

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ  
TRANS-ΛΙΠΑΡΑ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΖΩΙΚΩΝ  
ΛΙΠΑΡΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΓΟΡΑΣ ΜΕ  
ΧΡΗΣΗ GC-MS ΚΑΙ FT-IR**

ΓΚΟΥΛΟΥΣΗ Π. ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Κ. ΡΙΖΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ  
TRANS-ΛΙΠΑΡΑ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΖΩΙΚΩΝ  
ΛΙΠΑΡΩΝ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΓΟΡΑΣ ΜΕ  
ΧΡΗΣΗ GC-MS ΚΑΙ FT-IR**

Γκουλούση Π. Δήμητρα  
Επιβλέπων Καθηγητής: Απόστολος Κ. Ρίζος

Ηράκλειο 2017



UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GENERAL MASTER OF SCIENCE DEGREE

**INVESTIGATION OF TRANS FATTY ACID  
COMPOSITION IN MARGARINES AND  
BUTTERS OF THE GREEK MARKET USING  
GC-MS AND FT-IR**

Gkoulousi P. Dimitra  
Supervisor: Professor Apostolos K. Rizos

Heraklion 2017

**Επιβλέπων Καθηγητής**

**Απόστολος Κ. Ρίζος**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης

**Μέλη τριμελούς εξεταστικής επιτροπής:**

**Απόστολος Κ. Ρίζος**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης

**Αριστείδης Μ. Τσατσάκης**

Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

**Εμμανουήλ Τζατζαράκης**

Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης και τους καθηγητές που δέχτηκαν την εισαγωγή μου στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης και ιδιαίτέρως τον καθηγητή κ. *Απόστολο Ρίζο* για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή του ώστε να φέρω εις πέρας το αντικείμενο μελέτης που μου ανέθεσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής κ. *Εμμανουήλ Τζατζαράκη* για την καθοδήγηση και την επίβλεψη του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων μου, τον κ. *Εμμανουήλ Μπαρμπούνη* για την πολύτιμη βοήθεια του και την άριστη συνεργασία μας, καθώς και τον Καθηγητή κ. *Αριστείδη Τσατσάκη*, Διευθυντή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας, για την δυνατότητα που μου προσέφερε να διεκπεραιώσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, καθώς, και τον Δρ. *Εμμανουήλ Μπαρμπούνη* για την αμέριστη βοήθειά του.

Εν συνεχείᾳ, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου *Μαρία Αγγελάκη*, *Φαίδρα Αγγελάκη*, *Τζίνα Καλαφατάκη*, *Γιάννη Κουρτικάκη*, *Σωτήρη Μαυρίκη*, *Άννα Σπανάκη* και *Γιώργο Σφακάκη* για την βοήθειά τους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τον πατέρα μου *Παναγιώτη Γκουλούση*, την μητέρα μου *Ελισάβετ Αννφαντάκη* και την αδερφή μου *Κατερίνα Γκουλούση* καθώς και στον σύντροφό μου *Μιχάλη Καλογεράκη*, για την υποστήριξη, την βοήθεια και την ενθάρρυνση στο εγχείρημά μου, αυτό.

# Πίνακας περιεχομένων

Σελίδα

Περίληψη.....-9-

## Κεφάλαιο 1

1. Εισαγωγή.....	-14-
1.1. Ορισμός.....	-14-
1.2. Κατηγοριοποίηση trans- λιπαρών.....	-17-
1.3. Ιστορική αναδρομή.....	-18-
1.3.1. Ανάπτυξη της μεθόδου της υδρογόνωσης και πρώτες εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων.....	-18-
1.3.2. Ανησυχίες για την ασφάλεια κατανάλωσης των TFA.....	-19-
1.3.3. Η βιομηχανία ζάχαρης ενοχοποιεί τα κορεσμένα λιπαρά για την εκδήλωση καρδιακών παθήσεων.....	-20-
1.4. Ισχύουσα νομοθεσία.....	-21-
1.4.1. Ισχύουσα νομοθεσία στις χώρες τις Ευρώπης.....	-21-
1.4.2. Ευρωπαϊκές χώρες που έχουν θεσπίσει την εθελοντική μείωση των TFA.....	-22-
1.4.3. Ισχύουσα νομοθεσία στην Αμερική.....	-23-
1.4.4. Η «πρωτοπόρος» Δανία.....	-23-
1.5 Επιπτώσεις στην υγεία.....	-25-
1.5.1. TFA και Στεφανιαία νόσος.....	-25-
1.5.2. TFA και Διαβήτης τύπου 2.....	-28-
1.5.3. TFA και εκδήλωση της ασθένειας Alzheimer.....	-30-
1.6. Μεσογειακή Δίαιτα.....	-31-

1.6.1. Προστατευτικοί μηχανισμοί της Μεσογειακής Δίαιτας.....	-31-
1.6.2. Μελέτες Δευτερογενούς Πρόληψης.....	-33-
<b>Κεφάλαιο 2</b>	
2.Πειραματικό μέρος.....	-36-
2.1. Στόχος και αντικείμενο μελέτης.....	-36-
2.2. Δειγματοληψία.....	-37-
2.3. Πειραματική διαδικασία.....	-37-
2.3.1. Αντιδραστήρια.....	-37-
2.3.2. Επεξεργασία δειγμάτων.....	-37-
2.4. Οργανολογία.....	-38-
2.4.1. Αέρια Χρωματογραφία.....	-39-
2.4.2. Φασματομετρία Μάζας.....	-39-
2.4.2.1. Αναλυτής Μαζών.....	-39-
2.4.3. Συνθήκες Ανάλυσης.....	-40-
2.4.4. Ανάλυση Δειγμάτων με <i>FTIR- ATR</i> (Fourier Transform Infrared Spectroscopy).....	-42-
2.4.4.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier ( <i>FTIR</i> ).....	-42-
2.4.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης ( <i>ATR</i> ).....	-44-
2.4.4.3. Συνθήκες Ανάλυσης.....	-46-

## **Κεφάλαιο 3**

3. Αποτελέσματα.....-47-

    3.1. Αποτελέσματα και χαρακτηρισμός κορυφών *GC-MS*.....-47-

    3.2. Αποτελέσματα και χαρακτηρισμός κορυφών *FTIR- ATR*.....-57-

## **Κεφάλαιο 4**

4. Συζήτηση Αποτελεσμάτων.....-60-

    4.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα...-60-

    4.2. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες παγκοσμίως....-64-

    4.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες Ευρωπαϊκών χωρών.....-65-

    4.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων *GC-MS* και *FTIR- ATR*.....-69-

## **Κεφάλαιο 5**

Παράρτημα I/ Ευρετήριο εικόνων.....-72-

Βιβλιογραφία.....-73-

## **Περίληψη**

Από την ανάπτυξη της διαδικασίας της υδρογόνωσης μέχρι σήμερα, τα κορεσμένα λιπαρά κατείχαν πρώτη θέση στις διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών. Μετά από χρόνια ερευνών, αποδείχθηκε ότι τα κορεσμένα λιπαρά είναι υπεύθυνα για μια πληθώρα ασθενειών μέχρι που το 2015 η Υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (FDA) επέβαλλε την πλήρη απομάκρυνσή τους από όλα τα επεξεργασμένα τρόφιμα. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη μεθόδου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των trans- λιπαρών οξέων σε δείγματα μαργαρινών, βουτύρων και ελαίων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά με χρήση αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (*GC-MS*), σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα της τεχνικής φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier σε συνδυασμό με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (*FTIR- ATR*). Τέλος, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα, στην Ευρώπη αλλά και παγκοσμίως. Σαν trans-λιπαρά οξέα (TFA) ορίζονται τα γεωμετρικά ισομερή των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Αυτά που ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το t-ελαϊκό οξύ ( $C_{18:1}$ ), t,t- Λινολεϊκό οξύ ( $C_{18:2}$ ) και t,t,t- α- Λινολενικό οξύ ( $C_{18:3}$ ). Συλλέχθηκαν τριάντα δύο (32) δείγματα βουτύρων και μαργαρινών καθώς και επτά (7) δείγματα ελαίων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά και η επεξεργασία τους έγινε με την διαδικασία της μεθυλίωσης. Κανένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν, με εξαίρεση το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, δεν ήταν απαλλαγμένο από την παρουσία των TFA. Η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασαν συνολική συγκέντρωση χαμηλότερη του 1% w/w (<1% w/w) με εξαίρεση δύο (2) δείγματα που παρουσίασαν συνολική συγκέντρωση TFA 1.23 και 1.55% w/w. Το t,t- Λινολεϊκό οξύ ( $C_{18:2}$ ) είναι αυτό που επικρατεί στα περισσότερα δείγματα σε σύγκριση με το t-ελαϊκό οξύ ( $C_{18:1}$ ), με μέση συγκέντρωση 0.28% w/w και 0.14% w/w, αντίστοιχα, ενώ το t,t,t- α- Λινολενικό οξύ ( $C_{18:3}$ ) παρουσιάζει συγκέντρωση μόλις 0.11% w/w. Όπως παρατηρήθηκε, δείγματα μαργαρίνης περιείχαν κατά μέσο όρο 0.56% w/w TFA (0.26 έως 1.55% w/w), ζωικής προέλευσης- βιούτυρα 0.45% w/w (0.21 έως 0.74% w/w) και μείγματα 0.54% w/w (0.37 έως 0.85% w/w). Για να πραγματοποιηθεί συσχέτιση μεταξύ

των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η κορυφή που εμφανίζεται στους  $966 \text{ cm}^{-1}$  στα *FTIR* φάσματα, και παρατηρήθηκε πως υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών. Ο συνδυασμός τους, βέβαια, δεν παύει να είναι απαραίτητος για την διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με αντίστοιχες μελέτες παρατηρήθηκε ότι στο πέρασμα του χρόνου η περιεκτικότητα των σκευασμάτων αυτών σε TFA έχει μειωθεί αισθητά. Μελέτη που έγινε το 1994 από τον A. Καφάτο και την ομάδα του, έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε t-C<sub>18:1</sub> κυμαίνεται από 5.40 μέχρι 9.54% και σε t- C<sub>18:2</sub> από 0.40 μέχρι 3.65%. Στην παρούσα μελέτη οι αντίστοιχες τιμές είναι 0.16% (0.02- 1.12%) και 0,26% (0.04- 0.79%) καθώς και σε αντίστοιχες πρόσφατες μελέτες τα επίπεδα συγκέντρωσης των TFA είναι χαμηλότερα του 1% w/w. Σε σύγκριση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (Transfair study), αλλά και παγκοσμίως, η περιεκτικότητα διαφόρων σκευασμάτων σε TFA έχει μειωθεί αισθητά με τις Μεσογειακές χώρες να κατέχουν τις τελευταίες θέσεις στα ποσοστά ημερήσιας κατανάλωσης TFA. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στον τρόπο παρασκευής των διαφόρων σκευασμάτων, καθώς η Μεσογειακή διατροφή βασίζεται στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο είναι απαλλαγμένο από TFA.

## **Abstract**

Since the discovery of the hydrogenation process, saturated fatty acids hold the first place of consumers eating habits. After years of research, it has been shown that saturated fats are responsible for various diseases and in 2015, the Food and Drug Administration (FDA) required its full removal from all processed foods. The aim of this study, is the development of a method for the qualitative and quantitative determination of levels of trans-fatty acids in margarine samples, butters and oils which are sold in the Greek market.

To achieve this, a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique and an attenuated total reflectance with a Fourier transform infrared spectroscopy technique (FTIR-ATR) was applied and their results were compared. Furthermore, these results were compared with similar studies in Greece, Europe and even on a worldwide level. Trans Fatty Acids (TFAs) are geometric isomers of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. Those which are detected and studied in the present work are t-oleic acid ( $C_{18:1}$ ), t, t- Linoleic acid ( $C_{18:2}$ ), and t,t,t- a- Linolenic acid ( $C_{18:3}$ ). Thirty-two butter and margarine samples and seven oil samples were collected and their preparation was done according to the methylation process. None of the analyzed samples, with the exception of the extra virgin olive oil, was trans free. Most of the samples had a total concentration of TFA lower than 1% w/w (<1% w/w) except for two, which showed a total TFA concentration of 1.23 and 1.55% w/w. The t,t- Linoleic acid ( $C_{18:2}$ ) is the one which prevails in most samples as compared to the t-oleic acid ( $C_{18:1}$ ), with an average concentration of 0.28% w/w and 0.14% w/w, respectively, while the t, t, t- a- Linolenic acid's ( $C_{18:3}$ ) concentration appeared to be only 0.11% w/w. As observed, margarine samples contained an average of 0,56% w/w TFA (0.26 up to 1.55% w/w), animal origin butters 0.45% w/w (0.21 up to 0.74 % w/w) and mixtures 0.54% w/w (0.37 up to 0,85% w/w).

In order to compare and correlate the obtained results from the two aforementioned techniques we used, a peak at  $966\text{ cm}^{-1}$  from the FTIR spectra was used and showed a correlation between both methods. Both techniques are necessary though in order to obtain more valid results.

Comparing the results of this study with similar studies, it was observed that over the years the concentration of these formulations in TFA decreased significantly. A study conducted in 1994 by A. Kafatos and his team, showed that the concentration of t-C<sub>18:1</sub> ranged from 5.40 to 9.54% and t- C<sub>18:2</sub> from 0.40 to 3.65%. In this study, the corresponding values were 0.16% (0.02- 1.12%) and 0.26% (0.04- 0.79%) and in recent studies the TFA levels were found to be lower than 1% w/w.

In comparison to other European countries (Transfair study), but also globally, the content of different formulations in TFA is significantly reduced with the Mediterranean countries having the least daily consumption rates of TFA. This is probably due to the way of preparing the various formulations, as the Mediterranean diet is based on extra virgin olive oil, which is TFA free.

## **Ευρετήριο όρων:**

**TFA:** trans- fatty acids (trans λιπαρά οξέα)

**IP-TFA:** industrially produced partially hydrogenated fat

**RP-TFA:** ruminant produced trans fatty acids in dairy and meat products

**LDL:** low-density lipoprotein

**HDL:** high- density lipoprotein

**FDA:** Food & Drug Administration

**CHD:** Coronary heart disease (Στεφανιαία νόσος)

**SFA:** Saturated fatty acid

**WHO:** World Health Organization

**PUFA:** Polyunsaturated fatty acid

**MUFA:** Monounsaturated fatty acid

**PHVO:** Partially Hydrogenated Vegetable Oil

**AD:** νόσος Alzheimer

**PAF:** παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

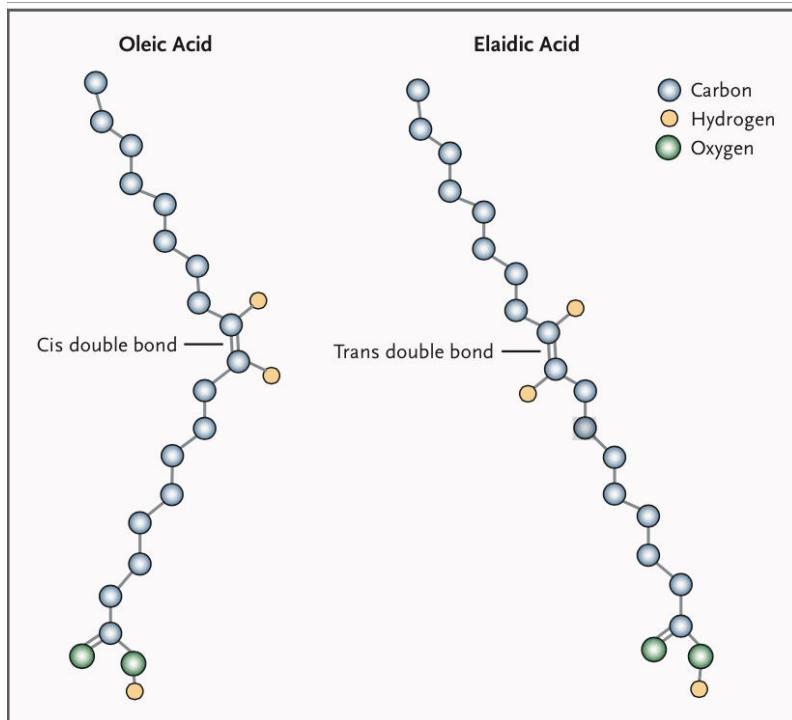
# **Κεφάλαιο 1**

## **1. Εισαγωγή**

Ο σημερινός τρόπος ζωής σε συνδυασμό με τις κακές διατροφικές συνήθειες έχει σαν αποτέλεσμα, την εμφάνιση πολλών προβλημάτων υγείας. Οι επίσημες διατροφικές οδηγίες όμως, δεν βοήθησαν προς τη σωστή κατεύθυνση και αυτό γιατί ώθησαν τον κόσμο προς την κατανάλωση χημικά επεξεργασμένων προϊόντων. Για παράδειγμα, η διαδικασία απόσμησης και ραφιναρίσματος ενός σπορελαίου, προκαλεί ισομερίωση των cis- λιπαρών οξέων σε trans- λιπαρά οξέα. Για πολλές δεκαετίες, οι καταναλωτές κατακλύστηκαν από εκατομμύρια τόνους μαργαρινών με το απατηλό μήνυμα ότι είναι πιο υγειεινό λόγω της απουσίας χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών. Το 2015 η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) με απόφασή της δεν αναγνωρίζει πια ως ασφαλή τα μερικώς υδρογονωμένα και όρισε μια προθεσμία τριών ετών για την πλήρη απομάκρυνσή τους από όλα τα επεξεργασμένα τρόφιμα.

## **1.1. Ορισμός**

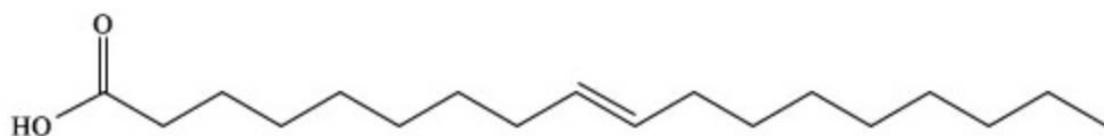
Τα trans-λιπαρά οξέα (TFA) είναι γεωμετρικά ισομερή των μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και ορίζονται ως «τα λιπαρά οξέα με τουλάχιστον ένα διακοπτόμενο (από τουλάχιστον μία ομάδα μεθυλενίου) διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα». [1].



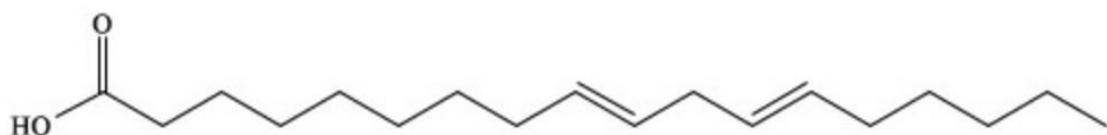
**Εικόνα 1.1.1. :** Απεικόνιση cis-, και trans- λιπαρών οξέων με τον ίδιο αριθμό ανθράκων στο μόριο τους.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται οι δομές του ελαϊκού οξέος και του ελαϊδικού οξέος. Είναι λιπαρά οξέα με 18 άτομα άνθρακα με ένα διπλό δεσμό. Το ελαϊκό οξύ έχει ένα cis διπλό δεσμό (άτομα υδρογόνου είναι στην ίδια πλευρά του δεσμού), ο οποίος προκαλεί μια κάμψη στην αλυσίδα του λιπαρού οξέος σε αντίθεση με το ελαϊδικό οξύ που έχει έναν trans διπλό δεσμό (άτομα υδρογόνου είναι σε αντίθετες πλευρές του δεσμού), με αποτέλεσμα η αλυσίδα του λιπαρού οξέος να είναι ευθεία. [2]

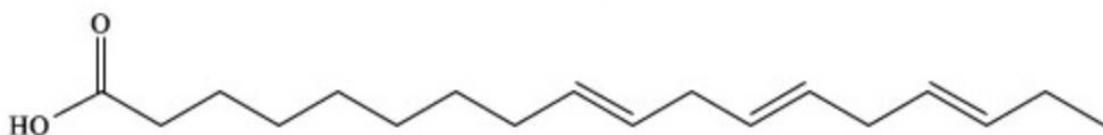
Τα TFA που ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το t-ελαϊκό οξύ ( $C_{18:1}$ ), t,t- Λινολεϊκό οξύ ( $C_{18:2}$ ) και t,t,t- Άλφα- Λινολενικό οξύ ( $C_{18:3}$ ) (Εικόνα 1.1.2).



*trans* -oleic acid



*t,t*-linoleic acid (linolelaidic acid)



*t,t,t*-  $\alpha$  -linolenic acid (linolenelaidic acid)

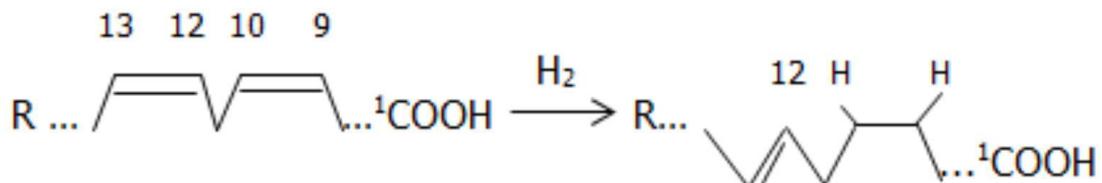
**Εικόνα 1.1.2.** : Δομές των TFA που μελετήθηκαν. (α) *t*-ελαϊκό οξύ, (β) *t,t*- Λινολεϊκό οξύ,  
(γ) *t,t,t*-  $\alpha$ - Λινολενικό οξύ

## **1.2. Κατηγοριοποίηση trans- λιπαρών οξέων**

Τα λιπαρά οξέα βρίσκονται είτε σε υγρή, είτε σε στερεή κατάσταση και ονομάζονται «έλαια», όπως το ηλιέλαιο και το αραβοσιτέλαιο και «λίπη», όπως τα βούτυρα και οι μαργαρίνες.

