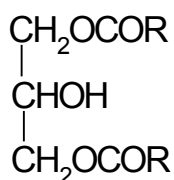
Οι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα ονομάζονται ακυλογλυκερόλες, γλυκερίδια ή απλά λίπη. Διακρίνονται σε μονοακυλογλυκερόλες ή μονογλυκερίδια, διακυλογλυκερόλες ή διγλυκερίδια και τριακυλογλυκερόλες ή τριγλυκερίδια.



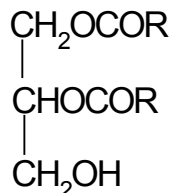
**1-μονοακυλογλυκερόλη**



**2-μονοακυλογλυκερόλη**



**1,3-διακυλογλυκερόλη**



**1,2-διακυλογλυκερόλη**

Το ποσοστό των διγλυκεριδίων στο αγελαδινό γάλα δεν ξεπερνά το 2%. Απαντώνται δύο κατηγορίες διγλυκεριδίων, τα 1,2-διγλυκερίδια (1,2-DGs) και τα 1,3-διγλυκερίδια (1,3-DGs). Τα 1,2-DGs προέρχονται από την ατελή

βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων και δευτερογενώς από την ενζυματική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων παρουσία του ενζύμου λιπάση. Τα 1,3-DGs θεωρούνται δευτερογενή προϊόντα του ισομερισμού των 1,2-DGs κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του γάλακτος, ο οποίος συνεχίζεται κατά την αποθήκευσή του. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναμένεται το φρέσκο γάλα χαμηλής παστερίωσης, να περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα 1,2-DGs και πολύ μικρή ποσότητα ή καθόλου 1,3- DGs.

Η αξιολόγηση της λιπόλυσης είναι πολύ σημαντική για τον χαρακτηρισμό των τροφίμων που περιέχουν λίπη, όπως τα φυτικά έλαια, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αφού η συσσώρευση των ελεύθερων λιπαρών οξέων οδηγεί σε προϊόντα χαμηλής ποιότητας με όχι ευχάριστη γεύση. Για το λόγο αυτό, αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του ποσοστού των διγλυκεριδίων στα τρόφιμα, οι οποίες βασίζονται σε χρωματογραφικές τεχνικές<sup>17,18,19</sup>, όπως π.χ. η αέρια χρωματογραφία, η υψηλής απόδοσης χρωματογραφία αποκλεισμού και η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία. Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι είναι πολύ ευαίσθητες σε πολύ χαμηλά όρια συγκέντρωσης, χαρακτηρίζονται από μεγάλους χρόνους ανάλυσης οφειλόμενους στην επεξεργασία που πρέπει να υποστεί το δείγμα πριν από τη χρωματογραφική του ανάλυση.

Η εργασία αυτή εισάγει μια εύκολη μέθοδο με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για την ανίχνευση και την ποσοτική ανάλυση των διγλυκεριδίων στα λιπαρά του γάλακτος. Αυτή η φασματοσκοπική μέθοδος έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διγλυκεριδίων και ολικών στερολών στο γαλακτικό λίπος

## 2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)

### 2.1 Χημική Μετατόπιση

Η φασματοσκοπία NMR ανακαλύφθηκε από τους Purcell και Bloch το 1945 –οι οποίοι πήραν από κοινού το βραβείο Νόμπελ, το 1952) και είναι μια δυναμική ποιοτική και ποσοτική αναλυτική μέθοδος.

Η συνεισφορά της φασματοσκοπίας NMR στην ποιοτική ανάλυση στηρίζεται στο γεγονός ότι το χημικό περιβάλλον των πυρήνων επιδρά δραστικά στην συχνότητα συντονισμού τους, με συνέπεια πυρήνες του ίδιου είδους, οι οποίοι βρίσκονται σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον στο μόριο της ένωσης να παρουσιάζουν διαφορετική συχνότητα συντονισμού.

Η επίδραση του χημικού περιβάλλοντος αντανακλάται στη σταθερά προστασίας του πυρήνα,  $\sigma$ , η οποία αποτελεί μέτρο της προστασίας του πυρήνα από το εφαρμοζόμενο εξωτερικό, ομογενές μαγνητικό πεδίου  $B_0$ , και του πραγματικού πεδίου  $B_\pi$ , το οποίο αισθάνεται ο πυρήνας,

$$B_\pi = (1 - \sigma) B_0 \quad (2.1)$$

Παρατηρούμε, δηλαδή, ότι ο πυρήνας αισθάνεται διαφορετικό σε ένταση πεδίο από το αρχικό, λόγω ακριβώς της προστασίας την οποία προσφέρει το χημικό περιβάλλον. Η σταθερά προστασίας είναι αδιάστατο μέγεθος και η τιμή της κυμαίνεται από  $10^{-3}$  έως  $10^{-6}$ , ανάλογα με το είδος του πυρήνα και το χημικό περιβάλλον.

Η διαφοροποίηση της συχνότητας συντονισμού των πυρήνων από το χημικό περιβάλλον περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\nu_{\pi} = \nu_0 (1-\sigma) = \gamma/2\pi (1-\sigma) B_0 \quad (2.2)$$

όπου  $\nu_0$  η συχνότητα συντονισμού του "γυμνού" πυρήνα, η οποία συμπίπτει με τη συχνότητα λειτουργίας του φασματογράφου NMR.

## 2.2 Κλίμακα δ.

Η μέτρηση της απόλυτης τιμής του πεδίου ή της συχνότητας στην οποία συντονίζεται ένας πυρήνας παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες. Πρώτον, απαιτεί όργανα υψηλής ακριβείας, τα οποία είναι πολύ δύσκολο να κατασκευαστούν (απαιτεί πολύ σταθερούς μαγνήτες) και δεύτερον μετρήσεις στο ίδιο πάντα μαγνητικό πεδίο, ώστε οι μετρήσεις να είναι συγκρίσιμες. Αυτό το τελευταίο οφείλεται στο γεγονός ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πρωτονίου εξαρτάται από την ένταση του εξωτερικού πεδίου (εξίσωση 2.2). Επειδή όμως στο εμπόριο κυκλοφορούν φασματογράφοι NMR με πεδία έντασης από 7.4T έως περίπου 18T, γίνεται φανερό ότι η σύγκριση συχνοτήτων συντονισμού, ιδιαίτερα σε πολύπλοκα μόρια με πολλούς πυρήνες είναι ακατόρθωτη. Έτσι καταφεύγουμε στη χρήση μιας ουσίας αναφοράς. Η ουσία αναφοράς πρέπει να πληρεί ορισμένες ιδιότητες: να είναι χημικά αδρανής, πτητική, διαλυτή σε μια ποικιλία διαλυτών και τα σήματα των πρωτονίων της να μην επικαλύπτουν σήματα που προέρχονται από το δείγμα. Μια τέτοια ουσία είναι το TMS (τετραμεθυλοσιλάνιο), της οποίας τα 12 πρωτόνια είναι χημικά ισοδύναμα και συντονίζονται σε πολύ χαμηλή συχνότητα.

Παρά το ότι είναι θεωρητικά αδύνατο να μετρήσουμε απόλυτη συχνότητα με τον υψηλό βαθμό ακρίβειας και επαναληψιμότητας που χρειάζεται το NMR, είναι δυνατόν με τη χρήση της ουσίας αναφοράς να μετρήσουμε διαφορές



συχνότητων. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο τα σήματα συχνότητας του NMR εκφράζονται ως διαφορές συχνότητων ( $\delta\nu_i$ ), μεταξύ της συχνότητας ταλάντωσης,  $\nu_i$ , και της συχνότητας του ταλαντωτή του οργάνου  $\nu_o$ ,  $\delta\nu = \nu_o - \nu_i$ , η οποία είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου. Έτσι, έχει οριστεί η χημική μετατόπιση του πυρήνα, η οποία είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου.

Η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα  $i$  στην κλίμακα  $\delta$  ( με αρχή της κλίμακας την κορυφή της ουσίας αναφοράς) δίνεται από την σχέση:

$$\delta_i = \frac{10^6(\Delta\nu_i - \Delta\nu_{ref})}{\nu_o} = 10^6 \frac{\delta\nu_i}{\nu_o} = \frac{\delta\nu_i}{\nu_o'} \quad (2.3)$$

$\nu_{ref}$  είναι η συχνότητα συντονισμού της ουσίας αναφοράς και όπου  $\Delta\nu_{ref} = \nu_o - \nu_{ref}$ ,  $\nu_o$  και  $\nu_o'$  είναι οι λειτουργικές συχνότητες σε Hz και MHz αντίστοιχα. Η κλίμακα  $\delta$  δεν έχει διαστάσεις αλλά μπορεί να εκφραστεί σε ppm.

### 2.3 Ιδιότητες του πυρήνα $^{31}\text{P}$ σε σχέση με το $^1\text{H}$ και τον $^{13}\text{C}$ .

Εκτός από το μεγάλο εύρος των χημικών μετατοπίσεων, ο πυρήνας  $^{31}\text{P}$  παρουσιάζει μεγάλη φυσική αφθονία (100%) και υψηλή την ευαισθησία, η οποία είναι μόνο ~15 φορές μικρότερη από την ευαισθησία του πρωτονίου. Αυτές οι ιδιότητες του πυρήνα  $^{31}\text{P}$  πρέπει να αντιπαρατεθούν με την μικρή φυσική αφθονία (1.1%) και τη χαμηλή ευαισθησία του πυρήνα  $^{13}\text{C}$ , ο οποίος επιπλέον χαρακτηρίζεται από μεγάλους χρόνους αποδιέγερσης. Συνεπώς, πειράματα ποσοτικού προσδιορισμού με  $^{13}\text{C}$ -NMR απαιτούν πολλές σαρώσεις και μακρείς χρόνους αναμονής, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός λόγος S/N. Επίσης, η συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη περιοχή απορροφήσεων του  $^{31}\text{P}$  (~ 800 ppm) επιτρέπει τη διασπορά των σημάτων και την καλύτερη διακριτική ικανότητα του φάσματος. Τέλος η διεξαγωγή των

πειραμάτων με τη χρήση φασματοσκοπίας  $^{31}\text{P}$  δεν επιτρέπει την αποσύνθεση ή τον ισομερισμό των διγλυκεριδίων κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Όπως θα δούμε παρακάτω ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου  $^{31}\text{P}$ -NMR σε σχέση με τις μεθόδους  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR είναι η χρησιμοποίηση κυκλοεξανόλης ως ουσίας αναφοράς, μέσα στο διάλυμα, η οποία επιτρέπει την εξαγωγή ποσοτικών μετρήσεων χωρίς την χρήση κανονικοποιήσεων των αποτελεσμάτων.

## **2.4 Εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR στο γάλα και στα γαλακτομικά προϊόντα<sup>20</sup>.**

Από το 1945 που ο Bloch και οι συνεργάτες του ανίχνευσαν για πρώτη φορά σήματα NMR, η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), έχει εξελιχθεί ραγδαία μέσα από την ανάπτυξη των οργάνων της και των μεθόδων, καθιστώντας την εφαρμόσιμη σε όλα τα πεδία. Σήμερα η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια μέθοδο με πολλές δυνατότητες στο χώρο της χημείας τροφίμων, τόσο για τη μοναδικότητα των πληροφοριών που μπορεί να παρέχει όσο και για την ταχύτητα με την οποία παρέχει πληροφορίες και την προσαρμοστικότητα του οργάνου. Παρ' όλα αυτά, εξαιτίας του υψηλού κόστους των φασματογράφων NMR, δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική στο χώρο της χημείας τροφίμων.

Το κυριότερο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας NMR είναι ότι δεν καταστρέφει το δείγμα, γεγονός που επιτρέπει να διεξαχθούν διαφορετικές αναλύσεις στο ίδιο δείγμα και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Ωστόσο διαθέτει και άλλα εξίσου σημαντικά πλεονεκτήματα μερικά από τα οποία είναι:

- ◆ Επιτρέπει την άμεση και γρήγορη ανάλυση του δείγματος.
- ◆ Δίνει ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα.
- ◆ Τα φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR είναι υψηλής αναλυτικής ικανότητας με μεγάλο εύρος χημικών μετατοπίσεων σχεδόν για όλους τους πυρήνες, εκτός ίσως του πρωτονίου, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα προσδιορισμού όλων των συστατικών του δείγματος.
- ◆ Είναι ταχεία μέθοδος και δεν απαιτεί πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος. Για τη λήψη ενός φάσματος  $^1\text{H}$ -NMR απαιτούνται 10-15 λεπτά, ενώ για το φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR 20 λεπτά περίπου.
- ◆ Δεν απαιτεί βαθμονόμηση με πρότυπες ουσίες

Στον τομέα των γαλακτοκομικών έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως οι πυρήνες  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ . Για το ίδιο δείγμα ο ερευνητής μπορεί να επιλέξει μεταξύ διαφορετικών πυρήνων προκειμένου να προσδιορίσει διαφορετικά χαρακτηριστικά ή για να βελτιώσει την ποιότητα των αποτελεσμάτων.

Για παράδειγμα, το γαλακτικό λίπος μπορεί να αναλυθεί είτε από ένα φάσμα  $^1\text{H}$  είτε από ένα φάσμα  $^{13}\text{C}$ , από τα οποία το δεύτερο δίνει καλύτερα αποτελέσματα αν και απαιτείται περισσότερος χρόνος για τη λήψη ενός φάσματος με υψηλό S/N. Κάθε μία από τις κορυφές που παρουσιάζονται σε ένα φάσμα ενός πυρήνα χαρακτηρίζονται από τη χημική τους μετατόπιση, μετρούμενη σε ppm, η οποία ποικίλει ανάλογα με τη χημική και δομική σύσταση του περιβάλλοντος τους. Το φάσμα  $^1\text{H}$  ενός απλού συστατικού, μπορεί να δώσει κορυφές σε πολλές και διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις αφού συνήθως στη δομή του περιέχονται περισσότερα από ένα είδος πρωτονίων. Επίσης, διαφορετικές δομές του ίδιου συστατικού μπορούν να δώσουν κορυφές με διαφορετική χημική μετατόπιση. Σε πολύπλοκα μίγματα τα μονοδιάστατα φάσματα  $^1\text{H}$  καθίστανται δύσκολα στην ανάλυση τους, επειδή παρατηρείται ικανή επικάλυψη κορυφών στο φάσμα. Συνήθως τέτοια

προβλήματα αντιμετωπίζονται με τη χρήση φασματοσκοπίας άλλων πυρήνων, την εφαρμογή τεχνικών δύο διαστάσεων και την κλασματοποίηση του δείγματος πριν από την ανάλυση. Το γεγονός ότι οι πυρήνες έχουν τη δυνατότητα να “επικοινωνούν” μεταξύ τους αποτελεί τη βάση για την εφαρμογή ομοπυρηνικής και ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας δύο (2D) ή περισσότερων διαστάσεων. Τέτοια φάσματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το ποίος πυρήνας συνδέεται με ποιόν καθώς και για τη μεταξύ τους απόσταση. Αυτού του είδους τα φάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της δομής ενός μεγάλου αριθμού μορίων<sup>20</sup> που βρίσκονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Όλα τα χαρακτηριστικά της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) που περιγράφηκαν παραπάνω, μπορούν να εφαρμοστούν σε γαλακτοκομικά δείγματα προκειμένου να επιτευχθούν πολλοί διαφορετικοί στόχοι. Παρακάτω αναφέρονται μερικοί από αυτούς.

#### **2.4.1 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση**

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα απλό αναλυτικό εργαλείο, που έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει διαφορετικά συστατικά. Η φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της λιπιδικής σύστασης του γαλακτικού λίπους, παρέχοντας ποσοτικές πληροφορίες για τα σχετικά μοριακά<sup>21</sup> κλάσματα του ελαϊκού, παλμιτικού, βουτυρικού οξέος και των τριγλυκεριδίων. Εξαιτίας της ευαισθησίας της μεθόδου απέναντι στη δομή των ενώσεων, έχει επίσης προσδιοριστεί η κατανομή των άκυλο ομάδων ανάμεσα στις θέσης sn-1(3) και sn-2 των τριγλυκεριδίων<sup>22,23</sup>. Το γεγονός αυτό χαίρει ιδιαίτερης σημασίας καθώς κάποια από τα ισομερή θέσης των τριγλυκεριδίων έχουν μεγάλη θρεπτική αξία.

Η χρήση του πυρήνα  $^{31}\text{P}$  για την ανάλυση του γάλακτος καθώς και κλασμάτων αυτού, έχει κάνει εφικτή την άμεση ανάλυση των φωσφολιπιδίων, των φωσφυτιλιωμένων υδρογονανθράκων, ανόργανου φωσφόρου και άλλων φωσφοριλυμένων συστατικών από ένα απλό φάσμα<sup>24</sup>.

#### **2.4.2 Παρακολούθηση αντιδράσεων ‘in vivo’<sup>25</sup>**

Οι βιολογικοί μετασχηματισμοί που προκαλούνται από μικροοργανισμούς, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Καθώς η φασματοσκοπία NMR είναι μία μη καταστρεπτική μέθοδος, επιτρέπει τη παρακολούθηση των βιολογικών αντιδράσεων ‘in vivo’. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να επωαστούν στα σωληνάκια που χρησιμοποιούνται για το NMR, και η μεταβολή που μας ενδιαφέρει μπορεί να παρακολουθηθεί λαμβάνοντας φάσματα του δείγματος σε διαφορετικούς χρόνους. Με τη χρήση NMR έχουν μελετηθεί ορισμένοι μεταβολικοί οδοί ενός μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών.

#### **2.4.3 Προσδιορισμός φυσικών χαρακτηριστικών του λίπους<sup>25</sup> του γάλακτος.**

Μία από τις κυριότερες εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι η αποτίμηση των φυσικών ιδιοτήτων του λίπους του γάλακτος. Η χρήση του πυρήνα  $^1\text{H}$ -NMR αποδείχθηκε ότι είναι εξαιρετικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της αναλογίας λίπους σε υγρή φάση και λίπους σε στερεή φάση. Η διαφορά της δυναμικής μεταξύ των υγρών και των στερεών κλασμάτων παρέχει τη βάση για τον προσδιορισμό αυτό. Το στερεό λίπος έχει μικρότερη δυναμική με αποτέλεσμα, οι πυρήνες  $^1\text{H}$  ή  $^{13}\text{C}$  να αποδιεγείρονται γρήγορα και να παρουσιάζουν στο φάσμα ευρείες κορυφές. Αντίθετα το λίπος που βρίσκεται σε υγρή κατάσταση παρουσιάζει γρήγορη δυναμική, οι πυρήνες αποδιεγείρονται πιο αργά και οι

κορυφές των φασμάτων είναι στενές. Οι εντάσεις των σημάτων μπορούν να υπολογισθούν με την προσομοίωση κορυφών (η ολοκλήρωση κορυφών δεν ενδείκνυται) και να δώσουν τη σχετική αναλογία στερεού λίπους /υγρού λίπους στο γαλακτοκομικό προϊόν.

Επίσης, η μέτρηση των χρόνων αποδιέγερσης  $T_1$  του υγρού και στερεού λίπους δίνει παρόμοια αποτελέσματα με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

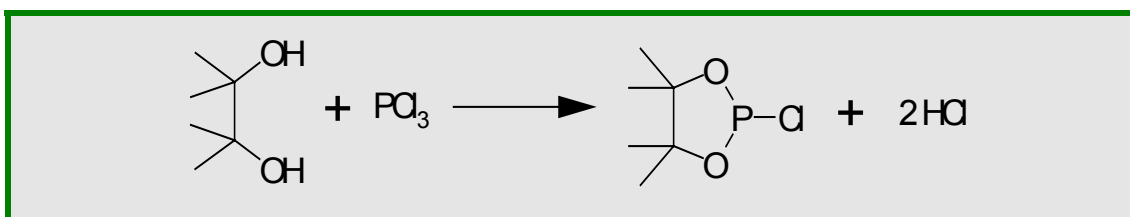
Οι διαλύτες NMR χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο  $\text{CDCl}_3$  99,8 % περιεκτικότητας σε δευτέριο και πυριδίνη καθαρότητας 99,5%, οι οποίοι αγοράστηκαν από τη MERCK. Το αντιδραστήριο φωσφόρου, 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο (I) (95%), παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Για την προστασία των διαλυμάτων προτύπων από την υγρασία χρησιμοποιήθηκαν Molecular Sieves<sup>TM</sup> διαμέτρου οπών 0,5 nm και μεγέθους 2 mm οι οποίες αγοράστηκαν, επίσης, από την MERCK. Η κυκλοεξανόλη (99%) και το τρις(ακετυλοακετονικό) χρώμιο (97%)  $[\text{Cr}(\text{acac})_3]$  αγοράστηκαν από την ALDRICH. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του λίπους ήταν ποιότητας αναλυτικής καθαρότητας και τους προμηθευτήκαμε από τη Riedel-de Haen.

