



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR.



Εργαστήριο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Υπεύθυνος Καθηγητής: Απόστολος Σπύρος

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Απόστολο Σπύρο για την ανάθεση της εργασίας και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της δουλειάς μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την υποψήφια διδάκτορα Ευσταθία Μανωλοπούλου για την καθοδήγησή της και την προθυμία της να βοηθήσει ανά πάσα ώρα και στιγμή. Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω το σύνολο των ανθρώπων που απαρτίζουν αυτό το εργαστήριο για το ζεστό κλίμα που δημιούργησαν και τη συνολική βοήθεια που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη.....	σελ. 4
2. Θεωρία	σελ. 5
3. Φασματοσκοπία NMR.....	σελ. 10
4. Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	σελ. 13
5. Πειραματική διαδικασία.....	σελ. 14
6. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	σελ. 16
7. Συμπεράσματα.....	σελ. 22
8. Βιβλιογραφία.....	σελ. 23
9. Παράρτημα.....	σελ. 25

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR

Υπεύθυνος καθηγητής: Απόστολος Σπύρος

Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών στο ελαιόλαδο με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR.

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μίας νέας αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού των ολικών πολυφαινολών που υπάρχουν στο ελαιόλαδο. Εξετάστηκαν δείγματα ελαιολάδου καθώς και πρότυπα διαλύματα ελαιοευρωπαϊνης υπό πειραματικές συνθήκες όξινης υδρόλυσης. Ο σκοπός της υδρόλυσης είναι η μετατροπή όλων των πολυφαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, τα οποία είναι κατά πλειοψηφία εστέρες είτε της τυροσόλης, είτε της υδροξυτυροσόλης στις αρχικές αλκοόλες, τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν πειραματικά είναι η βέλτιστη ποσότητα οξέος κατά την υδρόλυση, ο χρόνος διάρκειας της υδρόλυσης και η επίδραση της εξουδετέρωσης ή μη του τελικού διαλύματος προς μέτρηση στην ποσοτικοποίηση των συνολικών πολυφαινολών στα δείγματα που αναλύθηκαν.

Η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών έγινε με τη χρήση της ποσοτικής φασματοσκοπίας NMR μίας διάστασης του πυρήνα ^1H . Μετά την αρχική επεξεργασία των φασμάτων NMR, έγινε ανάθεση των κορυφών (μέσω σύγκρισης με πρότυπα φάσματα ^1H NMR), ολοκλήρωσή τους, και ποσοτικοποίηση των αλκοολών. Η επεξεργασία των φασμάτων και η ανάθεση των κορυφών έγινε με το πρόγραμμα Topspin της εταιρίας Bruker. Για την ανάθεση των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν φάσματα πρότυπων ενώσεων, ενώ η ποσοτικοποίησή των αλκοολών τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη έγινε χρησιμοποιώντας το λογισμικό WINNMR, ολοκληρώνοντας τις ελεύθερες από αλληλεπικαλύψεις κορυφές κάθε ένωσης με βάση το εσωτερικό πρότυπο.

ΘΕΩΡΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

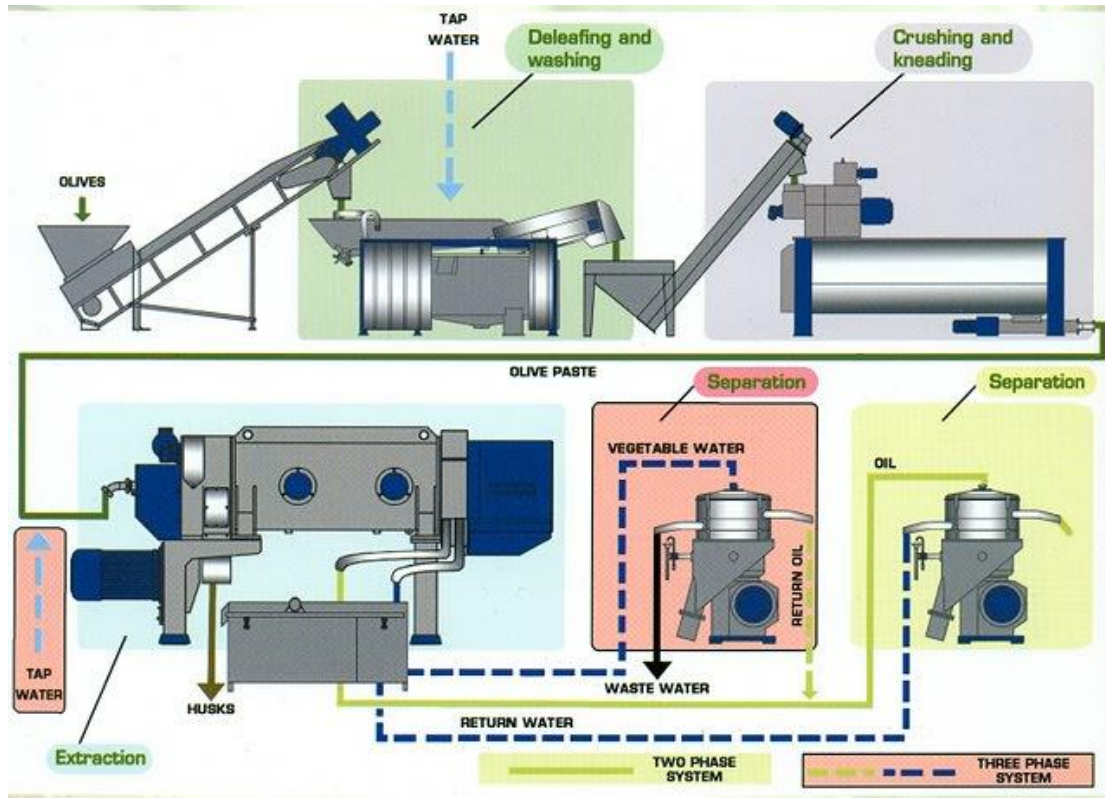
Ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαίας της Ευρωπαϊκής με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της μεσογειακής διατροφής και έχει σημαντική συνεισφορά στις ευεργετικές της ιδιότητες. Από την αρχαιότητα, στην εποχή του Σωκράτη, το ελαιόλαδο είχε πολύ σημαντική χρήση στη θεραπεία των εγκαυμάτων, των παθήσεων του δέρματος και φυσικά στην περιποίηση των πληγών από τις μάχες.^[1] Πλέον, είναι γνωστό ότι διαθέτει ακόμη, αντιοξειδωτικές^[1] και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες^[2] σε αντίθεση με άλλα λάδια που κυκλοφορούν. Η διαφορά του αυτή οφείλεται στην μικρή ποσότητα πολυφαινολών που περιέχει. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, η ανάγκη ανάπτυξης μιας μεθόδου αξιόπιστης ανάλυσης της σύστασης του λαδιού, έχει γνωρίσει ραγδαία αύξηση. Στο παρελθόν, για την ανάλυση του λαδιού έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές άλλες φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές τεχνικές όπως η HPLC-UV^[3], η GC-MS^[4] και η LC-MS^[4].

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ^[5]

- Παραλαβή των ελαιόκαρπων και ζύγιση.
- Αποφύλλωση. Ο διαχωρισμός των φύλλων από τον καρπό είναι απαραίτητος γιατί η σύνθλιψη του ελαιόκαρπου με μεγάλης ποσότητας φύλλα προσδίδει πικρή γεύση στο ελαιόλαδο και το εμπλουτίζει σε χλωροφύλλη η οποία δρα αρνητικά στην ποιότητά του. Οι ελιές από την λεκάνη μαζέματος προχωράνε πάνω στην κινητή τροχιά προς το πλυντήριο, κατά το πέρασμά τους υποβάλλονται σε ρεύμα αέρα που αποσύρει τα φύλλα και τα υπολείμματα μικρών κλωναριών και τα απομακρύνει εκτός συσκευής.