Τα TFA που βρίσκονται σε δείγματα τροφίμων μπορεί να προέρχονται από δύο διαφορετικές πηγές:[3]

1. Παράγονται στα στομάχια μηρυκαστικών ζώων και παρατηρούνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα κρέατος (φυσική πηγή προέλευσης) και ονομάζονται ruminal produced trans fatty acids (RP-TFA).
2. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της μερικής υδρογόνωσης των φυτικών ελαίων (Βιομηχανική πηγή προέλευσης) και ονομάζονται industrially produced hydrogenated fat (IP-TFA). Τα φυτικά έλαια μετατρέπονται σε ημι-στερεά λίπη για χρήση σε μαργαρίνες, εμπορικό μαγείρεμα, και στην παραγωγική διαδικασία. Η κύρια διαδικασία παραγωγής μαργαρίνης είναι η διαδικασία υδρογόνωσης. Στη διαδικασία υδρογόνωσης τα ακόρεστα λιπαρά οξέα απορροφούν υδρογόνο και μετατρέπονται σε κορεσμένα ή υφίστανται αναδιάταξη. Έτσι, προκύπτει ισομερισμός από cis σε trans διπλό δεσμό (Εικόνα 1.2.1).



**Εικόνα 1.2.1. :** Διαδικασία μερικής υδρογόνωσης όπου ένας cis δεσμός μετατρέπεται σε trans με την προσθήκη H<sub>2</sub>.

Από τη σκοπιά της βιομηχανίας τροφίμων, τα μερικώς υδρογονωμένα φυτικά έλαια είναι ελκυστικά λόγω της μετατροπής σε ημι-στερεά λίπη, με βελτιωμένο χρώμα, υψηλή σταθερότητα και με τις οργανοληπτικές ιδιότητες της λιπαρής ύλης. [4]

## **1.3. Ιστορική αναδρομή**

### **1.3.1. Ανάπτυξη της μεθόδου της υδρογόνωσης και πρώτες εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων**

Ο Paul Sabatier ήταν ένας επιστήμονας ο οποίος διερεύνησε την χημική αντίδραση της υδρογόνωσης για να δημιουργήσει τα λίπη που αποτελούν, σήμερα, τη βάση των προϊόντων, όπως η μαργαρίνη. Επικεντρώθηκε κυρίως στην υδρογόνωση των ατμών, αλλά αυτό ήταν η αρχή για να καταγράψει τη διαδικασία για να δημιουργηθούν τα λίπη που είναι τώρα γνωστά ως TFA. [5]

Η ιδέα αυτή τελειοποιήθηκε από τον Wilhelm Normall, ο οποίος ήταν Γερμανός χημικός, που έδειξε ότι τα υγρά έλαια μπορούν να υδρογονωθούν ώστε να αλλάξουν οι φυσικές τους ιδιότητες. Η διαδικασία κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1902 και συνέχισε χτίζοντας το Herford, μια εταιρεία που παρήγαγε σκληρά λίπη. Οι Joseph Crasfield & Sons Ltd επέκτειναν τη διαδικασία σε ένα εργοστάσιο παραγωγής μεγάλης κλίμακας στην Αγγλία και η παραγωγή υδρογονωμένων λιπών άρχισε το 1909.[6]

Η εταιρία Procter & Gamble απέκτησε τα δικαιώματα ευρεσιτεχνίας στις ΗΠΑ και κυκλοφόρησε το πρώτο υδρογονωμένο προϊόν, το Crisco (Εικόνα 1.3.1.1), το 1911. Αυτό το προϊόν δημιουργήθηκε από βαμβακέλαιο που είχε υποστεί υδρογόνωση για να γίνει ημι-στερεό σε θερμοκρασία δωματίου. Έκανε μια αισθητά επιτυχή είσοδο στην αγορά, καθώς προσφερόταν δωρεάν με βιβλία μαγειρικής που περιελάμβαναν συνταγές που συνιστούσαν το Crisco ως συστατικό. [7]



**Εικόνα 1.3.1.1. :** Το πρώτο υδρογονωμένο προϊόν που κυκλοφόρησε το 1911.

### **1.3.2. Ανησυχίες για την ασφάλεια κατανάλωσης των TFA**

Τα πρώτα στοιχεία ανησυχίας για την ασφάλεια των trans λιπαρών που υπάρχουν στο υδρογονωμένο λίπος και την επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου από την ευρεία κατανάλωσή τους, εμφανίστηκε στη δεκαετία του 1980 και αφορούσε αυξημένο κίνδυνο Στεφανιαίας νόσου. [8]

Αυτό οδήγησε σε περαιτέρω έρευνα και εκτίμηση του θέματος. Από το 1994 φάνηκε ότι η κατανάλωση trans λιπαρών ήταν πιθανό να προκαλέσει 30.000 θανάτους κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες και μόνο. Ακτιβιστές υγείας «καταδίκασαν» την κατανάλωση trans λιπαρών και η κυβέρνηση εισήγαγε κανονισμούς [9] για να ελαχιστοποιηθεί η παραγωγή των τρανς λιπαρών. [10]

Βιομηχανίες τροφίμων επηρεάστηκαν σε μεγάλο βαθμό από τα δεδομένα αυτά αλλά και από τις δημόσιες απαιτήσεις για πιο υγιεινά λίπη στα προϊόντα διατροφής. Πολλοί κατασκευαστές, συμπεριλαμβανομένων αυτών του Crisco από την Procter & Gamble χρειάστηκε να επαναπροσδιορίσουν τη διαδικασία παραγωγής.

Επιπλέον, μεγάλες αλυσίδες εταιρειών τροφίμων είχαν την υποχρέωση να τροποποιήσουν τα λίπη που χρησιμοποιούνται στις διαδικασίες μαγειρέματος τους και να ελαχιστοποιήσουν τη χρήση των TFA. Το 1999 η FDA προτείνει η περιεκτικότητα των προϊόντων σε TFA να αναγράφεται στη συσκευασία και το 2002 το Ινστιτούτο Ιατρικής συνιστά ότι θα πρέπει να καταναλώνονται όσο το δυνατόν λιγότερα TFA σε ημερήσια βάση. Η Δανία το 2003 είναι η πρώτη Ευρωπαϊκή χώρα, η οποία με νομοθεσία επιχειρεί να εξαλείψει τα τεχνητά TFA από τα τρόφιμα [11] και η FDA οριστικοποιεί τον κανονισμό που απαιτεί από τους κατασκευαστές τροφίμων από το 2006 να τοποθετούν ετικέτα στα τρόφιμα όπου ν' αναγράφεται η περιεκτικότητα σε TFA. Έτσι, το 2006 η επισήμανση των TFA καθίσταται υποχρεωτική σε συσκευασμένα τρόφιμα (Εικόνα 1.3.3.1).



**Εικόνα 1.3.3.1.** : Συσκευασία γάλακτος, όπου αναγράφεται η ποσότητα των TFA.

Την ίδια χρονιά στη Νέα Υόρκη το Συμβούλιο Υγείας εκδίδει κανονισμό που αφορά σχεδόν την εξάλειψη των τεχνητών TFA από τα τρόφιμα που πωλούνται σε εστιατόρια και ζαχαροπλαστεία της πόλης. Το 2012 το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων διαπιστώνει 58% μείωση σε TFA στο αίμα των καταναλωτών μεταξύ των ετών 2000 και 2009. [12] Τέλος, το 2015 η FDA ανακοινώνει ότι τα TFA δεν αναγνωρίζονται πλέον ως ασφαλή λιπαρά οξέα για τον οργανισμό.[13]

### **1.3.3. Η βιομηχανία ζάχαρης ενοχοποιεί τα κορεσμένα λιπαρά για την εκδήλωση καρδιακών παθήσεων.**

Κατά τη δεκαετία του 1950, τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας λόγω καρδιοαγγειακών παθήσεων στην Αμερική, οδήγησαν στην πραγματοποίηση ερευνών που μελετούσαν τον ρόλο των διαιτητικών παραγόντων. Η βιομηχανία της ζάχαρης χρημάτισε επιστήμονες, οι οποίοι τόνισαν σαν βασικό αίτιο καρδιοαγγειακών παθήσεων τα κορεσμένα λιπαρά ενώ η ζάχαρη “απενοχοποιήθηκε”.

H Cristin E. Kearns, μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια ανακάλυψε χιλιάδες σελίδες αλληλογραφίας και άλλων εγγράφων στα αρχεία του Χάρβαρντ, του πανεπιστημίου του Ιλινόις και άλλων βιβλιοθηκών. [14] Τα έγγραφα δείχνουν ότι μια εμπορική ομάδα, η Sugar Association, χρημάτισε τρεις επιστήμονες του Χάρβαρντ ώστε να δημοσιεύσουν το 1967 μια αναθεώρηση έρευνας σχετικά με τη ζάχαρη, η οποία ελαχιστοποιεί τη σύνδεση μεταξύ ζάχαρης και παθήσεων της καρδιάς και ταυτόχρονα να ενοχοποιεί τα κορεσμένα λιπαρά, με αντίτιμο περίπου 50.000 δολάρια. Συγκεκριμένα, τα έγγραφα δείχνουν ότι το 1964, ο John Hickson, κορυφαίο στέλεχος της βιομηχανίας ζάχαρης, συζήτησε ένα σχέδιο μαζί με άλλους στη βιομηχανία για να κατευθύνει την κοινή γνώμη. Ο κ. Hickson πρότεινε να αντικρούσουν τα ανησυχητικά συμπεράσματα των μέχρι τότε ερευνών κατά της ζάχαρης με μια χρηματοδοτούμενη έρευνα από την ίδια την βιομηχανία. Έτσι, θα υπήρχε η δυνατότητα να δημοσιευθούν δικά τους, ελεγχόμενα δεδομένα και ν' αντικρουστούν τα μέχρι τότε στοιχεία. Ένας από τους επιστήμονες που χρηματίστηκε, επίσης, ήταν ο D. Mark Hegsted, ο οποίος έφτασε να γίνει επικεφαλής Διατροφής στο αμερικανικό υπουργείο Γεωργίας. Ένας άλλος ήταν ο Δρ. Fredrick J. Stare, πρόεδρος του τμήματος Διατροφής του πανεπιστημίου του Χάρβαρντ.

## **1.4. Ισχύουσα νομοθεσία**

### **1.4.1. Ισχύουσα νομοθεσία στις γώρες της Ευρώπης**

Η πρώτη χώρα στον κόσμο που εισήγαγε νομοθεσία για τον περιορισμό των TFA ήταν η Δανία το 2003. Η νομοθεσία της Δανίας θέτει ένα ανώτατο όριο των 2 g /100 g λίπους ή ελαίου για τα βιομηχανικώς παραγόμενα TFA. [15] Ακολούθησαν το 2008 η Ελβετία (2008), [16,17] το 2009 η Αυστρία, [18] το 2011 η Ισλανδία, [19] το 2014 η Ουγγαρία, [20] και το 2014 η Νορβηγία. [21]

#### **1.4.2. Ευρωπαϊκές χώρες που έχουν θεσπίσει την εθελοντική μείωση των TFA**

1. Χώρες όπως το Βέλγιο, η Γαλλία, η Ολλανδία, η Πολωνία και η Τσεχία έχουν επιλέξει προγράμματα επισήμανσης, δηλαδή ένα προαιρετικό σύστημα επισήμανσης για προϊόντα που πληρούν μια σειρά από διατροφικά κριτήρια που καθορίζονται από την εθνική κυβέρνηση. Μία από τις πολλές απαιτήσεις είναι «το περιεχόμενο σε TFA <1,3% της συνολικής ενέργειας. [22-24]
2. Στη Γερμανία με κοινή πρωτοβουλία της γερμανικής βιομηχανίας τροφίμων και του Ομοσπονδιακού Υπουργείου Τροφίμων, Γεωργίας και Προστασίας των Καταναλωτών αναπτύσσονται κατευθυντήριες γραμμές για την ελαχιστοποίηση των TFA στα τρόφιμα και τη χρήση εναλλακτικών πηγών. [25]
3. Στην Ολλανδία, πραγματοποιούνται πολλαπλές παρεμβάσεις όπως: έρευνα και ανάπτυξη εναλλακτικών λύσεων έναντι της χρήσης TFA, εκπαίδευση της βιομηχανίας τροφίμων σχετικά με αυτό καθώς και δημόσια εκπαίδευση, παρακολούθηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. [26]
4. Στο Ηνωμένο Βασίλειο έχει εφαρμοστεί ένα ευρύ σύνολο στόχων της δημόσιας υγείας, όπου οι εταιρείες τροφίμων μπορούν να δεσμευτούν εθελοντικά για την πλήρη εξάλειψη των βιομηχανικών TFA από όλα τα τρόφιμα. [27]

Στη χώρα μας μέχρι στιγμής, δεν έχει θεσπιστεί κάποια νομοθετική απαγόρευση της περιεκτικότητας των τροφίμων σε TFA, με το πέρασμα των χρόνων όμως η περιεκτικότητα αυτή έχει μειωθεί αισθητά από τις βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων, όπως φαίνεται από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια.

#### **1.4.3. Ισχύουσα νομοθεσία στην Αμερική**

Στις ΗΠΑ το 2007 η τοπική νομοθεσία, που ρυθμίζει τη λειτουργία των εστιατορίων στη Νέα Υόρκη και που επηρεάζει τα μη συσκευασμένα τρόφιμα στην Καλιφόρνια το 2010, έθεσαν περιορισμό για την χρήση των TFA. [28] Επιπλέον, η FDA έχει εκδώσει ανακοίνωση ότι τα βιομηχανικώς παραγόμενα TFA δεν θεωρούνται ως «ασφαλή». Εάν εφαρμοστεί πλήρως, όπως προβλέπεται, μέχρι τον Ιούνιο του 2018 τα βιομηχανικώς παραγόμενα TFA θα θεωρούνται μη εγκεκριμένα πρόσθετα τροφίμων και τα τρόφιμα που τα περιέχουν δεν θα μπορούν να πωλούνται νόμιμα. [29] Η επιτυχής εφαρμογή των πολιτικών αυτών καταδεικνύει ότι η μείωση των TFA στα τρόφιμα είναι εφικτή μέσω των νομοθετικών ορίων.

#### **1.4.4. Η «πρωτοπόρος» Δανία**

Η Δανία ήταν η πρώτη χώρα στον κόσμο που επέβαλε όριο στην περιεκτικότητα των τεχνητών TFA σε όλα τα έλαια και λίπη που προορίζονται για κατανάλωση. Το έναυσμα για τον εν λόγω περιορισμό δόθηκε από μια έρευνα του 1993 στο Lancet σχετικά με το αντίκτυπο που έχει η πρόσληψη TFA σε γυναίκες σχετικά με τον κίνδυνο εκδήλωσης Στεφανιαίας νόσου (CHD). [30-32] Έτσι, το Συμβούλιο Διατροφής της Δανίας δημοσίευσε μια έκθεση το 2001 όπου, εκτιμάται ότι 50.000 Δανοί ήταν σε υψηλό κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα με κύριο αίτιο την πρόσληψη των TFA. Για να μειωθεί ο αριθμός αυτός, πρότεινε το Συμβούλιο να εισάγει η Κυβέρνηση νομοθεσία που να περιορίζει το περιεχόμενο σε TFA στα τρόφιμα. [32, 33] Η βιομηχανία μαργαρίνης της Δανίας, η οποία είχε ήδη αναπτύξει προϊόντα με χαμηλή περιεκτικότητα σε TFA μετά τη δημοσίευση στο Lancet [31], ήταν κατά της πρότασης αυτής, όπως επίσης του Υπουργείου Υγείας αλλά και του πληθυσμού της Δανίας.

Η εν λόγω νομοθεσία παρουσιάστηκε στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο το 2003 και εγκρίθηκε (Executive Order No 160 of 11 March 2003 on the Content of Trans Fatty Acids in Oils and Fats). Τέθηκε ως ανώτατο όριο περιεκτικότητας τεχνητών TFA σε τρόφιμα τα 2 g ανά 100 g λίπους (2% του συνολικού λίπους). Μετά από μια μεταβατική περίοδο 6 μηνών, το όριο αυτό εφαρμόστηκε στη Δανία σε όλα τα τρόφιμα. [15]

Μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της νομοθεσίας αυτής δείχνουν ότι τα τεχνητά TFA έχουν «σχεδόν εξαλειφθεί» από τη αγορά τροφίμων της Δανίας. [30, 34] Τα στοιχεία δείχνουν ότι τα ποσοστά θνησιμότητας λόγω CHD στη Δανία για την περίοδο 1980-2009 παρουσίαζαν μεγάλη μείωση, μέχρι και 70%. Η μείωση, αυτή, ήταν ιδιαίτερα υψηλή μεταξύ 2000 και 2009 σε σύγκριση με άλλες χώρες της Ε.Ε. [35]

Τα TFA έχουν αντικατασταθεί κυρίως από SFA στα δύο τρίτα περίπου των προϊόντων. Στο υπόλοιπο ένα τρίτο, έχουν αντικατασταθεί από μονοακόρεστα ή πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι πιο ευνοϊκά όσον αφορά την έκβαση της υγείας.

## **1.5. Επιπτώσεις στην υγεία**

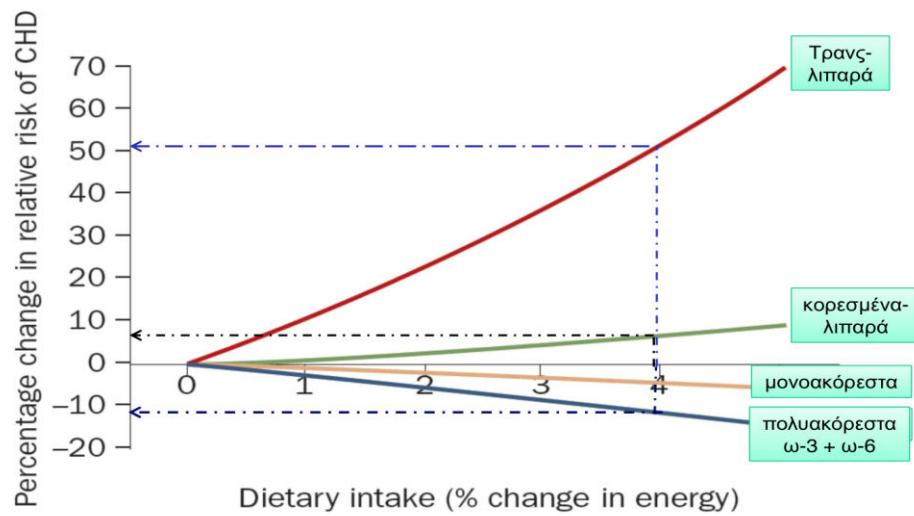
Ομάδα εμπειρογνωμόνων των WHO/FAO [36,37] επιβεβαίωσε ότι διατροφή πλούσια σε TFA έχει αρνητικές επιπτώσεις στις λιποπρωτεΐνες του αίματος και κατά συνέπεια στα άτομα με κίνδυνο εμφάνισης CHD. Οι δυσμενείς επιπτώσεις στην CHD προκαλούνται από:

1. Αυξήσεις στις συγκεντρώσεις της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης χοληστερόλης (LDL-C) και λιποπρωτεΐνης (a) (Lp (a)).
2. Τις μειώσεις των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνών χοληστερόλης (HDL-C).
3. Την προώθηση του πλάσματος της φλεγμονής και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, και τις πιθανές επιπτώσεις στην πήξη του αίματος.
4. Αντίσταση στην ινσουλίνη και τον εκτοπισμό των απαραίτητων λιπαρών οξέων από μεμβράνες, που επηρεάζουν τις λειτουργίες προστανγλαδινών που σχετίζονται, ενδεχομένως, και άλλων βασικών λειτουργιών της μεμβράνης.

### **1.5.1. TFA και Στεφανιαία Νόσος**

Παρά τις εγγενείς διαφορές στη χημική δομή, τα TFA βιομηχανικής ή φυσικής προέλευσης μπορεί να έχουν παρόμοιες συνέπειες για τις λιποπρωτεΐνες στον ορό του αίματος όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες. Τα TFA προκαλούν αύξηση της αναλογίας των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης προς των υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνών χοληστερόλης (HDL/HDL-C), που είναι ο πιο ενδεικτικός δείκτης του κινδύνου για εκδήλωση στεφανιαίας νόσου. Παρά το γεγονός ότι τα TFA που προέρχονται από μηρυκαστικά δεν μπορούν να αφαιρεθούν εντελώς από τη διατροφή, η πρόσληψή τους είναι αρκετά χαμηλή στους περισσότερους πληθυσμούς και δεν αποτελούν σημαντικό παράγοντα κινδύνου. [38]

Η κατανάλωση TFA βιομηχανικής προέλευσης πιστεύεται ότι αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών παθήσεων με πολλούς τρόπους, όπως αλλαγές στις λιποπρωτεΐνες, αύξηση της LDL-C και Lp (a), μείωση της HDL-C, αυξημένο συνολικό δείκτη HDL/ HDL-C καθώς και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Κάθε μία από αυτές τις επιπτώσεις μειώνεται αισθητά όταν αντικατασταθούν τα TFA με cis- ακόρεστα λίπη (PUFA ή MUFA). Επίσης, οι αρνητικές επιπτώσεις των TFA επί της συνολικής αναλογίας HDL/ HDL-C και της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας φαίνεται να μειώνονται όταν αντικατασταθούν από κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA). [38] (Εικόνα 1.5.1.1).



Micha & Mozaffarian, Nature Endocrine Reviews 2009

**Εικόνα 1.5.1.1.** : Σύγκριση επικινδυνότητας εκδήλωσης CHD ανάλογα με την ημερήσια πρόσληψη TFA, κορεσμάνων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Όλα αυτά υποδηλώνουν ότι, μεταξύ των διαιτητικών λιπών, η κατανάλωση TFA προκαλεί χαρακτηριστικές καρδιαγγειακές και μεταβολικές επιπτώσεις, [40] επιδεινώνοντας πολλαπλά αλληλένδετα μονοπάτια που συνδέονται και με την μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης.