##### 3.1.1 Παρασκευή αντιδραστηρίου

Το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλο-διοξα-φωσφολάνιο αγοράσθηκε κατ'αρχήν από τη Fluka chem.Co. Επειδή όμως η καθαρότητα του εμπορικού αντιδραστηρίου ήταν χαμηλή, παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με μια μέθοδο της βιβλιογραφίας<sup>26</sup> η οποία τροποποιήθηκε στο εργαστήριο NMR με στόχο την αύξηση της απόδοσης σε προϊόν. Στη νέα αυτή μέθοδο χρησιμοποιείται εξάνιο αντί για βενζόλιο και πυριδίνη αντί για τριαιθυλαμίνη. Σαν αποτέλεσμα παρατηρείται δραματική αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης από 19% σε 45%. Η παρασκευή έχει ως εξής:

Σε μία δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 250ml προσαρμόζουμε ψυκτήρα και προσθετική φιάλη των 100ml. Τοποθετήθηκαν στη σφαιρική 19,7 ml τριχλωριούχου φωσφόρου διαλυμένα σε 180 ml εξάνιο. Στην προσθετική

φιάλη τοποθετήθηκαν 23,6 gr πινακόλης διαλυμένα σε 150 ml εξάνιο με 32 ml πυριδίνης, η οποία χρησιμεύει στην δέσμευση του υδροχλωρίου το οποίο παράγεται κατά την αντίδραση. Η προσθήκη του διαλύματος πινακόλης γίνεται για μισή ώρα στάγδην υπό ανάδευση σε λουτρό πάγου γιατί η αντίδραση είναι εξώθερμη. Το μείγμα αφέθηκε για περίπου μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου να αντιδράσει και στη συνέχεια γίνεται διήθηση του ιζήματος και έκπλυση του με 100 ml εξάνιο. Λαμβάνεται το διήθημα και αποστάζεται το εξάνιο στους 30°C. Στη συνέχεια γίνεται απόσταξη του προϊόντος στους 48-64°C (κατά τη διάρκεια της οποίας η θερμοκρασία μπάνιου σιλικόνης είναι 106-130°C) σε πίεση 1 mbar. Το προϊόν είναι ένα διάφανο υγρό. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν ~45 %. Η αντίδραση έχει ως εξής:



### 3.1.2 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος.

Σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml ζυγίστηκαν 30.00 mg κυκλοεξανόλης (299.52 μM). Σε άλλο φιαλίδιο ζυγίστηκαν 1.6 mg Cr(acac)<sub>3</sub>, και προστέθηκαν 16 ml ξηρής πυριδίνης και 10 ml CDCl<sub>3</sub> (1.6:1 v/v). Το μείγμα των διαλυτών αναδεύτηκε και προστέθηκε στην ογκομετρική φιάλη. Το πρότυπο διάλυμα προστατεύθηκε από την υγρασία με την προσθήκη 5A μοριακών κόσκινων.



### 3.2 Δείγματα γάλακτος

Η προμήθεια των δειγμάτων γάλακτος έγινε από τα πολυκαταστήματα τροφίμων. Ο επόμενος πίνακας συγκεντρώνει τα εμπορικά δείγματα που χρησιμοποιήσαμε. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά την αγορά τους.

**Πίνακας 3-1 Εμπορικά διαθέσιμα δείγματα γάλακτος που χρησιμοποιήθηκαν**

ΕΙΔΟΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ
Φρέσκο αγελαδινό χαμηλής παστερίωσης	ΔΕΛΤΑ	4
Φρέσκο αγελαδινό υψηλής παστερίωσης	ΦΑΓΕ	4
Φρέσκο κατσικίσιο	ΚΡΙΑΡΑΣ	4
Μακράς διάρκειας (UHT)	ΦΑΓΕ	6
Συμπυκνωμένο	ΝΟΥΝΟΥ	1
	ΒΛΑΧΑΣ	2

### 3.3 Απομόνωση του λίπους από το γάλα

Κατά τον προσδιορισμό του λίπους του γάλακτος και των προϊόντων του στο Εργαστήριο, είναι δυνατό να ακολουθήσουμε μία ποσοτική ή μία ογκομετρική μέθοδο.

Οι βιομηχανίες χρησιμοποιούν για τη λιπομέτρηση του γάλακτος μεθόδους που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία γιατί με αυτές παίρνουν αποτελέσματα με ικανοποιητική ακρίβεια για τις ανάγκες τους και μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Στην πρώτη περίπτωση ξεκινάμε από μία ορισμένη ποσότητα γάλακτος ζυγισμένο με ακρίβεια και καταλήγουμε σε μία ποσότητα λίπος. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η μέθοδος Röse-Gottlieb<sup>27</sup> που θεωρείται η πλέον ακριβής για τον προσδιορισμό του λίπους του γάλακτος. Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου απαιτεί χρήση αιθυλικού και πετρελαϊκού αιθέρα προκειμένου να εκχυλίσουμε το λίπος, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο για την παρούσα εργασία, αφού οι αιθέρες εκχυλίζουν και ένα μικρό μέρος της υδατικής φάσης<sup>28</sup>, ακατάλληλη. Ως αποτέλεσμα βλέπουμε κορυφές της λακτόζης, η οποία κατά ένα μικρό ποσοστό είναι διαλυτή στο νερό (Διαλυτότητα λακτόζης = 17%, 25°C), στα φάσματα μας. Μια ακόμα πιο διαδεδομένη μέθοδος απομόνωσης του λίπους από το γάλα, εξαιτίας των μεγάλων ποσοστών ανάκτησης που δίνει στην απομόνωση του λίπους, είναι η μέθοδος Bligh & Dyer<sup>29,30</sup>. Σ' αυτήν γίνεται χρήση διαλύτη CHCl<sub>3</sub> που είναι ένας αρκετά τοξικός διαλύτης. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο μας χρησιμοποιήσαμε μια τροποποιημένη μέθοδο των Bligh & Dyer<sup>31</sup> κατά την οποία το CHCl<sub>3</sub> έχει αντικατασταθεί με εξάνιο.

### 3.3.1 Μέθοδος Roesse-Gotlieb

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται συνήθως με τη χρήση κυλίνδρου Roesse-Gotlieb. Ο κύλινδρος Roesse-Gotlieb είναι ένα είδος διαχωριστικής χοάνης ο οποίος διαθέτει πώμα που περιέχει σύστημα σιφωνίων, διευκολύνοντας έτσι τη μετάγγιση της λιπαρής φάσης. Στο εργαστήριο μας για τη διεξαγωγή της μεθόδου χρησιμοποιήσαμε κοινή διαχωριστική χοάνη.

#### Χρησιμοποιούμενα μέσα

- Ποτήρι ζέσεως των 200ml
- Διαχωριστική χοάνη των 250ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 10ml, 50ml, 100ml

- ζυγός ακριβείας τέταρτου δεκαδικού ψηφίου
- σφαιρική φιάλη των 50ml

### **Απαραίτητα αντιδραστήρια**

- διάλυμα αμμωνίας περίπου 25%
- αιθυλικός αιθέρας
- αιθυλική αλκοόλη
- πετρελαϊκός αιθέρας

### **Μεθοδολογία**

Λίγο πριν από την ανάλυση, το δείγμα θερμαίνεται στους 20°C και αναδεύεται με προσοχή. Αν το λίπος δεν είναι ομοιόμορφα διασκορπισμένο στη μάζα του γάλακτος, θερμαίνεται στους 40°C και αναδεύεται με προσοχή. Κατόπιν ψύχεται πάλι στους 20°C.

Ζυγίζουμε στο ποτήρι ζέσεως περίπου 30 gr. γάλακτος, με ακρίβεια δεύτερου δεκαδικού ψηφίου. Προσθέτουμε στη συνέχεια με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου 6 ml αμμωνίας, αναδεύουμε ήπια, προσθέτουμε 30 ml αιθυλικής αλκοόλης και αναδεύουμε.

Μεταφέρουμε το δείγμα στη διαχωριστική χοάνη και προσθέτουμε 75 ml αιθυλικού αιθέρα ξεπλένοντας ταυτόχρονα το ποτήρι ζέσεως για να παρασύρουμε τυχόν υπολείμματα. Ανακινούμε την διαχωριστική για 1 min ανοίγοντας συχνά τη στρόφιγγα για να φεύγουν τα αέρια που παράγονται και προσθέτουμε άλλα 75 ml πετρελαϊκού αιθέρα επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία.

Μετά ακινησία 2 ωρών τουλάχιστον, επέρχεται διαχωρισμός του περιεχομένου της διαχωριστικής χοάνης σε δύο σαφείς στρώσεις, από τις οποίες η μεν επάνω περιλαμβάνει το λίπος του γάλακτος εντός των διαλυτών, η δε κάτω τα μη λιπαρά συστατικά του.

Κατά το χρόνο που γίνεται διαχωρισμός, ζυγίζεται επακριβώς η σφαιρική φιάλη. Κατόπιν μεταφέρουμε την πάνω στοιβάδα σταδιακά στη σφαιρική και αποστάζουμε τους αιθέρες στο ρότορα.

Επαναλαμβάνουμε την εκχύλιση για δεύτερη και τρίτη φορά με τη χρήση 75 ml αιθυλικού και 75 ml πετρελαϊκού αιθέρα και μεταφέρουμε κάθε φορά τη στρώση που περιέχει το λίπος στην ίδια φιάλη.

Μετά την απόσταξη τοποθετούμε το δείγμα σε αντλία κενού για να διώξουμε τυχόν υπολείμματα υγρασίας.

Από το βάρος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε και το βάρος του λίπους που προσδιορίστηκε κατά την ανωτέρω διαδικασία υπολογίζουμε την % περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος ως εξής:

$$\% \text{ Λίπος γάλακτος} = \frac{\text{Γραμμάρια λίπους που ανακτήθηκε}}{\text{Γραμμάρια δείγματος γάλακτος}} \times 100 \quad (3.1)$$

### **3.3.2 Τροποποιημένη μέθοδος Bligh and Dyer**

#### **Χρησιμοποιούμενα μέσα**

- Πλαστικά φιαλίδια φυγοκέντρισης των 250ml
- ζυγός ακριβείας δεύτερου δεκαδικού ψηφίου
- σιφόνιο των 10ml και των 2ml
- πιπέτες Pasteur και πουάρ
- ογκομετρικός σωλήνας των 50ml
- πλαστική σύριγγα των 25ml
- σφαιρική μακρύλαιμη των 25ml

#### **Απαραίτητα Αντιδραστήρια**

- διάλυμα αμμωνίας περίπου 25%
- εξάνιο 95%
- αιθυλική αλκοόλη
- απιονισμένο νερό

## Μεθοδολογία

Λίγο πριν από την ανάλυση θερμαίνουμε το δείγμα στους 20°C και αναδεύουμε με προσοχή. Ζυγίζουμε ένα πλαστικό φιαλίδιο φυγοκέντρησης και τοποθετούμε μέσα σ' αυτό 10ml γάλακτος. Καταγράφουμε το βάρος του δείγματος (περίπου 10gr.). Προσθέτουμε 2ml αμμωνίας 25%, αναμειγνύουμε ήπια, προσθέτουμε 24ml αιθυλικής αλκοόλης και αναμειγνύουμε.

Προσθέτουμε 30ml εξάνιο και 20ml νερό, αναμειγνύουμε έντονα και φυγοκεντρούμε για 15min στις 2000rpm.

Μεταφέρουμε την οργανική στοιβάδα –πάνω φάση- με τη βοήθεια πλαστικής σύριγγας σε προζυγισμένη σφαιρική των 25ml και αποστάζουμε το εξάνιο στο ρότορα, θερμαίνοντας ταυτόχρονα το δείγμα σε υδατόλουτρο στους 40°C.

Πραγματοποιούμε δεύτερη εκχύλιση του δείγματος με 30ml 10% v/v αιθανόλη σε εξάνιο, και μεταφέρουμε πάλι την οργανική φάση στην ίδια σφαιρική. Εάν πρόκειται για δείγμα με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος, π.χ. συμπυκνωμένο γάλα, πραγματοποιούμε και τρίτη εκχύλιση. Τέλος αφήνουμε το δείγμα μας στην αντλία κενού για μία ώρα περίπου έτσι ώστε να φύγουν τυχόν υπολείμματα υγρασίας.

Ζυγίζουμε τη φιάλη και προσδιορίζουμε το ποσοστό του λίπους στο γάλα με τη χρήση της εξίσωσης 3.1.

### **3.3.3 Υπολογισμός του ποσοστού ανάκτησης του λίπους με τη τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer.**

Η αξιοπιστία της τροποποιημένης μεθόδου Bligh & Dyer, για την απομόνωση του λίπους από το γάλα αντανακλάται, τόσο στο ποσοστό ανάκτησης του λίπους, όσο και στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων όπως θα δούμε σε επόμενη παράγραφο.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού ανάκτησης του λίπους από τα διάφορα είδη γάλακτος μετρήθηκε το λίπος που ανακτήθηκε από 10 δείγματα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος, 5 δείγματα φρέσκου κατσικίσιου γάλακτος, 5 δείγματα συμπυκνωμένου και 5 δείγματα UHT. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3-2: Ποσοστά ανάκτησης του λίπους με τη τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer**

Παράμετρος	Αγελαδινό (%)	Κατσικίσιο (%)	Συμπυκνωμένο (%)	UHT (%)
Αναφορά <sup>a</sup>	3.5	4	7	3.5
Μέσος όρος <sup>b</sup>	2.82	3.2	5.8	3.0
Ανάκτηση	80.5	79.7	81.4	85.4
R.S.D. <sup>c</sup>	2.3	3.1	4.3	3.5
Διακύμανση	77.4-82.6	75.3-82.5	77.1-85.7	81.1-90.0

<sup>a</sup>Τιμή που αναφέρεται στη συσκευασία

<sup>b</sup>Αγελαδινό γάλα, n=10. Κατσικίσιο γάλα, Συμπυκνωμένο γάλα και UHT, n=5

<sup>c</sup>Relative standard deviation: Σχετική τυπική απόκλιση (100 x σχετική απόκλιση/μέσο όρο)

### 3.3.4 Έλεγχος επαναληψιμότητας της μεθόδου απομόνωσης του λίπους.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εξετάστηκε ως εξής: από ένα δείγμα γάλακτος απομονώθηκε το λίπος συνολικά τέσσερις φορές για 15 g περίπου δείγματος την κάθε φορά. Τα πειραματικά αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3-3: Αναπαραγωγιμότητα απομόνωσης αγελαδινού γαλακτικού λίπους με την τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer.**

Μετρήσεις	Βάρος δείγματος (g.)	Βάρος λίπους(g.)	Περιεκτικότητα σε λίπος %
1	15.02	0.43	2.86
2	11.78	0.33	2.80
3	15.01	0.43	2.86
4	10.32	0.29	2.81
6	10.97	0.31	2.83
7	15.02	0.4	2.66
8	15.54	0.44	2.83
9	10.64	0.29	2.73
10	15.02	0.42	2.80
Μέσος όρος			2.79
Τυπική απόκλιση			0.07
R.S.D.			2.51%
Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας			0.196

\*R.S.D : σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation)



**Πίνακας 3-4 : Επαναληψιμότητα απομόνωσης αγελαδινού γαλακτικού λίπους με την τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer.**

Μετρήσεις	Βάρος δείγματος (g.)	Βάρος λίπους(g.)	Περιεκτικότητα σε λίπος %
1	10.64	0.29	2.73
2	11.78	0.33	2.80
3	10.32	0.30	2.91
4	10.97	0.31	2.83
<b>Μέσος όρος</b>			2.82
<b>Τυπική απόκλιση</b>			0.08
<b>*R.S.D.</b>			2.84%
<b>Επαναληψιμότητα</b>			0.224

\*RSD =relative standard diviation

\*\*r= repeatability value (r) =2,8 x s<sub>r</sub>

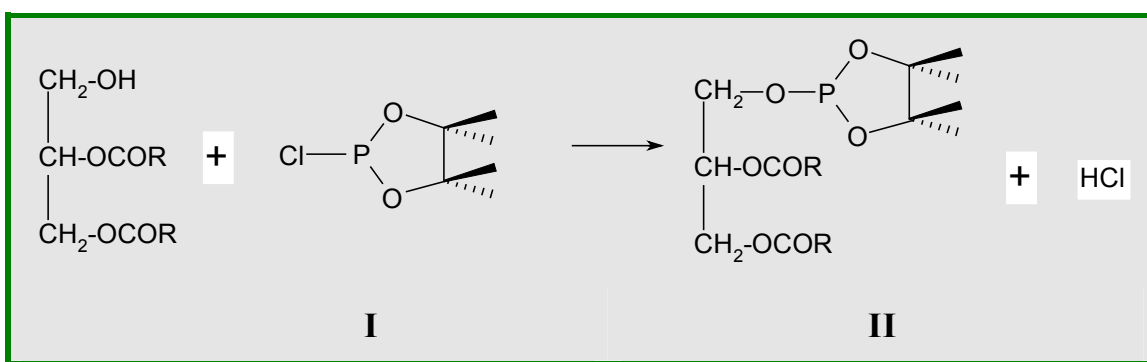
Σύμφωνα με τον ορισμό που δίνει το ISO<sup>Error! Bookmark not defined.</sup> η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων τυπικών αποκλίσεων με τη σταθερά 2,8. Όπως προκύπτει από τους Πίνακες 3.3 και 3.4 η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι 0,224 και η αναπαραγωγιμότητα 0,196 ( ή σε όρους τυπικής απόκλισης  $2.84 \pm 0.08$  και  $2.84 \pm 0.08$  αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.

### 3.4 Αντίδραση φωσφυτιλίωσης για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων.

Ποσότητα 110-150mg λίπους γάλακτος ζυγίστηκε απ' ευθείας σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5 mm, και στη συνέχεια προστέθηκαν 0.3 ml του πρότυπου

διαλύματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20ml αντιδραστήριου 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο (I). Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη λήψη των φασμάτων  $^{31}\text{P}$  NMR.

Η νέα τεχνική βασίζεται στην αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια, αλδεϋδικές ομάδες) με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο (I), σύμφωνα με την αντίδραση:



### 3.5 Μονοδιάστατα φάσματα NMR

Όλα τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker AMX500 λειτουργικής συχνότητας 500.1 MHz για το πρωτόνιο, 125.7 MHz για τον άνθρακα-13 και 202.2 MHz για τον φώσφορο-31. Η θερμοκρασία στο δοκιμαστή ήταν  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  και ελέγχθηκε με τη χρήση διαγράμματος βαθμονόμησης με αιθυλενογλυκόλη.