- Πλύσιμο των καρπών. Το πλυντήριο ελιάς (κατασκευασμένο εξ' ολοκλήρου από ανοξείδωτο μέταλλο INOX) λειτουργεί με την αρχή της ροής ρεύματος νερού στην αφετηρία της λεκάνης πλυσίματος, το νερό ρέει υπό μορφή κυκλώνα νερού που οι καρποί της ελιάς στρέφονται μαζί και μετά εκτοξεύονται στην τροχιά του νερού που σχηματίζει κύματα για την πλύση. Αυτός ο τύπος είναι εφοδιασμένος με ελικοειδή μεταφορέα που απομακρύνει τις πέτρες και τα σκληρά συστατικά εκτός πλυντηρίου.
- Σπάσιμο και άλεση, όπου συνθλίβεται ο καρπός με την χρήση μεταλλικών σπαστήρων. Μετά το πλύσιμο χρησιμοποιείται ένας ελικοειδής μεταφορέας ελιάς, εφοδιασμένος με πυραμιδόμορφη λεκάνη για τη μεταφορά της ελιάς στο χειρόμυλο. Ο χειρόμυλος πολτοποιεί την ελιά διατηρώντας την ποιότητα χωρίς θερμοκρασία. Υπάρχουν διάφοροι τύποι , NJ χειρόμυλος με σφυριά τοποθετημένα ευθέως στον άξονα του κύριου κινητήρα με σταθερό κόσκινο και ελικόμορφο εφοδιαστή ελιάς . Η ισχύς του μεγάλου κινητήρα ρυθμίζεται ανάλογα με την εντολή. Σε αυτήν τη φάση αλλά και στις επόμενες έχει μεγάλη σημασία η θερμοκρασία στην οποία θα βρίσκεται το μίγμα έτσι ώστε να μην καεί το λάδι οπότε ουσιαστικά καταστρέφεται.
- Μάλαξη, όπου μαλάσσεται η ελαιοζύμη.
- Φυγοκεντριστής, όπου διαχωρίζεται ο πυρήνας (κουκούτσι). Ο πολτός της ελιάς οδηγείται στους φυγοκεντριστές τριών φάσεων όπου εξάγεται ουσιαστικά το λάδι. Λάδι, νερό και ψίχα είναι τα τρία υλικά που βγαίνουν από το μηχάνημα. Από την ψίχα θα παραχθεί στη συνέχεια το πυρηνέλαιο και το σαπουνί ελιάς, ενώ το «νερό» αποτελεί τα γνωστά και πολύ «ανθεκτικά» απόβλητα ελαιοτριβείου, τα οποία καταλήγουν σε λάκκους δίπλα στο ελαιοτριβείο.
- Παραλαβή του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη.
- Τελικός διαχωρισμός όπου διαχωρίζεται το λάδι από το νερό και καθαρισμός του ελαιόλαδου.

- Τυποποίηση. Όταν το λάδι «βγει» από τα μηχανήματα, ακολουθεί η μέτρηση της οξύτητας, ώστε ο παραγωγός, που τις περισσότερες φορές είναι παρών, να ξέρει την ποιότητα λαδιού που παρήγαγε.



Εικόνα: Συνοπτικό διάγραμμα του συνόλου των σταδίων παραγωγής ελαιολάδου

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

- Παρθένα ελαιόλαδα: Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους οι οποίες δεν συνεπάγονται αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία εκτός από την πλύση, την καθίζηση, την φυγοκέντριση και τη διήθηση.
- Εξευγενισμένο (ραφινρισμένο) ελαιόλαδο: Ελαιόλαδο λαμβανόμενο από εξευγενισμό παρθένου ελαιολάδου.
- Ελαιόλαδο: Ελαιόλαδο προερχόμενο από ανάμιξη εξευγενισμένου αι παρθένου ελαιολάδου. .
- Πυρηνέλαιο. Το πυρηνέλαιο προέρχεται από ελαιοπυρήνες και αποτελείται από μίγμα εξευγενισμένου πυρηνέλαιου και παρθένου ελαιολάδου.

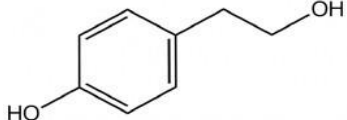
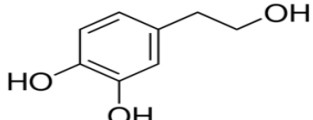
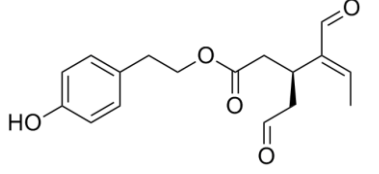
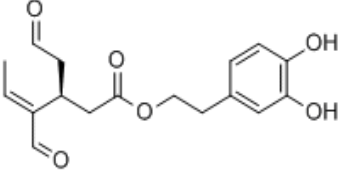
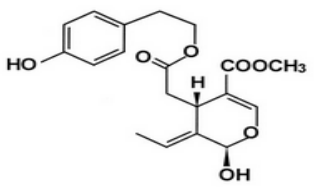
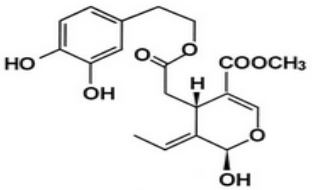
ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Σε σύγκριση με τα άλλα φυτικά έλαια, το ελαιόλαδο είναι το μοναδικό που φέρει ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες. Επομένως, η διαφορά αυτή έγκειται στην μικρή ποσότητα φαινολικών συμπλόκων που περιέχει, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα έλαια.^[6] Οι φαινόλες υπάρχουν στο ελαιόλαδο από την φύση ώστε να λειτουργούν αντιοξειδωτικά και να προστατεύουν το ελαιόλαδο από το τάγγισμα, όταν αυτό δέχεται την καταστροφική επίθεση του οξυγόνου του ατμοσφαιρικού αέρα και της ηλιακής ακτινοβολίας. Σημειώνεται λοιπόν ότι ένα ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες έχει υψηλό βαθμό προστασίας και άρα αντοχής στον χρόνο, ενώ ταυτόχρονα η κατανάλωσή του προστατεύει τα ανθρώπινα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες^{[7],[8]}. Τα κυριότερα φαινολικά σύμπλοκα που περιέχονται είναι τα σεκοϊριδοειδή, δηλαδή τα παράγωγα της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου, και τα απλά φαινολικά, δηλαδή οι τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη^[4] τα οποία εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Το 2012, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) πρότεινε έναν καινούριο ισχυρισμό υγείας.^{[10],[11]} Σύμφωνα με τον κανονισμό 432/2012 λοιπόν, θεωρείται ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες στα πλαίσια μιας ποικίλης και ισορροπημένης διατροφής.

Ωστόσο, για να αναγραφεί ο ισχυρισμός σε ένα ελαιόλαδο πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 250 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (σύμπλοκο ελευρωπαΐνης και τυροσόλης) ανά 1kg ελαιολάδου.

Πίνακας 1: Δομές των φαινολικών συμπλόκων του ελαιολάδου

 <p style="text-align: center;">Τυροσόλη</p>	 <p style="text-align: center;">Υδροξυτυροσόλη</p>
 <p style="text-align: center;">Ολεοκανθάλη</p>	 <p style="text-align: center;">Ολεασίνη</p>
 <p style="text-align: center;">Λιγκστροσίδιο</p>	 <p style="text-align: center;">Ελευρωπαΐνη</p>

ΘΕΩΡΙΑ NMR

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες ορισμένως ατόμων τοποθετούνται σε ένα ομογενές μαγνητικό πεδίο, και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός αρχικά περιεγράφη και μετρήθηκε σε μοριακές δομές από τον Isidor Rabi το 1938. Αργότερα το 1946, οι Felix Bloch και Edward Mills Purcell, επέκτειναν την τεχνική ώστε να χρησιμοποιηθεί σε υγρά και στερεά, και για αυτήν τους την έρευνα τιμήθηκαν με Nobel Φυσικής το 1952.