Οι διαφορετικές επιδράσεις των TFA με βάση το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας ή τη θέση του trans δεσμού/ δεσμών δεν έχουν τεκμηριωθεί εκτενώς. Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που συνέκριναν τα t-C<sub>18:2</sub> και t-C<sub>18:3</sub>, τα οποία παρουσιάζουν χαμηλές συγκεντρώσεις σε μερικώς υδρογονωμένα έλαια. Σε μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν βιοδείκτες κατανάλωσης TFA, και τα δύο ισομερή t-C<sub>18:1</sub> και t-C<sub>18:2</sub> φαίνεται να συνεισφέρουν στον κίνδυνο εκδήλωσης Στεφανιαίας νόσου. Με τη διαδικασία της υδρογόνωσης μπορεί να δημιουργηθούν αναλογικά περισσότερο t-C<sub>18:2</sub> ισομερή και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να έχουν μεγαλύτερη επίδραση από ό,τι θα αναμενόταν με βάση το περιεχόμενο τους επί της συνολικής περιεκτικότητας σε TFA. [39]

Υπολογίστηκε το ποσοστό κινδύνου εκδήλωσης Στεφανιαίας νόσου με την αντικατάσταση διάφορων σκευασμάτων PHVO με εναλλακτικά λίπη και έλαια. [40]

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών έδειξαν ότι η αντικατάσταση των PHVO (που έχουν 20, 35 ή 45% TFA) παρέχοντας 7,5% της συνολικής ενέργειας με οποιοδήποτε από τα εναλλακτικά λίπη / έλαια θα μειώσει τον κίνδυνο εκδήλωσης Στεφανιαίας νόσου. Για ένα PHVO περιεκτικότητας 20% σε TFA, η αντικατάστασή του με βούτυρο θα είχε ελάχιστες επιπτώσεις για τον κίνδυνο εκδήλωσης Στεφανιαίας νόσου, ενώ η αντικατάσταση με φυτικό έλαιο θα μείωνε τον κίνδυνο κατά 10%. [40]

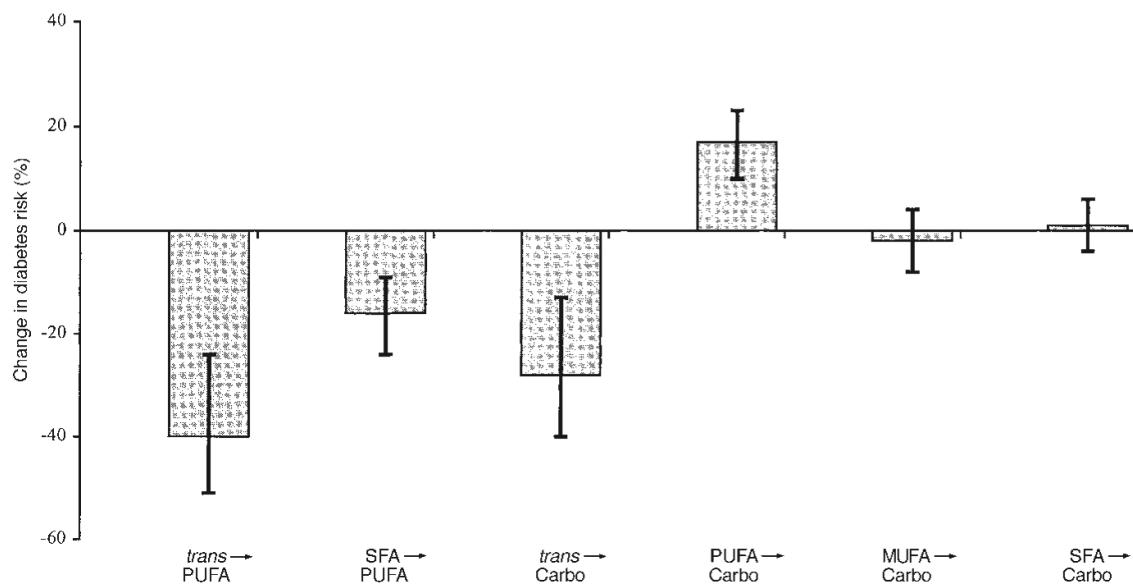
### **1.5.2. TFA και Διαβήτης τύπου 2**

Η περίσσεια σωματικού λίπους που προκύπτει από μια ανισορροπία μεταξύ της ενεργειακής πρόσληψης και της σωματικής δραστηριότητας είναι ο πρωταρχικός παράγοντας κινδύνου για τον Διαβήτη τύπου 2, [41,42] αλλά έχει μελετηθεί και ο ρόλος των λιπαρών στη συγκεκριμένη ασθένεια. Δίαιτες πλούσιες σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον έλεγχο της γλυκόζης και της ινσουλίνης σε σχέση με δίαιτες χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και υψηλές σε υδατάνθρακες. [43,44] Μελέτες έχουν τεκμηριώσει ότι η πρόσληψη TFA έχει αρνητικές επιδράσεις στο προφίλ λιποπρωτεΐνών του ορού του αίματος [45,46] καθώς και στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. [47]

Η μελέτη υγείας των νοσοκόμων (Nurses' Health Study) είναι μια διαχρονική έρευνα σχετικά με την διατροφή και τους παράγοντες του τρόπου ζωής και τις επιπτώσεις που έχουν σε χρόνιες ασθένειες σε 121.700 γυναίκες νοσηλεύτριες των ΗΠΑ ηλικίας 30-55 χρονών. Η ομάδα συγκροτήθηκε το 1976, όταν οι συμμετέχοντες συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο σχετικά με γνωστούς παράγοντες υπεύθυνους για τον κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου και καρδιαγγειακής νόσου. [48] Αποκλείστηκαν συμμετέχοντες που δεν πληρούσαν τα απαραίτητα κριτήρια όπως ημερήσια πρόσληψη ενέργειας μεταξύ 2092 και 14644 kJ/d (500 και 3500 kcal/d) και εκείνοι που ανέφεραν ιστορικό ασθενειών, όπως καρκίνο, έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο, και χειρουργική επέμβαση στεφανιαίας αρτηρίας, λόγω του ότι μπορεί να ακολουθούσαν ειδικό διαιτολόγιο. Οι υπόλοιπες 84.204 γυναίκες παρακολουθήθηκαν για διαβήτη για τα επόμενα 14 χρόνια (1980-1994).

Σε έρευνα που δημοσιεύθηκε στο αμερικανικό περιοδικό κλινικής διατροφής οι Jorge Salmerónet. Al. [49] παρατήρησαν ότι μια αύξηση 5% της ενέργειας από φυτικά λιπαρά συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο για την εκδήλωση Διαβήτη τύπου 2, ενώ μια παρόμοια αύξηση της ενέργειας από ζωικό λίπος δεν συσχετίστηκε με τον κίνδυνο. Η πρόσληψη κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων δεν σχετίζονται σημαντικά με τον κίνδυνο για Διαβήτη. Αντίθετα, μια αύξηση κατά 2% σε ενέργεια προερχόμενη από TFA συσχετίστηκε με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο έως και 12%. Αντικατάσταση

5% της ενέργειας από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με την ίδια ποσότητα ενέργειας από τους υδατάνθρακες συσχετίστηκε με 58% μεγαλύτερο κίνδυνο για την εκδήλωση διαβήτη. Αντικατάσταση 5% της ενέργειας από κορεσμένα λιπαρά οξέα με ενέργεια από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συσχετίστηκε με 35% χαμηλότερο κίνδυνο, ενώ αντικατάσταση 2% της ενέργειας από trans λιπαρά οξέα με υδατάνθρακες συσχετίστηκε με 28% χαμηλότερο κίνδυνο. Τέλος, αντικατάσταση των TFA με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συσχετίστηκε με 40% χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου (Εικόνα 1.5.2.1).



**Εικόνα 1.5.2.1.** :Εκτιμώμενες αλλαγές για τον κίνδυνο εκδήλωσης Διαβήτη τύπου 2 και πως συνδέεται με αντικατάσταση του 2% της ενέργειας από ισοενεργιακές πηγές.

### **1.5.3. TFA και εκδήλωση της ασθένειας Alzheimer**

Η νόσος Alzheimer είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια μνήμης, διανοητική παρακμή και τελικά γνωστική εξασθένηση. Η συχνότητα εμφάνισης της άνοιας στις δυτικές χώρες, της οποίας η νόσος Alzheimer (AD) είναι η κύρια αιτία, υπολογίζεται να κυριαρχεί στο 10% περίπου του πληθυσμού ηλικίας άνω των 65 ετών και στο 47% του πληθυσμού άνω των 80 ετών. Οι αιτίες εκδήλωσης AD πιθανολογείται ότι οφείλεται σε έναν συνδυασμό παραγόντων.

Η ποικιλομορφία στη σύνθεση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων του εγκεφάλου μπορούν να επηρεάσουν τις βιοφυσικές ιδιότητες των λιπιδίων της μεμβράνης, όπως την ρευστότητα και το φορτίο. Η βέλτιστη λειτουργία των πρωτεΐνων της μεμβράνης των νευρώνων εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης. [50] Σε νευρώνες, τα συναπτοσώματα έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση PUFA μακριάς αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένων των DHA και του αραχιδονικού οξέος. [51] Η ακριβής λειτουργία αυτών των PUFA δεν είναι σαφής αν και το αραχιδονικό οξύ είναι κύριο υπόστρωμα για τη σύνθεση διαφόρων εικοσανοειδών μεσολαβητών [52] και το DHA φαίνεται να ασκεί σημαντικό ρόλο στην ρευστότητα της μεμβράνης και μακρόχρονη ενδυνάμωση, μια διαδικασία που είναι απαραίτητη για την λειτουργία της μνήμης. [53] Δεδομένα πάνω στον τομέα της βιοχημείας των λιπιδίων υποδηλώνουν ότι η AD σχετίζεται με ανωμαλίες των λιπιδίων του εγκεφάλου. [54-57]

Σε έρευνα που δημοσιεύτηκε στην Αμερικανική Ιατρική κοινότητα το 2003 με 815 συμμετέχοντες, παρατήρησαν ότι η πρόληψη λιπαρών ζωικής προέλευσης δεν είχαν σχέση με την εκδήλωση της ασθένειας του Alzheimer. [58]

Ο μεγαλύτερος κίνδυνος από τα TFA έγκειται στην ικανότητά τους να επηρεάζουν την δομή των βιολογικών μεμβρανών. Τα TFA ενσωματώνονται σε κυτταρικές μεμβράνες του εγκεφάλου και μεταβάλλουν την ικανότητα των νευρώνων να επικοινωνούν μεταξύ τους. Έτσι, έχουν δυσμενή επίδραση στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα και μπορεί να μειώσουν σημαντικά την διανοητική λειτουργία. [59]

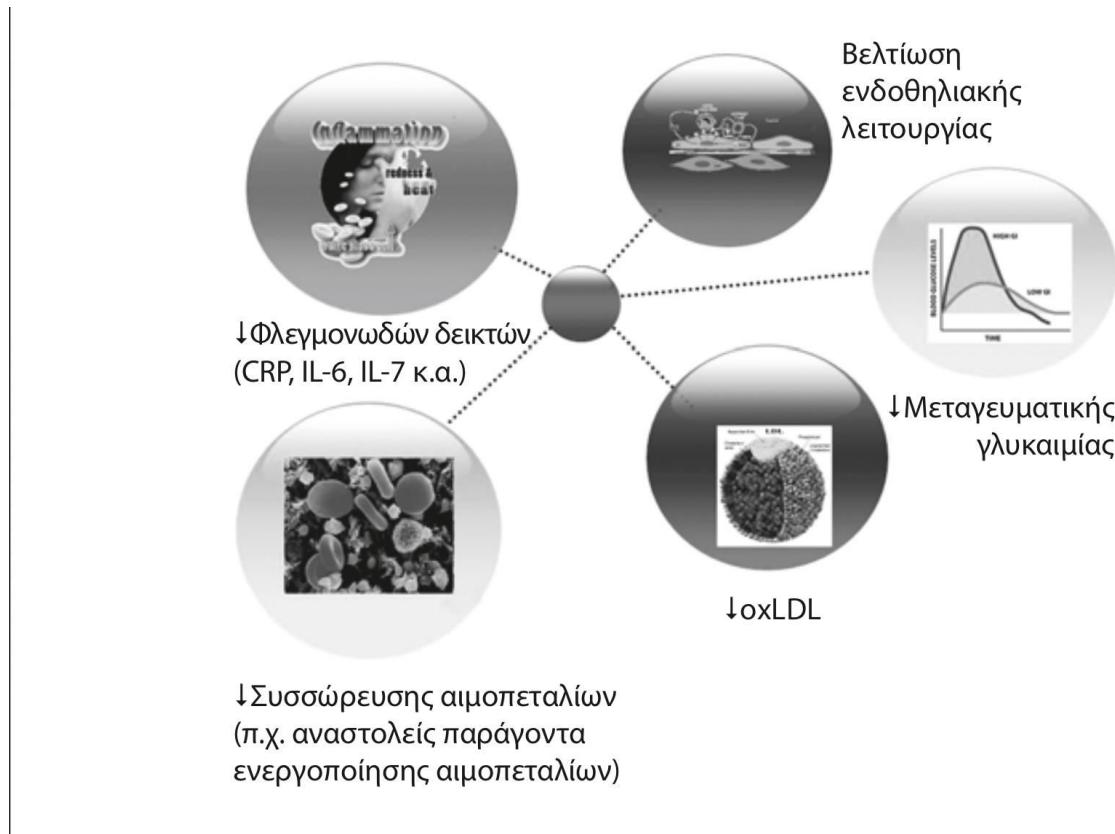
## **1.6. Μεσογειακή Δίαιτα**

Αν και στις αρχές του προηγούμενου αιώνα η έρευνα ήταν στραμμένη κυρίως στην ανακάλυψη των βιταμινών και των συμπτωμάτων έλλειψης και τοξικότητάς τους, [60] στην συνέχεια το ενδιαφέρον στράφηκε προς ολοκληρωμένα διαιτητικά σχήματα και τις επιδράσεις τους στην πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη νοσημάτων. [61] Όσον αφορά στα καρδιαγγειακά νοσήματα, η «μελέτη σταθμός» που ανέδειξε τη σημασία της διατροφής στην πρωτογενή πρόληψη ήταν η μελέτη των επτά Χωρών, από την οποία φάνηκε ότι η Κρήτη όπως και οι συμμετέχοντες από την Ιαπωνία είχαν τη μικρότερη ολική θνησιμότητα. [62] Η Μεσογειακή διατροφή είναι βασισμένη στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο φαίνεται να είναι απαλλαγμένο από τρανς λιπαρά.

### **1.6.1. Προστατευτικοί μηχανισμοί της Μεσογειακής Δίαιτας**

Η Μεσογειακή δίαιτα αφενός, μετριάζει τους δείκτες φλεγμονής [63] και αφετέρου, περιέχει πολλά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, που δρουν ευεργετικά στην LDL- και HDL- χοληστερόλη, αποτρέπουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων [64] και βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία. [65] Η κύρια πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στη Μεσογειακή δίαιτα είναι το ελαιόλαδο [64] που περιέχει και λιποειδή με ανταγωνιστική δράση σε παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) [66,67] ο οποίος αποτελεί έναν διαμεσολαβητή της φλεγμονής που σχετίζεται με την αθηροσκλήρωση. [68] Παράλληλα, η μεσογειακή δίαιτα είναι χαμηλή σε χοληστερόλη και τρανς λιπαρά οξέα. Η χαμηλή περιεκτικότητά της σε νάτριο και η υψηλή περιεκτικότητά της σε κάλιο, μαγνήσιο και ασβέστιο βοηθά στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. [69] Βασικά τρόφιμα της μεσογειακής δίαιτας περιέχουν φυτοχημικές ουσίες, όπως το κρασί, τα φρούτα και το ελαιόλαδο [70] που μπορούν να συμβάλουν στη μείωση της οξείδωσης της LDL. [71] Έχει παρατηρηθεί ότι το μείγμα ελαιολάδου-ξυδιού που προστίθεται στις μεσογειακές σαλάτες, μειώνει τα μεταγενματικά επίπεδα γλυκόζης. [72] Επιπρόσθετα, η ενσωμάτωση άγριων χόρτων της Κρήτης σε γεύμα με ελαιόλαδο και ψωμί οδήγησε σε μείωση των

επιπέδων γλυκόζης μεταγευματικά σε υγιή άτομα [73] και έχουν δράση αναστολέα του PAF, δηλαδή μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (μείωση της πηκτικότητας του αίματος) σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο.[74]



**Εικόνα 1.6.1.1. :** Πιθανοί προστατευτικοί μηχανισμοί της Μεσογειακής Δίαιτας.

### **1.6.2. Μελέτες δευτερογενούς πρόληψης**

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες στις οποίες φάνηκε η σημασία της νιοθέτησης μιας διατροφής μεσογειακού τύπου για την αντιμετώπιση δευτερογενών καρδιαγγειακών νοσημάτων. Μια από αυτές ήταν η Lyon Heart Study, [75-77] όπου συμμετείχαν 605 ασθενείς που παρακολούθηκαν για 3,5 έτη. Η μελέτη δεν ολοκληρώθηκε λόγω των πρόωρων θετικών της αποτελεσμάτων. Η μελέτη δεν ήταν διπλή- τυφλή, οπότε υπήρξε υπερεκτίμηση των αποτελεσμάτων της δίαιτας σε μικρό χρονικό διάστημα. Σε δύο μελέτες των Singhetal, [78,79] όπου συμμετείχαν 505 και 1000 άνδρες για 1 και 2 έτη αντίστοιχα, επίσης βρέθηκαν ευεργετικά αποτελέσματα σχετικά με τη μείωση στην καρδιαγγειακή θνησιμότητα και γενικά των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην Indomediterranean Study [79] τα 2/3 των συμμετεχόντων ήταν χορτοφάγοι και ότι η επιστημονική κοινότητα αμφισβήτησε την ορθότητα και γνησιότητα της μελέτης. [80] Στη μελέτη THIS (The Heart Institute of Spokane Diet Intervention and Evaluation Trial) συμπεριλήφθησαν λιγότεροι συμμετέχοντες σε σχέση με τις προηγούμενες μελέτες (n=101 ασθενείς), οι οποίοι χωρίστηκαν σε δύο σκέλη διατροφικών παρεμβάσεων (i) μεσογειακή δίαιτα και (ii) δίαιτα χαμηλή σε λιπαρά και παρακολούθηκαν για 3,5 έτη. Στην περίπτωση αυτή δεν φάνηκε υπεροχή κάποιας από τις δύο παρεμβάσεις αλλά όταν συνδυάστηκαν τα αποτελέσματα και των δύο φάνηκε η ευεργετική δράση της διατροφικής παρέμβασης. Συνοπτικά τα αποτελέσματα των μελετών εμφανίζονται στον Πίνακα 1.6.2.1.

				Μελέτη ασθενών, διάρκεια	Αριθμός χρονικό διάστημα μετά την εμφάνιση ασθένειας	Έναρξη παρέμβασης: Δίαιτα	Δίαιτα	Αποτέλεσμα
<b>Lyon Heart Study</b>	605, 3,5 έτη	6 μήνες				Μεσογειακή δίαιτα πλούσια σε α-λινολενικό	↓68% στα μη θανατηφόρα εμφράγματα, ↓68% στην καρδιαγγειακή θνησιμότητα, ↓47% στο σύνολο των καρδιαγγειακών νοσημάτων	
<b>Singh</b>	505, 1 έτος	1–2 ημέρες				Φυτοφαγική δίαιτα πλούσια σε α-λινολενικό	↓38% στα μη θανατηφόρα εμφράγματα, ↓40% στην καρδιαγγειακή θνησιμότητα, ↓40% στο σύνολο των καρδιαγγειακών νοσημάτων	
<b>Indo- mediterranean Study</b>	1000, 2 έτη	1/3 των ασθενών είχαν υποστεί έμφραγμα πριν 1 μήνα				Φυτοφαγική δίαιτα πλούσια σε α-λινολενικό	↓46% στα μη θανατηφόρα εμφράγματα, ↓49% στην καρδιαγγειακή θνησιμότητα, ↓21% στο σύνολο των καρδιαγγειακών νοσημάτων	
<b>THIS Trial</b>	101, 3,8 έτη	<1,5 μήνας				Δίαιτα χαμηλού λίπους. Μεσογειακή δίαιτα	↓28% στο σύνολο των καρδιαγγειακών σημείων με το συνδυασμό των δύο παρεμβάσεων	

**Πίνακας 1.6.2.1.** : Μελέτες που αξιολόγησαν την επίδραση της κατανάλωσης ψωμάτων ή ω-3 λιπαρών οξέων στη δευτερογενή πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Καθίσταται σαφές ότι οι περισσότερες μελέτες στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση της μεσογειακής διατροφής έδειξαν θετικά αποτελέσματα. Παράλληλα, οι υπάρχουσες μελέτες έγιναν κυρίως σε άνδρες και ενδεχομένως να υπάρχει διαφοροποίηση του μεγέθους των αποτελεσμάτων σε γυναίκες. Άλλωστε υπάρχει διαφοροποίηση των δύο φύλων όσον αφορά στα καρδιαγγειακά επεισόδια καθώς υπάρχουν ξεχωριστές κατευθυντήριες οδηγίες για τον γυναικείο πληθυσμό. [81] Οι μελέτες διεξήχθησαν σε ευρωπαϊκές χώρες (Γαλλία), τις ΗΠΑ και την Ινδία. Η έλλειψη μελετών από μεσογειακές χώρες αποτελεί ένα κενό στη βιβλιογραφία. Η φαρμακευτική αγωγή και τα ιατρικά μέσα ήταν σαφώς διαφοροποιημένα σε σχέση με σήμερα, ιδιαίτερα στις μελέτες που διεξήχθησαν πριν το 2002. Αν οι μελέτες αυτές σχεδιάζονταν σήμερα τα αποτελέσματα θα ήταν πολύ διαφορετικά. Τέλος, εξετάζοντας το προσλαμβανόμενο λίπος που συστηνόταν στις παρεμβάσεις αυτές (25–30% των θερμίδων) αντιλαμβάνεται κανείς ότι απέχει από την παραδοσιακή κρητική δίαιτα, όπου το ελαιόλαδο ήταν κυρίαρχο στοιχείο. [62, 82]

## Κεφάλαιο 2

### 2. Πειραματικό Μέρος

#### 2.1 Στόχος και Αντικείμενο Μελέτης

Το 1902 πρώτος ο Wilhelm Norman [83] μετέτρεψε υγρά έλαια σε ημι- στερεά λίπη με τη διαδικασία της υδρογόνωσης, η οποία αναπτύχθηκε το 1890 από τον Paul Sabatier. [5] Τα υδρογονωμένα προϊόντα κατέκλυσαν την αγορά λόγω του βελτιωμένου χρώματος τους, της σταθερότητας και όλων των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των λιπαρών υλών.