#### 3.5.1 Μονοδιάστατα φάσματα $^1\text{H}$ NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR ελήφθησαν με 16 k πραγματικά δεδομένα (data points) στην διάρκεια καταγραφής ( $t_2$ ). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 32 FID οι οποίες αποθηκεύθηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 2sec. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων  $^1\text{H}$  NMR αναφέρονται στην κλίμακα  $\delta$  με πρότυπη ουσία αναφοράς το TMS ( $\delta$  0.0)

#### 3.5.2 Μονοδιάστατα φάσματα $^{13}\text{C}$ NMR

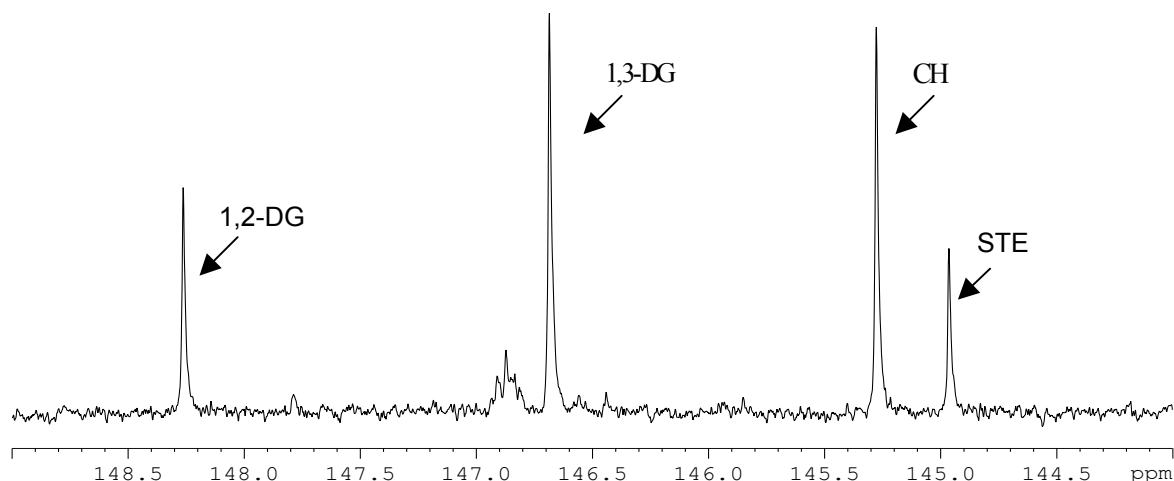
Τα μονοδιάστατα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR ελήφθησαν με 32 k πραγματικά δεδομένα (data points). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 1024 σαρώσεις. Χρησιμοποιήθηκαν 4 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 2 sec. Πριν τον μετασχηματισμό Fourier η ελεύθερη επαγωγική φθορά (FID) πολλαπλασιάστηκε με μία εκθετική συνάρτηση με εκθέτη  $1b=1\text{Hz}$  για την

αύξηση της ευαισθησίας του πειράματος και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη 16 k μηδενικών στην μνήμη του υπολογιστή (zero filling). Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction) με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης, μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε σχέση με την κορυφή του TMS ( $\delta$  0.0).

### 3.5.3 Μονοδιάστατα φάσματά $^{31}\text{P}$ NMR

Για τη λήψη ποσοτικών φασμάτων  $^{31}\text{P}$ -NMR, θα πρέπει να αποκλειστεί η αλληλεπίδραση NOE μεταξύ του πυρήνα του φωσφόρου και γειτονικών πρωτονίων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική (inverse gated decoupling), κατά την οποία ο αποσυζευκτής πρωτονίων λειτουργεί μόνο κατά την διάρκεια του χρόνου ανάκτησης, ενώ παραμένει κλειστός καθ' όλη την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος. Για την ελάττωση των χρόνων αποδιέγερσης  $T_1$  των πυρήνων  $^{31}\text{P}$  χρησιμοποιήθηκε το παραμαγνητικό αντιδραστήριο  $\text{Cr}(\text{acac})_3$ , με αποτέλεσμα οι χρόνοι αποδιέγερσης να μην υπερβαίνουν τα 5 s. Ο χρόνος αναμονής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30 s ίσος περίπου με  $5T_1^{\text{max}}$ , όπου  $T_1^{\text{max}}$  ο μεγαλύτερος παρατηρούμενος χρόνος αποδιέγερσης σπιν-πλέγμα. Τυπικοί παράμετροι ενός πειράματος για ποσοτικές μετρήσεις ήταν: εύρος παλμού  $90^\circ$  ή 12.5  $\mu\text{s}$ , φασματικό εύρος 48.41 ppm, χρόνος αναμονής 30 s, αριθμός πραγματικών δεδομένων (data points) 16 k. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκαν 32 FIDs. Πριν από το μετασχηματισμό Fourier, η ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) πολλαπλασιάστηκε με μία εκθετική συνάρτηση με έκθετη  $\text{lb}=1$  Hz και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη μηδενικών 16 k (zero filling) στην μνήμη του υπολογιστή. Πριν από την ολοκλήρωση, η γραμμή βάσης του φάσματος διορθώθηκε χρησιμοποιώντας ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και έγινε διόρθωση φάσης.

Όλες οι χημικές μετατοπίσεις  $^{31}\text{P}$ -NMR αναφέρονται στην κορυφή η οποία οφείλεται στην φωσφυτιλίωση του νερού (υγρασία του δείγματος), η οποία παρουσιάζει μία στενή κορυφή σε  $\delta$  132.20. Το φάσμα στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζει το φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR γαλακτικού λίπους στην περιοχή που απορροφούν τα φωσφυτιλιωμένα διγλυκερίδια και οι στερόλες.



**Σχήμα 3.1:** Περιοχή φάσματος  $^{31}\text{P}$ -NMR γαλακτικού λίπους, στην οποία απορροφούν τα διγλυκερίδια (1,2-DG και 1,3-DG) και οι στερόλες.

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων κάνουμε τις εξής παραδοχές: (α) θεωρούμε ότι ένα mole διγλυκεριδίων αντιδρά με ένα mole αντιδραστήριου (I)

(β) θεωρούμε ότι το οξύ που εστεροποιεί το μόριο της γλυκερόλης είναι το παλμιτικό οξύ (MB=256)

(γ) Το ποσοστό των διγλυκεριδίων αναφέρεται σε 100 γραμμάρια λίπους.

Τελικά το ποσοστό των διγλυκεριδίων (1,2-DGs ή/και 1,3-DGs) υπολογίζεται από την σχέση:

$$\% \text{ διγλυκερίδια} = \frac{I_{\text{DGs}} \times A \times 10^{-3} \text{MB}_{\text{διγλυκερίδια}}}{I_{\text{CH}} \cdot 10 * W_{\text{δείγματος}}} \quad (3.2)$$

$I_{DGs}$  : Ολοκλήρωμα των κορυφών των φωσφυτιλιωμένων διγλυκεριδίων στο φάσμα  $^{31}P$ - NMR

$I_{CH}$  : Ολοκλήρωμα της φωσφυτιλιωμένης πρότυπης ουσίας (κυκλοεξανόλη).

$A$  : Ποσότητα του πρότυπου διαλύματος σε mmoles.

$MB_{\text{Διγλυκεριδίων}}$  : Μοριακό βάρος διγλυκεριδίων (568)

$W_{\text{δείγματος}}$  : Βάρος δείγματος

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των στερολών στο λίπος του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση:

$$\% \text{ Στερόλες} = \frac{I_{\text{στερόλες}}}{m} \times 38.7 \quad (3.3)$$

όπου :

$I_{\text{στερόλες}}$  : Ολοκλήρωμα της κορυφής των στερολών στο φάσμα

$m$  : Βάρος του δείγματος (λίπους) σε mg.

**38.7** : Σχετικό μοριακό βάρος χοληστερόλης/10

Υπενθυμίζεται ότι στις στερόλες του γάλακτος κυριαρχεί ή χοληστερόλη.

### 3.6 Ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA)

Στις διάφορες επιστήμες περισσότερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συγκριτικές μελέτες με στόχο να ανακαλυφθούν διαφορές (εάν υπάρχουν) μεταξύ διαφόρων γεγονότων παρά αυτά τα ίδια τα γεγονότα. Μερικά παραδείγματα είναι η σύγκριση της συγκέντρωσης ενός πρωτεϊνικού διαλύματος κάτω από διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, η σύγκριση του ποσού και χρόνου μάθησης που παρουσιάζουν διάφοροι μέθοδοι διδασκαλίας. Σε όλες τις περιπτώσεις η σύγκριση μπορεί να γίνει με την ανάλυση της διακύμανσης ή της διασποράς (analysis of variance, ANOVA), με τον έλεγχο της **στατιστικής σημαντικότητας** (statistical significance) μεταξύ των **μέσων όρων** (means) των μετρήσεων μιας ή περισσότερων **μεταβλητών** (variables) σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Το **δείγμα** αντιπροσωπεύει μια σειρά από πεπερασμένο αριθμό μετρήσεων μιας ανεξάρτητης μεταβλητής από ένα πολύ μεγάλο αριθμό μετρήσεων (θεωρητικά άπειρο), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον **πληθυσμό**. Διαφορετικά δείγματα ανήκουν σε διαφορετικές **κατηγορίες** (classes) ή **ομάδες** (groups). Εάν η σύγκριση γίνεται μεταξύ των μέσων όρων δύο διαφορετικών δειγμάτων, τότε η ANOVA θα δώσει τα ίδια αποτελέσματα με το **t-test για ανεξάρτητα δείγματα** (όταν η σύγκριση γίνεται μεταξύ δύο ανεξάρτητων δειγμάτων με βάση μια τουλάχιστον εξαρτημένη μεταβλητή, π. χ. η σύγκριση δύο αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε διαφορετικά δείγματα ή η σύγκριση της απόδοσης των αγοριών και κοριτσιών σε μια τάξη με βάση τις βαθμολογίες τους) ή με το **t-test για εξαρτημένα δείγματα** (όταν η σύγκριση γίνεται μεταξύ δύο ανεξάρτητων μεταβλητών σε όμοια δείγματα, π. χ. η σύγκριση δύο αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε δείγματα της ίδιας ομάδας, η σύγκριση των βαθμολογιών των αγοριών με βάση τις βαθμολογίες του

πρώτου και δευτέρου εξαμήνου). Στην πρώτη περίπτωση, η σύγκριση των μέσων όρων γίνεται **μεταξύ των δύο ομάδων** (between-groups variability), ενώ στη δεύτερη περίπτωση η σύγκριση γίνεται **μέσα στην ομάδα** (within-group variability).

Ελήφθη ένας ικανός αριθμός  $n$  αντιπροσωπευτικών δειγμάτων γαλακτικού λίπους από  $h$  είδη γάλακτος (ομάδες). Στο γαλακτικό λίπος κάθε ομάδας μετρήθηκαν οι ανεξάρτητες μεταβλητές 1,2-DGs, 1,3-DGs, ο συνολικός αριθμός διγλυκεριδίων (DGs) και υπολογίστηκε ο λόγος  $L = 1,2\text{-DGs}/\text{DGs}$ . Για κάθε μεταβλητή σε κάθε ομάδα  $i$  έγιναν  $j$  μετρήσεις,  $x_{ij}$ . Το πείραμα για ( $h=5$ ) είδη γάλακτος απεικονίζεται στον Πίνακα 3.6. Ο πίνακας περιέχει και τους μέσους όρους των μετρήσεων για κάθε ομάδα και τον μέσο όρο όλων των επί μέρους μέσων όρων των ομάδων. Το ερώτημα που τίθεται είναι **ποια ή ποιες από τις μεταβλητές, 1,2-DGs, 1,3-DGs, DGs και L μπορεί να διαφοροποιήσει τα γάλατα κατά είδος**. Απάντηση στο ερώτημα μπορεί να δοθεί με τη στατιστική ανάλυση ANOVA, η οποία ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

- i. Υπολογίζεται η διακύμανση,  $s_w^2$ , των μετρήσεων μιας μεταβλητής μέσα σε κάθε ομάδα (within-group). Ο υπολογισμός γίνεται με την εξίσωση 
$$s_w^2 = \sum_i \sum_j (x_{ij} - x_i)^2 / h(n-1)$$

Το άθροισμα για τις τιμές του  $j$  και η διαίρεση με  $(n-1)$  δίνει τη διακύμανση για κάθε ομάδα. Το άθροισμα για τις τιμές του  $i$  και η διαίρεση με  $h$  δίνει το μέσο όρο των διακυμάνσεων όλων των ομάδων. Το γινόμενο  $h(n-1)$  εκφράζει τον αριθμό των **βαθμών ελευθερίας** των μετρήσεων μέσα στις ομάδες

- ii. Υπολογίζεται η διακύμανση,  $s_b^2$  των μετρήσεων μιας μεταβλητής από ομάδα σε ομάδα (μεταξύ των ομάδων) (between-groups), λαμβάνοντας υπόψη την απόκλιση του μέσου όρους των μετρήσεων των



δειγμάτων κάθε ομάδας από το γενικό μέσο όρο. Ο υπολογισμός γίνεται με την εξίσωση  $s_b^2 = n \sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (h-1)$

Για τον υπολογισμό της διακύμανσης μεταξύ των ομάδων, θεωρούμε ότι όλα τα δείγματα έχουν επιλεγεί από έναν πληθυσμό. Οι βαθμοί ελευθερίας των μετρήσεων μεταξύ των ομάδων είναι  $(h-1)$ .

iii. Ελέγχεται η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων με το F-test, το οποίο συγκρίνει τις διακυμάνσεις μέσα και μεταξύ των ομάδων.

$$F = s_b^2 / s_w^2$$

Εάν η μηδενική υπόθεση είναι αληθινή, τότε  $s_w^2 = s_b^2 = 1$  και  $F=1$ . Με άλλα λόγια δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των μετρήσεων μεταξύ των ομάδων και η ανεξάρτητη μεταβλητή που μετρήθηκε δεν διαφοροποιεί τα δείγματα. Αν όμως τα δείγματα διαφοροποιούνται από τη συγκεκριμένη μεταβλητή τότε θα πρέπει  $F = s_b^2 / s_w^2 > 1$

iv. Εκτιμάται η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων. Προς τούτο συγκρίνεται ο λόγος  $F$  που υπολογίσθηκε με κάποια θεωρητική τιμή  $F_{h-1, n-h}(a)$  που βρίσκεται από πίνακες F-κατανομής, λαμβανομένου υπόψη ότι ο λόγος των δύο διακυμάνσεων ακολουθεί την F-κατανομή. Στο συμβολισμό  $F_{h-1, n-h}(a)$ , το  $a$ , ονομάζεται **στάθμη σημαντικότητας** (significance level) του τεστ. Το  $a$  εκφράζει τη πιθανότητα του σφάλματος τύπου I, δηλαδή το σφάλμα να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση ( $H_0$ ), ενώ είναι σωστή. Συνήθως, η πιθανότητα  $a$  για το σφάλμα τύπου I, λαμβάνει τιμή μεταξύ 0.05 και 0.01. Δηλαδή ορίζουμε σαν απορριπτική περιοχή της αρχικής υπόθεσης, το κομμάτι του δειγματοχώρου που έχει τιμές  $F > F_{h-1, n-h}$

### 3.7 Αποτελέσματα –Συζήτηση

#### 3.7.1 Παρατηρήσεις κατά την διαδικασία απομόνωσης του λίπους.

Τα λιποσφαίρια του γάλακτος φέρουν εξωτερικά προστατευτική μεμβράνη που εμποδίζει την ανάμειξη τους με το εξάνιο<sup>32</sup>, το οποίο όπως είναι γνωστό αναμιγνύεται εύκολα με το λίπος. Γι' αυτό το λόγο στη παραπάνω μέθοδο χρησιμοποιούμε αφ' ενός μεν αμμωνία για τη διάσπαση της μεμβράνης των λιποσφαιρίων αφ' ετέρου δε αλκοόλη για να διευκολυνθεί η είσοδος του λίπους από την υδάτινη φάση που βρίσκεται στο γάλα σε εκείνη του διαλύτη, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το εξάνιο.

Ο ρόλος της αλκοόλης στην απομόνωση του λίπους έχει μελετηθεί εκτενώς<sup>30,32,33</sup> από πολλούς ερευνητές τόσο για τη δυσκολία που εμφανίζουν στην απομόνωση κάποια συστατικά του λίπους όπως π.χ τα μονογλυκερίδια όσο και για τη βελτίωση του ποσοστού ανάκτησης του λίπους. Στην προσπάθεια μας να αποφύγουμε τη χρήση αλκοόλης ή έστω την ελάττωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητας, προκειμένου να αποφύγουμε την εκχύλιση μη λιπαρών συστατικών, δημιουργήθηκε γαλάκτωμα το οποίο ήταν αδύνατο να καταστραφεί.

#### 3.7.2 Φάσματα <sup>31</sup>P NMR γαλακτικού λίπους.

Στο Σχήμα 3.2 και παρουσιάζονται τυπικά φάσματα <sup>31</sup>P NMR του γαλακτικού λίπους που ελήφθη με τις μεθόδους ανάκτησης Bligh & Dyer και Roese-Gotlieb καθώς και μίγμα πρότυπης λακτόζης με λίπος που ανακτήθηκε με τη μέθοδο Roese-Gotlieb .

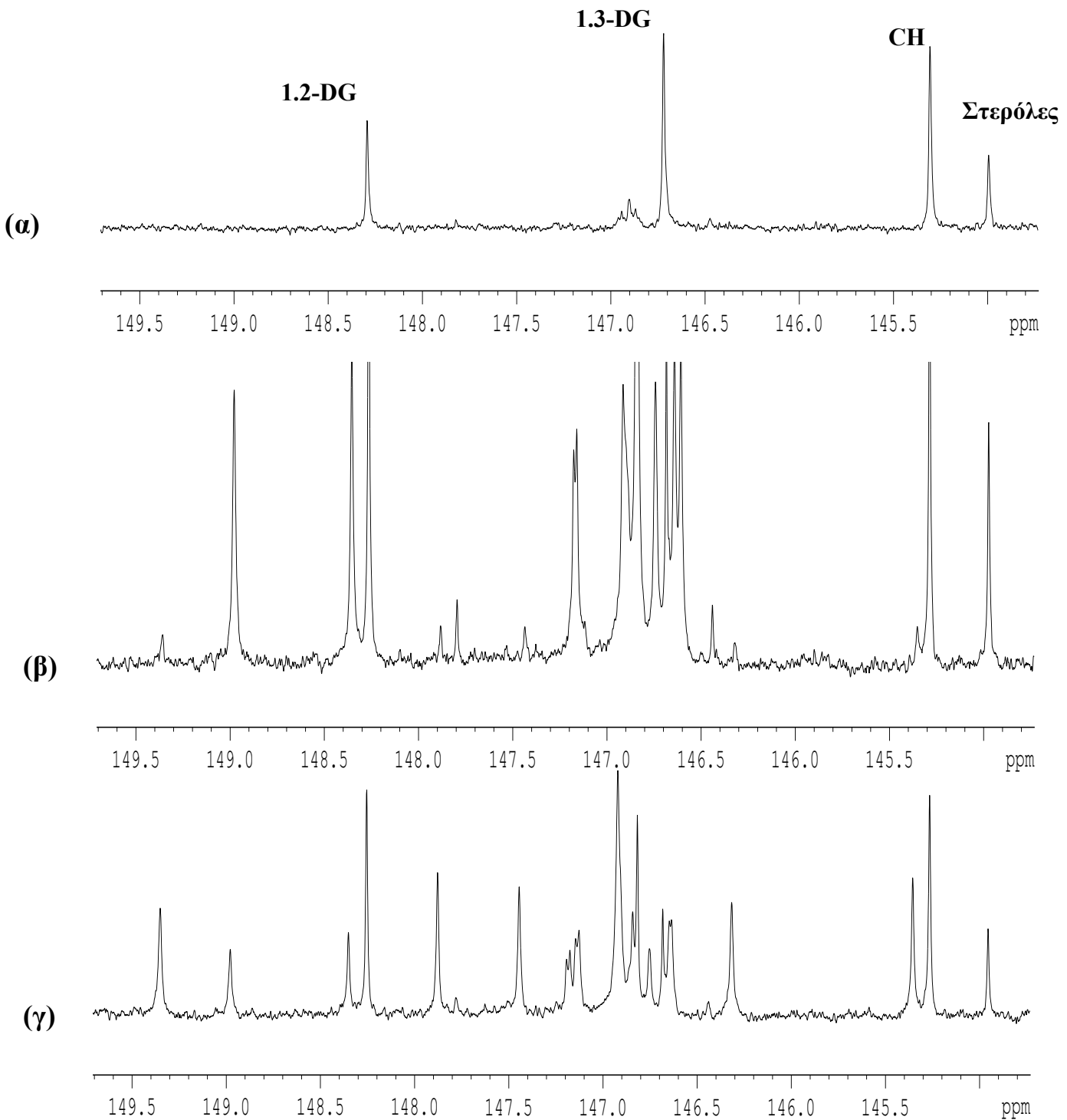
Στον παρακάτω Πίνακα 3.3 συνοψίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των φωσφυτυλιωμένων πρότυπων ουσιών, βάση των οποίων αποδόθηκαν οι

κορυφές των διγλυκεριδίων και στερολών στα φάσματα<sup>34</sup>. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται στην κορυφή η οποία οφείλεται στην φωσφυτιλίωση του νερού (υγρασία του δείγματος), η οποία παρουσιάζει μία στενή κορυφή σε δ 132.20.