Γενικά η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογή σε οποιοδήποτε δείγμα περιέχει μόρια με πυρήνα που έχει περιττό αριθμό νουκλεονίων, δηλαδή είτε περιττό αριθμό νετρονίων είτε περιττό αριθμό πρωτονίων. Οι πυρήνες που μελετώνται συνήθως είναι ^1H και ^{13}C , σε οποιαδήποτε φάση δείγματος (στερεή, υγρή και αέρια) και σε οποιοδήποτε μέγεθος μορίων (από απλά μόρια μέχρι πρωτεΐνες). Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιεί τις μαγνητικές ιδιότητες ενός ατομικού πυρήνα για να προσδιορίσει της φυσικές και χημικές ιδιότητες των ατόμων ή μορίων μέσα στο διάλυμα. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που απορροφούν και επανεκπέμπουν οι πυρήνες βρίσκεται στην περιοχή των ραδιοκυμάτων και έχει συχνότητα $3 \times 10^6 - 3 \times 10^8 \text{ Hz}$.

Δύναται να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική ανάλυση, καθώς το εμβαδόν των κορυφών είναι ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που αντιστοιχίζονται στην κορυφή. Έτσι επιτυγχάνεται απευθείας ποσοτικός προσδιορισμός του δείγματος χωρίς να απαιτείται κάποια επιπλέον διαδικασία βαθμονόμησης.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ NMR

- Στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας και συγκεκριμένα στο σχεδιασμό φαρμάκων όπου μελετάται η σχέση δομής δραστικότητας.
- Στον χώρο της διαγνωστικής ιατρικής, η Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού (MRI) ή αλλιώς μαγνητική τομογραφία, όπου υπάρχει η δυνατότητα απεικόνισης του εσωτερικού του ανθρώπινου σώματος μη επεμβατικά και απουσία επικίνδυνης ακτινοβολίας
- Στα πολυμερή, η μελέτη της σύστασης και της δομής τους μπορεί να μας παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την παλαιότητά του και στην βέλτιστη συντήρησή του, για παράδειγμα αν πρόκειται για κάποιο έργο τέχνης.
- Στην ανάλυση τροφίμων, η φασματοσκοπία NMR (^1H , ^{13}C και ^{31}P κυρίαρχα) βρίσκει εφαρμογή στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων, στον χαρακτηρισμό γεωγραφικής προέλευσης και στον έλεγχο της καθαρότητας για την εξακρίβωση ή μη νοθείας.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΕΧΝΙΚΗΣ NMR

Η τεχνική NMR παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές. Πραγματοποιείται ανάλυση δειγμάτων και ολοκληρωμένη παρατήρηση χωρίς την καταστροφή του δείγματος. Συγκεκριμένα, απαιτεί ελάχιστη ή και μηδενική προεργασία στο δείγμα ενώ συνήθως δεν απαιτεί κάποια εκτεταμένη διαδικασία καθαρισμού όπως απαιτείται στις χρωματογραφικές τεχνικές^{[12],[13]}. Οι εκχυλίσεις με διαλύτη και οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί είναι αρκετά χρονοβόροι και δαπανηροί ένεκα των μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, ένας παράγοντας που αποκτά μεγαλύτερη σημασία σε μια εποχή που συνεχώς προτείνονται ολοένα και πιο οικολογικές πειραματικές τεχνικές^[12]. Η ανάλυση μπορεί να είναι ταυτόχρονα ποιοτική και ποσοτική, αφού η ολοκλήρωση μιας και μόνο κορυφής της ένωσης αρκεί για την ποσοτικοποίηση της ένωσης^[13]. Επομένως, σε ένα μεγάλο όγκο δειγμάτων και αναλύσεων μπορεί να παράσχει μεγάλη οικονομία χρόνου.

ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών που περιέχονται σε δείγματα ελαιολάδου με βάση την όξινη υδρόλυση. Η όξινη υδρόλυση επιτρέπει την λήψη όλων των αποτελεσμάτων ως προς τις κύριες φαινόλες, τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη λόγω της υδρόλυσης των εστέρων των φαινολών. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου που μας παραχώρησε ευγενικά ένας ελαιοπαραγωγός και κάποια πρότυπα διαλύματα τα οποία αναλύθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Σημαντικό μέρος της μελέτης απασχολεί ο πειραματικός έλεγχος της επίδρασης της εξουδετέρωσης, η ιδανική ποσότητα οξέος και ο ιδανικός χρόνος ανάδευσης για τα δείγματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Στο πλαίσιο των δοκιμών για την εύρεση των ιδανικών συνθηκών της όξινης υδρόλυσης πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε πρότυπο διάλυμα ελευρωπαϊνης αλλά και σε εκχύλισμα κανονικών δειγμάτων ελαιολάδου και συγκεκριμένα την πολική φάση.

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος ελευρωπαϊνης

Ζυγίζεται ποσότητα 3,2mg ελαιοευρωπαϊνης η οποία διαλύεται σε ποσότητα 6ml μίγματος MeOH/υπερκάθαρο H₂O (80:20), ώστε να δημιουργηθεί διάλυμα με συγκέντρωση που να προσομοιάζει τη συγκέντρωση ενός κανονικού δείγματος ελαιολάδου σε ελευρωπαϊνη.

Δείγματα ελαιολάδου

Λήψη 10g ελαιολάδου και εκχύλιση τους με 20ml εξάνιο και 20ml MeOH/H₂O σε αναλογία 60:40 (12ml MeOH + 8ml H₂O)^[11]. Για την εκχύλιση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση (10', 3500rpm) και κατόπιν παραλήφθηκε η πολική φάση, εισήχθη σε vial, πωματίστηκε και επικαλύφθηκε με parafilm, ούτως ώστε για κάθε διαφορετικό επόμενο πείραμα να υπάρχει έτοιμη ποσότητα πολικής φάσης διαθέσιμη.

Όξινη υδρόλυση

Λήψη ποσότητας 0,5-1,0 ml διαλύματος και εισαγωγή του σε φιαλίδιο των 4ml. Το φιαλίδιο εισάγεται σε σφαιρική φιάλη χωρίς το πάμα, η οποία συνδέεται στο ρότορα, για να πραγματοποιηθεί η ξήρανση. Μετά την ολική ξήρανση του διαλύματος, στο φιαλίδιο προστίθεται ποσότητα μίγματος δευτεριωμένων διαλυτών (MeOD-D₂O) σε αναλογία 80:20 με εσωτερικό αναλυτικό πρότυπο (TSP), στο οποίο θα βασιστεί η ποσοτικοποίηση των φασμάτων. . Προστίθεται ακόμη ποσότητα διαλύματος HCl, 2M για να πραγματοποιηθεί η όξινη υδρόλυση των εστέρων. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο των δοκιμών ήταν 200-600μL οξέος. Το φιαλίδιο εισάγεται σε λουτρό υπερήχων για να θερμανθεί στους 80 °C και να αναδευτεί για κάποιο χρονικό διάστημα. Οι χρόνοι που δοκιμάστηκαν ήταν 2-4 ώρες. Κατόπιν, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου

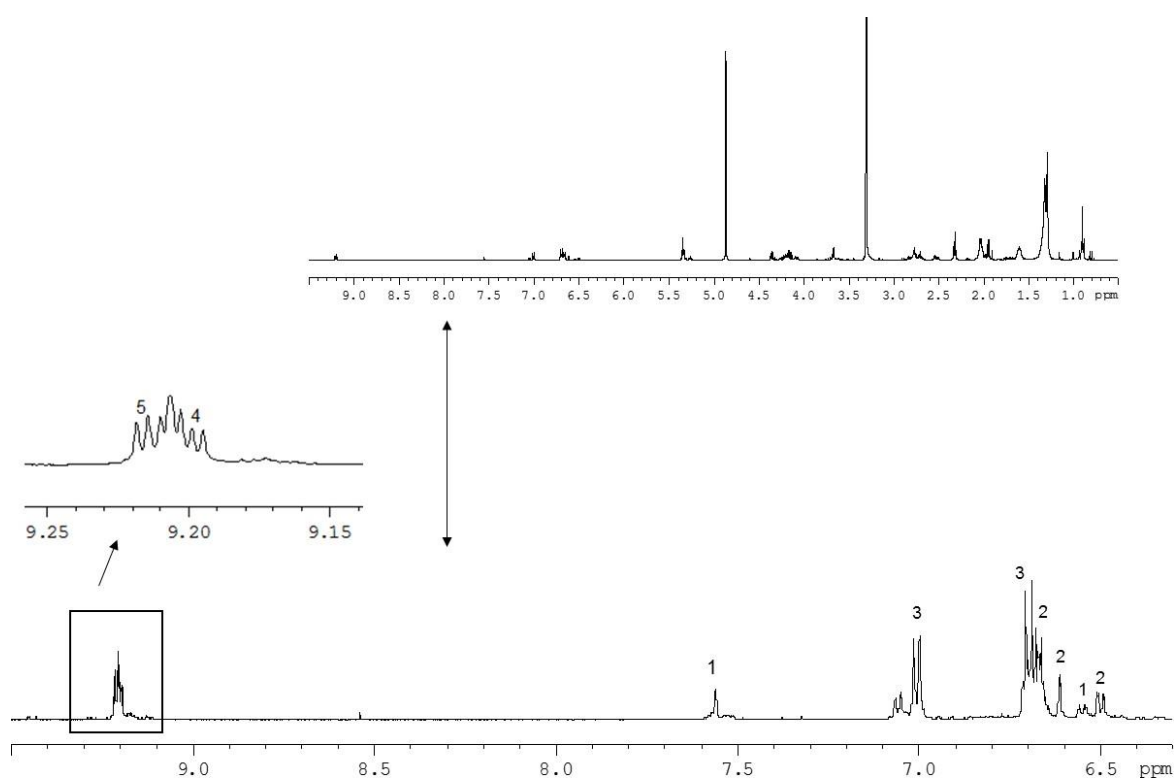
για μικρό χρονικό διάστημα και μεταφέρεται σε καθαρό και ξηρό NMR tube, πωματίζεται και επικαλύπτεται με parafilm ώστε να λάβουμε το φάσμα.

Για την μελέτη της επίδρασης της εξουδετέρωσης με NaOH 10M στην απόδοση της αντίδρασης, μετά την απόσυρση του φιαλιδίου από τους υπερήχους, προστίθενται σταγόνες NaOH μέχρι να εξουδετερωθεί το pH, το οποίο ελέγχεται συνεχώς σε πεχαμετρικό χαρτί. Το εξουδετερωμένο πλέον δείγμα εισάγεται στο NMR tube διαμέτρου 5mm. Τέλος έγινε λήψη του φάσματος σε φασματοόμετρο Avance-III-500 της εταιρίας Bruker συχνότητας 500,13 MHz για τον πυρήνα πρωτονίου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο κομμάτι αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε δείγματα ελαιολάδου όσο και σε πρότυπα διαλύματα ελευρωπαΐνης. Σε πρώτο στάδιο λήφθηκαν μονοδιάστατα (1D) φάσματα NMR και ακολούθως πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των κορυφών που εμφανίστηκαν στο φάσμα με τη χρήση του λογισμικού WINNMR.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ



Εικόνα 1: Μονοδιάστατο φάσμα ^1H NMR της πολικής φάσης δείγματος ελαιολάδου άνευ οξίνισης σε διαλύτη MeOD-TMS στα 500 MHz, όπου 1 \rightarrow τα πρωτόνια της ελευρωπαΐνης, 2 \rightarrow τα πρωτόνια της υδροξυτυροσόλης 3 \rightarrow τα πρωτόνια της τυροσόλης 4 \rightarrow τα πρωτόνια της ολεασίνης και 5 \rightarrow τα πρωτόνια της ολεοκανθάλης

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, η απλή κορυφή στα 7,55 ppm και η διπλή κορυφή στα 6,56 ppm ανήκουν στην ελευρωπαϊνή, η διπλή κορυφή στα 7,02 ppm και η διπλή κορυφή στα 6,69 ppm (αλληλεπικάλυψη με την διπλή κορυφή της υδροξυτυροσόλης), ανήκουν στην τυροσόλη ενώ η διπλή κορυφή στα 6,51 ppm, η απλή κορυφή στα 6,63 ppm και η διπλή κορυφή στα 6,69 ppm ανήκουν στην υδροξυτυροσόλη. Τέλος η διπλή κορυφή στα 9,19 ppm αντιστοιχεί στην ολεασίνη ενώ η διπλή κορυφή στα 9,22 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της ολεοκανθάλης.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΣΕ ΟΞΙΝΑ ΥΔΡΟΛΥΜΕΝΟ

ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

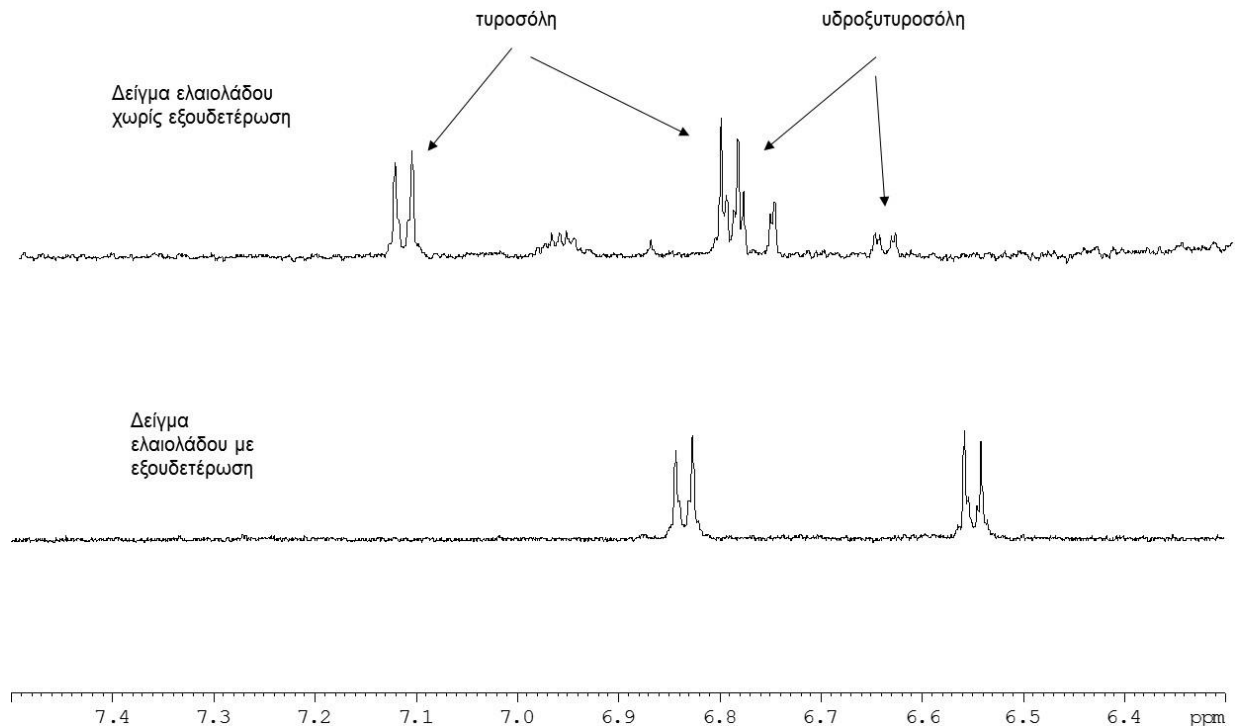
Στα παρακάτω φάσματα φαίνεται η απουσία χαρακτηριστικών κορυφών του ελαιολάδου στο εξουδετερωμένο δείγμα. Συγκεκριμένα εμφανίζονται μόνο δυο διπλές κορυφές στα 6,56 και στα 6,83 ppm, ενώ στο όξινα καταλυμένο δείγμα άνευ της υδρόλυσης εμφανίζονται κορυφές στα 7,21 (διπλή), στα 6,64 (διπλή) και μια πολλαπλή κορυφή στα 6,78 ppm. Από την ανάθεση των κορυφών προκύπτει ότι η κορυφή στα 7,21 με την μία εκ των δυο διπλών κορυφών που αλληλεπικαλύπτονται στα 6,78 ανήκουν στην τυροσόλη, ενώ οι κορυφές στα 6,64 και η άλλη κορυφή εκ της σύνθετης ανήκει στην υδροξυτυροσόλη.