Η κατανάλωση TFA σε ημερήσια βάση, όμως, μπορεί να επιφέρει σοβαρά προβλήματα υγείας. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος θανάτου από καρδιακό νόσημα είναι μεγαλύτερος όταν το 2% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης είναι ως TFA σε σύγκριση με υδατάνθρακες ή άλλα είδη λιπαρών οξέων. Η αύξηση του κινδύνου κυμαίνεται από 20% μέχρι 32% σε κάποιες περιπτώσεις. [39] Επιπροσθέτως, τα υψηλά επίπεδα TFA στη διατροφή αυξάνουν τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης, της LDL- χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο αίμα, ενώ μειώνει την HDL- χοληστερόλη. [84] Αποτέλεσμα αυτού, τα υψηλά ποσοστά θνητιμότητας στην Ε.Ε. από στεφανιαία νόσο, το οποίο ξεκινά από 6% και φτάνει ως 36%.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

- Να γίνει τόσο ποιοτικός, όσο και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων TFA σε δείγματα βουτύρων, μαργαρινών καθώς και ελαίων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά.
- Σύγκριση τεχνικών ανάλυσης και προσδιορισμού (GC-MS και FTIR- ATR)
- Να πραγματοποιηθεί σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων έτσι ώστε να διαπιστωθεί ποιό λιπαρό βρίσκεται στη μεγαλύτερη αναλογία στα υπό έλεγχο δείγματα .
- Να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με αποτελέσματα ερευνών προηγούμενων μελετών.
- Τέλος, να γίνει σύγκριση με τα αποτελέσματα μελετών σε άλλες χώρες της Ευρώπης για την ημερήσια κατανάλωση προϊόντων πλούσιων σε TFA.

## **2.2 Δειγματοληψία**

Συλλέχθηκαν τριάντα δύο (32) δείγματα μαργαρινών και βουτύρων τα οποία είναι διαθέσιμα στην ελληνική αγορά και αναλύθηκαν. Κατηγοριοποιήθηκαν σε τρεις (3) ομάδες: μαργαρίνες (n= 18), ζωικής προέλευσης (n= 9) και μίγματα (n=5). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν επτά δείγματα ελαίων σαν πρότυπα διαλύματα μεταξύ των οποίων ήταν Αραβοσιτέλαιο 100%, Ηλιέλαιο 100%, Σογιέλαιο 100%, έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 100% καθώς και μίγματα αυτών, Αραβοσιτέλαιο-Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1:1, Ηλιέλαιο-Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1:1, Σογιέλαιο-Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1:1.

## **2.3 Πειραματική Διαδικασία**

### **2.3.1 Αντιδραστήρια**

- KOH (Merk D-6100 Darmstadt F.R. Germany, methanolic solution 84%)
- Εσωτερικό πρότυπο (IS) (Sigma- Aldrich, cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester  $\geq 98\%$ , capillary GC)
- TFAs (δείγματα ελαίων, μαργαρινών, βουτύρων και μειγμάτων που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά)
- n- επτάνιο p.a. (Merk D-6100 Darmstadt F.R. Germany, 99%)

### **2.3.2. Επεξεργασία Δειγμάτων**

Σε test tube των 5 ml με βιδωτό καπάκι, ζυγίζονται 0.20g από το δείγμα. Προσθέτουμε 4 ml επτάνιο και ανακινούμε. Προσθέτουμε 0.5 ml από μεθανολικό διάλυμα KOH 2N και κλείνουμε με το καπάκι που παρέχεται με PTFE (polytetrafluoroethylene)- στην άρθρωση. Κουνάμε έντονα για 15 δευτερόλεπτα. Το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι η πάνω φάση να γίνει διαυγής. Αφαιρούμε την πάνω φάση που περιέχει τους methylesters. Από αυτή τη φάση συλλέγονται 0.95ml και συμπληρώνουμε μέχρι το 1 ml με εσωτερικό πρότυπο, το οποίο ήταν methylester του λιπαρού οξέος C<sub>21:0</sub> που δεν υπήρχε ως συστατικό στα δείγματά μας. Η ποσότητα αυτή διοχετεύοταν σε ειδικά vials για να πραγματοποιηθεί ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

## **2.4 Οργανολογία**

Κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν διάφορα σκεύη και εξοπλισμός του Εργαστηρίου Τοξικολογίας & Εγκληματολογικής Χημείας (Ιατρική Σχολή, Π.Κ.). Συγκεκριμένα, σύστημα ανάδευσης vortex της Heidolph, μοντέλο Topmix 94323 (Εικόνα 2.4.1.) και το βασικό όργανο ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε είναι αέριος χρωματογράφος, συζευγμένος με φασματογράφο μαζών ταχείας σάρωσης (εταιρεία Shimadzu και συγκεκριμένα το μοντέλο GCMS-QP-2010) (Εικόνα 2.4.2).



**Εικόνα 2.4.1.** : Σύστημα ανάδευσης



**Εικόνα 2.4.2.** : Αέριος χρωματογράφος της εταιρείας Shimadzu

## 2.4.1. Αέρια Χρωματογραφία

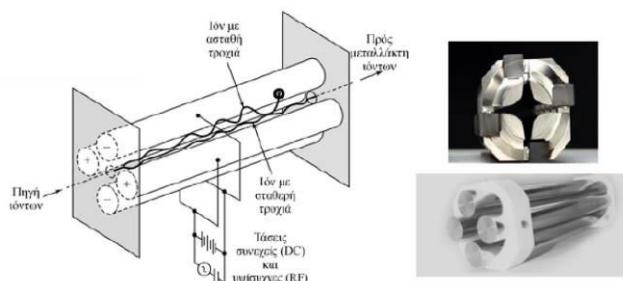
Βασική αρχή της αέριας χρωματογραφίας είναι ο διαχωρισμός οργανικών πτητικών ενώσεων σύμφωνα με το διαφορετικό σημείο ζέσης και πολικότητά τους. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε στήλη χρωματογραφίας, η οποία βρίσκεται σε θερμοστατούμενο φούρνο και η κίνηση του αναλύτη επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ροής φέροντος αερίου, το οποίο είναι αδρανές.

Το φέρον αέριο περνά από το σύστημα εισαγωγής, το οποίο βρίσκεται επίσης μέσα στο φούρνο και η βελόνα της σύριγγας, με το δείγμα, διαπερνά το septum (ελαστικό διάφραγμα από σιλικόνη) και εισέρχεται στο θάλαμο εξάτμισης. Η θερμοκρασία του θαλάμου είναι 60 °C. Όταν οι αναλύτες εισέλθουν στη στήλη η θερμοκρασία του φούρνου αυξάνεται προοδευτικά. Οι ουσίες με το χαμηλότερο σημείο ζέσης (πιο πτητικές) θα κινηθούν πιο γρήγορα στη στήλη και θα εκλουστούν πρώτες.

## 2.4.2. Φασματομετρία Μάζας

Στην φασματομετρία μαζών οι ενώσεις που βρίσκονται στην αέρια φάση ιονίζονται και ανιχνεύονται σύμφωνα με το λόγο μάζα/ φορτίο ( $m/z$ ). Μετατρέπονται σε ιόντα στην πηγή ιονισμού και στη συνέχεια διαχωρίζονται με βάση τον λόγο  $m/z$  από τον αναλυτή μαζών.

### 2.4.2.1. Αναλυτής Μαζών



Εικόνα2.4.2.1.1. : Τετραπολικός Αναλυτής Μαζών

Το μηχάνημα GCMS-QP-2010 της Shimadzu, που χρησιμοποιήθηκε έχει έναν τετραπολικό αναλυτή μαζών (quadrupole mass analyzer) (Εικόνα 2.4.2.1.1.). Το μικρό μέγεθος, μικρότερο κόστος καθώς επίσης και οι υψηλές ταχύτητες σάρωσης είναι μερικά πλεονεκτήματα. Καρδιά του τετραπολικού φασματομέτρου είναι οι τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι, οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC (με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων), που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης  $180^{\circ}$ . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας όμως τον λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z, φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον μεταλλάκτη μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z.

#### **2.4.3. Συνθήκες Ανάλυσης**

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριχοειδής (SP-2340, 60mx 0.25mm i.d. x 0.20um). Η εμβολή έγινε στους  $270^{\circ}\text{C}$  με ποσότητα δείγματος 1ul. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας και η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου ρυθμίστηκε ως εξής: η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίστηκε στους  $60^{\circ}\text{C}$  και παρέμεινε εκεί σταθερή για 1 min, έπειτα αυξήθηκε στους  $180^{\circ}\text{C}$  με ρυθμό  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  όπου και παρέμεινε για 1 min σε αυτή τη θερμοκρασία, έπειτα αυξήθηκε στους  $250^{\circ}\text{C}$  με ρυθμό  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , όπου και παρέμεινε σε αυτή τη θερμοκρασία για 1 min. Τέλος, με ρυθμό  $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , στους  $300^{\circ}\text{C}$  όπου κρατήθηκε σταθερή για 2 min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα ήταν 32.2 min (Πίνακας 2.4.3.1.). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε ανιχνεύοντας συγκεκριμένα θραύσματα σε συγκεκριμένο χρόνο έκλουσης που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.3.2..

Injector	Splitless, 270°C, flow rate 1ml/min
Column	SP-2340 capillary (SGE), 60m x 0.25 mm i.d. x 0.20um
Oven	60°C, hold 1min 20 °C/min to 180°C, hold 1min 4°C/min to 250°C, hold 1min 25°C/min to 300°C, hold 2 min Total run time 32.2 min
Detector	MS (quadrupole), ion source temperature 230°C, interface temperature 310°C, SIM

Πίνακας 2.4.3.1. : Συνθήκες ανάλυσης δειγμάτων

Λιπαρά οξέα		Θραύσματα	retention time (λεπτά)
<b>myristic</b>	C14:0	74, 87, 43, 55	6.35
<b>palmitate</b>	C16:0	74, 87, 43, 55, 143	8.12
<b>palmitoleate</b>	C16:1	41, 55, 69, 74, 84, 96	8.71
<b>margarate</b>	C17:0	74, 87, 43, 55	9.12
<b>heptadecenoic (cis-10)</b>	C17:1	41, 55, 69, 83, 97, 110	9.80
<b>stearate</b>	C18:0	74, 43, 69	10.46
<b>elaidic, vaccenic(trans-11)</b>	C18:1- trans	40, 44, 55, 69, 74, 84, 87, 97	10.90
<b>oleate, cis-vassenate</b>	C18:1	41, 55, 68, 74, 97, 123	11.40
<b>linolelaidic</b>	C18:2- trans	44, 40, 55, 67, 81, 96	12.13, 12.28
<b>linoleate</b>	C18:2	67, 81, 41, 55, 95, 109	12.54
<b>arachidate</b>	C20:0	74, 87, 43, 55	13.68
<b>a- Linolenic</b>	C18:3- trans	40, 44, 55, 67, 79, 95, 108	13.79, 14.21
<b>linolenate</b>	C18:3	41, 55, 67, 79, 95, 108	14.46
<b>gondoate</b>	C20:1	41, 55, 69, 83, 97, 111, 292	14.72
<b>IS ( Heneicosanoic acid)</b>	C21:0	74, 87, 43, 55, 327	16.44
<b>behenate</b>	C22:0	74, 87, 43, 55, 143, 354	19.02
<b>lignoceric</b>	C24:0	74, 87, 43, 55, 143, 382	26.04

Πίνακας 2.4.3.2. : Θραύσματα και χρόνοι έκλουσης σύμφωνα με τους οποίους έγινε η ανίχνευση των λιπαρών οξέων.

#### **2.4.4. Ανάλυση δειγμάτων με FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)**

Μέρος των δειγμάτων (n=25) αναλύθηκαν ποιοτικά με την μέθοδο του *FTIR-ATR*, ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση τεχνικών ανάλυσης και προσδιορισμού. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Φασματόμετρο Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (*FTIR*) Prestige 21- Shimadzu, της εταιρίας N. Αστεριάδης στην Αθήνα.

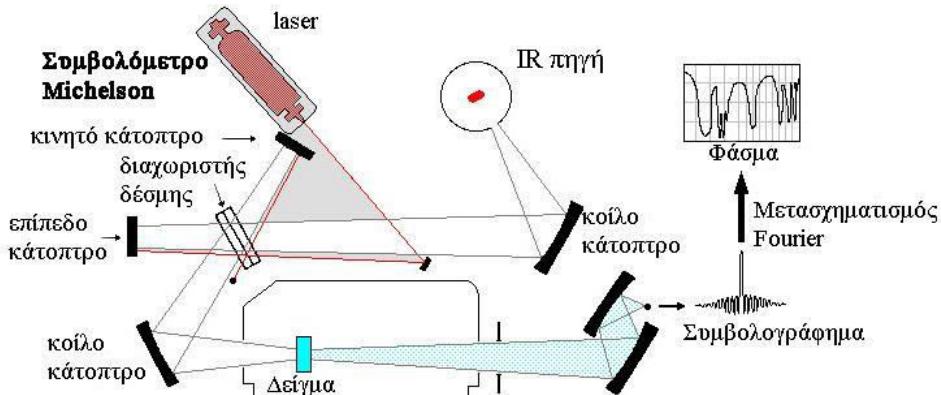


**Εικόνα 2.4.4.1. :** Φασματόμετρο Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (*FTIR*) Prestige 21, διακριτικής ικανότητας  $4 \text{ cm}^{-1}$ , με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (*ATR*).

#### **2.4.4.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (*FTIR*). [85, 86]**

Το βασικό πλεονέκτημα της *FTIR* φασματοσκοπίας σε σχέση με την *IR* φασματοσκοπία έγκειται στη χρήση συμβολόμετρου αντί μονοχρωμάτορα, το οποίο επιτρέπει να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα και όχι διαδοχικά, μόνο μία τη φορά, υπερνικώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις αδυναμίες και τους περιορισμούς των συμβατικών φασματοφωτόμετρων διασποράς.

Το σχηματικό διάγραμμα ενός τυπικού φασματοφωτομέτρου *FTIR* με συμβολόμετρο *Michelson* (*Michelson interferometer*) παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.4.5.1.1., όπου διακρίνονται τα εξής τρία βασικά μέρη: η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο και ο ανιχνευτής υπερύθρου. Η πηγή *laser* χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, τη μέτρηση των κυματαρίθμων και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών.



Εικόνα 2.4.4.1.1.: Σχηματική αναπαράσταση φωσματοφωτόμετρου *FTIR* με συμβολόμετρο.

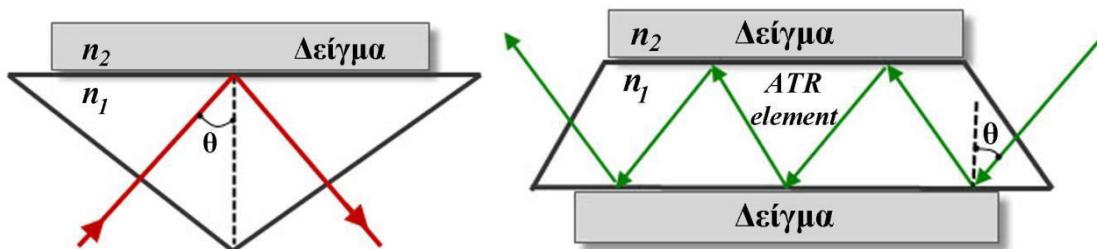
Τα φασματοφωτόμετρα *FTIR* παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα κυρίως ως προς την υψηλή ευαισθησία και ταχύτητα που παρουσιάζουν, καθώς και τον βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (*SNR*) ανά μονάδα χρόνου. Τέλος, η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή στην *FTIR* φασματοσκοπία προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων αλλά και επεξεργασίας των δεδομένων με μία μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων τεχνικών επεξεργασίας, με αποτέλεσμα την καταγραφή φασμάτων πολύ υψηλής ποιότητας.

#### 2.4.4.2. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR). [87, 88]

Η λειτουργία της τεχνικής *ATR* βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας. Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας.

Στα *ATR* εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (*internal reflection element, IRE*) ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία  $45^{\circ}$ ) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται.

Πολλαπλές ανακλάσεις της *IR* ακτινοβολίας στο δείγμα έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου του σήματος προς τον θόρυβο και επομένως την αύξηση της έντασης των ταινιών του φάσματος ακόμα και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις.



**Εικόνα 2.4.5.2.1. :** Σχηματική αναπαράσταση της διαδρομής της δέσμης της *ATR* ανάλυσης σε μονή εσωτερική ανάκλαση (αριστερά) και πολλαπλές διαδοχικές εσωτερικές ανακλάσεις (δεξιά).

Η FTIR-ATR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους. Το βασικό πλεονέκτημα της FTIR-ATR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί οποιαδήποτε επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίηση για τον σχηματισμό δισκίου του δείγματος με σκόνη KBr, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο ως έχει. (Εικόνα 2.4.4.2.2.)



Εικόνα 2.4.4.2.2. : Εξοπλισμός ATR. Το δείγμα τοποθετείται στον υποδοχέα κρύσταλλο και η ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο δείγμα μέσω συστήματος που επιτρέπει την απόλυτη επαφή.

#### **2.4.4.3. Συνθήκες Ανάλυσης**

Η λήψη των φασμάτων κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε στο φασματόμετρο IR Prestige 21 με διόρθωση ATR, χρησιμοποιώντας ως συχνότητα αναφοράς τους  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Αναλυτικά, οι συνθήκες αναγράφονται στον Πίνακα 2.4.5.3.1.

<b>Gain</b>	Auto
<b>Aperture</b>	Auto
<b>Measurement mode</b>	Absorbance
<b>Apodization</b>	Happ- Genzel
<b>Scans</b>	10
<b>Resolution</b>	$4.0\text{ cm}^{-1}$
<b>Range</b>	$800\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$

**Πίνακας 2.4.4.3.1.:** Συνθήκες ανάλυσης φασματομέτρου Prestige 21.

## Κεφάλαιο 3

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Αποτελέσματα και χαρακτηρισμός κορυφών GC-MS

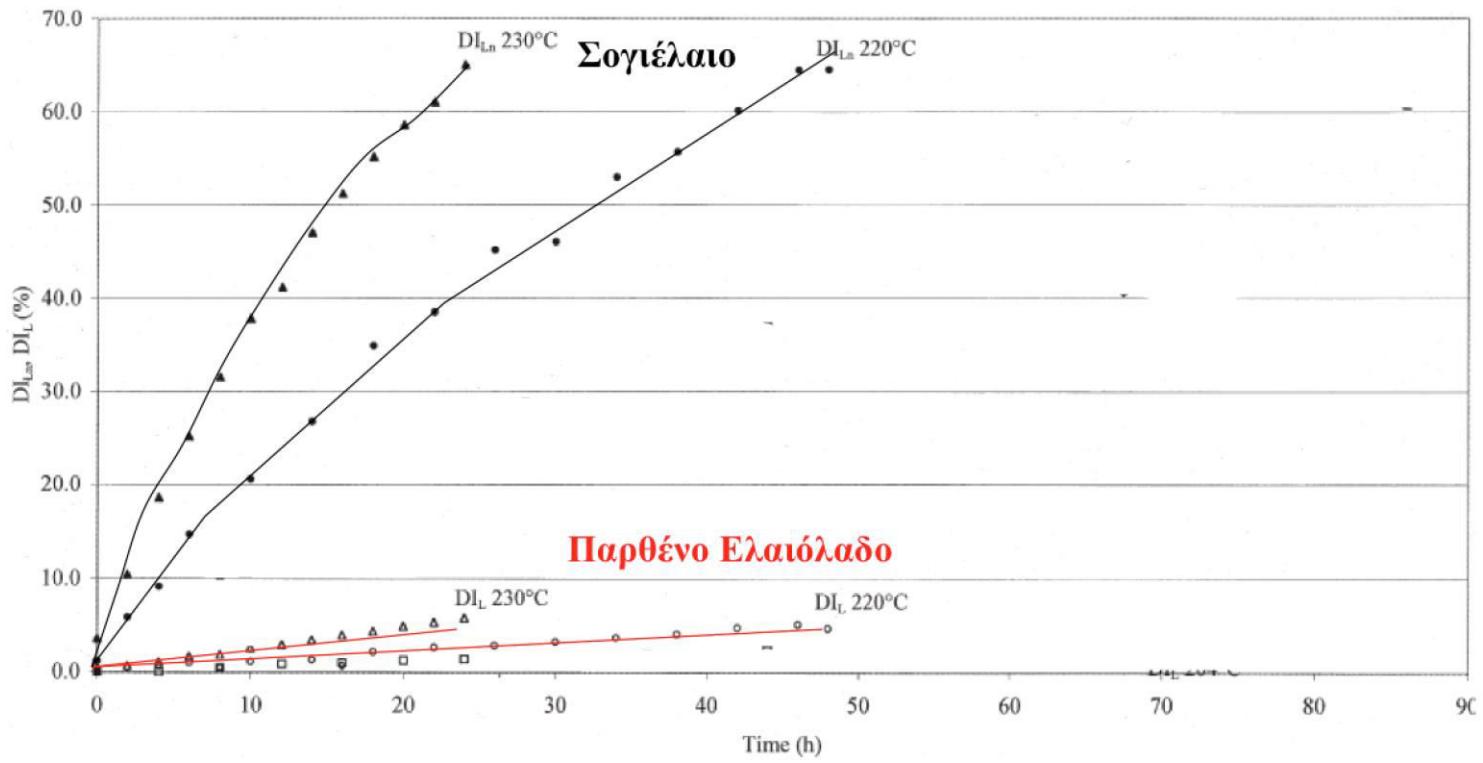
Για την επικύρωση της μεθόδου μελετήθηκαν δείγματα ελαίων γνωστής συγκέντρωσης καθαρά καθώς και μίγματα αυτών. Τέτοια ήταν το αραβοσιτέλαιο 100%, το ηλιέλαιο 100%, το σογιέλαιο 100%, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 100% καθώς και μίγματα αυτών, το αραβοσιτέλαιο-έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1:1, το ηλιέλαιο-έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1:1, και το σογιέλαιο-έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 1:1. Μόνο το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο ήταν απαλλαγμένο από TFA ενώ τα υπόλοιπα έλαια και τα μίγματά τους παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα.

Έλαια	Συγκέντρωση TFA (% w/w)
<b>Ηλιέλαιο 100%</b>	<b>0.27</b>
<b>Ηλιέλαιο- Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (50%-50%)</b>	<b>0.14</b>
<b>Αραβοσιτέλαιο 100%</b>	<b>0.23</b>
<b>Αραβοσιτέλαιο- Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (50%-50%)</b>	<b>0.14</b>
<b>Σογιέλαιο Oil 100%</b>	<b>0.34</b>
<b>Σογιέλαιο- Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (50%-50%)</b>	<b>0.17</b>
<b>Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο 100%</b>	<b>ND</b>

Πίνακας 3.1.1. : Συγκέντρωση TFA % σε δείγματα ελαίων.