**Πίνακας 3-5: Χημικές μετατοπίσεις πρότυπων διγλυκεριδίων και β-σιτοστερόλης στο φάσμα <sup>31</sup>P-NMR**

Συστατικό	Υδροξυλικά πρωτόνια
1,3-διολεΐνη	146.69
1,2-διολεΐνη	148.26
Κυκλοεξανόλη	145.28
β-σιτοστερόλη	144.95

Στο φάσμα του Σχήματος 3.2(β) παρατηρούμε την εμφάνιση ενός μεγάλου αριθμού κορυφών που προφανώς οφείλονται και στην ύπαρξη λακτόζης στο δείγμα μας. Το γεγονός αυτό, μπορεί να επιβεβαιωθεί αν το συγκρίνουμε με τα φάσμα 3.2(γ) στο οποίο εμφανίζονται καθαρά οι κορυφές της λακτόζης. Αντίθετα στο φάσμα του Σχήματος 3.2(α) εμφανίζονται μόνο οι κορυφές των διγλυκεριδίων και των στερολών, γεγονός το οποίο ενισχύει την άποψη ότι η μέθοδος Bligh & Dyer αποτελεί την πλέον αποτελεσματική για την απομόνωση του λίπους του γάλακτος σε σύγκριση με τη μέθοδο Roes-Gottlieb.



**Σχήμα 3.2 (α) Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR από δείγμα λίπους που ανακτήθηκε με την τροποποιημένη μέθοδο Bligh & Dyer, (β) Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR από δείγμα λίπους που ανακτήθηκε με την μέθοδο Roese-Gottlieb, (γ) Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR από δείγμα λίπους που ανακτήθηκε με την μέθοδο Roese-Gottlieb και στο οποίο έχει προστεθεί πρότυπη λακτόζη. . Και στα τρία φάσματα παρουσιάζεται η περιοχή απορρόφησης των διγλυκεριδίων και στερολών.**

Η πρότυπη λακτόζη που χρησιμοποιήθηκε περιείχε περίπου 25-30% w/w α-λακτόζη και η φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$ -NMR φαίνεται να αποτελεί μία καλή μέθοδο για τον προσδιορισμό λακτόζης στο γάλα.

### 3.7.3 Περιεκτικότητα διγλυκεριδίων στους διάφορους τύπους γάλακτος

Η εφαρμογή της μεθόδου  $^{31}\text{P}$  NMR στον ποσοτικό προσδιορισμό της διγλυκεριδικής σύστασης στο λίπος του γάλακτος φαίνεται στα Σχήματα 3.1 και 3.2, στα οποία παρουσιάζονται τα φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR από ένα δείγμα αγελαδινού γάλακτος. Η κορυφή σε  $\delta$  145.28 αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο (κυκλοεξανόλη-CH). Παρατηρούνται επίσης πολύ καλά διαχωρισμένες οι κορυφές για τα 1,2 και 1,3 διγλυκερίδια στα  $\delta$  146.67 και  $\delta$  148.28, αντίστοιχα. Το σήμα σε  $\delta$  144.95 οφείλεται στις φωσφιτυλιωμένες ολικές στερόλες.

Ένας μικρός αριθμός δειγμάτων γάλακτος διαφορετικής ζωικής προέλευσης και επεξεργασίας παραγωγήθηκαν με το αντιδραστήριο I και στη συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματα  $^{31}\text{P}$  NMR. Η έξοχη διακριτική ικανότητα στο φάσμα του  $^{31}\text{P}$  επιτρέπει τον προσδιορισμό των χημικών μετατοπίσεων και την αξιόπιστη ανίχνευση και ποσοτική ανάλυση των φωσφιτυλιωμένων συστατικών που βρίσκονται σε πολύ μικρό ποσοστό στο λίπος του γάλακτος. Τα ολοκληρώματα αυτών των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 1,2-DG, 1,3-DG και των ολικών στερολών (εξισώσεις 3.2 και 3.3). Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης για μια σειρά δειγμάτων γάλακτος διαφορετικής προέλευσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 3.5 αποκαλύπτει μερικές ενδιαφέροντες τάσεις στη διγλυκεριδική σύσταση των διαφόρων τύπων γάλακτος.

(α) Τα ολικά διγλυκερίδια (DGs) στο αγελαδινό γάλα κυμαίνονται από 1.03% έως 1.44% και βρίσκονται σε συμφωνία με τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις (1.1%-1.6%) για τον συγκεκριμένο τύπο γάλακτος.

(β) Το κατσικίσιο γαλακτικό λίπος περιέχει το μικρότερο ποσοστό ολικών διγλυκεριδίων (0.44%-0.89%) σε σχέση με τα άλλα είδη γάλακτος λίπους, εκ των οποίων το συμπυκνωμένο και το υπερπαστεριωμένο (UHT) εμφανίζονται με τα μεγαλύτερα ποσοστά ολικών διγλυκεριδίων.

(γ) Το ποσοστό των 1,2-διγλυκεριδίων είναι μεγαλύτερο για τα αγελαδινά γάλατα υψηλής παστερίωσης, το συμπυκνωμένο και το υπερπαστεριωμένο (UHT), υποδεικνύοντας έτσι ότι ακόμη και η επεξεργασία τους σε υψηλές θερμοκρασίες δεν αποτρέπει τη λιπολυτική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από τα θερμοανθεκτικά ψυχοτροπικά ένζυμα.

(δ) Σε όλα τα είδη γαλακτικού λίπους παρατηρείται ένα υψηλότερο ποσοστό 1,3-DGs σε σχέση με τα 1,2-DGs. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και στις χαμηλές τιμές, του λόγου των 1,2-διγλυκεριδίων προς τα ολικά διγλυκερίδια, ( λόγος **D**, Πίνακας 3.5). Παρ' όλα αυτά, ο λόγος D είναι μικρότερος για τα υψηλής παστερίωσης φρέσκο αγελαδινό γάλα, το συμπυκνωμένο και το μακράς διάρκειας σε σχέση με τα χαμηλής παστερίωσης αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος.

(ε) Το ποσοστό των στερολών, που αποτελούνται κυρίως από χοληστερόλη, δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα στους διάφορους τύπους γάλακτος που χρησιμοποιείθηκαν σε αυτή την εργασία.

Οι προσπάθειες που έχουν γίνει για τη μείωση του ποσοστού της χοληστερόλης που περιέχεται στο φρέσκο γάλα, ακόμα και μέσω της διατροφής των ζώων φαίνεται ότι δεν φέρνουν το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Τα ποσοστά της χοληστερόλης όπως ανιχνεύονται και με την παρούσα μέθοδο παραμένουν σχεδόν σταθερά.

Πίνακας 3-6 Πίνακας πειραματικών αποτελεσμάτων.

Γάλα/δείγμα	1,2-DGs	1,3-DGs	Ολικά DGs	D <sup>a</sup>	Ολικές στερόλες
Αγελαδινό γάλα/1 <sup>b</sup>	0.28	0.75	1.03	0.27	0.17
Αγελαδινό γάλα/2 <sup>b</sup>	0.35	0.77	1.12	0.1	0.18
Αγελαδινό γάλα/3 <sup>b</sup>	0.43	0.81	1.24	0.35	0.24
Αγελαδινό γάλα/4 <sup>b</sup>	0.39	0.74	1.13	0.35	0.20
<b>Μέσος όρος</b>	<b>0.36±0.06</b>	<b>0.77±0.03</b>	<b>1.13±0.04</b>	<b>0.32±0.04</b>	<b>0.20±0.03</b>
Αγελαδινό γάλα/5 <sup>c</sup>	0.50	0.53	1.03	0.49	0.18
Αγελαδινό γάλα/6 <sup>c</sup>	0.42	0.70	1.12	0.38	0.19
Αγελαδινό γάλα/7 <sup>c</sup>	0.64	0.61	1.25	0.51	0.21
Αγελαδινό γάλα/8 <sup>c</sup>	0.58	0.86	1.44	0.40	0.25
Αγελαδινό γάλα/8 <sup>d</sup>	0.60	1.07	1.67	0.36	0.20
<b>Μέσος όρος</b>	<b>0.54±0.09</b>	<b>0.68±0.14</b>	<b>1.21±0.18</b>	<b>0.45±0.07</b>	<b>0.21±0.03</b>
Κατσικίσιο γάλα/1	0.36	0.53	0.89	0.40	0.18
Κατσικίσιο γάλα/2	0.18	0.25	0.44	0.41	0.18
Κατσικίσιο γάλα/3	0.22	0.47	0.69	0.32	0.29
Κατσικίσιο γάλα/4	0.23	0.47	0.70	0.33	0.32
<b>Μέσος όρος</b>	<b>0.25±0.08</b>	<b>0.43±0.12</b>	<b>0.68±0.19</b>	<b>0.37±0.05</b>	<b>0.24±0.07</b>
Συμπυκνωμένο γάλα/1	0.50	1.09	1.59	0.31	0.27
Συμπυκνωμένο γάλα/2	0.58	1.25	1.83	0.32	0.28
Συμπυκνωμένο γάλα/3	0.60	1.02	1.62	0.37	0.29
Συμπυκνωμένο γάλα/3 <sup>d</sup>	0.59	1.72	2.31	0.26	0.25
<b>Μέσος όρος</b>	<b>0.56±0.05</b>	<b>1.12±0.12</b>	<b>1.69±0.13</b>	<b>0.33±0.03</b>	<b>0.28±0.01</b>
UHT <sup>e</sup> /1	0.62	1.17	1.79	0.36	0.31
UHT/2	0.66	1.26	1.92	0.34	0.18
UHT/3	0.43	0.98	1.41	0.30	0.21
UHT/4	0.46	1.06	1.52	0.30	0.22
UHT/5	0.46	1.11	1.57	0.29	0.24
UHT/6	0.66	1.27	1.93	0.34	0.31
<b>Μέσος όρος</b>	<b>0.55±0.11</b>	<b>1.14±0.11</b>	<b>1.69±0.22</b>	<b>0.32±0.03</b>	<b>0.25±0.05</b>

<sup>a</sup> Λόγος των 1,2-διγλυκεριδίων προς τα ολικά διγλυκερίδια

<sup>b</sup> Φρέσκο γάλα υψηλής παστερίωσης.

<sup>c</sup> Φρέσκο γάλα χαμηλής παστερίωσης.

<sup>d</sup> Ανάκτηση του λίπους με τη μέθοδο Roesse-Gottlieb

<sup>e</sup> UHT=Ultra high temperature treatment

Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι τα παραπάνω συμπεράσματα είναι τα πρώτα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Η διγλυκεριδική σύσταση μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες σχετιζόμενους με το περιβάλλον, την κατεργασία και την αποθήκευση. Πιο συγκεκριμένα, η διγλυκεριδική σύσταση στα τυποποιημένα αγελαδινά γάλατα, όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα, επηρεάζεται από την θερμική επεξεργασία του γάλατος. Γεγονός, που δεν προκαλεί έκπληξη εφόσον είναι γνωστή η αυξημένη υδρόλυση που υφίστανται τα τριγλυκερίδια σε υψηλές θερμοκρασίες.



### 3.7.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων ANOVA

Η παραπάνω ποιοτικές παρατηρήσεις οδηγούν σε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τα επίπεδα των διγλυκεριδίων και των στερολών στους διάφορους τύπους γαλακτικού λίπους. Ωστόσο, για την ενίσχυση της αξιοπιστίας αυτής της έρευνας, θεωρήθηκε απαραίτητο η διεξαγωγή ενός στατιστικού τεστ προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα συσχετισμού μεταξύ των ποσοστών των διγλυκεριδίων και στερολών και την προέλευση/κατεργασία του γάλακτος. Για το λόγο αυτό, τα ποσοστά των 1,2-DGs, 1,3-DGs, ολικών DGs και ο λόγος D, αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ANOVA. Ο πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για τα διάφορα είδη γάλακτος.

Παρατηρούμε ότι εκτός από τις ολικές στερόλες, οι υπόλοιπες μεταβλητές ήταν σημαντικά διαφορετικές για κάθε ομάδα ( τύπο γάλακτος), υποδεικνύοντας έτσι ότι η μηδενική υπόθεση θα πρέπει να απορριφθεί και οι μέσοι όροι μεταξύ των ομάδων για τα διάφορα δείγματα γαλακτικού λίπους διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

**Πίνακας 3-7 Πίνακας αποτελεσμάτων της ANOVA**

Μεταβλητή	1,2-DG	1,3-DG	Ολικά DGs	D	Στερόλες
<b>F (4,19)</b>	13.59	40.03	30.75	8.92	2.39
<b>F<sub>critical</sub> (p = 0,05)</b>	2.90	2.90	2.90	2.90	2.90
<b>p</b>	0.000022	<0.000001	<0.000001	0.000313	0.086561

Κατόπιν χρησιμοποιήσαμε μια μέθοδο πολλαπλών συγκρίσεων των μεταβλητών που αποτέλεσαν παράγοντες διαχωρισμού των διάφορων τύπων γάλακτος στην ANOVA με σκοπό να δούμε ποιες από αυτές μπορούν να διαφοροποιήσουν καλύτερα τους διάφορους τύπους γάλακτος που μελετήσαμε μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό αρχικά σκεφτήκαμε να χρησιμοποιήσουμε το lsd τεστ όμως αυτό απαιτεί ίδιο αριθμό δειγμάτων ανά ομάδα και για το λόγο αυτό καταφύγαμε στο tuckey hsd test για το οποίο δεν υφίσταται αυτή η προϋπόθεση, και προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- i. Τα 1,3-διγλυκερίδια και τα ολικά διγλυκερίδια αποτελούν παράγοντες διαχωρισμού μεταξύ του συμπυκνωμένου του κατσίκισιου και του γάλακτος μακράς διάρκειας (UHT).
- ii. Τα 1,2-διγλυκερίδια και ο λόγος D διαχωρίζουν το φρέσκο αγελαδινό γάλα υψηλής παστερίωσης από αυτό της χαμηλής παστερίωσης.

### 3.7.5 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του γαλακτικού λίπους.

Το μεγαλύτερο ποσοστό του γαλακτικού λίπους αποτελούν τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στα μόρια των γλυκεριδίων. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 80 διαφορετικά λιπαρά οξέα, τα οποία είναι απλής, διπλής ή πολλαπλής αλυσίδας, κορεσμένα ή ακόρεστα. Τα πιο σημαντικά από αυτά αποτελούν το 90% περίπου των λιπαρών οξέων και παρουσιάζονται μαζί με την τυπική αναλογία τους στον Πίνακα 3.6<sup>35</sup>.

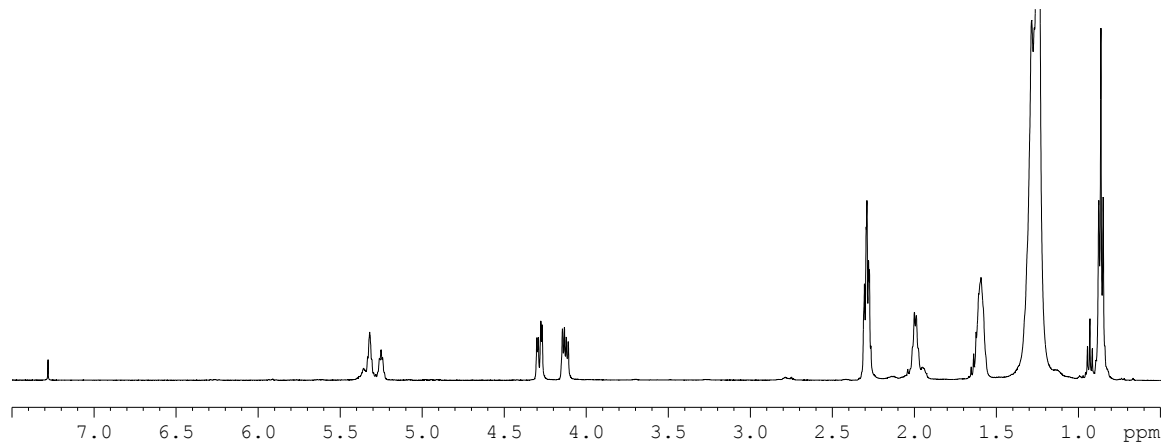
Στο παρελθόν, η φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στο γαλακτικό λίπος<sup>36,37</sup>. Λόγω όμως του μεγάλου αριθμού των οξέων και της σχετικά μικρής περιοχής απορροφήσεων στα φάσματα πρωτονίου, οι πληροφορίες για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων είναι σχετικά περιορισμένες. Το Σχήμα 3.4 παρουσιάζει ένα τυπικό φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  στα 500 MHz του γαλακτικού λίπους αγελάδας, ενώ τα φάσματα των Σχημάτων 3.4 και 3.5 παρουσιάζουν επιλεγμένες περιοχές του φάσματος. Η ανάθεση των κορυφών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.7.