Μπορούμε με σιγουριά να αναθέσουμε τις δυο διπλές κορυφές στο εξουδετερωμένο δείγμα στην τυροσόλη καθώς η μορφολογία των κορυφών και η σύζευξη J είναι η ίδια με το φάσμα της πρότυπης ένωσης της τυροσόλης.

Ο λόγος που η αλληλουχία των κορυφών της τυροσόλης εμφανίζεται σε αισθητά διαφορετικά ppm παρουσία και απουσία εξουδετέρωσης είναι ότι τα δυο δείγματα διαφέρουν αισθητά στο pH. Στο εξουδετερωμένο δείγμα το pH είναι εξακριβωμένα στο 7 ενώ στο μη εξουδετερωμένο δείγμα το pH είναι σίγουρα πιο όξινο μετά την προσθήκη HCl. Η διαφοροποίηση αυτή δικαιολογεί την μετατόπιση των κορυφών^[14]. Επομένως, απουσιάζουν οι κορυφές της υδροξυτυροσόλης.

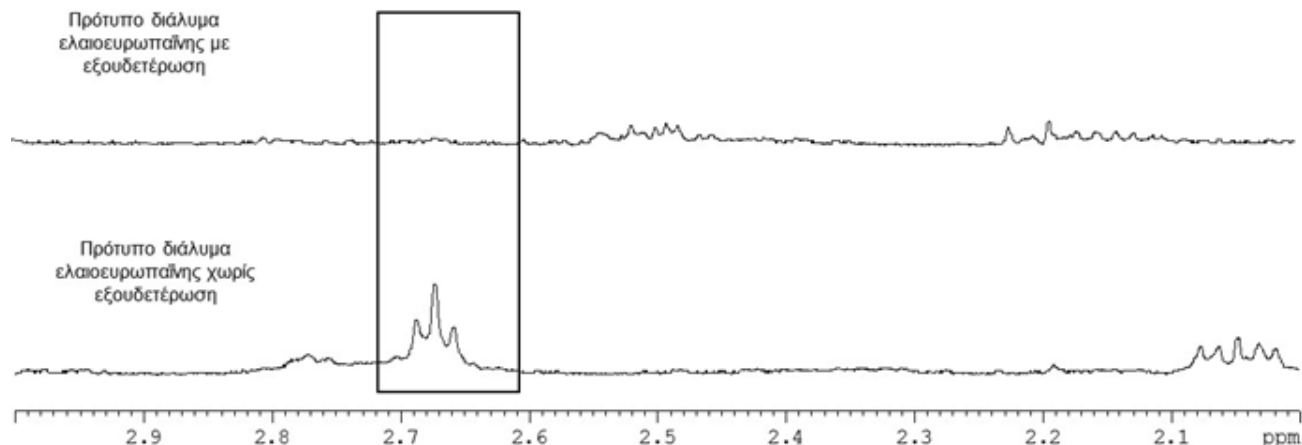
].

Εικόνα 2: Αρωματική περιοχή του μονοδιάστατου φάσματος ^1H NMR της πολικής φάσης δείγματος ελαιολάδου σε διαλύτη MeOD-TMS στα 500 MHz.



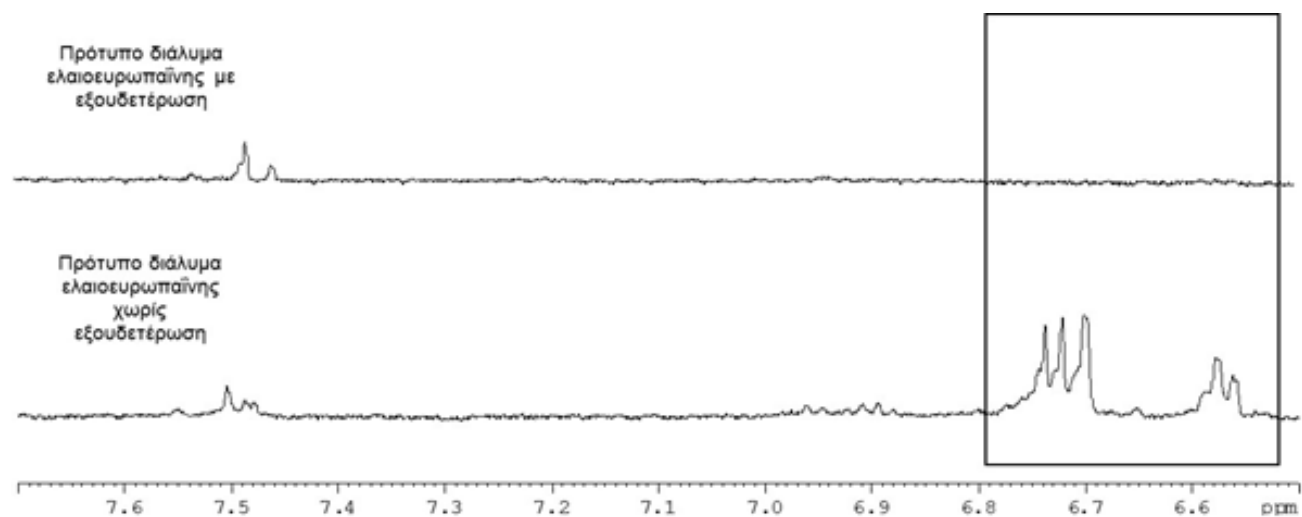
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΣΕ ΟΞΙΝΑ ΥΔΡΟΛΥΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΛΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ

Στα φάσματα που ακολουθούν παρουσιάζεται ένα πρότυπο διάλυμα ελευρωπαϊνης υπό όξινη υδρόλυση παρουσία και απουσία εξουδετέρωσης. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται το αλειφατικό μέρος και στην εικόνα 3.2 το αρωματικό μέρος των φασμάτων.



Εικόνα 3.1: Αλειφατική περιοχή του μονοδιάστατου φάσματος ^1H NMR της πολικής φάσης δείγματος ελαιολάδου σε διαλύτη MeOD-TMS στα 500 MHz.

Όπως φαίνεται στην εικόνα, στο εξουδετερωμένο διάλυμα απουσιάζει εντελώς η κορυφή που αντιστοιχεί στο αλειφατικό πρωτόνιο της υδροξυτυροσόλης το οποίο εμφανίζεται στα 2,67 ppm στο μη εξουδετερωμένο φάσμα.



Εικόνα 3.2: Αρωματική περιοχή του μονοδιάστατου φάσματος ^1H NMR της πολικής φάσης δείγματος ελαιολάδου σε διαλύτη MeOD-TMS στα 500 MHz.