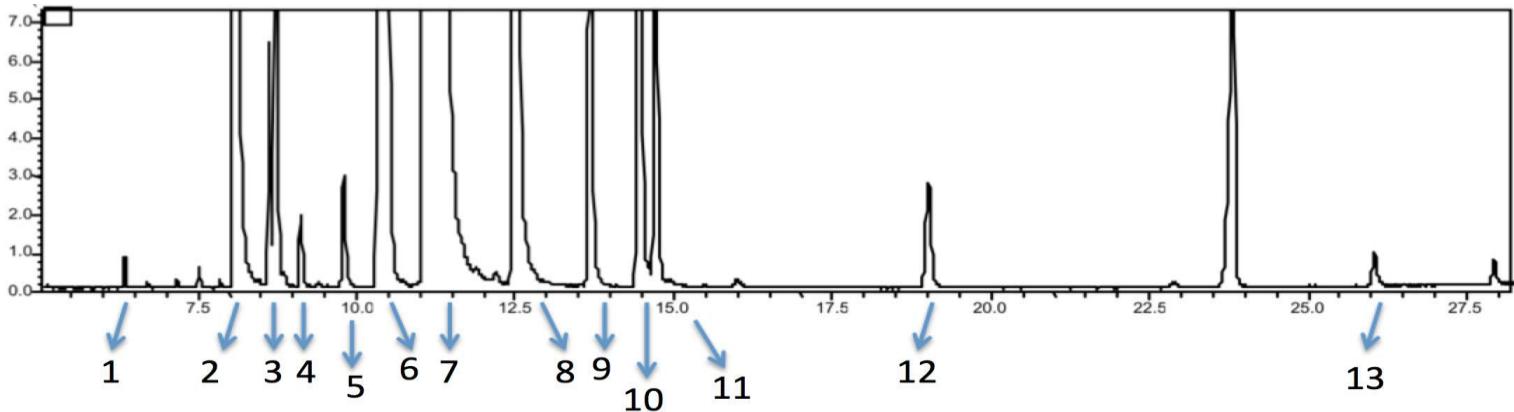
Το κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και λήφθηκε χρωματογράφημα για κάθε ένα ξεχωριστά.

Η διαδικασία της απόσμησης πραγματοποιείται στα σπορέλαια, κατά την διάρκεια της οποίας, χάνουν ουσιαστικά την έντονη οσμή τους. Πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν τα TFA που περιέχουν τα σπορέλαια, όπως προαναφέρθηκε. Παρακάτω, παρατίθεται γράφημα στο οποίο φαίνεται το ποσοστό δημιουργίας TFA κατά την απόσμηση του σπορελαίου. Το παρθένο ελαιόλαδο, υποβλήθηκε σε θερμική επεξεργασία σε αντίστοιχες θερμοκρασίες ( $220$  και  $230$  °C) και παρατηρήθηκε η δημιουργία TFA σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά. (Γράφημα 3.1.1.). [102]

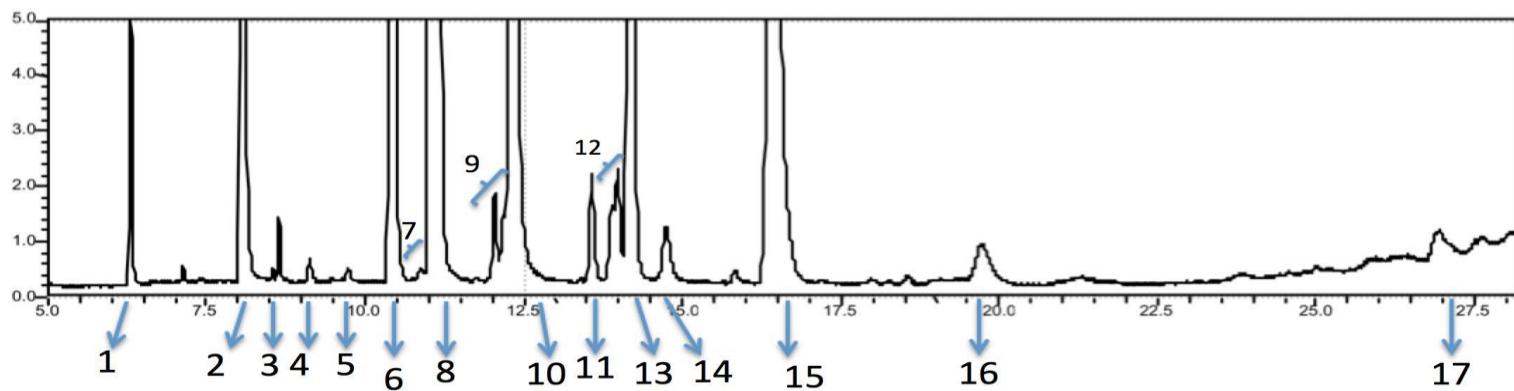


Γράφημα 3.1.1.: Δημιουργία TFA στο σογιέλαιο και το παρθένο ελαιόλαδο κατά την διαδικασία της διαδικασίας της απόσμησης, αντίστοιχα. [102]

Τυπικό χρωματογράφημα από δείγμα έξτρα- παρθένου ελαιόλαδου, το οποίο ήταν απαλλαγμένο από TFA, αλλά και δείγματος βουτύρου που περιέχει όλα τα TFA παρουσιάζονται παρακάτω.

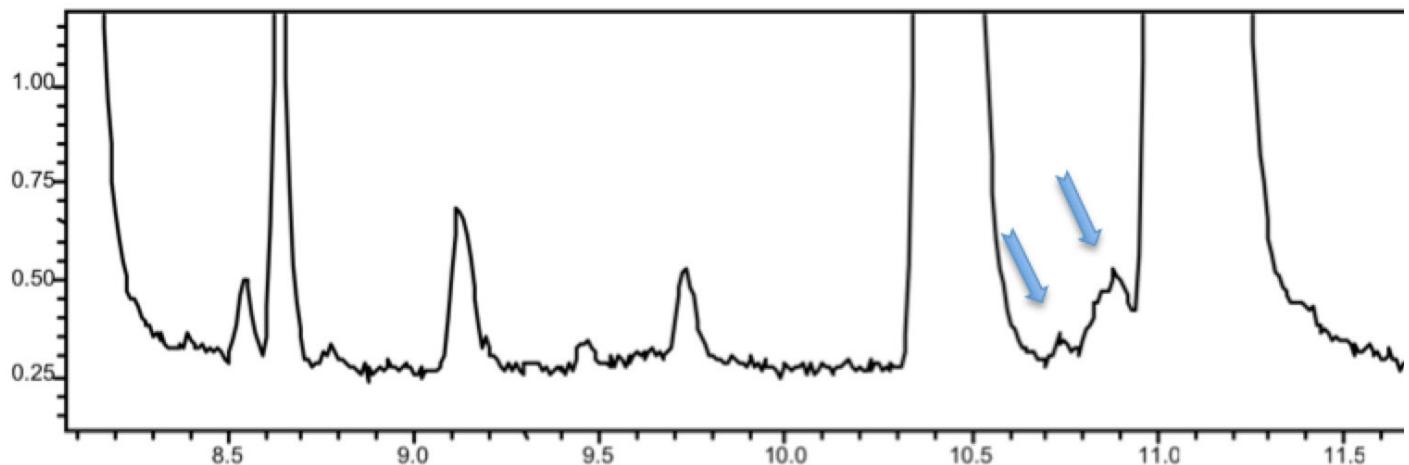


**Χρωματογράφημα 3.1.**: Προφίλ λιπαρών οξέων στο Παρθένο Ελαιόλαδο. 1: myristic, 2: palmitate 3: palmitoleate 4: margarate 5: heptadecenoic (cis-10) 6: stearate 7: oleate 8: linoleic 9: arachidate 10: linolenate 11: gondoate 12: behenate 13: lignoceric

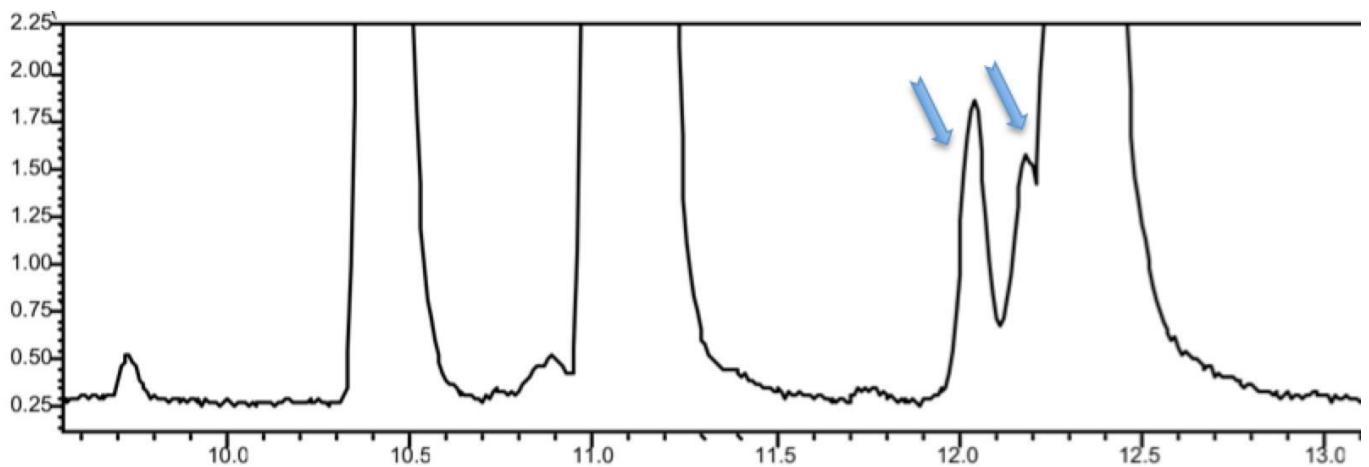


**Χρωματογράφημα 3.2.**: Προφίλ λιπαρών οξέων σε δείγμα μαργαρίνης. 1: myristic, 2: palmitate 3: palmitoleate 4: margarate 5: heptadecenoic (cis-10) 6: stearate 7: Oleic (trans-11) 8: Oleate 9: Linolelaidic 10: Linoleate 11: Arachidate 12: g- Linolenic 13:linolenate 14:gondoate 15: IS 16: behenate 17: Lignoceric

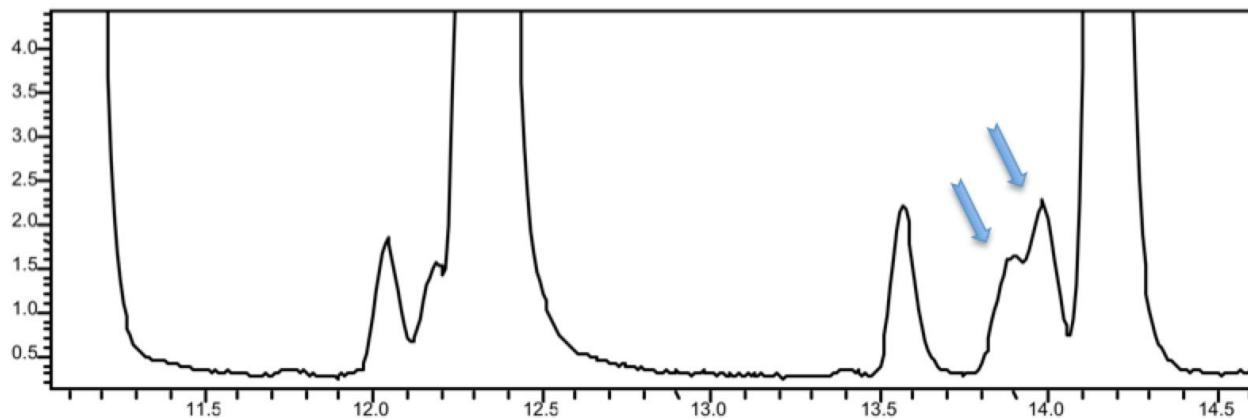
Οι περιοχές που μας ενδιαφέρει να συγκρίνουμε είναι αυτές που εμφανίζονται τα TFA.  
 Παρακάτω εμφανίζονται τρεις συγκριτικές εικόνες από ένα δείγμα έξτρα- παρθένου ελαιολάδου και μίας μαργαρίνης για τις περιοχές αυτές.



**Εικόνα 3.1.**: Περιοχή ανίχνευσης Oleic acid (trans-C<sub>18:1</sub>).

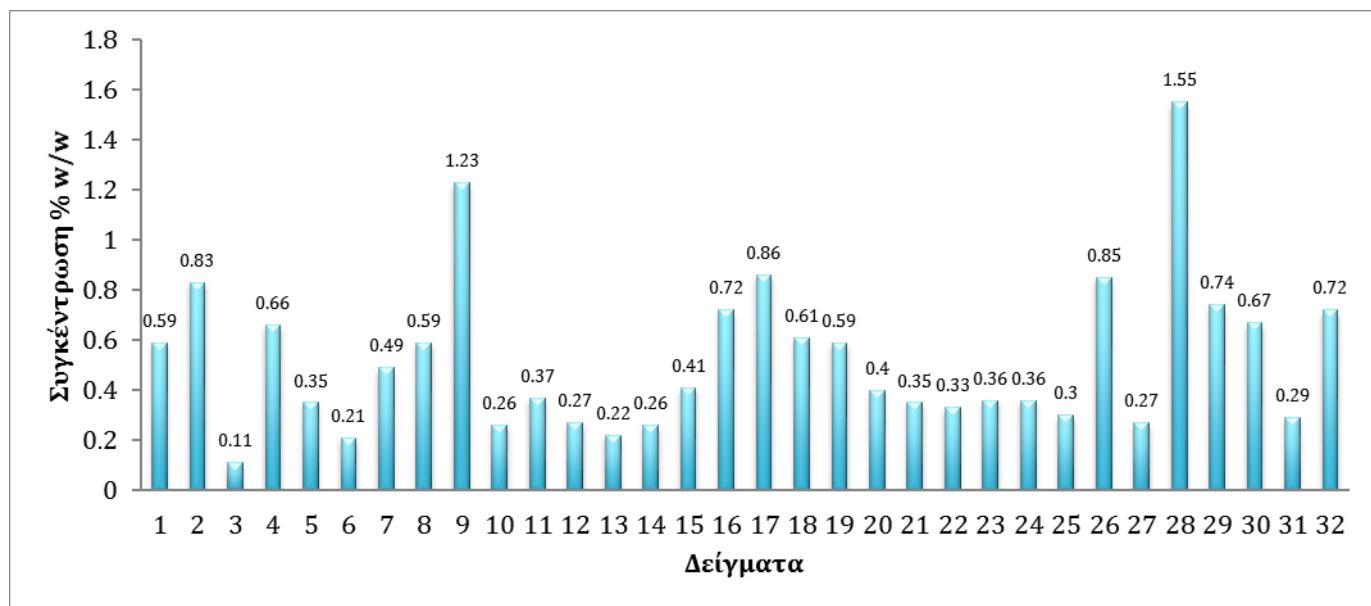


**Εικόνα 3.2.** : Περιοχή ανίχνευσης Linoleic acid (trans-C<sub>18:2</sub>).



**Εικόνα 3.3.** : Περιοχή ανίχνευσης  $\alpha$ - Linolenic acid (trans-C<sub>18:3</sub>)

Κανένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν ήταν απαλλαγμένο από TFA. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν το ελαϊδικό οξύ (t-C<sub>18:1</sub>), λινολελαϊδικό οξύ (t-C<sub>18:2</sub>) και  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (t-C<sub>18:3</sub>). Η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσίασαν συνολική συγκέντρωση χαμηλότερη του 1% w/w (<1 % w/w) με εξαίρεση δύο δείγματα που παρουσίασαν συνολική συγκέντρωση TFA 1.23 και 1.55 % w/w.

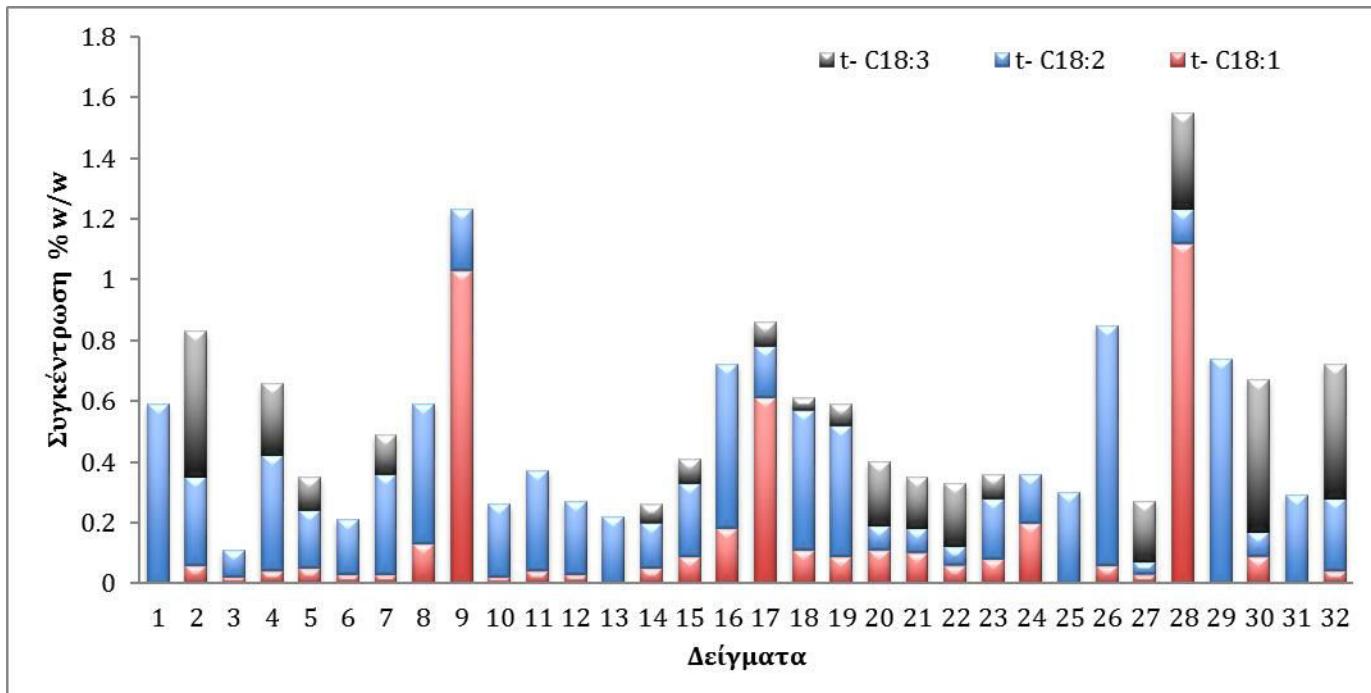


**Εικόνα 3.1.: Συνολική συγκέντρωση των TFA (% w/w) σε δείγματα βουτύρων, μαργαρινών και μιγμάτων στην ελληνική αγορά.**

<b>Δείγμα</b>	<b>t- C<sub>18:01</sub></b>	<b>t- C<sub>18:02</sub></b>	<b>t- C<sub>18:03</sub></b>
1	ND	0.59	ND
2	0.06	0.29	0.48
3	0.02	0.09	ND
4	0.04	0.38	0.24
5	0.05	0.19	0.11
6	0.03	0.18	ND
7	0.03	0.33	0.13
8	0.13	0.46	ND
9	1.03	0.2	ND
10	0.02	0.24	ND
11	0.04	0.33	ND
12	0.03	0.24	ND
13	ND	0.22	ND
14	0.05	0.15	0.06
15	0.09	0.24	0.08
16	0.18	0.54	ND
17	0.61	0.17	0.08
18	0.11	0.46	0.04
19	0.09	0.43	0.07
20	0.11	0.08	0.21
21	0.1	0.08	0.17
22	0.06	0.06	0.21
23	0.08	0.2	0.08
24	0.2	0.16	ND
25	ND	0.3	ND
26	0.06	0.79	ND
27	0.03	0.04	0.2
28	1.12	0.11	0.32
29	ND	0.74	ND
30	0.09	0.08	0.5
31	ND	0.29	ND
32	0.04	0.24	0.44
<b>Sum</b>	<b>0.14</b>	<b>0.28</b>	<b>0.11</b>

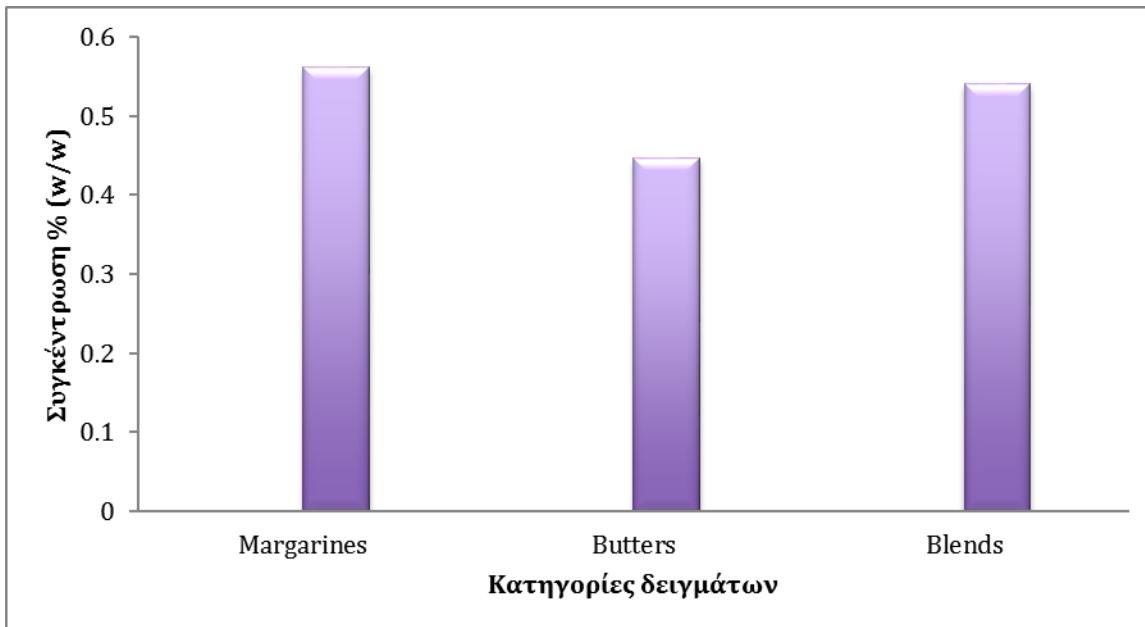
**Πίνακας 3.2.** : Συγκέντρωση κάθε TFA ανά εξεταζόμενο δείγμα.

Τα περισσότερα από τα δείγματα που εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα για το ελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:1</sub>) και το λινολελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub>) σε αντίθεση με το α-λινολενικό οξύ (t- C<sub>18:3</sub>), το οποίο δεν ανιχνεύθηκε στο 50% των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Το λινολελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub>) είναι εκείνο το οποίο επικρατεί στα περισσότερα δείγματα σε σύγκριση με ελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:1</sub>), με μέση συγκέντρωση 0.28% w / w και 0.14% w / w, αντίστοιχα, ενώ το α-λινολεϊκό οξύ (t- C<sub>18:3</sub>) παρουσιάζει συγκέντρωση 0.11% w/w.