**Πίνακας 3-8 Κυριότερα λιπαρά οξέα του λίπους του γάλακτος αγελάδας.**

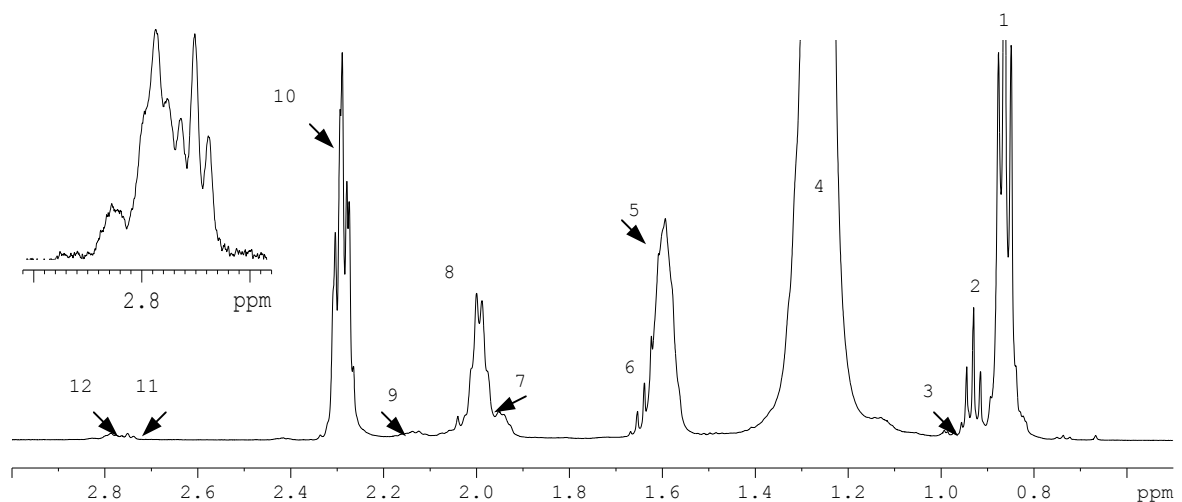
<b>Κορεσμένα λιπαρά οξέα</b>	<b>Άνθρακες</b>	<b>% mol<sup>14</sup></b>	<b>% w/w</b>
Βουτυρικό	C(4:0)	11.8, 8.6	3.78
Καπροϊκό	C(6:0)	4.6, 3.6	2.38
Καπρυλικό	C(8:0)	1.9, 1.8	1.39
Καπρικό	C(10:0)	3.7, 3.3	3.46
Λαυρικό	C(12:0)	3.9, 3.7	4.63
Μυριστικό	C(14:0)	11.2, 11.1	12.85
Πενταδεκανοϊκό	C(15:0)	0.79	1.10
Παλμιτικό	C(16:0)	23.9, 28.9	43.74
Επταδεκανοϊκό	C(17:0)	2.1, 1.2	0.70
Στεατικό	C(18:0)	7.0, 8.8	11.28
<b>Ακόρεστα λιπαρά οξέα</b>			
Παλμιτοελαϊκό οξύ	C(14:1)	1.0	1.62
Μυριστελαϊκό οξύ	C(16:1)	2.6, 1.3	2.56
Ελαϊκό	C(18:1)	24.0, 18.1	11.3
Λινελαϊκό	C(18:2)	2.5, 1.3	1.52
Λινολενικό	C(18:3)	0,38	1.3

**Πίνακας 3-9 Χημική μετατόπιση και ανάθεση των κυρίων κορυφών του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR γαλακτικού λίπους.**

Κορυφή	$\delta$ (ppm)	Πρωτόνιο	Λιπαρά οξέα
1	0.86	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Όλα τα οξέα εκτός από το βουτυρικό και το λινολενικό
2	0.93	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Βουτυρικό οξύ
3	0.97	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Λινολενικό οξύ
4	1.27	$(\text{C}_{\text{int}}\text{H}_2)_n$	Όλα τα οξέα εκτός από το βουτυρικό
5	1.61	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$	Όλα τα οξέα εκτός από το βουτυρικό
6	1.63	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$	Βουτυρικό οξύ
7	1.95	$\text{CH}=\text{CHC}_{17}\text{H}_2\text{CH}_3$	Λινολενικό οξύ
8	1.98	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	Όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με <i>cis</i> δ.δ
9	2.15	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$	Όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με <i>trans</i> δ.δ
10	2.29	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$	Όλα τα οξέα
11	2.75	$-\text{CH}=\text{CHC}_{11}\text{H}_2\text{CH}=\text{CH}-$	Λινολενικό, Λινελαϊκό οξύ
12	2.79	$-\text{CH}=\text{CHC}_{14}\text{H}_2\text{CH}=\text{CH}-$	Λινολενικό οξύ
13-15	ABX φάσμα	$-\text{CH}_2-\text{OCOR}$   $-\text{CH}-\text{OCOR}$	Γλυκερόλη
16	5.32	$-\text{CH}=\text{CH}-$	Όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με <i>cis</i> δ.δ
17	5.35	$-\text{CH}=\text{CH}-$	Όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα με <i>trans</i> δ.δ



**Σχήμα 3.3** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  γαλακτικού λίπους αγελάδας.



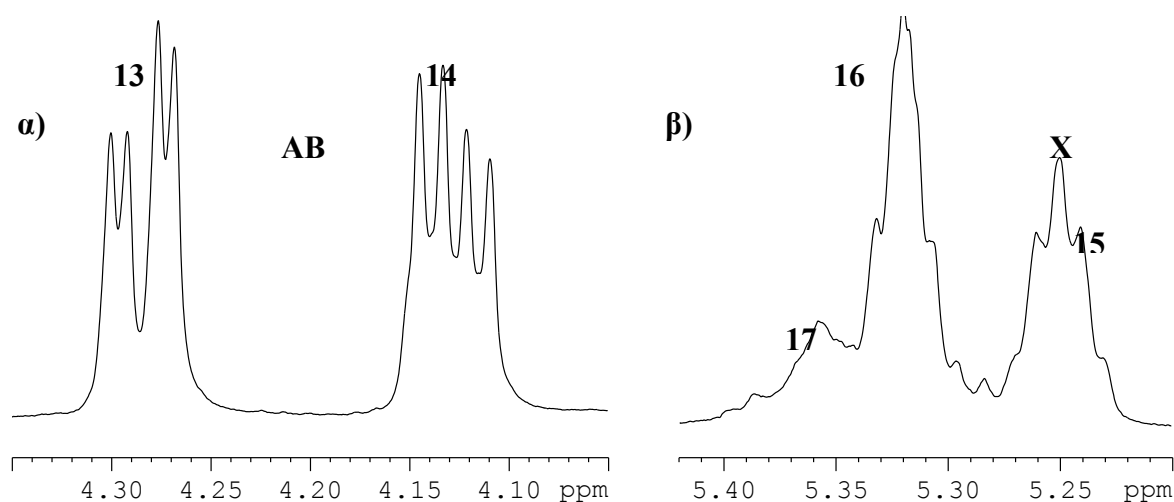
**Σχήμα 3.4** Περιοχή φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  (0-3 ppm) στα 500MHz, δείγματος γαλακτικού λίπους.

Τα διαλλυλικά πρωτόνια των ακόρεστων λιπαρών οξέων –λινελαϊκό, λινολενικό- και αλλυλικών πρωτονίων των πολυακόρεστων και ακόρεστων ακυλο-αλυσίδων εμφανίζονται σε  $\delta$  2.79 και 2.05, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια των C-2 και C-3 των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων εμφανίζονται σε  $\delta$  2.29 και 1.61, αντίστοιχα. Η κορυφή για το πρωτόνιο του C-2 του βουτυρικού ξεχωρίζει και εμφανίζεται σε  $\delta$  1,63. Τα μεθυλικά

πρωτόνια των πολυακόρεστων οξέων εμφανίζονται σε υψηλότερες συχνότητες  $-\delta$  0.97 για το λινολενικό (C18:3)- σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μεθυλικά πρωτόνια των ακόρεστων και κορεσμένων οξέων που εμφανίζονται συνολικά σε  $\delta$  0.86. Παρατηρούμε και πάλι ότι η κορυφή του μεθυλικού πρωτονίου του βουτυρικού οξέως διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες και εμφανίζεται σε  $\delta$  0.93. Οι απορροφήσεις των πρωτονίων εξηγούνται από τα μακράς εμβέλειας φαινόμενα προστασίας και αποπροστασίας που δημιουργούνται από τις χαρακτηριστικές ομάδες των *cis*-ακόρεστων λιπαρών οξέων και εστέρων. Για παράδειγμα ο διπλός δεσμός και οι καρβοξυλικές ομάδες που βρίσκονται μέχρι και 5 άνθρακες μακριά από τα μεθυλενικά πρωτόνια προάγουν τέτοιου είδους φαινόμενα.

Η διαμόρφωση στο χώρο των πρωτονίων του διπλού δεσμού θεωρητικά μπορεί να προσδιοριστεί από τη σταθερά σύζευξης των μεθυλενικών πρωτονίων που είναι πάντα μεγαλύτερη για τους *trans* δεσμούς από ότι για τους *cis*. Στην πράξη αυτό είναι σχετικά δύσκολο γιατί η διαφορά στη χημική μετατόπιση των μεθυλενικών πρωτονίων των απομονωμένων διπλών δεσμών είναι μικρή και παράγεται έτσι ένα πολλαπλό σήμα με πολλές επικαλύψεις, το οποίο είναι πολύ δύσκολο να αναλυθεί. Η διαμόρφωση του διπλού δεσμού επηρεάζει επίσης τις χημικές μετατοπίσεις των αλληλικών μεθυλενικών πρωτονίων. Συγκεκριμένα, τα μεθυλενικά πρωτόνια που γειτονεύουν με ένα *cis* διπλό δεσμό δίνουν ένα οξύτερο σήμα σε  $\delta$  1.98 από αυτό που δίνουν τα πρωτόνια που γειτονεύουν με ένα *trans* διπλό δεσμό, σε  $\delta$  2.15.

Τα ολεφινικά πρωτόνια  $-\text{CH}=\text{CH}-$  των ακόρεστων λιπαρών οξέων συντονίζονται σε  $\delta$  5.32 και 5.35 ppm. Τα μεθυλενικά και μεθινικά πρωτόνια της γλυκερόλης είναι διατερεοτοπικά και μαζί με το μεθινικό πρωτόνιο αυτής παρουσιάζουν φάσμα δεύτερης τάξης του τύπου ABX (Σχήμα 3.6 και Πίνακας 3.6).



**Σχήμα 3.5** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  στα 500 MHz δείγματος γαλακτικού λίπους. (α) Περιοχή απορρόφησης πρωτονίων της γλυκερόλης των τριγλυκεριδίων (φάσμα ABX). (β) Περιοχή απορρόφησης ακόρεστων πρωτονίων των λιπαρών οξέων.

Η ανάθεση των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  η οποία συγκεντρώνεται στον πίνακα 3.5, έγινε με τη βοήθεια πρότυπων ουσιών και συμφωνούν με σχετικές πληροφορίες από τη βιβλιογραφία<sup>38,39,40</sup>.

### 3.7.6 Φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ του γαλακτικού λίπους.

Περισσότερες ίσως πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του γαλακτικού λίπους σε λιπαρά οξέα μπορούν να εξαχθούν από τα φάσματα  $^{13}\text{C-NMR}$ . Την τελευταία δεκαετία η χρήση του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στη χημεία τροφίμων αυξάνει συνεχώς. Σε αυτή την εργασία εξετάζουμε τα 15 πιο διαδεδομένα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα τριγλυκερίδια του αγελαδινού γάλακτος με τη φασματοσκοπία  $^{13}\text{C-NMR}$ . Τα σήματα<sup>32</sup> των λιπαρών οξέων στα φάσματα  $^{13}\text{C-NMR}$  μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δέκα φασματικές περιοχές:

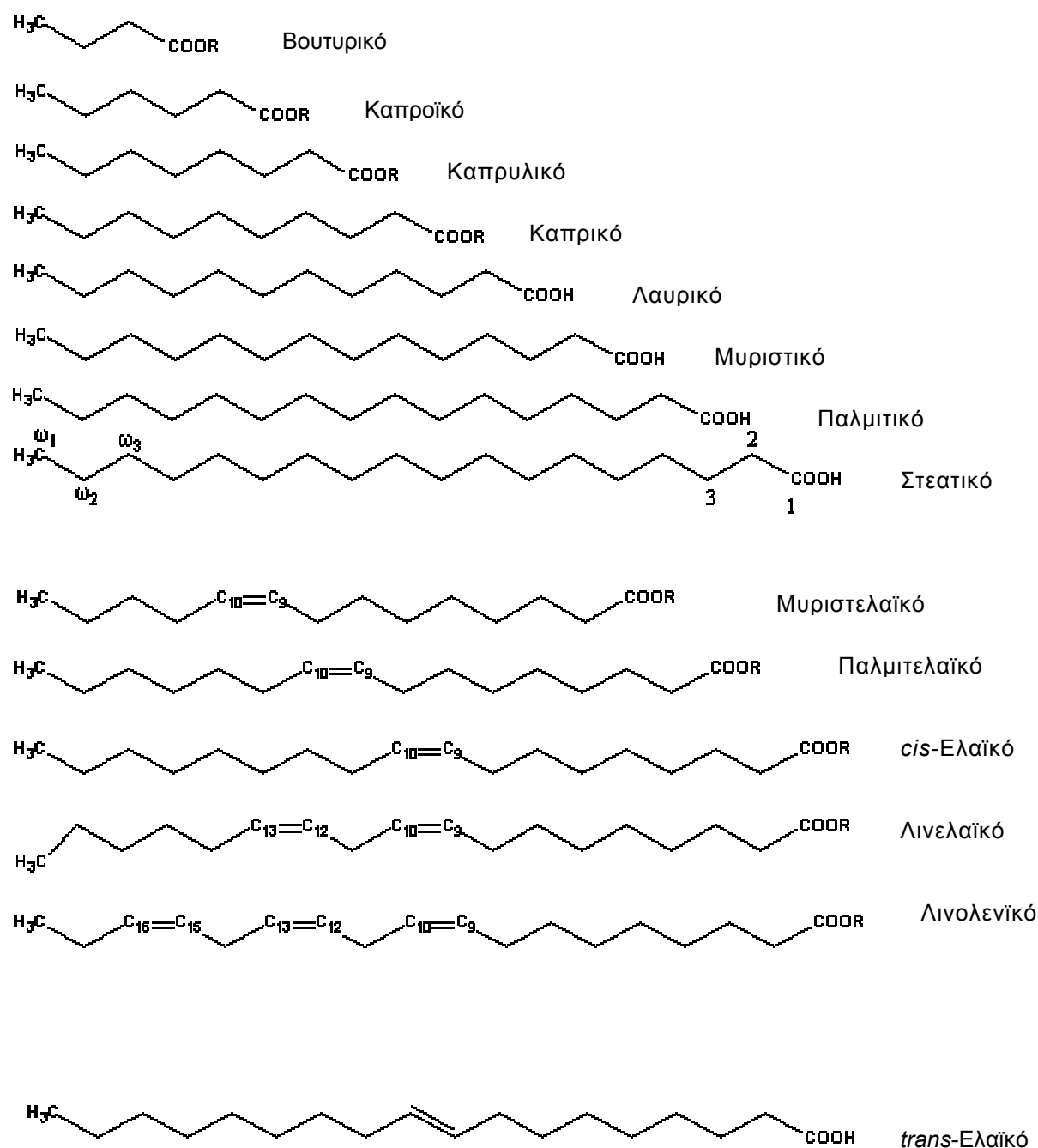
(α) την περιοχή που συντονίζονται οι καρβοξυλικοί άνθρακες C-1,  $\delta$  172-174,

- (β) την περιοχή που συντονίζονται οι ακόρεστοι ολεφινικοί άνθρακες , δ 129-131,
- (γ) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες της γλυκερόλης, δ 60-70,
- (δ) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες C-2, δ 33-36,
- (ε) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες ω-3, δ 30.5-32.5,
- (στ) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες στο εσωτερικό της αλειφατικής αλυσίδας των οξέων, δ 28.5-30.0,
- (ζ) την περιοχή που συντονίζονται οι αλλυλικοί άνθρακες, δ 25-27.5,
- (η) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες C-3, δ 24-26,
- (θ) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες ω<sub>2</sub>, δ 22-23,
- (ι) την περιοχή που συντονίζονται οι άνθρακες ω<sub>1</sub>, δ 13-14.5.

Το Σχήμα 3.6 παρουσιάζει τον σκελετό και την ονοματολογία των ατόμων άνθρακα των αλειφατικών αλυσίδων των κυριότερων λιπαρών οξέων που παρέχονται υπό τη μορφή τρι- και διγλυκεριδίων στο λίπος του γάλακτος.

Η ανάθεση των κορυφών στα φάσματα <sup>13</sup>C-NMR των λιπαρών οξέων έγινε με τη βοήθεια πρότυπων ουσιών και συμφωνούν με σχετικές πληροφορίες από τη βιβλιογραφία<sup>41,37</sup>. Η ονοματολογία και αρίθμηση των ατόμων άνθρακα των οξέων απεικονίζεται στο Σχήμα 3.6.

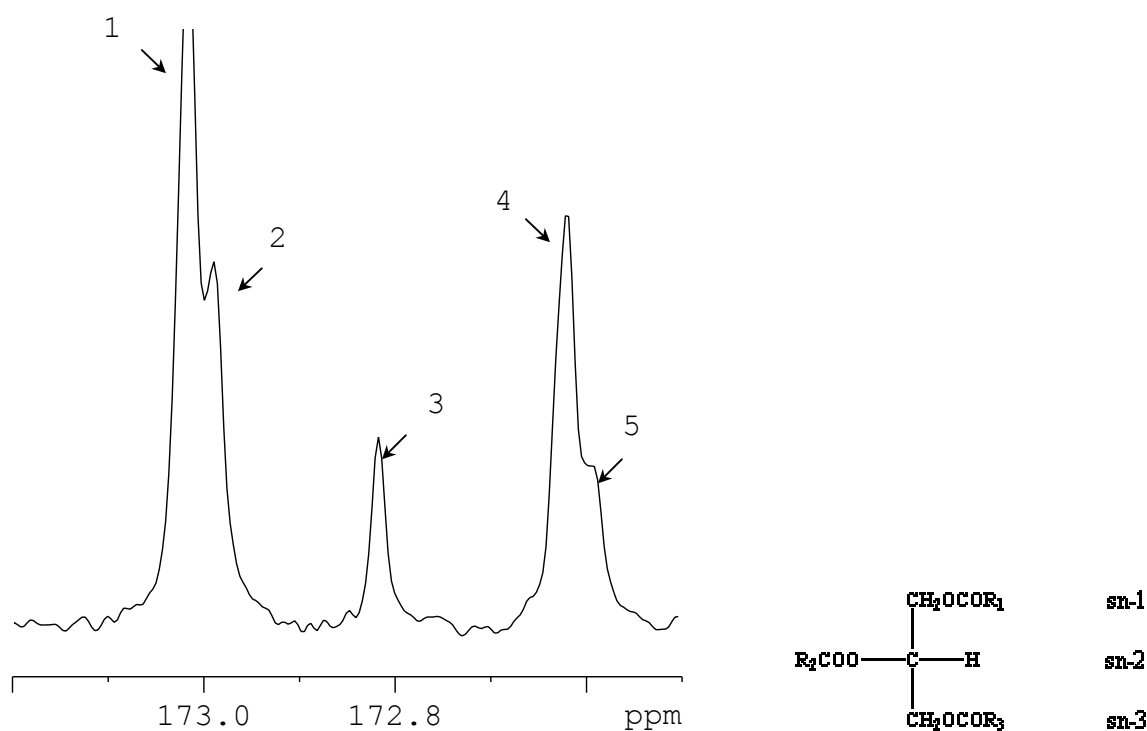




Σχήμα 3.6 Συντακτικά ισομερή των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λίπος του γάλακτος.

**(α) Περιογή γημικών μετατοπίσεων 172-174 ppm.**

Στην περιοχή αυτή (Σχήμα 3.7) συντονίζονται οι καρβοξυλικοί άνθρακες των εστεροποιημένων καρβοξυλικών οξέων. Η ανάθεση των κορυφών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.8.



**Σχήμα 3.7** Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C-NMR}$  που συντονίζονται οι καρβοξυλικοί άνθρακες.

Από το Σχήμα 3.7 διαπιστώνουμε ότι οι καρβονυλικοί άνθρακες όλων των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων εκτός του βουτυρικού, εμφανίζουν ένα ζεύγος κορυφών. Η κορυφή σε υψηλές συχνότητες αντιστοιχεί στα λιπαρά οξέα που έχουν εστεροποιηθεί στις θέσεις sn-1,3, ενώ η κορυφή σε χαμηλότερες συχνότητες αντιστοιχεί στα λιπαρά οξέα που έχουν εστεροποιηθεί στη θέση sn-2 της γλυκερόλης. Αυτή η διαφορά στις συχνότητες απορρόφησης παρατηρείται ανεξάρτητα από τη φύση της αλυσίδας των λιπαρών οξέων. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι ο άνθρακας της καρβονυλομάδας  $\text{C}=\text{O}$  στη θέση sn-2 δέχεται την *γ-gauche* στερεοχημική αλληλεπίδραση τόσο από την καρβονυλομάδα στη θέση sn-1 όσο και από την καρβονυλομάδα στη θέση sn-3. Αντίθετα οι καρβονυλομάδες που βρίσκονται στις θέσεις sn-1 και sn-3 δέχονται την *γ-gauche* στερεοχημική αλληλεπίδραση μόνο από την καρβονυλομάδα στη θέση sn-2. Έτσι, δημιουργείται μια μεγαλύτερη αύξηση του ηλεκτρονιακού νέφους γύρω από τον άνθρακα στη θέση sn-2 σε σχέση με τη θέση sn-1,3 με

αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται οι χημικές μετατοπίσεις των καρβοξυλικών ομάδων (C=O) στις θέσεις sn-2 και sn-1,3.