Στο αρωματικό μέρος των δυο φασμάτων παρατηρείται ότι ενώ εμφανίζεται η κορυφή στα 7,50 ppm η οποία ανήκει σε πρωτόνιο της ελευρωπαϊνης, απουσιάζουν πάλι οι 2 κορυφές των αρωματικών πρωτονίων της υδροξυτυροσόλης, στα 6,58 και 6,73 ppm, από το φάσμα του εξουδετερωμένου διαλύματος.

Για τα παρακάτω ποσοτικά αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των κορυφών. Αυτό έγινε με το λογισμικό επεξεργασίας φασμάτων NMR της εταιρίας Bruker, WIN-NMR. Οι ολοκληρώσεις έγιναν σε συγκεκριμένες κορυφές για κάθε ένωση και τα ολοκληρώματα κανονικοποιήθηκαν βάσει του αριθμού των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε κορυφή. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ένωση TSP. Η ένωση αυτή υπάρχει σε γνωστή συγκέντρωση στον δευτεριωμένο διαλύτη.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΣΕ ΟΞΙΝΑ ΥΔΡΟΛΥΜΕΝΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ

Πραγματοποιήθηκε πειραματική δοκιμή σε τέσσερα όμοια πρότυπα διαλύματα ελευρωπαϊνης όπου προστέθηκαν διάφορες ποσότητες οξέος. Επίσης ο χρόνος της ανάδευσης ήταν διαφορετικός για ένα από τα δείγματα, με σκοπό να εξεταστεί και αυτή η παράμετρος.

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα, η αύξηση της ποσότητας του οξέος από τα 200μL στα 400μL προκαλεί ραγδαία αύξηση στην παραγωγή της υδροξυτυροσόλης. Ωστόσο η περαιτέρω αύξηση στην ποσότητα του οξέος φαίνεται να μην προκαλεί ανάλογη αύξηση της παραγωγής υδροξυτυροσόλης αλλά αντίθετα, μειώνεται ελάχιστα. Επιπλέον, η αύξηση του χρόνου ανάδευσης, από τις 2h στις 4h φαίνεται να επάγει την αύξηση της παραγωγής υδροξυτυροσόλης.

Επομένως, με τη δεδομένη σύσταση του προτύπου διαλύματος ελευρωπαϊνης, η οποία ισούται με τη σύσταση κανονικού δείγματος ελαιολάδου, προτείνεται η αναλογία 400μL HCl και 4h θέρμανση και ανάδευση ανά 1ml ελαιολάδου.

Πίνακας 2: Παραγωγή υδροξυτυροσόλης στα διάφορα πρότυπα διαλύματα ελαιουρωπαΐνης

ΔΙΑΛΥΜΑ	μmol hydroxytyrosol
oleuropein (1ml) (200μL HCl/2h)	0,84
oleuropein (1ml) (400μL HCl/2h)	1,08
oleuropein (1ml) (400μL HCl/4h)	1,14
oleuropein (1ml) (600μL HCl/2h)	1,05

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Συγκρίθηκαν δυο όμοια διαλύματα πολικής φάσης ίδιου δείγματος ελαιολάδου υδρολυμένα με την ίδια ποσότητα οξέος σε διαφορετικό χρόνο ανάδευσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν αισθητά μεγαλύτερη παραγωγή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στο δείγμα που υπέστη 1h παραπάνω ανάδευση και θέρμανση. Επιβεβαιώνεται έτσι η εξάρτηση της παραγωγής των δύο κυρίως πολυφαινολών από τις δύο παραμέτρους.

Πίνακας 3: Παραγωγή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στην πολική φάση δείγματος ελαιολάδου για διαφορετικούς χρόνους θέρμανσης.

ΔΕΙΓΜΑ	μmol/g δείγματος tyrosol μετά την υδρόλυση	μmol/g δείγματος hydroxytyrosol μετά την υδρόλυση
0,5ml πολική φάση/300μL HCl/2h	1,72	0,96
0,5ml πολική φάση/300μL HCl/3h	2,01	1,41

Τα αντίστοιχα στοιχεία για την πολική φάση του ίδιου δείγματος ελαιολάδου, πριν την υδρόλυση απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Με την μέτρηση της παραγωγής των δυο ενώσεων σε $\mu\text{mol/g}$ μπορούμε να κανονικοποιήσουμε πειράματα που μεταξύ τους διαφέρουν στην ποσότητα δείγματος που μετρήθηκε.

Παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην παραγωγή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στα δείγματα που υπέστησαν όξινη υδρόλυση, γεγονός που ερμηνεύεται από την διάσπαση όλων των υπόλοιπων φαινολικών και πολυφαινολικών εστέρων του ελαιολάδου προς τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη.

Πίνακας 4: Παραγωγή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στην πολική φάση δείγματος ελαιολάδου πριν την υδρόλυση.

ΔΕΙΓΜΑ	$\mu\text{mol/g}$ δείγματος tyrosol πριν την υδρόλυση	$\mu\text{mol/g}$ δείγματος hydroxytyrosol πριν την υδρόλυση
2ml πολική φάση	1,00	0,81

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με το πέρας αυτής της εργασίας μπορεί να διαπιστωθεί με ασφάλεια ότι μέσω της φασματοσκοπίας NMR είναι εφικτός ο προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών στο ελαιόλαδο. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, προτείνει ως βέλτιστη την αναλογία 400μl HCl με 4 ώρες θέρμανση ανά 1ml ελαιολάδου, αφού συνέκρινε και τους δυο παράγοντες δείχνοντας ότι είναι εξ ίσου σημαντικοί. Ωστόσο, περαιτέρω πειράματα με περισσότερα δείγματα ελαιολάδου είναι απαραίτητα για την επικύρωση της προτεινόμενης μεθοδολογίας ανάλυσης.

Αποδείχτηκε επίσης ότι η εξουδετέρωση του pH του δείγματος με τη χρήση κάποιας ισχυρής βάσης δεν επιτρέπει την εμφάνιση του συνόλου των κορυφών, ενώ ο μηχανισμός υπό τον οποίο συμβαίνει αυτή η παρεμπόδιση της εμφάνισης των κορυφών της υδροξυτυροσόλης αποτελεί αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