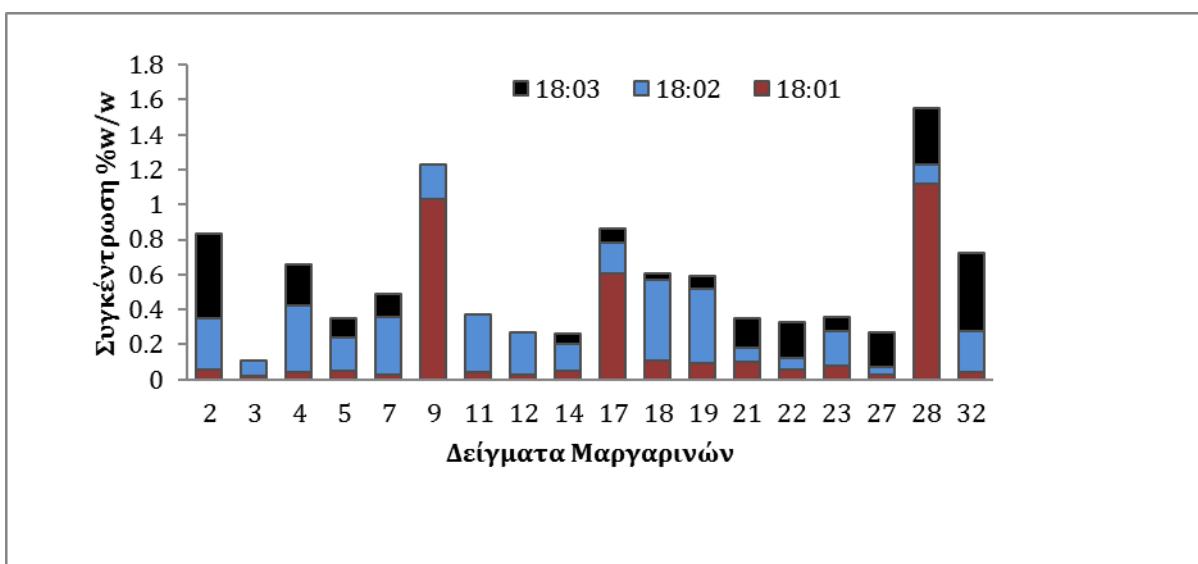
**Εικόνα 3.2. :** Σύγκριση του κάθε TFA με τα υπόλοιπα αλλά και με τη συνολική συγκέντρωση.

Τα δείγματα μαργαρίνης περιείχαν κατά μέσο όρο 0.56% w/w TFA (0.26 έως 1.55% w/w), ενώ τα ζωικής προέλευσης βούτυρα 0.45% w/w (0.21 έως 0.74% w/w) και τα μείγματα 0.54% w/w (0.37 έως 0.85% w / w).



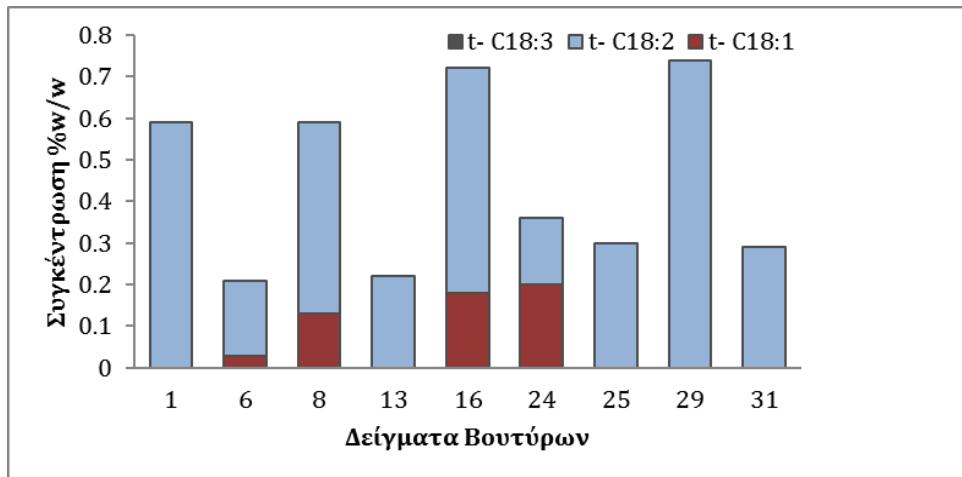
**Εικόνα 3.3.** : Μέσος όρος συγκεντρώσεων TFA (% w/w) ανα κατηγορία δειγμάτων.

Στα περισσότερα δείγματα μαργαρινών ( $n=18$ ) επικρατούν το λινολελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub>) και το ελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:1</sub>), ενώ σε μικρότερες περιεκτικότητες παρατηρείται το α-λινολενικό οξύ (t- C<sub>18:3</sub>).



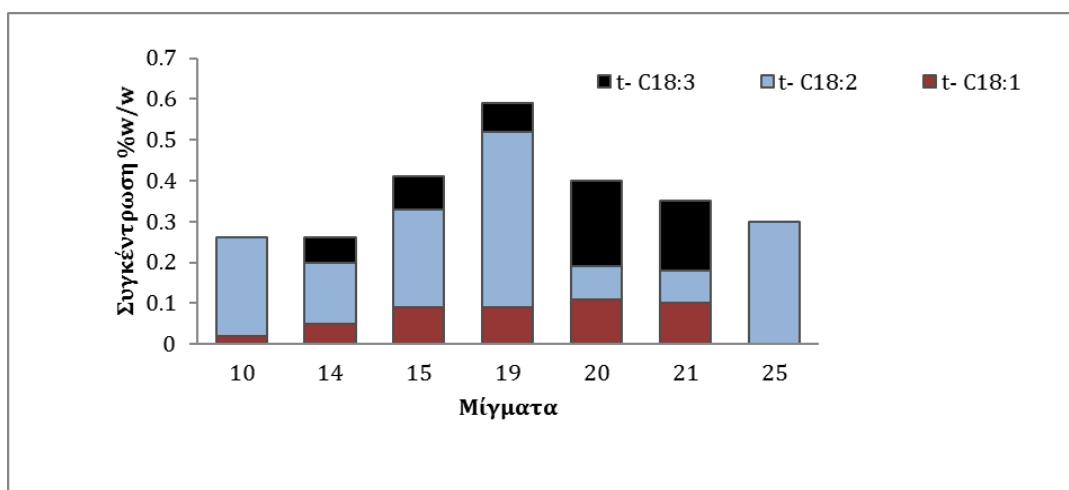
**Εικόνα 3.4.** : Σύγκριση κάθε TFA με τα υπόλοιπα και με τη συνολική τους συγκέντρωση σε δείγματα μαργαρινών.

Σε δείγματα ζωικής προέλευσης ( $n=9$ ) παρατηρήθηκε ότι επικρατεί το το λινολελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub>) ενώ το ελαιϊδικό οξύ (t- C<sub>18:1</sub>) εμφανίζεται σχεδόν στο 50% των δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το α-λινολενικό οξύ (t- C<sub>18:3</sub>) δεν εμφανίζεται σε κανέναν από τα δείγματα, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αποτελεί ένα TFA αποκλειστικά ζωικής προέλευσης.



**Εικόνα 3.5. :** Σύγκριση κάθε TFA με τα υπόλοιπα και με τη συνολική συγκέντρωση σε δείγματα βουτύρων.

Τέλος, στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα μιγμάτων φυτικών και ζωικών λιπαρών ( $n= 5$ ), παρατηρήθηκε ότι και εδώ κυριαρχεί το λινολελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub>) έναντι των άλλων δύο.



**Εικόνα 3.6. :** Σύγκριση κάθε TFA με τα υπόλοιπα και με τη συνολική τους συγκέντρωση σε δείγματα μιγμάτων ζωικών και φυτικών λιπαρών.

Μετά από την ανάλυση των εικόνων 3.4-3.6 μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι το λινολελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub>) είναι το κύριο ισομερές που συναντάται πιο συχνά στην πλειονότητα των σκευασμάτων που καταναλώνονται, το οποίο έχει και ζωική και φυτική προέλευση. Από την άλλη, το α- Λινολενικό, εμφανίζεται μόνο σε δείγματα φυτικής προέλευσης και μίγματα αυτών, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είναι μια από τις κύριες ειδοποιούς διαφορές μεταξύ των λιπαρών ζωικής και φυτικής προέλευσης.

### **3.2. Αποτελέσματα και χαρακτηρισμός κορυφών FTIR- ATR**

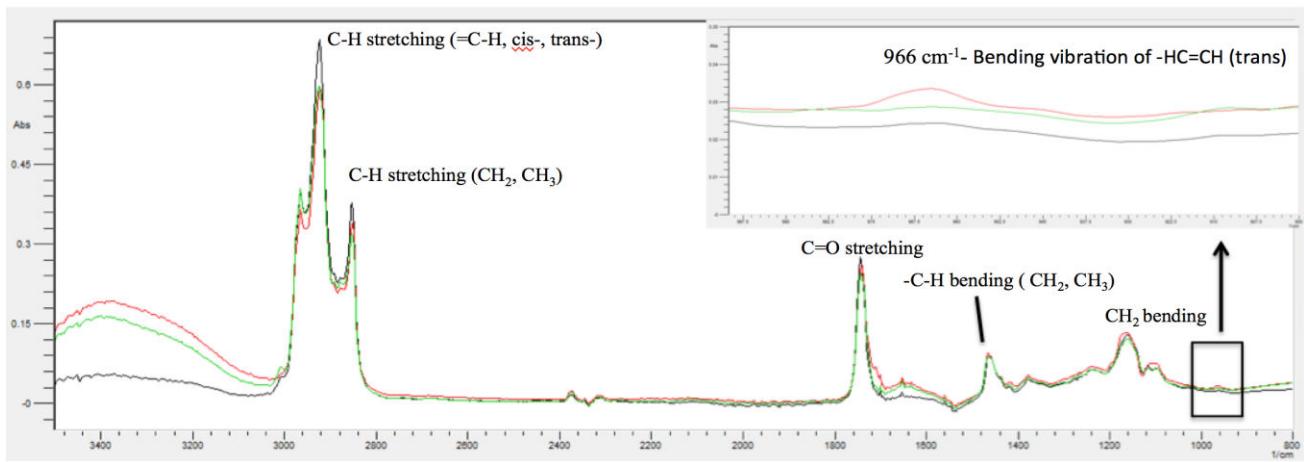
Η φασματομετρία *FTIR-ATR* είναι μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά για την ποιοτική ανάλυση λιπαρών και ελαίων, καθώς αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια τα οποία μπορούν να εφαρμοστούν απευθείας στον *ATR* κρύσταλλο. Το καλιμπράρισμα του μηχανήματος μπορεί να γίνει μία φορά και να χρησιμοποιηθεί για αναλύσεις ρουτίνας. Η ανάθεση κορυφών σε φάσμα *FTIR* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον πίνακα 3.2.1.

Ανάθεση	Κυματάριθμοι ( $\text{cm}^{-1}$ )	Χαρακτηριστικά	Τρόπος Δόνησης
		Ομάδα	
(α)	3700- 3000	O-H	Stretching (sym)
(β)	3006	-C=C-H (cis)	cis C=CH stretching
(γ)	2953	-C-H ( $\text{CH}_3$ )	Asymmetric stretching vibration of methyl ( $-\text{CH}_3$ ) group
(δ)	2924	-C-H ( $\text{CH}_2$ )	Asymmetric or symmetric stretching vibration of methylene ( $-\text{CH}_2$ ) band
(ε)	2854	-C-H ( $\text{CH}_2$ )	Asymmetric or symmetric stretching vibration of methylene ( $-\text{CH}_2$ ) band
(στ)	1745	-C=O (ester)	Carbonyl (C=O) functional group from the ester linkage of triacylglycerol
(ζ)	1650	-C=C- (cis)	cis C=C
(η)	1460	-C-H- ( $\text{CH}_2, \text{CH}_3$ )	Bending vibrations of the $\text{CH}_2$ and

CH <sub>3</sub> aliphatic groups			
(θ)	1377	=C-H- (cis)	Symmetric bending vibration of CH <sub>3</sub> group
(ι)	1161	-C-O, -CH <sub>2</sub> -	Vibration of stretching mode from the C-O group in esters
(κ)	1097	-C-H- bending	-CH bending vibrations of fatty acids
(λ)	1117	-C-H-	-CH deformation deformation vibrations of fatty acids
(μ)	966	-HC=CH (trans)	Bending vibration of CH functional groups of isolated trans- olefin

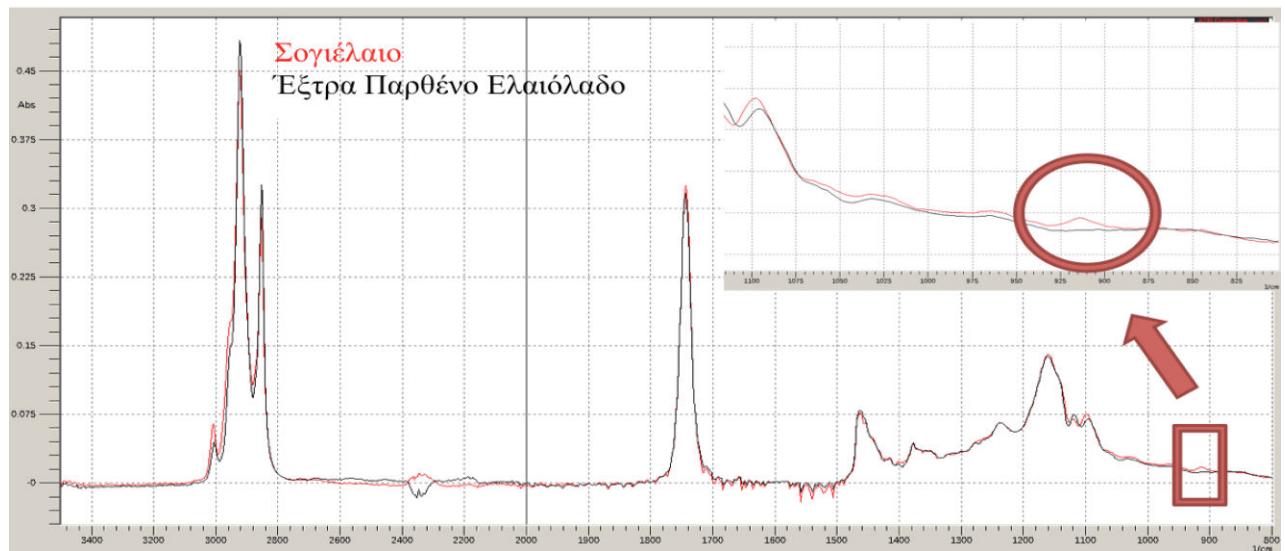
**Πίνακας 3.2.1.:Δονήσεις χαρακτηριστικών ομάδων λιπαρών σε βούτυρα και μαργαρίνες.** [89]

Τυπικά φάσματα FTIR βουτύρου (κόκκινο), μίγματος (πράσινο) και μαργαρίνης (μαύρο) παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.1. Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση της μπάντας απορρόφησης του H<sub>2</sub>O που οφείλεται στις O-H ομάδες και παρατηρείται στην περιοχή των 3500- 3000 cm<sup>-1</sup> η δόνηση stretching και 1600- 1500 cm<sup>-1</sup> η δόνηση bending καθώς και αυτή του CO<sub>2</sub> που εμφανίζεται 2400-2250 cm<sup>-1</sup> η δόνηση stretching και 700-630 cm<sup>-1</sup> η δόνηση bending, οι οποίες λόγω της μεγάλης έντασής τους μείωναν τις χαρακτηριστικές κορυφές δόνησης των λιπαρών στα δείγματα.



**Εικόνα 3.2.1.: FTIR φάσμα βοντύρου (κόκκινο), μίγματος (πράσινο) και μαργαρίνης (μαύρο) στην περιοχή  $3500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ .**

Παρατηρήθηκε μια ακόμα κορυφή στους  $914\text{ cm}^{-1}$  μικρής έντασης, η οποία οφείλεται στην δόνηση κάμψης της χαρακτηριστικής ομάδας  $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ .



**Εικόνα 3.2.2.: FTIR φάσμα Σογιελαίου (κόκκινο), και Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου (μαύρο) στην περιοχή  $3500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ .**

Η κορυφή αυτή δεν αναλύθηκε περαιτέρω λόγω των ελλιπών στοιχείων της βιβλιογραφίας, καθώς και δεν μπορούσε να γίνει συσχέτιση με τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας (GC-MS).

## **Κεφάλαιο 4**

### **4. Συζήτηση Αποτελεσμάτων**

#### **4.1. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα**

Μετά από ανάλυση σε 32 δείγματα βουτύρων και μαργαρινών που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά, κανένα δείγμα δεν φαίνεται να είναι απαλλαγμένο από την παρουσία των trans λιπαρών. Η πλειοψηφία των δειγμάτων περιείχε TFA σε ποσοστά <1% με δύο εξαιρέσεις που βρίσκονται πάνω από την τιμή αυτή. Τα δείγματα μαργαρινών περιείχαν έναν μέσο όρο συγκέντρωσης 0.56% w/w σε TFA (0.26-1.55% w/w), τα δείγματα ζωικής προέλευσης 0.45% w/w (0.21-0.74% w/w) και τα μίγματα 0.54% w/w (0.37-0.85% w/w). Στα δείγματα φυτικής προέλευσης το ελαιϊδικό και λινολελαϊδικό οξύ εμφανίζονται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, 0.20% w/w και 0.22% w/w αντίστοιχα, ενώ το α- λινολενικό στο 88% των δειγμάτων και σε χαμηλότερη συγκέντρωση (0.15% w/w). Στα δείγματα ζωικής προέλευσης φαίνεται να επικρατεί το λινολελαϊδικό οξύ με μια συγκέντρωση 0.37% w/w ενώ ακολουθεί το ελαιϊδικό με 0.06% w/w και εμφανίζεται στο 50% των δειγμάτων ενώ το α-λινολενικό εκλείπει από αυτά. τέλος, στα μίγματα επίσης επικρατεί το λινολελαϊδικό οξύ με 0.27% w/w ενώ τα άλλα δύο γεωμετρικά ισομερή εμφανίζονται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο 66% των δειγμάτων. Όπως φαίνεται, λοιπόν, οι συγκεντρώσεις σε TFA στα δείγματα ζωικής προέλευσης ήταν χαμηλότερες σε σχέση με τις μαργαρίνες, ενώ τα μίγματα παρουσιάζουν παρόμοιες συγκεντρώσεις με αυτές των μαργαρινών. Τα TFA βρίσκονται σε μικρά ποσά φυσικά στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Μάλιστα, τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι η πρόσληψη των φυσικών trans λιπαρών οξέων μάλλον δεν είναι επιβλαβής για την υγεία.

<b>Ελαιϊδικό οξύ</b>	<b>Λινολελαϊδικό οξύ</b>	<b>α- Λινολενικό οξύ</b>
Μαργαρίνες  (0.02-1.12% w/w)	0.20% w/w  (0.02- 0.46% w/w)	0.22%w/w  (0.02- 0.46% w/w)  Εμφανίστηκε στο 88% των δειγμάτων
Βούτυρα  Εμφανίστηκε στο 50% των δειγμάτων	0.06% w/w  (0-0.20%w/w)	0.37%w/w  (0.15- 0.74% w/w)
Μίγματα  Εμφανίστηκε στο 66% των δειγμάτων	0.09% w/w  (0-0.25%w/w)	0.27% w/w  (0.15-0.43%w/w)  Εμφανίστηκε στο 66% των δειγμάτων

**Πίνακας 4.1.1:** Συγκεντρώσεις και εύρη τιμών κάθε γεωμετρικού ισομερούς TFA ανα κατηγορία δειγμάτων.

Μεγαλύτερα ποσά TFA βρίσκονται σε βιομηχανοποιημένα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, αυτά παράγονται κατά την υδρογόνωση των φυτικών ελαίων, με στόχο να προσδώσει στο προϊόν ιδιότητες που είναι περισσότερο επιθυμητές στον καταναλωτή και τον παρασκευαστή τροφίμων. Τα αυξημένης σκληρότητας λίπη, όπως οι «σκληρές» μαργαρίνες, περιέχουν περισσότερα trans λιπαρά οξέα σε σχέση με τις πιο «μαλακές» μαργαρίνες.

Επίσης, κατά το τηγάνισμα των ελαίων σε υψηλές θερμοκρασίες μέρος των λιπαρών οξέων που περιέχουν μετατρέπονται σε TFA. Μάλιστα, η επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου λαδιού οδηγεί σε ολοένα μεγαλύτερη συγκέντρωση TFA.

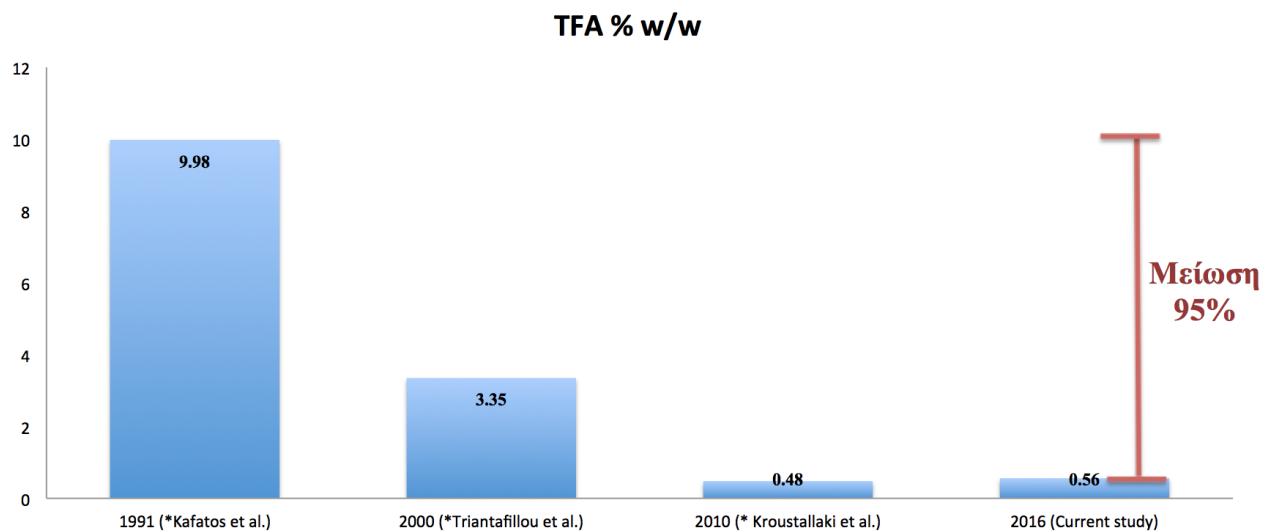
Πιο αναλυτικά, τα οξέα που μελετήθηκαν ήταν το Ελαϊδικό οξύ (t- C<sub>18:1</sub> ), το Λινοελαιϊδικό οξύ (t- C<sub>18:2</sub> ) και το α- Λινοελαιϊδικό οξύ (t- C<sub>18:3</sub>). Αξίζει να παρατηρηθεί ότι τα δείγματα 2 και 32 περιέχουν TFA σε ποσοστό 0.83 και 0.72 %, αντίστοιχα, ενώ στην συσκευασία τους αναγράφεται ότι περιέχουν παρθένο ελαιόλαδο, το οποίο είναι απαλλαγμένο από την παρουσία TFA.