**Πίνακας 3-10** Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του  $^{13}\text{C-NMR}$  του σχήματος στην περιοχή δ 172-174.

Κορυφή	$\Delta$ (ppm)	Καρβονυλικός άνθρακας	Λιπαρά οξέα
1	173.04	C-1, sn-1,3 <sup>a</sup> (S)	Όλων των οξέων
2	173.01	C-1, sn-1,3 (U)	Όλων των οξέων
3	172.84	C-1, sn-1,3	Βουτυρικό οξύ
4	172.64	C-1, sn-2 <sup>b</sup> (S) <sup>c</sup>	Όλων των οξέων
5	172.62	C-1, sn-2 (U) <sup>d</sup>	Όλων των οξέων

<sup>a</sup> sn-1,3= εστεροποίηση της γλυκερόλης στις θέσεις 1 και 3 με το αντίστοιχο οξύ

<sup>b</sup> sn-2= εστεροποίηση της γλυκερόλης στη θέση 2 με το αντίστοιχο οξύ

<sup>c</sup>S= saturated (κορεσμένα λιπαρά οξέα)

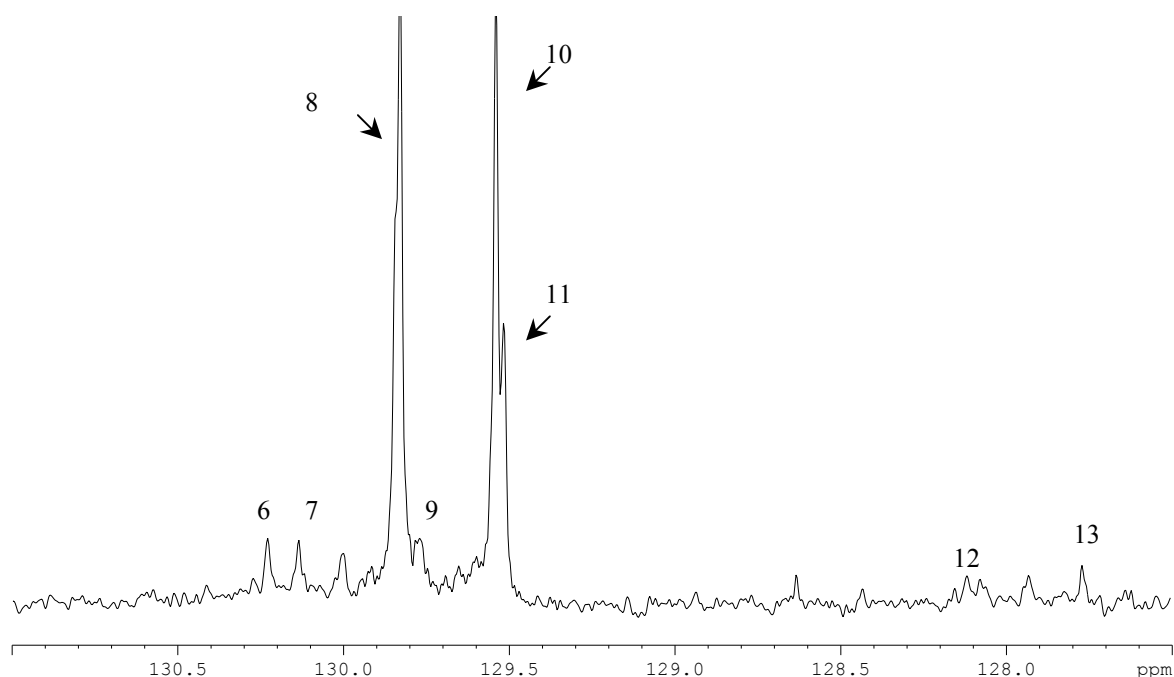
<sup>d</sup>U= unsaturated (ακόρεστα λιπαρά οξέα)

Στο ίδιο φάσμα παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζεται κορυφή στα 173,46 ppm, η οποία αναμένεται να αντιστοιχεί στον καρβοξυλικό άνθρακα του εστεροποιημένου βουτυρικού οξέως στη θέση sn-2 της γλυκερόλης. Το βουτυρικό οξύ, δηλαδή, προτιμάει να εστεροποιείται στις θέσεις sn-1,3 της γλυκερόλης. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με την αποακυλιωτική δράση της παγκρεατικής λιπάσης, η οποία έχει μελετηθεί με τη χρήση NMR<sup>42</sup> καθώς και χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.<sup>43</sup> Παρατηρείται επίσης μία διαφοροποίηση στο συντονισμό των ανθράκων των καρβοξυλικών ομάδων μεταξύ κορεσμένων και ακόρεστων αλυσίδων. Οι καρβονυλικοί άνθρακες των κορεσμένων οξέων συντονίζονται σε μεγαλύτερες χημικές μετατοπίσεις από τους αντίστοιχους άνθρακες των ακόρεστων οξέων. Η προστασία των καρβοξυλομάδων στα ακόρεστα οξέα φαίνεται ότι οφείλεται στην πόλωση (παραμόρφωση ηλεκτρονιακού νέφους) στην ομάδα C=O από το επαγωγικό φαινόμενο των πολλαπλών δεσμών στην ακόρεστη αλυσίδα. Παρ' όλα αυτά η παρουσία πολλών διαφορετικών ακυλομάδων καθιστά αδύνατη την

ύπαρξη ξεχωριστών σημάτων για καθένα από τα λιπαρά οξέα λόγω αλληλοεπικάλυψης των κορυφών τους, με εξαίρεση το βουτυρικό οξύ.

**(β) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 129-131 ppm.**

Στην ολεφινική περιοχή (Σχήμα 3.8) ταυτοποιούνται τα πιο διαδεδομένα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα-ελαϊκό, παλμιτελαϊκό και μυριστελαϊκό-καθώς και τα πιο διαδεδομένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, το λινελαϊκό και το λινολενικό. Η ανάθεση των κορυφών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.9.



**Σχήμα 3.8 Περιοχή του φάσματος <sup>13</sup>C-NMR που συντονίζονται οι ολεφινικοί άνθρακες.**

Οι ακόρεστοι άνθρακες (C9-C10 για τα μονοακόρεστα, C9-C10 και C12-C13 για τα διακόρεστα λιπαρά οξέα) εμφανίζουν δύο χαρακτηριστικά ζεύγη σημάτων ανάλογα με τη θέση εστεροποίησης τους με τη γλυκερόλη, (sn-1,3 και sn-2). Η διαφορά στη χημική μετατόπιση μεταξύ των κορυφών σε ένα τέτοιο ζεύγος, γίνεται μικρότερη όταν ο ολεφινικός άνθρακας βρίσκεται πιο κοντά στο μεθυλικό άκρο της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέως. Το γεγονός αυτό δυσκολεύει τη σαφή διάκριση των δύο κορυφών στα  $\delta$  129.85.

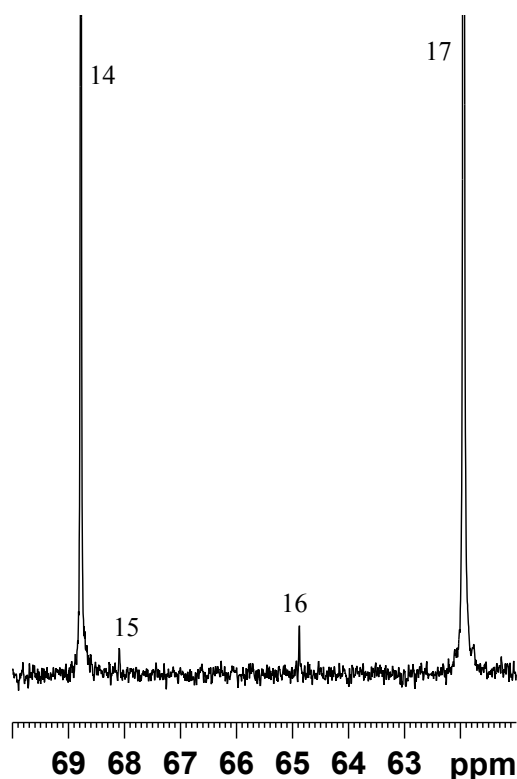
Για τους ίδιους λόγους που περιγράψαμε σε προηγούμενη παράγραφο ο άνθρακας ενός διπλού δεσμού που βρίσκεται πιο κοντά στην καρβονυλομάδα C=O, μετατοπίζεται σε χαμηλότερες συχνότητες αν το λιπαρό οξύ είναι εστεροποιημένο στη θέση sn-2 (129.52 ppm) από ότι εάν είναι εστεροποιημένο στις θέσεις sn-1,3 (129.54 ppm).

**Πίνακας 3-11 Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του  $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή 129-131 ppm.**

Κορυφή	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρά οξέα
6	130.25	C-9	Λινολενικό οξύ
7	130.15	C-13	Λινελαϊκό οξύ
8	129.85	C-10, sn-2	Παλμιτελαϊκό οξύ, Ελαϊκό οξύ
		C-10, sn-1,3	Παλμιτελαϊκό οξύ, Ελαϊκό οξύ
9	129.80	C-9	Λινελαϊκό οξύ
		C-10	Μυριστολεϊκό οξύ
10	129.54	C-9 sn-1,3	Ελαϊκό, Παλμιτελαϊκό, Μυριστολεϊκό οξύ
11	129.52	C-9 sn-2	Παλμιτελαϊκό, Ελαϊκό οξύ
12	128.20	C-10	Λινελαϊκό οξύ
13	127.79	C-12	Λινολενικό οξύ

**(γ) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 60-70 ppm.**

Οι άνθρακες της γλυκερόλης εμφανίζονται στην περιοχή 60-70 ppm (Σχήμα 3.9). Η ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων βασίζεται στην υπόθεση ότι η μαγνητική ή μη μαγνητική ισοδυναμία, των ενώσεων αυτών, καθορίζει τον αριθμό των σημάτων που θα δώσουν καθώς και την σχετική μεταξύ τους ένταση. Η ανάθεση των κορυφών που αντιστοιχούν στους άνθρακες της γλυκερόλης παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.10. Στο συγκεκριμένο πείραμα, γίνεται εμφανής η μεγάλη διαφορά μεταξύ των εντάσεων των κορυφών που αποδίδονται στα διγλυκερίδια και στα τριγλυκερίδια εξαιτίας της πολύ μικρής περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων. Παρ' όλα αυτά οι συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος περιλαμβάνουν μικρούς χρόνους αναμονής (2s) και δεν ευνοούν ώστε να γίνει εμφανής και η αναλογία των εντάσεων μεταξύ των κορυφών που αποδίδονται στις θέσεις sn-2 και sn-1,3.



**Σχήμα 3.9** Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C-NMR}$  που συντονίζονται οι άνθρακες της γλυκερόλης.

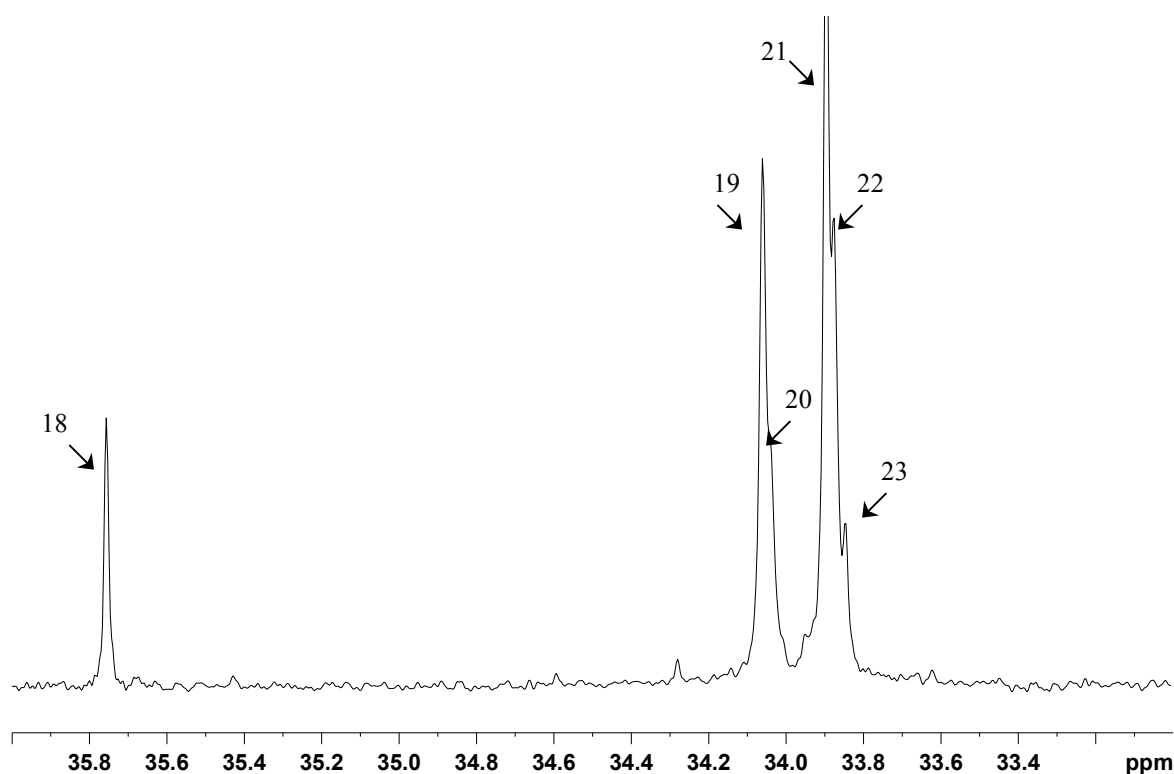
Ο άνθρακας sn-2 της γλυκερόλης είναι μετατοπισμένος σε όλα τα γλυκερίδια σε υψηλότερες συχνότητες από αυτές των ανθράκων sn-1,3. Από τα φάσματα διαπιστώνεται ότι οι χημικές μετατοπίσεις των ατόμων άνθρακα της γλυκερόλης στα τριγλυκερίδια δεν επηρεάζονται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας καθώς και από το βαθμό ακορεστότητας του λιπαρού οξέως που έχει εστεροποιηθεί με τη γλυκερόλη.

**Πίνακας 3-12** Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του  $^{13}\text{C-NMR}$  του στην περιοχή  $\delta$  60-70.

Κορυφή	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρά οξέα
14	68.80	CH, sn-2	Τριγλυκερίδια
15	68.18	CH, sn-2	sn-1,3-διγλυκερίδια
16	64.90	CH <sub>2</sub> sn-1,3	sn-1,3-διγλυκερίδια
17	61.96	CH <sub>2</sub> sn-1,3	Τριγλυκερίδια

**(δ) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 33-36 ppm.**

Στο Σχήμα 3.10 φαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στους άνθρακες C-2 των λιπαρών οξέων, ενώ η απόδοση τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.11. Παρατηρούνται δύο ζεύγη κορυφών που αντιστοιχούν στις θέσεις sn-1,3 και sn-2 ανάλογα σε ποια θέση εστεροποιείται η γλυκερόλη με το λιπαρό οξύ και από το εάν το οξύ αυτό είναι κορεσμένο ή ακόρεστο. Παρατηρούμε επίσης ότι το καπροϊκό και το παλμιτελαϊκό δείχνουν μια ιδιαίτερη προτίμηση για τις θέσεις sn-1,3, δίνοντας μια κοινή κορυφή σε  $\delta$  33,87. Στο αγελαδινό γάλα το καπροϊκό οξύ έχει βρεθεί<sup>37</sup> κυρίως στη θέση sn-1,3 ενώ το παλμιτολεϊκό φαίνεται να επικρατεί στη θέση sn-2 στα μικρού μεγέθους τριγλυκερίδια και στη θέση sn-1,3 στα τριγλυκερίδια με μακρύτερες ανθρακικές αλυσίδες.



**Σχήμα 3.10** Περιοχή του φάσματος <sup>13</sup>C-NMR που συντονίζονται οι άνθρακες C-2 των λιπαρών οξέων.

Η παρουσία έντονης αλληλοεπικάλυψης των σημάτων στην περιοχή που απορροφούν οι άνθρακες C-2 των λιπαρών οξέων την καθιστά μη χρηστική για την ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων με βάση αυτά τα σήματα.

Στην περιοχή όπου συντονίζεται C-2 των λιπαρών οξέων, παρατηρούμε εμφανή διαχωρισμό της κορυφής του βουτυρικού οξέως σε σχέση με τα υπόλοιπα. Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί όπως προαναφέραμε στη θέση sn-1,3 και εμφανίζεται σε δ 35,77 ενώ αν υπήρχε βουτυρικό οξύ στη θέση sn-2 θα παρατηρούσαμε κορυφή σε χαμηλότερες συχνότητες.

**Πίνακας 3-13** Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του <sup>13</sup>C-NMR στην περιοχή δ 33–36.

Κορυφή	δ (ppm)	Άνθρακας	Συστατικό
--------	---------	----------	-----------



18	35.77	C-2, sn-1,3	Βουτυρικό οξύ
19	34.09	C-2, sn-2	Όλων των κορεσμένων οξέων
20	34.08	C-2, sn-2	Όλων των ακόρεστων οξέων
21	33.90	C-2, sn-1.3	Όλων των ακόρεστων οξέων
22	33.88	C-2, sn-1.3	Όλων των κορεσμένων οξέων
23	33.87	C-2, sn-1.3	Καπροϊκό, Παλμιτελαϊκό οξύ

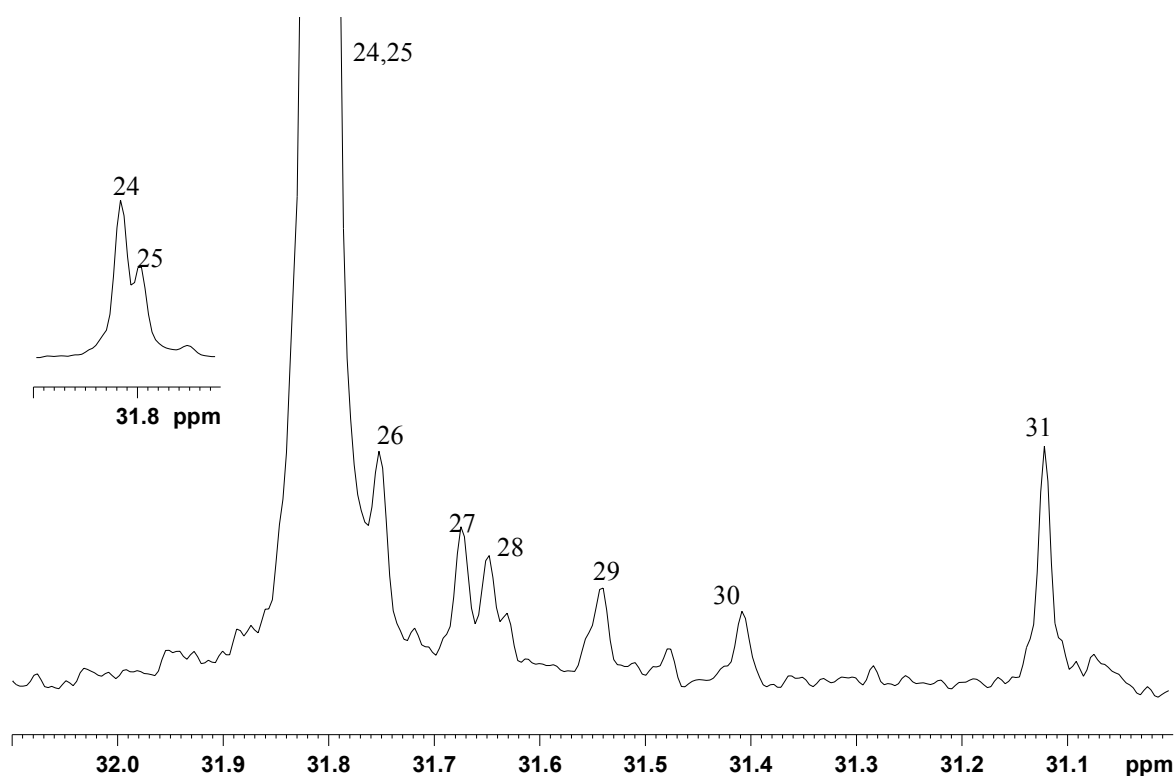
**(ε) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 30.5-32.5 ppm.**

Στην περιοχή αυτή συντονίζονται οι άνθρακες  $\omega_3$  (Σχήμα 3.11) των οποίων η ανάθεση των κορυφών τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.12.