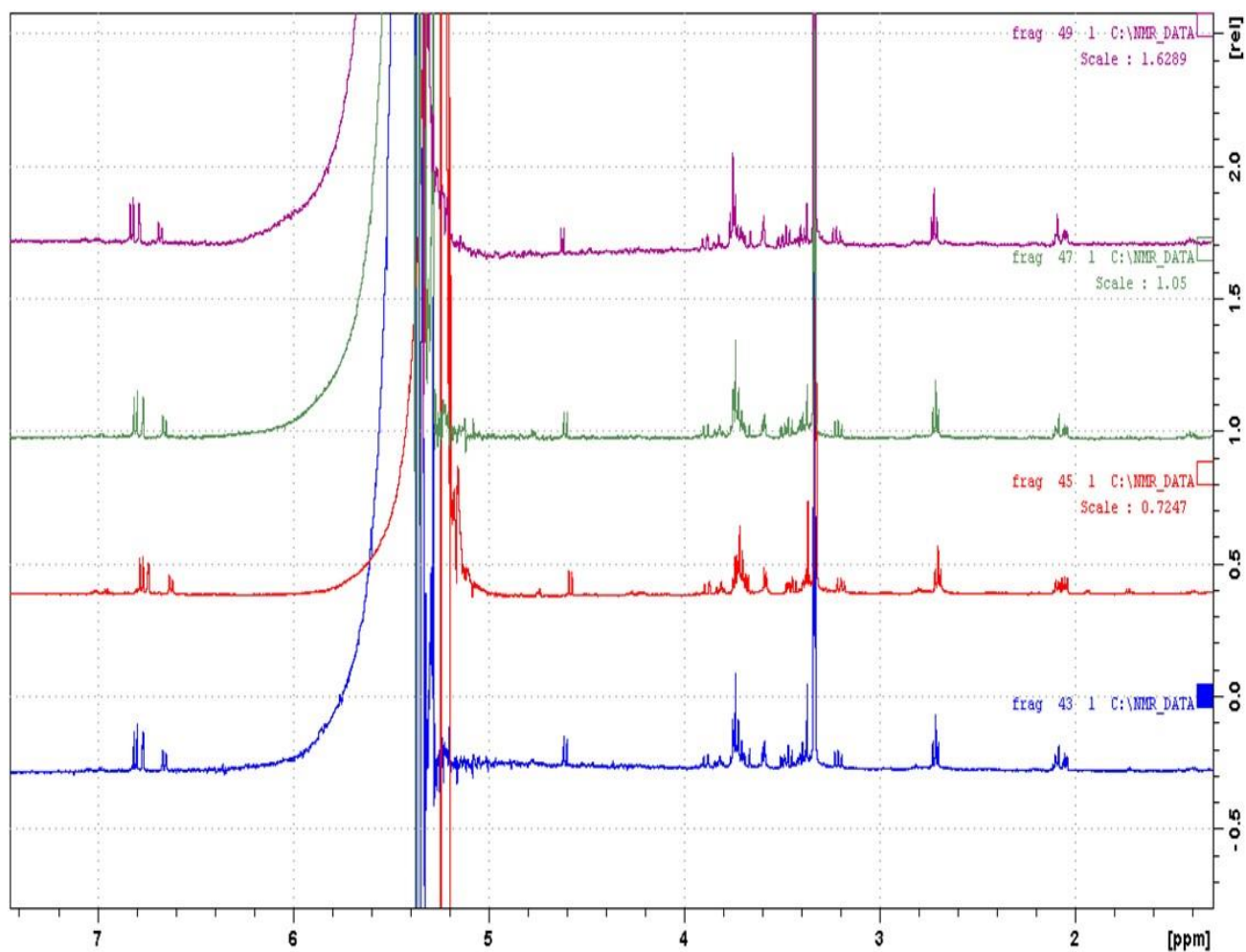
Η ανάλυση ενός δείγματος ελαιολάδου με την προτεινόμενη μεθοδολογία μπορεί /να προσδιορίσει επιτυχώς το φαινολικό περιεχόμενό του ώστε ο ελαιοπαραγωγός να γνωρίζει αν το λάδι του συμβαδίζει με την Ευρωπαϊκή Οδηγία του EFSA (κανονισμός 432/2012).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

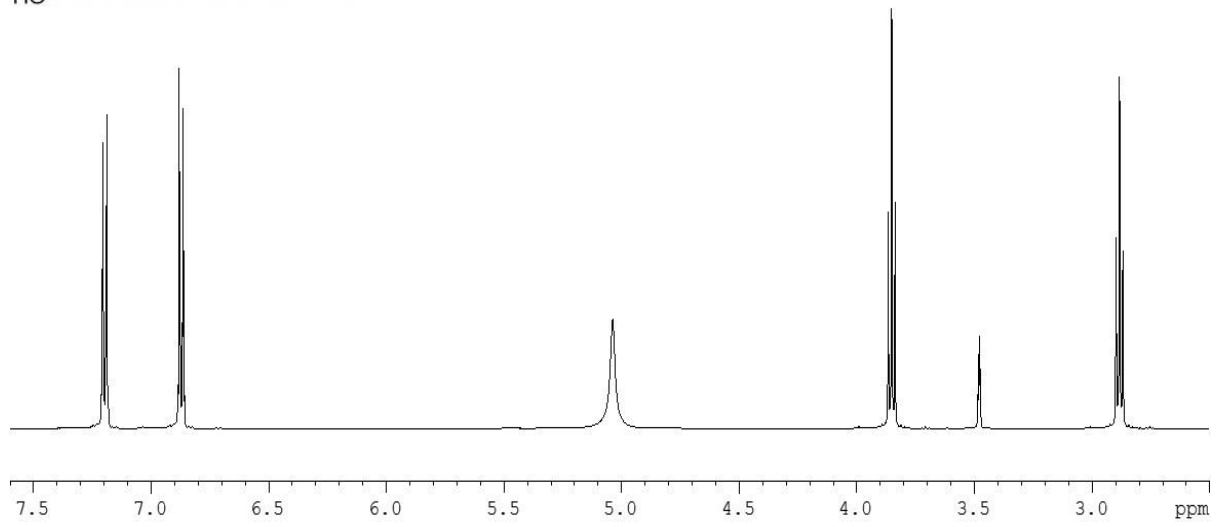
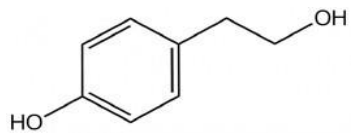
1. Parkinson L., Keast R., Oleocanthal, a Phenolic Derived from Virgin Olive Oil: A Review of the Beneficial Effects on Inflammatory Disease, *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 12323-12334.
2. Karkoula E., Skantzari A., Melliou E., Magiatis P., Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative ¹H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 47, 11696-11703.
3. International Olive council testing methods. Determination of biophenols in olive oil by HPLC. COI/T.20/Doc No 29, November 2009
4. Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 2007, 12, 1679–1719.
5. Κάρκουλα Ε., «Νέα μέθοδος άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού τεσσάρων σεκοϊριδοειδών σε ελαιόλαδο με φασματοσκοπία ¹H-NMR», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2013.
6. 1. Cicerale S., Lucas L.J., Keast R.S.J., Oleocanthal: A Naturally Occurring Anti-Inflammatory Agent in Virgin Olive Oil, *Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, 2012, 357-374.
7. Romero C., Brenes M., Analysis of Total Contents of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Olive Oils, *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 9017–9022.
8. Brenes M., Garcia A., Garcia P, Garrido A., Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin Olive Oil, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5609-5614.
9. Purcaro G., Codony R., Pizzale., Mariani C., Conte L., Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2014, 116.

10. European Community Council Regulation No. 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Off. J. Eur. Comm. L.* 2012, 136, 1-40.
11. Mastralexi A., Nenadis N., Tsimidou M.Z., Addressing Analytical Requirements To Support Health Claims on "Olive Oil Polyphenols" (EC Regulation 432/2012), *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 2459–2461.
12. Μανωλοπούλου Ε., «Μελέτη των φύλλων της ελιάς με τη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) στερεής και υγρής φάσης», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο 2012.
13. Karkoula E., Skantzari A., Melliou E., Magiatis P., Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers, *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 600–607.
14. Spyros A., Dais P., "NMR Spectroscopy in Food Analysis", RSC Publishing