Τα επίπεδα των TFA ήταν < 1% στις περισσότερες περιπτώσεις και πολύ χαμηλότερα από προηγούμενες μελέτες. Συγκεκριμένα, ο Δημήτριος Τριανταφύλλου και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν έρευνα για να υπολογίσουν την περιεκτικότητα μαργαρινών σε λιπαρά οξέα στην ελληνική αγορά. [90,91] Για την ανίχνευση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας. Στη μελέτη λοιπόν αυτή, όπως και στην παρούσα έρευνα, κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν ήταν απαλλαγμένο από την παρουσία TFA. Η πλειοψηφία των δειγμάτων περιείχε συγκέντρωση μικρότερη του 1% w/w (<1% w/w) με εξαίρεση δύο δείγματα των οποίων η περιεκτικότητα σε TFA εκτιμήθηκε κοντά στο 19% w/w. Κατά γενική ομολογία, η μέθοδος GC είναι η πλέον κατάλληλη για την ανάλυση τροφίμων. Η ανάλυση των τροφίμων ενδιαφέρεται για τη σύσταση των λιπιδίων, των πρωτεΐνων, των υδατανθράκων, των συντηρητικών, των γεύσεων, των χρωστικών ουσιών και των τροποποιητών, και επίσης των βιταμινών, των στεροειδών, των υπολειμμάτων φαρμάκων, φυτοφαρμάκων και των ιχνοστοιχείων. Η μέθοδος GC-MS που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, συνδυάζει τα πλεονεκτήματα του υψηλού διαχωρισμού και της ταχύτητας ανάλυσης που χαρακτηρίζουν το GC, ενώ το MS παρέχει και τον προσδιορισμό και τις ποσοτικές αναλύσεις κάτω του μg/ml. Συγκρίνοντας λοιπόν τις δύο μεθόδους, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μέθοδος GC-MS ενδείκνυται για ασφαλέστερα και ακριβέστερα αποτελέσματα.

Σε άλλη αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1994 από τον A. Καφάτο και την ομάδα του, [92] μελετήθηκε η περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε μαργαρίνες που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά. Δέκα δείγματα μαργαρινών που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής-αέριας χρωματογραφίας (GLC) και σαν control χρησιμοποιήθηκε κρητικό παρθένο ελαιόλαδο, όπως στην παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε t-C<sub>18:1</sub> κυμαίνεται από 5.40

μέχρι 9.54% w/w και σε t- C<sub>18:2</sub> από 0.40 μέχρι 3.65%w/w. Στην παρούσα μελέτη οι αντίστοιχες τιμές είναι 0.16%w/w (0.02- 1.12%w/w) και 0.26% w/w(0.04- 0.79%w/w). Οι τιμές αυτές συγκριτικά με αυτές της βιβλιογραφίας είναι αισθητά μειωμένες. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι με το πέρασμα του χρόνου και μετά από έρευνες που έγιναν πάνω στις επιπτώσεις που έχει στην υγεία του ανθρώπου η μεγάλη κατανάλωση TFA, οι εταιρίες μείωσαν την περιεκτικότητα των προϊόντων τους σε TFA.

Σε έρευνα τους που δημοσιεύθηκε το 2011, η Π. Κρουσταλλάκη με τους συνεργάτες της, [93] ανέλυσαν τριάντα ένα (31) δείγματα μαργαρινών που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC). Παρατηρήθηκε, λοιπόν, όπως και στην παρούσα εργασία ότι η συγκέντρωση των TFA στα δείγματα ήταν αρκετά χαμηλή. Συγκεκριμένα, το ποσοστό κυμαίνεται στο 0.48% w/w (0.16–0.97%w/w) του συνόλου των λιπών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που υπολογίστηκαν 0.56% w/w (0.26- 1.55%w/w). Όπως αναφέρει η συγκεκριμένη έρευνη η ομάδα, συγκριτικά με τα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών, [90,92] παρατηρείται μια μείωση 95% στην περιεκτικότητα των TFA στις μαργαρίνες που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά. (Εικόνα 4.1.1.)



**Εικόνα 4.1.1.:** Μείωση στην περιεκτικότητα των TFA στις μαργαρίνες που κυκλοφορούν στην ελληνική αγορά τα τελευταία 25 χρόνια.

#### **4.2. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες παγκοσμίως**

Συγκρίνοντας, αποτελέσματα από παρόμοιες μελέτες παγκοσμίως έγινε αντιληπτό ότι κατά την τελευταία δεκαετία, η περιεκτικότητα σε TFA των μαργαρινών έχει μειωθεί σημαντικά.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αυστρία, στην οποία οι μαργαρίνες χρησιμοποιούνται τόσο για οικιακή όσο και βιομηχανική χρήση, η μέση συγκέντρωση TFA εντοπίστηκε σε 3.37% της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, οι βιομηχανικές μαργαρίνες (π.χ. ψησίματος) που διατίθενται στο εμπόριο σε μεγάλα βαρέλια περιείχαν κατά μέσο όρο πέντε φορές υψηλότερη περιεκτικότητα σε TFA σε σχέση με αυτές των οικιακών ουσιών. [94] Συγκριτικά με τα αποτελέσματα στην παρούσα μελέτη, όπου το ποσοστό της περιεκτικότητας των TFA των μαργαρινών υπολογίστηκε στο 0.54% w/w, παρατηρείται μια αισθητή μείωση, η οποία πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι από το 2014 και μετά, έχει τεθεί περιορισμός στην περιεκτικότητα των TFA στα προϊόντα ευρείας κατανάλωσης στην Ευρώπη.

Η περιεκτικότητα σε TFA των μαργαρινών στη Νέα Ζηλανδία έχει επίσης μειωθεί σημαντικά κατά την τελευταία δεκαετία. Το 1995, η μέση περιεκτικότητα σε TFA των μαργαρινών εκτιμήθηκε σε 14.9% w/w. Σε έρευνα το 2006, η περιεκτικότητα σε TFA βρέθηκε να έχει μειωθεί σε λιγότερο από 10% w/w. [95,96]

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Μεξικό το 2011, συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν 42 δείγματα μαργαρίνης με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Το 1/3 των δειγμάτων παρουσιάστηκε σαν “απαλλαγμένο από TFA” σύμφωνα με τη Δανέζικη νομοθεσία, καθώς η περιεκτικότητά τους σε TFA ήταν χαμηλότερη του 1% w/w. Στα υπόλοιπα δείγματα, η συγκέντρωση κυμανόταν μεταξύ 1.35- 23.87% w/w με εξαίρεση ένα δείγμα που η περιεκτικότητά του σε TFA άγγιζε το 40.65%w/w. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια, ότι δεν υπήρχε κάποια σχετική νομοθεσία μέχρι το 2011, η οποία να περιορίζει την περιεκτικότητα των μαργαρινών σε TFA. [97]

Το 2005 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα στο Πακιστάν, όπου συλλέχθηκαν δέκα δείγματα μαργαρινών και δέκα δείγματα βουτύρων, τα οποία αναλύθηκαν με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Τα αποτελέσματα και για τις δυο κατηγορίες δειγμάτων ήταν αισθητά υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά της παρούσας μελέτης. Πιο συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα των TFA των μαργαρινών υπολογίστηκε από 2.45% w/w μέχρι και 21.10% w/w, ενώ στα δείγματα βουτύρων οι τιμές αυτές ξεκινούσαν από το 1.20% w/w και έφταναν μέχρι 2.94% w/w. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο λαμβάνοντας υπόψιν την υψηλότερη περιεκτικότητα των μαργαρινών σε TFA σε σχέση με τα βούτυρα, λόγω της διαδικασίας της υδρογόνωσης. [98]

#### **4.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες Ευρωπαϊκών χωρών.**

Μελέτες σε χώρες της Ευρώπης έδειξαν ότι η πρόσληψη σε TFA κυμαινόταν από 0.5% (Ελλάδα, Ιταλία) έως 2.1% (Ισλανδία) της ενεργειακής πρόσληψης στους άνδρες και από 0.8% (Ελλάδα) έως 1.9% μεταξύ των γυναικών (Ισλανδία). Η πρόσληψη σε TFA ήταν χαμηλότερη στις χώρες της Μεσογείου (0.5-0.8 %), αλλά ήταν επίσης κάτω από το 1% της ενέργειας στη Φινλανδία και τη Γερμανία. Μέτρια πρόσληψη παρατηρήθηκε στο Βέλγιο, την Ολλανδία, τη Νορβηγία και το Ήνωμένο Βασίλειο και η υψηλότερη πρόσληψη στην Ισλανδία. Trans ισομερή του C<sub>18:1</sub> λιπαρού οξέος είναι αυτά που συναντώνται πιο συχνά στη διατροφή. [99]

Σύμφωνα με έρευνα [100] η οποία βασίστηκε στη διατροφή 14 ευρωπαϊκών χωρών για την ημερήσια κατανάλωση TFA σε g/ημέρα, η χώρα μας συγκαταλέγεται σε αυτές με την χαμηλότερη ημερήσια πρόσληψη TFA. Η διατροφή στις βόρειες ευρωπαϊκές χώρες περιέχει παραδοσιακά μεγαλύτερο ποσοστό TFA σε σχέση με τη Μεσογειακή διατροφή στην οποία χρησιμοποιείται συνήθως ελαιόλαδο. Η διατροφή που ακολουθούν οι κάτοικοι της Γαλλίας ήταν σχετικά χαμηλή σε TFA επειδή χρησιμοποιούνται κυρίως λίπη ζωικής προέλευσης και όχι υδρογονωμένα φυτικά έλαια, τα οποία περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό TFA.

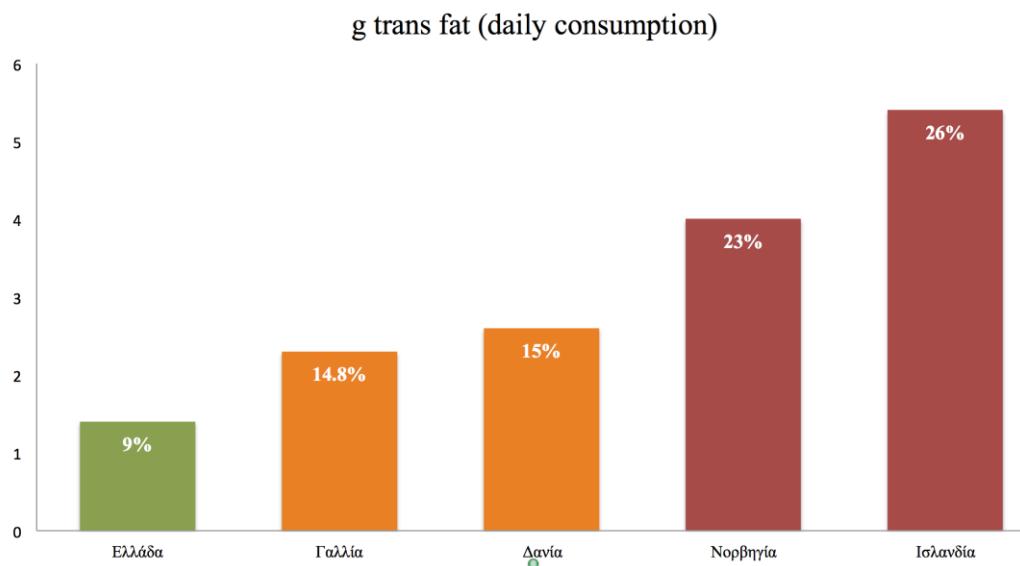
Χώρα της Ευρώπης	Ημερήσια κατανάλωση TFA (g/μέρα)
<b>Ελλάδα</b>	1.4
<b>Πορτογαλία</b>	1.6
<b>Ιταλία</b>	1.6
<b>Ισπανία</b>	2.1
<b>Φιλανδία</b>	2.1
<b>Γερμανία</b>	2.2
<b>Γαλλία</b>	2.3
<b>Σουηδία</b>	2.6
<b>Δανία</b>	2.6
<b>Ηνωμένο Βασίλειο</b>	2.8
<b>Νορβηγία</b>	4.0
<b>Βέλγιο</b>	4.1
<b>Ολλανδία</b>	4.3
<b>Ισλανδία</b>	5.4

**Πίνακας 4.2.1.** : Δεδομένα ημερήσιας κατανάλωσης TFA (g/μέρα) σε 14 Ευρωπαϊκές χώρες

Ο τρόπος παρασκευής των διαφόρων σκευασμάτων διαφέρει από χώρα σε χώρα καθώς και ο τρόπος μαγειρέματος. Μια από τις κύριες αιτίες που υπάρχει τόσο μεγάλη διαφορά στην ημερήσια κατανάλωση TFA είναι και ο τύπος ελαίου που χρησιμοποιήθηκε. Από ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε ότι μόνο το έξτρα Παρθένο ελαιόλαδο στερείται trans- λιπαρών οξέων.

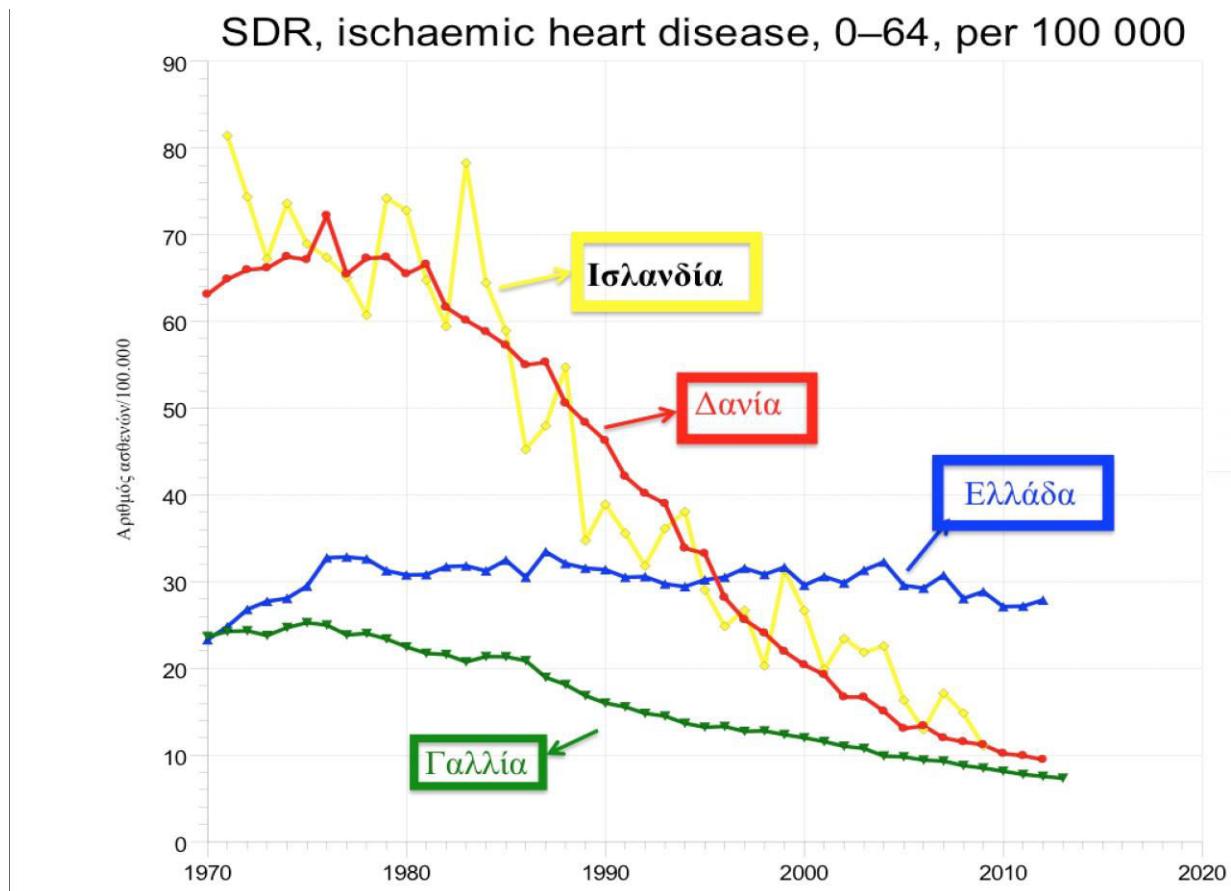
Ενδεικτικά, εκτιμήθηκε ο κίνδυνος εκδήλωσης Αθηρογένεσης σε κάποιες από τις χώρες που προαναφέρθηκαν. Η Αθηρογένεση, είναι ένα σύνδρομο που επηρεάζει τις αρτηρίες και συγκεκριμένα, μειώνουν την ελαστικότητά τους. Τα τοιχώματα των αρτηριών, πυκνώνουν σαν αποτέλεσμα συσσώρευσης λιπαρών, όπως χοληστερόλη και τριγλυκερίδια. Έτσι, σχηματίζονται πολλαπλές πλάκες στο εσωτερικό των αρτηριών. Όταν το 1% της ημερήσιας πρόσληψης σε ενέργεια ~ 20 θερμίδες, το οποίο ισοδυναμεί με 2gr TFA για κάποιον που καταναλώνει 2000 θερμίδες ημερησίως, ο κίνδυνος Αθηρογένεσης αυξάνεται κατά 12%, περίπου. (2)

Μετά από υπολογισμό της εκτίμησης του κινδύνου Αθηρογένεσης για πέντε χώρες, μέσα σε αυτές και η Ελλάδα, αναμένεται οι Μεσογειακές χώρες να κινδυνεύουν λιγότερο από την εκδήλωση αυτής της ασθένειας, γεγονός που δεν αντιστοιχεί στην πραγματικότητα αφού κάθε χρόνο καταγράφονται χιλιάδες θάνατοι που οφείλονται σε καρδιαγγειακές παθήσεις. Παρά την χαμηλή περιεκτικότητα σε trans λιπαρά οξέα σε δημοφιλή τρόφιμα στην Ελλάδα, τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας δείχνουν ότι οι Έλληνες εξακολουθούν να διατρέχουν πολλαπλάσιο κίνδυνο για ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο.



**Εικόνα 4.3.1.:** Εκτίμηση κινδύνου Αθηρογένεσης σε χώρες τις Ευρώπης.

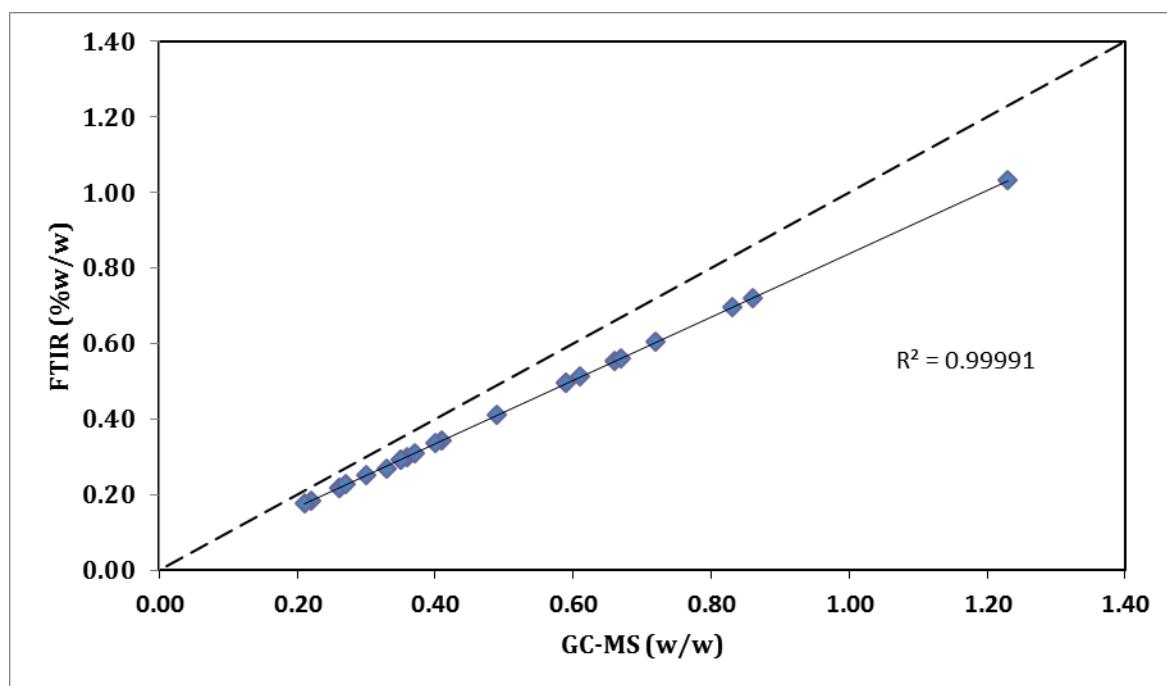
Σύμφωνα με στοιχεία της World Health Organization του 2016 που δείχνουν πόσα άτομα νοσούν από καρδιαγγειακές παθήσεις ανά 100.000 άτομα από το 1970 και μετά, η Γαλλία φαίνεται να έχει το χαμηλότερο ποσοστό. Η Δανία και η Ισλανδία τα τελευταία 30 χρόνια μείωσαν κατά πολύ τα ποσοστά αυτά και ειδικά η Δανία με την θέσπιση νόμου για την περιεκτικότητα των βιομηχανικώς παραγόμενων TFA σε τρόφιμα. Η Ελλάδα, φαίνεται να έχει ένα σταθερό υψηλό ποσοστό, καθώς καμία νομοθεσία δεν έχει θεσπιστεί στη χώρα μας, ούτε ο κόσμος έχει ενημερωθεί για τις επιπτώσεις των TFA στην υγεία.