Στο φάσμα του Σχήματος 3.11 διακρίνονται εύκολα οκτώ κορυφές που αποδίδονται στο καπρικό, καπριλικό, καπροϊκό, λινελαϊκό, πενταδεκανοϊκό και παλμιτοελαϊκό (Πίνακας 3.12). Η κορυφή σε  $\delta$  31,84 οφείλεται στα στεατικό, παλμιτικό, μυριστικό, λαυρικό ενώ η κορυφή στα  $\delta$  31.82 στα οξέα μυριστελαϊκό και ελαϊκό.

Στα μικρής αλυσίδας εστεροποιημένα λιπαρά οξέα η ταυτόχρονη επίδραση μεθυλομάδας  $\text{CH}_3$  και της καρβοξυλομάδας  $\text{COOH}$ , γίνεται αισθητή σε όλο το μήκος της ανθρακικής τους αλυσίδας. Σαν αποτέλεσμα εμφανίζουν χημικές μετατοπίσεις ελαφρώς διαφοροποιημένες από αυτές που δίνουν τα αντίστοιχα άτομα άνθρακα στα μακράς αλυσίδας εστεροποιημένα οξέα, τα οποία δεν υφίστανται, ταυτόχρονη επίδραση της μεθυλομάδας  $\text{CH}_3$  και της καρβοξυλομάδας  $\text{COOH}$ . Κατά συνέπεια, οι τέσσερις άνθρακες του εστεροποιημένου βουτυρικού οξέως δίνουν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα οξέα ενώ οι κορυφές του διαφοροποιούνται ακόμη και από τη θέση εστεροποίησης του με την γλυκερόλη. Παρομοίως το καπροϊκό οξύ δίνει διαφοροποιημένα σήματα για

τους άνθρακες C-3 έως C-6 και το καπροϊκό για τον άνθρακα  $\omega_3$ (C-6), με τη διαφορά ότι δεν διαφοροποιούνται οι κορυφές των  $\omega_1$  και  $\omega_2$  ανθράκων τους σε σχέση με τη θέση εστεροποίησης (sn-2 ή sn-1,3).



**Σχήμα 3.11** Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται τα άτομα  $\omega_3$  των λιπαρών οξέων.

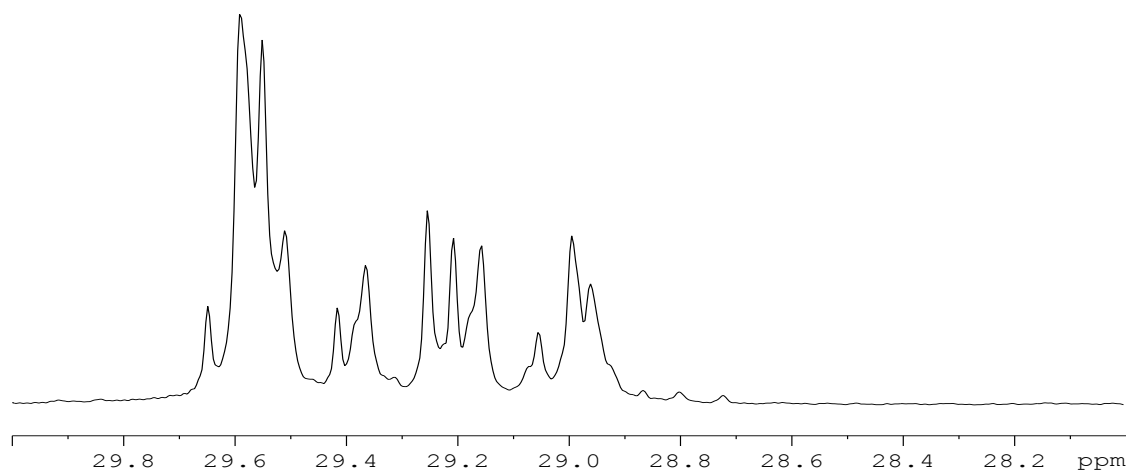
Έτσι, κορυφή του άνθρακα  $\omega_3$  για το βουτυρικό, που είναι ουσιαστικά ο άνθρακας C-2 στη θέση sn-1,3, εμφανίζεται σε  $\delta$  35.77 και η αντίστοιχη κορυφή του καπροϊκού στην ίδια θέση σε  $\delta$  31.12. Στο αγελαδινό γάλα το καπροϊκό έχει παρατηρηθεί ότι εστεροποιείται κυρίως στη θέση sn-1,3.<sup>37</sup>

**Πίνακας 3-14** Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του  $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή  $\delta$  30.5-32.5.

Κορυφή	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρά οξέα
24	31.84	$\omega_3$	Στεατικό, Παλμιτικό, Μυριστικό, Λαυρικό οξύ
25	31.82	$\omega_3$	Μυριστελαϊκό, Ελαϊκό οξύ
26	31.77	$\omega_3$	Καπρικό οξύ
27	31.69	$\omega_3$	Παλμιτελαϊκό οξύ
28	31.67	$\omega_3$	Πενταδεκανοϊκό οξύ
29	31.56	$\omega_3$	Καπρυλικό οξύ
30	31.43	$\omega_3$	Λινελαϊκό οξύ
31	31.12	$\omega_3$ , sn-1,3	Καπροϊκό οξύ

**(στ) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 28,5-30 ppm.**

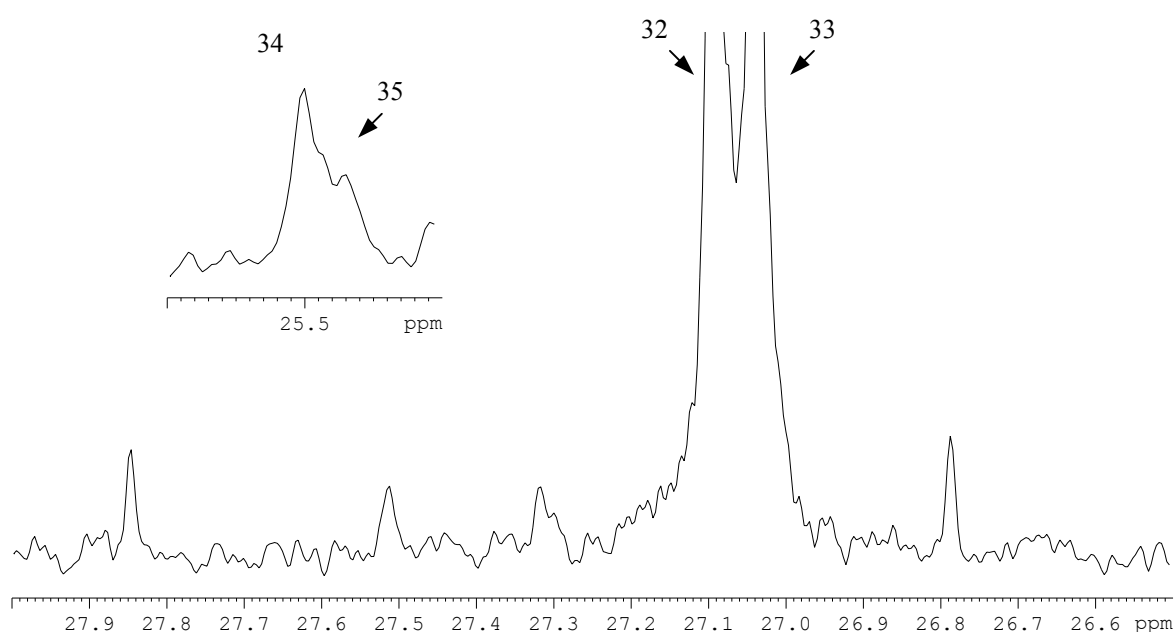
Στην περιοχή αυτή συντονίζονται οι πυρήνες  $^{13}\text{C}$  των εσωτερικών ατόμων άνθρακα των αλειφατικών αλυσίδων και παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12. Οι κορυφές αντιστοιχούν συνήθως σε πολλά άτομα άνθρακα των λιπαρών οξέων (μεθυλενικός φάκελος) και είναι από δύσκολο έως αδύνατο να προσδιοριστούν.



**Σχήμα 3.12** Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι εσωτερικοί άνθρακες των αλειφατικών αλυσίδων.

**(ζ) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 26,5-28,0 ppm.**

Οι αλλυλικοί μεθυλενικοί άνθρακες  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$  των φυσικών ακόρεστων λιπαρών οξέων συντονίζονται στην περιοχή του φάσματος που εμφανίζεται στο Σχήμα 3.13 και η ανάθεση των κορυφών τους παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.13. Οι άνθρακες αυτοί, απορροφούν σε χαμηλότερες συχνότητες κατά 2.5 ppm περίπου, σε σχέση με τους εσωτερικούς μεθυλενικούς άνθρακες ως αποτέλεσμα της ύπαρξης  $\gamma$ -*gauche* αλληλεπίδρασης. Όπως αναφέραμε προηγουμένως, αυτή η στερική αλληλεπίδραση μετατοπίζει το συντονισμό σε υψηλότερα πεδία (μικρότερες χημικές μετατοπίσεις). Στην περιοχή αυτή συντονίζονται οι άνθρακες C-8 των οξέων παλμιτελαϊκό, μυριστελαϊκό, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό. Επίσης, οι άνθρακες C-11 του ελαϊκού οξέως και C-14 του λινολενικού οξέως, συντονίζονται στην ίδια περιοχή, αλλά σε χαμηλότερα πεδία.



**Σχήμα 3.13 Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι αλλυλικοί άνθρακες.**

**Πίνακας 3-15** Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του  $^{13}\text{C-NMR}$  στην περιοχή  $\delta$  25-27.5

Κορυφή	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρό οξύ
32	27.11	C-11, C-14	Παλμιτοελαϊκό, Μυριστελαϊκό, Ελαϊκό οξύ
		C-8	Λινολενικό οξύ
33	27.06	C-8	Παλμιτοελαϊκό, Μυριστελαϊκό, Ελαϊκό οξύ
34	25.52	C-11	Λινελαϊκό, Λινολενικό οξύ
35	25.41	C-14	Λινολενικό οξύ

Στα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, τα ολεφινικά άτομα άνθρακα απομακρύνονται σταδιακά και φτάνουν μέχρι και 11 άτομα άνθρακα μακριά από την καρβοξυλική ομάδα. Ένα χαρακτηριστικό αυτών των ισομερών θέσης είναι ότι όσο απομακρύνεται ο διπλός δεσμός από την καρβοξυλική ομάδα οι χημικές μετατοπίσεις των αλληλικών ανθράκων στους εστέρες των λιπαρών οξέων μετατοπίζονται σε υψηλότερες συχνότητες. Προκειμένου να εκτιμηθεί η θέση των διπλών δεσμών σε μία τέτοια άκυλο αλυσίδα και να αποδοθούν οι αντίστοιχες κορυφές σε ένα φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  πρέπει να συνεκτιμηθεί η επίδραση που έχει, τόσο ένας διπλός δεσμός, όσο και η καρβοξυλομάδα στους γειτονικούς του άνθρακες.

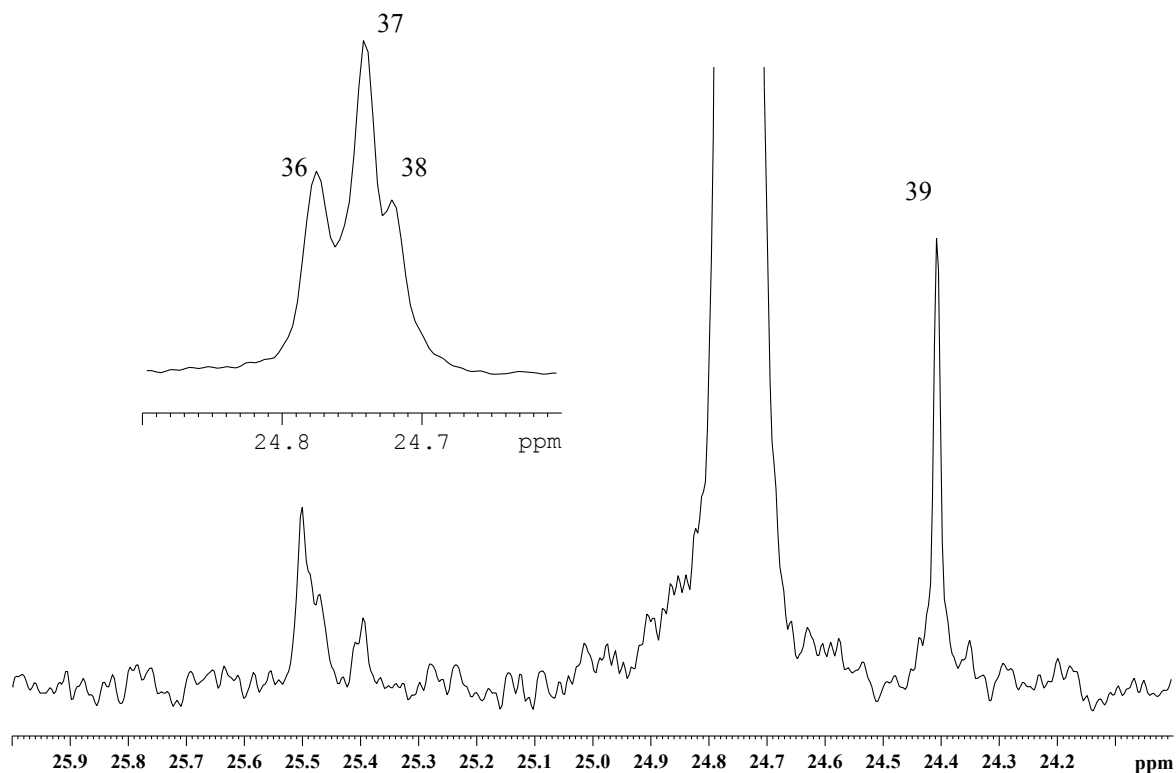
Οι διαλλυλικοί άνθρακες ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), C-11 και C-14 του λινολενικού οξέος και ο C-11 του λινελαϊκού οξέος συντονίζονται σε ακόμα χαμηλότερες συχνότητες (εσωτερικό φάσμα στο Σχήμα 3.13 επειδή δέχονται την επίδραση  $\gamma$ -*gauche* από δύο γειτονικές μεθυλενικές ομάδες. Στο λινολενικό, ο C-14 από τις ομάδες C-17 και C-11 και ο C-11 από τις ομάδες C-14 και C-8 (βλέπε Σχήμα 3.6).

**(η) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 24-26 ppm.**

Στο Σχήμα 3.14 παρουσιάζεται η περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται οι άνθρακες C-3 των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων. Η ανάθεση των κορυφών γίνεται στον Πίνακα 3.14.

**Πίνακας 3-16** Ανάθεση των χημικών μετατοπίσεων που εμφανίζονται στο φάσμα του  $^{13}\text{C}$ -NMR στην περιοχή δ 24-26.

Κορυφή	δ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρό οξύ
36	24.79	C-3	Λαυρικό, Στεατικό οξύ
37	24.74	C-3	Μυριστελαϊκό, Ελαϊκό, Λινελαϊκό, Λινολενικό οξύ
38	24.72	C-3	Καρυλικό, Καπρικό οξύ
39	24.43	C-3	Καπροϊκό οξύ



**Σχήμα 3.14** Περιοχή του φάσματος <sup>13</sup>C-NMR που συντονίζονται οι C-3 των λιπαρών οξέων

**(θ) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 22-23 ppm.**

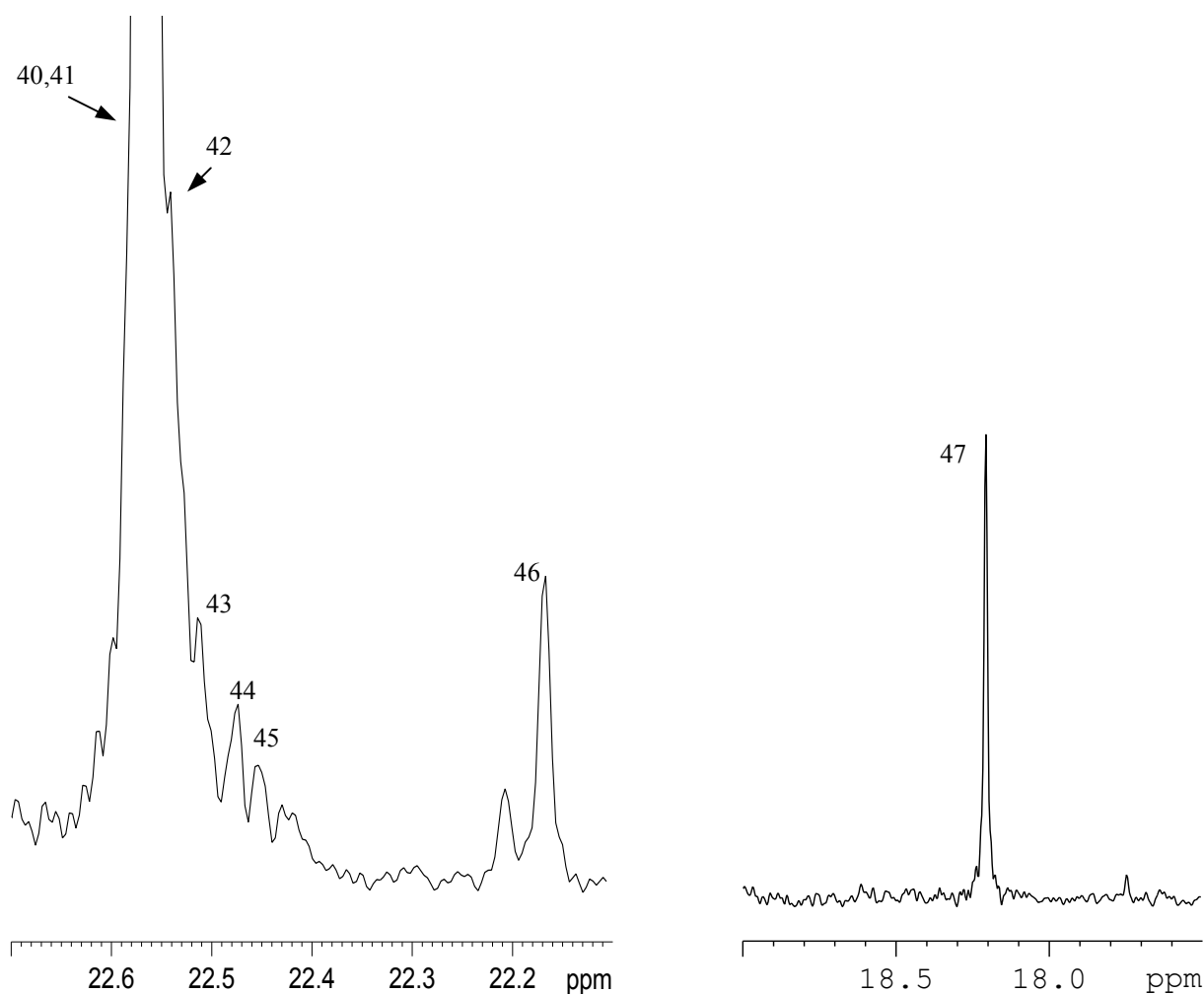
Στην περιοχή που απεικονίζεται στο Σχήμα 3.15 απορροφούν οι άνθρακες ω<sub>2</sub> των οξέων. Η ανάθεση των κορυφών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.15. Οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων ω<sub>2</sub> των λιπαρών οξέων εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας και από την απόσταση σε σχέση με διπλούς δεσμούς και καρβονυλικών ομάδων. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα με μακρά αλυσίδα παρουσιάζουν ένα φάκελο κορυφών, ενώ ξεχωριστές κορυφές παρουσιάζουν τα οξέα με βραχεία αλυσίδα. Η ανάλυση των κορυφών εμφανίζεται ήδη από το λαυρικό και καπρικό οξύ, με 12 και 10 άτομα άνθρακα, αντίστοιχα και συνεχίζεται με το καπρυλικό ( 8 άτομα άνθρακα), καπροϊκό (6 άτομα

άνθρακα) και βουτυρικό οξύ (4 άτομα άνθρακα). Ξεχωριστές κορυφές παρουσιάζουν και οι άνθρακες  $\omega_2$  των οξέων λινελαϊκό (2 διπλούς δεσμούς) και μυριστελαϊκό οξύ (1 διπλό δεσμό) αλλά με αλυσίδα μικρότερου μήκους. Τέλος, στο ελαϊκό και παλμιτελαϊκό οξύ οι άνθρακες  $\omega_2$  παρουσιάζουν την ίδια συχνότητα συντονισμού.