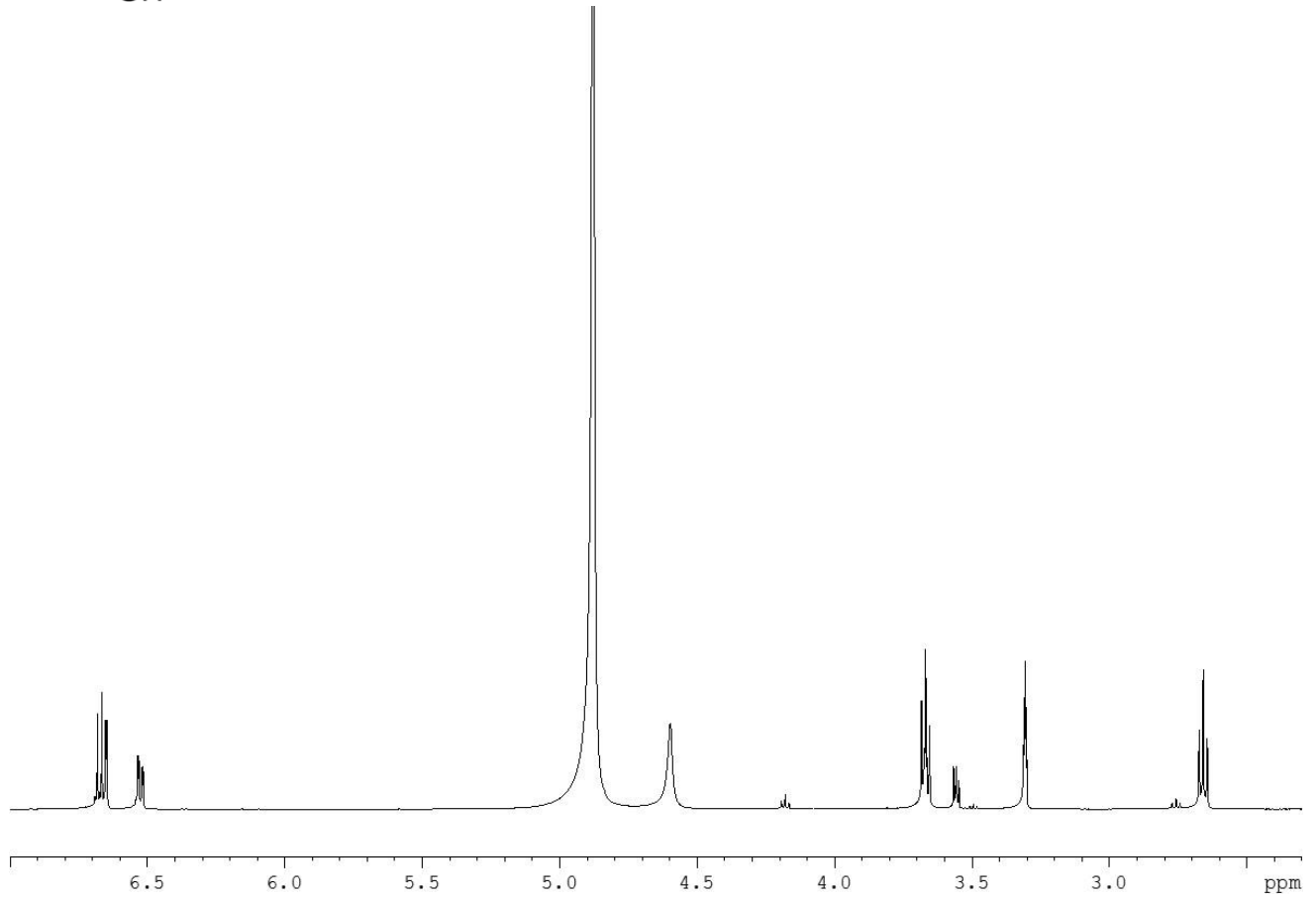
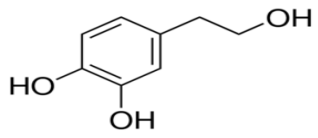
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



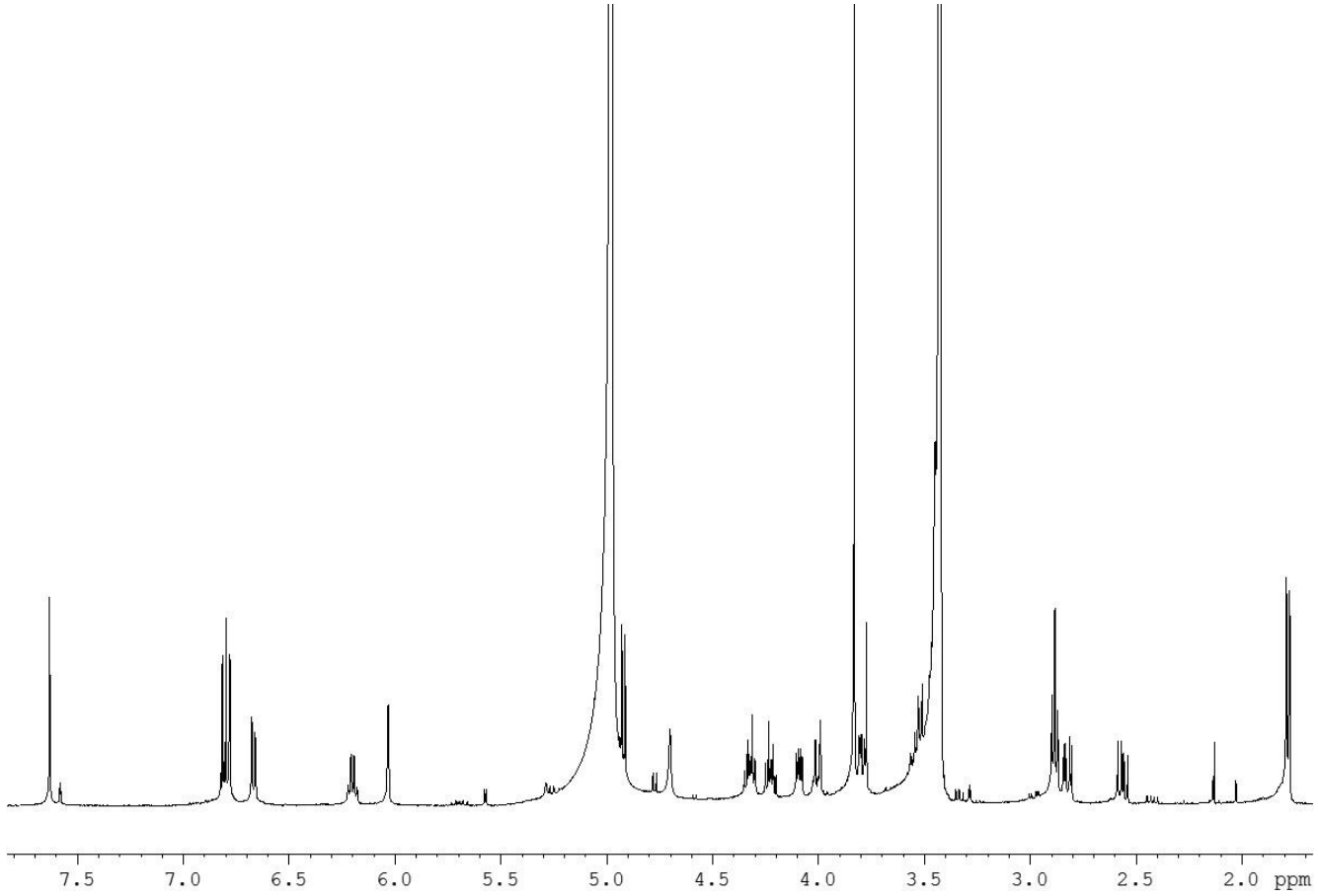
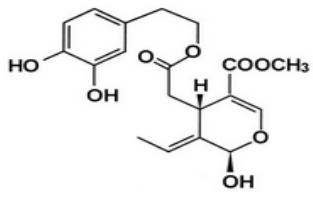
Εικόνα ΠΙ: Συγκριτικό φάσμα των 4 προτύπων διαλυμάτων ελευρωπαΐνης υπό διαφορετική ποσότητα οξέος και διαφορετικό χρόνο θέρμανσης, όπου: 43 → 200μL HCl/2h, 45 → 400μL HCl/2h, 47 → 400μL HCl/4h, 49 → 600μL HCl/2h



Εικόνα Π2: Πρότυπο μονοδιάστατο φάσμα ^1H NMR στα 500 MHz της Τυροσόλης.



Εικόνα Π3: Πρότυπο μονοδιάστατο φάσμα ^1H NMR στα 500 MHz της Υδροξυτυροσόλης.



Εικόνα Π4: Πρότυπο μονοδιάστατο φάσμα $^1\text{H NMR}$ στα 500 MHz της Ελαιοευρωπαΐνης.