**Πίνακας 3-17 Χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  στην περιοχή  $\delta$  22-23.**

Κορυφή	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρά οξέα
40	22.58	$\omega_2$	Όλα τα υπόλοιπα οξέα
41	22.56	$\omega_2$	Ελαϊκό, Παλμιτελαϊκό οξύ
42	22.53	$\omega_2$	Λαυρικό οξύ
43	22.49	$\omega_2$	Καπρυλικό οξύ
44	22.46	$\omega_2$	Λινελαϊκό οξύ
45	22.23	$\omega_2$	Μυριστελαϊκό οξύ
46	22.19	$\omega_2$	Καπροϊκό οξύ
47	18.23	$\omega_2$ (C-3)	Βουτυρικό οξύ



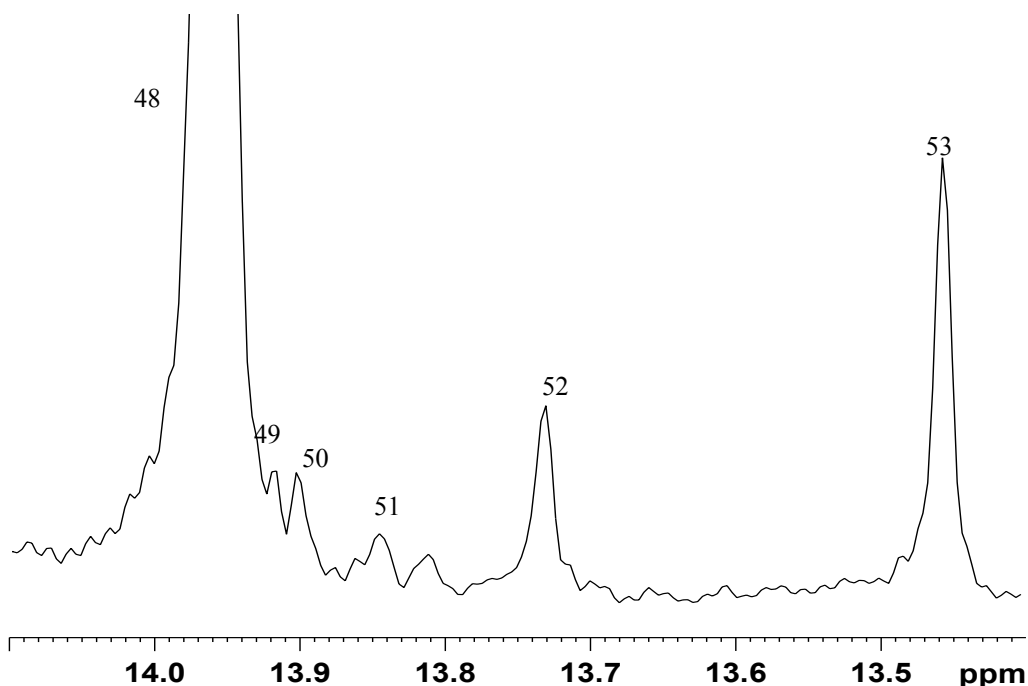


**Σχήμα 3.15** Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR που συντονίζονται τα άτομα άνθρακα  $\omega_2$  των λιπαρών οξέων.

**(i) Περιοχή χημικών μετατοπίσεων 13,0-14,5 ppm.**

Και εδώ, οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων  $\omega_3$  (μεθυλικοί άνθρακες) εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας και τη θέση των πολλαπλών δεσμών και των καρβοξυλομάδων. Έτσι, στο φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR του Σχήματος 3.16 αναλύονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στα μικρού μήκους κορεσμένα λιπαρά οξέα, βουτυρικό καπροϊκό και καπρυλικό οξύ, καθώς και για τα ακόρεστα μυριστελαϊκό και λινελαϊκό οξύ. Οι μεθυλικοί άνθρακες των υπολοίπων οξέων παρουσιάζουν την ίδια ή σχεδόν την ίδια χημική

μετατόπιση και εμφανίζονται υπό τη μορφή φακέλου κορυφών. Η ανάθεση των κορυφών παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.16.



Σχήμα 3.16 Περιοχή του φάσματος  $^{13}\text{C-NMR}$  που συντονίζονται τα άτομα άνθρακα  $\omega_1$  των λιπαρών οξέων.

Πίνακας 3-18 Χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  στην περιοχή 13-14.5 ppm.

	$\delta$ (ppm)	Άνθρακας	Λιπαρά οξέα
48	13.98	$\omega_1$	Όλα τα υπόλοιπα
49	13.92	$\omega_1$	Μυριστελαϊκό, Λινελαϊκό οξύ
50	13.91	$\omega_1$	Καπρυλικό οξύ
51	13.86	$\omega_1$	Μυριστικό οξύ
52	13.75	$\omega_1$	Καπροϊκό οξύ
53	13.47	$\omega_1$	Βουτυρικό οξύ

### 3.7.7 Συμπεράσματα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στο γαλακτικό λίπος.

Το γαλακτικό λίπος περιέχει ένα σημαντικό αριθμό λιπαρών οξέων μικρής ή μεγάλης περιεκτικότητας. Η ανάλυση του φάσματος  $^{13}\text{C}$ -NMR των λιπαρών οξέων, έδειξε ότι η διαφορά των χημικών μετατοπίσεων για αρκετά άτομα άνθρακα των ανθρακικών αλυσίδων είναι πολύ μικρή, ώστε να είναι πειραματικά αδύνατος ο διαχωρισμός τους. Παρ' όλα αυτά, οι περιοχές όπου εμφανίζονται οι κορυφές των ανθράκων  $\omega_1$ ,  $\omega_2$  και  $\omega_3$  παρουσιάζουν αρκετές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν σε μεμονωμένα λιπαρά οξέα και μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των οξέων με ολοκλήρωση. Στην περιοχή  $\omega_1$  ξεχωριστές κορυφές παρουσιάζουν τα οξέα, βουτυρικό, καπροϊκό, καπρυλικό, μυριστικό και λινελαϊκό (μυριστελαϊκό). Στην περιοχή  $\omega_2$  αναλύονται οι κορυφές για τα μεμονωμένα οξέα βουτυρικό, καπροϊκό, καπρυλικό, λαυρικό (καπρικό), μυριστελαϊκό, ελαϊκό (παλμιτελαϊκό) και λινελαϊκό, ενώ στην περιοχή  $\omega_3$  τα οξέα, καπροϊκό, καπρικό, καπρυλικό, λινελαϊκό, πενταδεκανοϊκό, παλμιτελαϊκό και ελαϊκό (μυριστελαϊκό). Έτσι, με την ολοκλήρωση των κορυφών σ' αυτές τις περιοχές και τους κατάλληλους υπολογισμούς μπορούμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά το σύνολο σχεδόν των κυριότερων λιπαρών οξέων του γαλακτικού λίπους (Πίνακας 3.6). Θα πρέπει να τονισθεί, ότι τα ποσοτικά πειράματα στη φασματοσκοπία  $^{13}\text{C}$ -NMR επηρεάζονται από το φαινόμενο NOE και τους χρόνους αποδιέγερσης σπιν-πλέγμα ( $T_1$ ) των ατόμων άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας. Συνεπώς, η κατάστρωση ενός ποσοτικού  $^{13}\text{C}$ -NMR πειράματος θα πρέπει να ακυρώσει το φαινόμενο NOE με την τεχνική της απορύθμισης της σύζευξης C-H (gated decoupling)<sup>44</sup> και τη χρήση μεγάλων χρόνων αναμονής ( $\geq 5 T_1$ ), ώστε να μπορούν να αποδιεγερθούν πλήρως οι πυρήνες  $^{13}\text{C}$  πριν την εφαρμογή νέου παλμού σε ένα πείραμα παλμικού NMR και να εξασφαλίζεται έτσι, η μέγιστη δυνατή ένταση των κορυφών.

### 3.8 Γενικά συμπεράσματα.

Στην εργασία αυτή παρουσιάστηκε μια νέα μέθοδος για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διγλυκεριδίων και των στερολών του γαλακτικού λίπους με τη χρήση της φασματοσκοπίας  $^{31}\text{P}$  NMR. Η μέθοδος συνίσταται στην φωσφυτιλίωση των υδροξυλικών ομάδων των διγλυκεριδίων και στερολών και την ανίχνευση των φωσφυτιλιωμένων παραγώγων στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR χρησιμοποιώντας ένα εσωτερικό πρότυπο για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Η ανάλυση των φασμάτων και οι ποσοτικοί υπολογισμοί έδωσαν νέα και χρήσιμα στοιχεία για τη συγκέντρωση των διγλυκεριδίων και στερολών σε σχέση με τον τύπο του γάλακτος και το είδος της επεξεργασίας που υφίσταται το προϊόν. Παρατηρήθηκε ότι οι υψηλές θερμοκρασίες δεν παρεμποδίζουν σημαντικά τη λιπολυτική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων στο λίπος, ενώ τα επίπεδα της χοληστερόλης παραμένουν σχεδόν σταθερά.

Η απομόνωση και ανάκτηση του γαλακτικού λίπους έγινε με την τροποποιημένη μέθοδο Blight & Dyer, όπως αυτή περιγράφεται στη βιβλιογραφία. Η χρήση της μεθόδου αυτής σε σχέση με την ευρέως χρησιμοποιούμενη στη βιομηχανία μέθοδο, Rose-Gottlieb, προτιμήθηκε για τη διευκόλυνση στην επεξεργασία των φασμάτων  $^{31}\text{P}$  NMR καθώς η πρώτη μέθοδος περιορίζει σημαντικά την ποσότητα της λακτόζης, η οποία παρουσιάζει ένα πλήθος κορυφών στο φάσμα.

Παράλληλα, λήφθηκαν φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  του γαλακτικού λίπους σε μια προσπάθεια ταυτοποίησης των κορυφών των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο γαλακτικό λίπος. Οι απορροφήσεις των πιο σημαντικών κορυφών προσδιορίστηκαν με τη χρήση πρότυπων ουσιών και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αυτά υπήρχαν. Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι πολλά ακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, έχουν ταυτοποιηθεί στο γάλα με τη βοήθεια της υγρής και της αέρια χρωματογραφίας<sup>38</sup>. Ωστόσο σε τέτοιου είδους αναλύσεις, προϋποθέτουν ότι τα ακόρεστα κέντρα των

λιπαρών οξέων βρίσκονται στη συνήθη θέση τους, π.χ ο διπλός δεσμός του ελαϊκού βρίσκεται στη θέση C9-C10. Λιπαρά οξέα με διπλούς δεσμούς σε διαφορετικές θέσεις από τις προβλεπόμενες δεν μπορούν εύκολα να ταυτοποιηθούν στην αέρια χρωματογραφία<sup>45</sup> με βάση τους χρόνους κατακράτησης τους, με αποτέλεσμα να απαιτείται η χρήση και μιας δεύτερης αναλυτικής τεχνικής, όπως η υπέρυθη, η υπεριώδη φασματοσκοπία ή η φασματοσκοπία μάζας. Αντίθετα η χρήση φασματοσκοπίας <sup>13</sup>C NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας επιτρέπει την ανίχνευση πολλών ισομερών θέσης των λιπαρών οξέων και των εστέρων τους. Επιπρόσθετα, η ανάλυση των κορυφών μεμονωμένων λιπαρών οξέων σε ορισμένες περιοχές απορρόφησης επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του συνόλου σχεδόν των κυριότερων λιπαρών οξέων στο λίπος του γάλακτος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΠΑΝ. Ι. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Η ΤΥΡΟΚΟΜΙΑ ΣΤΗΝ ΠΡΑΞΗ, ΤΡΙΑΙΝΑ, 1995, ΑΘΗΝΑ
2. ΑΝΤΩΝΗ Ι. ΜΑΝΤΗ, ΥΓΙΕΙΝΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ, ΕΚΔΟΤΙΚΟΣ ΟΙΚΟΣ ΑΦΩΝ ΚΥΡΙΑΚΥΔΗ, 1983, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ σελ. 21
3. ΑΝΤΩΝΗ Ι. ΜΑΝΤΗ, ΥΓΙΕΙΝΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ, ΕΚΔΟΤΙΚΟΣ ΟΙΚΟΣ ΑΦΩΝ ΚΥΡΙΑΚΥΔΗ, 1983, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
4. Owen R. Fennema., FOOD CHEMISTRY, © Marcel Dekker, Inc., 1996, New York
5. Owen R. Fennema., FOOD CHEMISTRY, © Marcel Dekker, Inc., 1996, New York σελ. 850
6. ΑΝΤΩΝΗ Ι. ΜΑΝΤΗ, ΥΓΙΕΙΝΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ, ΕΚΔΟΤΙΚΟΣ ΟΙΚΟΣ ΑΦΩΝ ΚΥΡΙΑΚΥΔΗ, 1983, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ σελ. 25
7. Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland., Milk and milk products, © Chapman & Hall, 1996, London σελ. 23
8. John McMurry, ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ ΙΙ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ 1998
9. Ronald S. Kirk, Ronald Sawyer., Pearson's Composition and Analysis of Food, LONGMAN 1991
10. Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland., Milk and milk products, © Chapman & Hall, 1996, London
11. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/grading.html#rancid>
12. Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland., Milk and milk products, © Chapman & Hall, 1996, London σελ. 26
13. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/grading.html#rancid>
14. Owen R. Fennema., FOOD CHEMISTRY, © Marcel Dekker, Inc., 1996, New York, σελ. 238
15. Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland., Milk and milk products, © Chapman & Hall, 1996, London σελ. 18
16. <http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/factorsnutritional.html>
17. Olivera Koprivnjak.; Lanfranco Conte.; Ornella Boscelle.; Stefano Morassi.; Validation of diglyceride contents in cheeses using co-ordinated chromatographic techniques. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1997, 204, 429-432.
18. Smedes, F., Determination of total lipid using non-chlorinated solvents, *Analyst*, 1999, 124, 1711-1718
19. Estela L. Arrese, Justin L. Gazard, Mathew T. Flowers, Jose L. Soulages, and Michael A. Wells, Diacylglycerol transport in the insect fat body: evidence of involvement of lipid droplets and fraction, *Journal of Lipid Research*, 2001, 42, 225-234
20. BELLOQUE, J., RAMOS, M. "Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products". *Trends Food Sci. Tech.* (1999) 10 313-320

21. Smolnyi, A.V., Chesnov, V.O., Shepeleva, E.V., Geremovich O.A. and Denisovich, E.Y. "Spectroscopic NMR Determination of Chemical Composition of Milkfat". *Moloch. Promysh.* (1996) 4, 20-22
22. Kalo, P., Kempinen, A. and Kilpelainen, I. 'Determination of Positional Distribution of Butyryl Groups in Milkfat Triacylglycerols, Triacylglycerol Mixtures, and Isolated Positional Isomers of Triacylglycerols by Gas Chromatography and  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance' in *Lipids* (1996) 31, 331-336
23. Dewettinck, K., de Greyt, W. and Huyghebaert, A. 'Lipase Catalysed Interesterification of Milkfat: Influence on the Free Fatty Acid Profile' in *Medelin. Fac. Landbouwet. Rijsunivt.* (1992) Gent. 57, 1905-1907
24. Wahlgren, M., Drakenberg, T., Vogel, H.J. and Dej (1986) "31P-nuclear Magnetic Resonance Study of milk fractions" *J. Dairy Res.* 53, 539-545
25. Bashkar, A.R., Rizvi, S.S.H., Bertoli, C, Fay, L.B. and Hug, B. 'A Comparison of Physical and Chemical Properties of Milk Fat Fractions Obtained by Two Processing Technologies' in *JAACS* (1998) 75, 1249-1264
26. Zwierzak, A.; Cyclic organophosphorus compounds. I. Synthesis and infrared spectral studies of cyclic hydrogen phosphites and thiophosphites. *Can. J. of Chem.*, 1967, 45, 2501-2512.
27. AOAC (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (W. Horwitz, Ed.), Method 905.02. Association of Analytical Chemists, Arlington, U.S.A.
28. <http://courses.che.umn.edu/02fscn43121f/Lecture/Crude%2520fat%2520determination>
29. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37, 911-917
30. Smedes, F. and Thomson, T. K. Evaluation of the Bligh & Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, 1996, 32, 681-688.
31. Manirakiza, P., Covaci, A., and Schepens, P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001, 14, 93-100.
32. Evers, J.M., Wightman, L.M., Crawford, R.A., Contarini, G., Coors, U., Farrington D.S., Molkentin, J., Nicolas, M.: A precise method to measure the total fat content of spreadable fats. *Int. Dairy J.* 10 815-827 (2000).
33. Smedes Foppe,.: Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst*, 124, 1711-1718, (1999)
34. Spyros A., Dais P.,: Application of 31P NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 48, 802-805 (2000)
35. ΑΝΤΩΝΗ Ι. ΜΑΝΘΗ, ΥΓΙΕΙΝΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΛΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥ, ΕΚΔΟΤΙΚΟΣ ΟΙΚΟΣ ΑΦΩΝ ΚΥΡΙΑΚΥΔΗ, 1983, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ σελ 27
36. Sacchi, R., F. Addeo, S. Spagna Musso, L. Paolillo.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of virgin oil. An overview. *Magn. Reson. Chem.* 35: S133-S145 (1997)
37. G. Andreotti, E. Trivellone, R. Lamanna.: Milk Identification of different species:  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of Triacylglycerols from cows and buffaloes' milk' s. *J. Dairy Sci.* 83: 2432-2437 (2000)

- 
- <sup>38</sup>. Paavo Kalo, Asmo Kemppinen, Ilkka Kilpeläinen.; Determination of Positional Distribution of Butyryl Groups in Milk Triacylglycerols, Triacylglycerol Mixtures, and Isolated Positional Isomers of Triacylglycerols by Gas Chromatography and <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy; *Lipids*, 31, 331-336, (1996)
- <sup>39</sup>. M. Aursand, F. Marbon and G.J.Martin.; High-Resolution <sup>1</sup>H and <sup>2</sup>H NMR Spectroscopy of Pure Essential Fatty Acids for Plants and Animals.; *Magn. Reson. Chem.* 35, S91-S100 (1997)
- <sup>40</sup>. María D. Guillén and Ainhoa Ruiz.; <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 12, Issue 9, September 2001, Pages 328-338
- <sup>41</sup>. G. Vlaxou.; Application of NMR to the study of olive oils, *Progress*
- <sup>42</sup>. Gunstone, F. D. Information on the composition of fats from their high resolution C-13 nuclear magnetic resonance spectra. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 361-366 (1993)
- <sup>43</sup>. Angers, P., E. Tousignant, A. Boudreau, and J. Arul. Regiospecific analysis of fractions of bovine milk fat triacylglycerols with the same partition number. *Lipids* 33, 1195-1201, (1998)
- <sup>44</sup> R. S. Macomber, *A complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., 1998
- <sup>45</sup>. Marcel S.F. Lie Ken Jie and J. Mustafa.; High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy—Applications to Fatty Acids and Triglycerols. *Lipids*, 32, 1019-1034, (1997)