Εικόνα 4.3.2.: WHO/Europe, Βάση Δεδομένων European HFA, 2016. Ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο, 0-64 ανά 100.000 άτομα πληθυσμού.

#### 4.4. Σύγκριση αποτελεσμάτων GC-MS και FTIR- ATR.

Για να πραγματοποιηθεί συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η κορυφή που εμφανίζεται στους  $966 \text{ cm}^{-1}$  στα FTIR φάσματα. Επιλέχθηκε αυτή η κορυφή, γιατί οι υπόλοιπες έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους στα διάφορα δείγματα και θα ήταν αναγκαία πρόσθετη στατιστική ανάλυση (Partial Least Squares). Πρόσθετα, η συγκεκριμένη κορυφή είναι αυτή που παρουσιάζει την δόνηση μεταξύ των ατόμων άνθρακα του trans δεσμού. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων, φτιάχτηκε γράφημα συμφωνίας (γράφημα 4.4.1.) στο οποίο φαίνεται η μεταξύ τους συσχέτιση.



Γράφημα 4.4.1.: Συσχέτιση αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο τεχνικών.

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρείται συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους. Σχετικός πίνακας με τις αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης που ανιχνεύθηκαν τα TFA για κάθε προς μελέτη δείγμα , παρατίθεται παρακάτω (Πίνακας 4.4.1.).

<b>Δείγμα</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ TFA % w/w (GC-MS)</b>	<b>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ TFA % w/w (FTIR)</b>
1	0.33	0.27
2	0.61	0.51
3	0.26	0.22
4	0.36	0.30
5	0.86	0.72
6	0.41	0.34
7	0.40	0.34
8	0.26	0.22
9	1.23	1.03
10	0.30	0.25
11	0.59	0.49
12	0.37	0.31
13	0.66	0.55
14	0.72	0.60
15	0.49	0.41
16	0.67	0.56
17	0.35	0.29
18	0.22	0.18
19	0.21	0.18
20	0.27	0.23
21	0.35	0.29
22	0.83	0.70
23	0.59	0.49
Average	0.49	0.41

**Πίνακας 4.4.1.: Αποτελέσματα ανίχνευσης TFA των δύο τεχνικών.**

Η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας είναι αυτή που χρησιμοποιείται ευρέως για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των trans λιπαρών σε δείγματα βουτύρων και μαργαρινών. Αν και με την χρήση της μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα για την σύνθεση του εκάστοτε δείγματος, η διαδικασία είναι αρκετά χρονοβόρα για να χρησιμοποιηθεί σε αναλύσεις ρουτίνας. Από την άλλη μεριά, η μέθοδος του *FTIR* ήταν ταχεία με αποτελέσματα τα οποία έρχονται σε συμφωνία με αυτά της μεθόδου *GC-MS*. Το μοντέλο *FTIR* χρειάζεται να αναπτυχθεί μόνο μία φορά σε αντίθεση με τις *GC* αναλύσεις που πρέπει να εκτελούνται σε κάθε δείγμα, συμπεριλαμβανομένης της μετατροπής σε FAME που ακολουθείται από ερμηνεία των δεδομένων. Η χρήση μακριάς πολικής αλυσίδας, βέβαια, στη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας βελτιώνει την επίλυση και ερμηνεία πολλών κορυφών που μπορεί να εμφανίζονται σαν ευρείες μπάντες στα *IR* φάσματα. Για να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα βέβαια, ο συνδυασμός μεθόδων είναι απαραίτητος. [101]

# Κεφάλαιο 5

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

### ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

- **Εικόνα 1.1.1.** : Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease, Mozaffarian et. al., N Engl J Med 2006;354:1601-13.
- **Εικόνα 1.1.2.** : <http://www.internationalhempassociation.org/jiha/jiha5212.html>
- **Εικόνα 1.2.1.**:
- [https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4719/1/ΚΕΦ\\_3\\_ΓΕΝΙΚΕΣ%20ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ%20ΤΩΝ%20ΛΙΠΑΡΩΝ%20ΥΛΩΝ.pdf](https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/4719/1/ΚΕΦ_3_ΓΕΝΙΚΕΣ%20ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ%20ΤΩΝ%20ΛΙΠΑΡΩΝ%20ΥΛΩΝ.pdf)
- **Εικόνα 1.3.1.1.** : [http://www.walmart.ca/en/ip/72risco-all-vegetable shortening/6000016940574](http://www.walmart.ca/en/ip/72risco-all-vegetable-shortening/6000016940574)
- **Εικόνα 1.3.3.1.** : <http://www.anh-usa.org/the-trans-fat-ban-that-never-was/>
- **Εικόνα 1.5.2.1.** : Jorge Salmerónet. Al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women, American Society for Clinical Nutrition 2001;73: 6 1001-1002.
- **Εικόνα 1.6.1.1.** : Μεσογειακή διατροφή, ω-3 λιπαρά και δευτερογενής πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων, Π. Ντετοπούλου, Ελληνική Επιθεώρηση διαιτολόγια-διατροφής 2011, 2(2), 83–94

## **Βιβλιογραφία**

- [1] Παράρτημα Ι σημείο 4 του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1169/2011.
- [2] Dariush Mozaffarian, M.D., M.P.H. et. al., Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease, N Engl J Med 2006; 354:1601-13.
- [3] S. Stender, J. Dyerberg, A. Bysted, T.Leth, A.Astrup: A *trans* world journey. *Atheroscler Suppl.* 2006, 7, 47–52.
- [4] Copyright Technological Educational Institute of Athens, Ioannis Tsaknis 2014. John Tsaknis. "Technology and quality-Fat Olives (TH). Section 10: Hydrogenation. " Version: 1.0. Athens 2014.
- [5] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1912/sabatier-bio.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1912/sabatier-bio.html)
- [6] [http://www.dgfett.de/history/normann/nr\\_fiedler.php](http://www.dgfett.de/history/normann/nr_fiedler.php)
- [7] [https://www.pg.com/translations/history\\_pdf/english\\_history.pdf](https://www.pg.com/translations/history_pdf/english_history.pdf)
- [8] Der Simonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. Control Clin Trials 1986; 7:177-88.
- [9] Legislative highlights: final food labeling regulations. J Am Diet Assoc. 1993; 93:146- 148.
- [10] Walter C. Willett, MD, Dr PH, and Albert Ascherio, MD, Dr PH, Trans Fatty Acids: Are the Effects Only Marginal, American journal of Public Health, 1994 May, vol. 84, No. 5.
- [11] 2003 Danish Nutrition Council The influence of trans-fatty acids on health-fourth edition.
- [12] [https://www.cdc.gov/media/releases/2012/p0208\\_trans-fatty\\_acids.html](https://www.cdc.gov/media/releases/2012/p0208_trans-fatty_acids.html)
- [13] (CSPI, 2014, <http://cspinet.org/transfat/timeline.html> last access: )
- [14] Cristin E. Kearns et. al., Sugar Industry and Coronary Heart Disease Research A Historical Analysis of Internal Documents, JAMA; 2016: 176 (11): 1680- 1685.

- [15] Trans fatty acid content in food. Danish legislation on industrially produced trans fatty acids. In: Ministry of Food, Agriculature and Fisheries. Danish Veterinary Food Administration [website]. Glostrup: Danish Veterinary Food Administration; 2015 <http://www.foedevarestyrelsen.dk/english/Food/Trans%20fatty%20acids/Pages/default.aspx#1>.
- [16] Verordnung des EDI über Speiseöl, Speisefett und daraus hergestellte Erzeugnisse [Regulation of the Federal Department of Home Affairs on cooking oil, cooking fat and products thereof]. Bern: Die Bundesbehörden der Schweizerischen Eidgenossenschaft; 2005 (<http://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/20050165/index.html#fn6>, accessed 13 March 2015).
- [17] Départementfédéral de l'intérieur. Révision du droit des denré esalimentaires: actualisation et adaptation au droit communautaire [Review of food law: updating and adaptation to community law]. In: ConfédérationSuisse [website]. Bern: Confédération Suisse; 2008 (<https://www.news.admin.ch/message/index.html?lang=fr&msg-id=17685> , accessed 13 March 2015).
- [18] Verordnung des Bundesministers für Gesundheit über den Gehalt an trans-Fettsäuren in Lebensmitteln (Trans- Fettsäuren-Verordnung) [Regulation of the Minister of Health on the content of trans-fatty acids in foods (trans-fat regulation)]. Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich. 20 August 2009 ([http://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/BgblAuth/BGBLA\\_2009\\_II\\_267/BGBLA\\_2009\\_II\\_267.html](http://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/BgblAuth/BGBLA_2009_II_267/BGBLA_2009_II_267.html), accessed 13 March 2015).
- [19] Nr. 79/2010 - Reglugerð um hámarks magntransfitursýra í matvælum [Nr. 79/2010 - Regulation establishing a maximum level for trans fatty acids in food]. In: Ministries of Industries and Innovation [website]. Reykjavik: Ministries of Industries and Innovation; 2015 (<http://www.atvinnuvegaraduneyti.is/utgafa/frettir/eldri-frettir/sjrlan/nr/3631>, accessed 13 March 2015).

- [20] Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet. az élelmiszerben lévő transzsírsavak megengedhető legnagyobb mennyiségről, a transzsírsavtartalmú élelmiszer forgalmazásának feltételei róléhatósági ellenőrzéséről, valamint a lakosság transz-sírsav bevitelének nyomon követésére vonatkozó szabályokról [Trans-fatty acids in food: the maximum allowable amount, marketing conditions and regulatory control of trans-fatty foods and rules for the monitoring of population intake of trans-fatty acids] (71/2013. (XI. 20) EMMI rendelet). Budapest: 2013 ([http://njt.hu/cgi-bin/njt\\_doc.cgi?docid=165027.252284](http://njt.hu/cgi-bin/njt_doc.cgi?docid=165027.252284), accessed 13 March 2015).
- [21] Forskrift om transfettsyrer i næringsmidler [English translation]. Oslo: Helse- og omsorgsdepartementet; 2014 (<https://lovdata.no/dokument/LTI/forskrift/> 2014-01-16-34, accessed 13 March 2015).
- [22] Dötsch-Klerk M, Jansen L. The choices programme: a simple, front-of-pack stamp making healthy choices easy. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2008;17(S1): 383–6 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18296385>, accessed 14 March 2015).
- [23] The Choices Programme. In: Healthy choice based on international dietary guidelines [website]. Brussels: Choices Programme. (<http://www.choicesprogramme.org/about/the-programme>, accessed 14 March 2015).
- [24] Les chartes d'engagements volontaires de progrès nutritionnel, 1er juillet 2013 [The charters of voluntary commitments for progress in nutrition]. In: Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes [website]. Paris: Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes; 2013 (<http://www.sante.gouv.fr/les-chartes-d-engagements-volontaires-de-progres-nutritionnel.html> , accessed 14 March 2015).
- [25] Leitlinien zur Minimierung von Trans-Fettsäuren in Lebensmitteln. Gemeinsame Initiative der deutschen Lebensmittelwirtschaft und des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz [Guidelines to minimize trans fatty acids in foods. Joint Initiative of the German food industry and the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection]. Bonn: Federal Ministry

of Food, Agriculture and Consumer Protection; 2012 ([http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Rueckstaende/TransFettsaeuren/TFA\\_Inhalt.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Ernaehrung/Rueckstaende/TransFettsaeuren/TFA_Inhalt.pdf?__blob=publicationFile), accessed 25 March 2015).

[26] Website Task Force VerantwoordeVetzuursamenstelling [website]. Rijswijk: Task Force VerantwoordeVetzuursamenstelling; 2015 (<http://www.vetzuursamenstelling.nl/index.html> , accessed 14 March 2015).

[27] About the Public Health Responsibility Deal. In: Public Health Responsibility Deal [website]. London: Department of Health; 2015 (<https://responsibilitydeal.dh.gov.uk/about/>, accessed 14 March 2015).

[28] The regulation to phase out artificial trans fat in New York City food service establishments (Section 81.08 of the New York City Health Code). How to comply: what restaurants, caterers, mobile food-vending units and others need to know. New York: New York City Department of Health and Mental Hygiene; 2007 (<http://www.nyc.gov/html/doh/downloads/pdf/cardio/cardio-transfat-bro.pdf> , accessed 13 March 2015, + State of California. Assembly Bill No. 97: Chapter 207: Food facilities: trans fats. ([http://leginfo.legislature.ca.gov/faces/billTextClient.xhtml?bill\\_id=200720080AB97&search\\_keywords=artificial+transfat+ban](http://leginfo.legislature.ca.gov/faces/billTextClient.xhtml?bill_id=200720080AB97&search_keywords=artificial+transfat+ban) , accessed 13 March 2015).

[29] Food and Drug Administration. Final determination regarding partially hydrogenated oils; Federal Register. 2013;80:34650 – 34670 (<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2015-06-17/pdf/2015-14883.pdf>, accessed 23 June 2015).

[30] Downs SM, Thow AM, Leeder SR. The effectiveness of policies for reducing dietary trans fat: a systematic review of the evidence. Bulletin of the World Health Organization. 2013 Apr 1;91(4):262–9H (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3629452/>, accessed 14 March 2015).

[31] Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Rosner BA et al. Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. Lancet. 1993;341(8845):581–5.

- [32] Stender S, Dyerberg J, Hølmer G, Ovesen L, Sandström B. The influence of trans fatty acids on health: a report from the Danish Nutrition Council. Clinical Science. 1995;88(4):375–92.
- [33] Stender S, Dyerberg J. The importance of trans-fatty acids for health. Update 2001. Ugeskrift for Laeger. 2001;163(17):2349–53 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347454>, accessed 14 March 2015).
- [34] Stender S, Dyerberg J, Astrup A. Consumer protection through a legislative ban on industrially produced trans fatty acids in foods in Denmark. Scandinavian Journal of Food and Nutrition. 2006;50(4):155–60 (<http://foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/viewFile/1596/1464>, accessed 14 March 2015). + Leth T, Jensen HG, Mikkelsen AA, Bysted A. The effect of the regulation on trans fatty acid content in Danish food. Atherosclerosis Supplements. 2006;7(2):53–6.
- [35] Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980–2009. European Heart Journal. 2013;34(39):3017–27 (<http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/34/39/3017.long>, accessed 14 March 2015).
- [36] WHO (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 916. World Health Organization: Geneva.
- [37] Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P (2004). The Joint WHO/ FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. Public Health Nutr 7, 245S–250S.
- [38] Mozaffarian D, Aro A, Willett WC (2009). Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. Eur J Clin Nutr 63(Suppl 2), S5–S21.
- [39] Mozaffarian D, Willett WC (2007). Trans fatty acids and cardiovascular risk: a unique cardiometabolic imprint? CurrAtheroscler Rep 9, 486–493.

- [40] Mozaffarian D, Clarke R (2009). Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils. *Eur J Clin Nutr* 63(Suppl 2), S22–S33.
- [41] Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes in women. *Ann Intern Med* 1995;122: 481–6.
- [42] Manson JE, RimmEB, StampferMJ, et al. A prospective study of physical activity and the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet* 1991;338:774–8.
- [43] Storlien LH, Baur LA, Kriketos AD, et al. Dietary fats and insulin action. *Diabetologia* 1996;39:621–31.
- [44] Heine RJ, Mulder C, Popp-Snijders C, van der Meer J, van der Veen EA. Linoleic-acid-enriched diet: long-term effects on serum lipoprotein and apolipoprotein concentrations and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 1989;49: 448–56.
- [45] Mensink RPM, Katan MB. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 1990;323:439–45.
- [46] Ascherio A, Katan MB, Zock PL, StampferMJ, Willett WC. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med* 1999;340: 1994–8.
- [47] Christiansen E, Schnider S, Palmvig B, Tauber-Lassen E, Pedersen O. Intake of a diet high in *trans* monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1997;20:881–7.
- [48] Colditz GA, StampferMJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *Am J Epidemiol* 1986;123:48–58.
- [49] Jorge Salmerón et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women, American Society for Clinical Nutrition 2001;73: 6 1001-1002.
- [50] Chapman, D. (1983) *Biomembrane Fluidity: the Concept and Its Development in Membrane Fluidity in Biology*. Vol. 2: General Principles (Aaloia, R.C., ed.) pp. 5–42, Academic Press, New York.
- [51] Martinez, M., and Mougan, I. (1998) Fatty Acid Composition of Human Brain Phospholipids During Normal Development, *J. Neurochem.* 71, 2528–2533.
- [52] Spector, A.A. (1999) Essentiality of Fatty Acids, *Lipids* 34 (suppl.), S1–S3.

- [53] Lim, S.Y., and Suzuki, H. (2000) Intakes of Dietary Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Egg Phosphatidylcholine Improve Maze-Learning Ability in Young and Old Mice, *J. Nutr.* 130, 1629–1632.
- [54] Söderburg, M., Edlund, C., Kristensson, K., and Dallner, G. (1991) Fatty Acid Composition of Brain Phospholipids in Aging and in Alzheimer's Disease, *Lipids* 26, 421–428.
- [55] Söderburg, M., Edlund, C., Kristensson, K., Alafuzoff, I., and Dallner, G. (1992) Lipid Composition in Different Regions of the Brain in Alzheimer's Disease/Senile Dementia of Alzheimer's Type, *J. Neurochem.* 59, 1646–1653.
- [56] Nitsch, R., Pittas, A., Blusttajn, J.K., Slock, B.E., and Growdon, J. (1991) Alterations of Phospholipid Metabolites in Post-Mortem Brains from Patients with Alzheimer's Disease, *Ann. NY Acad. Sci.* 640, 110–113.
- [57] Mulder, M., Ravid, R., Swaab, D.F., deLoet, E.R., Haasdijk, E.D., Julk, J., van der Bloom, J., and Havekes, L.M. (1998) Reduced Levels of Cholesterol, Phospholipids, and Fatty Acids in CSF of Alzheimer's Disease Patients Are Not Related to Apo E4, *Alz. Dis. Assoc. Dis.* 12, 198–203.
- [58] Martha Clare Morris et. al., Dietary Fats and the Risk of Incident Alzheimer Disease, American medical Association, 2003;60:194-200
- [59] Grimm MO, et. al., Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP), *Journal of Nutritional Biochemistry* (2012), 10, 1214- 1223.
- [60] Carpenter KJ. A short history of nutritional science: part 3 (1912–1944). *J Nutr* 2003, 133:3023–3032.
- [61] Carpenter KJ. A short history of nutritional science: part 4 (1945–1985). *J Nutr* 2003, 133:3331–3342.
- [62] Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986, 124:903–915.
- [63] Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol* 2004, 44:152–158.
- [64] Huang CL, Sumpio BE. Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health. *J Am Coll Surg* 2008, 207:407–416.
- [65] Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A et al. Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat. *Atherosclerosis* 1999, 145:351–358.

- [66] Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Antonopoulou S et al. Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediat Inflamm* 2007, 2007:36204.
- [67] Demopoulos VJ, Tani E, Long JP. Synthesis and biological evaluation of 3-(2-aminoethyl) pyrrole derivatives. *Arch Pharm* (Weinheim) 1989, 322:827–828.
- [68] Demopoulos CA, Karantonis HC, Antonopoulou S. Platelet activating factor -a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003, 105:649–724.
- [69] Mitka M. DASH dietary plan could benefit many, but few hypertensive patients follow it. *JAMA* 2007, 298:164–165.
- [70] Simopoulos AP. The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J Nutr* 2001, 131:S3065–S3073.
- [71] Jones JL, Comperatore M, Barona J, Calle MC, Andersen C, McIntosh M et al. A Mediterranean-style, low-glycemic- load diet decreases atherogenic lipoproteins and reduces lipoprotein (a) and oxidized low-density lipoprotein in women with metabolic syndrome. *Metabolism* (in press) doi:10.1016/j.metabol.2011.07.013.
- [72] Leighton F, Urquiaga I. The Mediterranean diets: Nutrition and gastronomy. In: Smith J, Charter E (eds) *Functional food product development*. Singapore, Blackwell Publishing, 2010.
- [73] Nomikos T, Detopoulou P, Fragopoulou E, Pliakis E, Antonopoulou S. Boiled wild artichoke reduces post-prandial glycemic and insulinemic responses in normal subjects but has no effect on metabolic syndrome patients. *Nutr Res* 2007, 27:741–749.
- [74] Fragopoulou E, Detopoulou P, Nomikos T, Pliakis E, Panagiotakos DB, Antonopoulou S. Mediterranean wild plants reduce postprandial platelet aggregation in patients with metabolic syndrome. *Metabolism* 2012, 61:325–334.
- [75] de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994, 343:1454–1459.
- [76] De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Mamelle N, Monjaud I, Touboul P et al. Effect of a mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. Insights into the cardioprotective effect of certain nutriments. *J Am Coll Cardiol* 1996, 28:1103–1108.
- [77] de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999, 99:779–785.

- [78] Singh RB, Rastogi SS, Verma R, Laxmi B, Singh R, Ghosh S et al. Randomised controlled trial of cardioprotective diet in patients with recent acute myocardial infarction: results of one year follow up. *BMJ* 1992, 304:1015–1019.
- [79] Singh RB, Dubnov G, Niaz MA, Ghosh S, Singh R, Rastogi SS et al. Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (IndoMediterranean Diet Heart Study): a randomised singleblind trial. *Lancet* 2002, 360:1455–1461.
- [80] Horton R. Expression of concern: Indo-Mediterranean Diet. *Heart Study*. *Lancet* 2005, 366:354–356
- [81] Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update: a guideline from the American Heart Association. *J Am Coll Cardiol* 57:1404–1423.
- [82] Kafatos A, Verhagen H, Moschandreas J, Apostolaki I, Van Westerop JJ. Mediterranean diet of Crete: foods and nutrient content. *J Am Diet Assoc* 2000, 100:1487–1493.
- [83] Chemiker-Zeitung, 25, Nr. 13, S. 136 (1901).
- [84] Mensink RP, Zock PL, Kester ADM, Katan MM (2003) Effects of dietary fatty acids and carbohydrate on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 77:1146–1155.
- [85] T. Theophanides, *Introduction to Infrared Spectroscopy. Infrared Spectroscopy*. Materials Science, Engineering and Technology. T. Theophanides (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-and-technology>, pp. 1-10, 2002.
- [86] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. ATTS-Analytical Techniques in the Sciences Series.ISBN: 978-0-470-85428-0, 2004.
- [87] Z. M. Khoshhesab, *Reflectance IR spectroscopy*. Infrared Spectroscopy. Materials Science, Engineering and Technology. T. Theophanides (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-and-technology>, pp. 233-244, 2002.
- [88] N.J. Harrick, *Internal reflection spectroscopy*. Wiley- Interscience, New York, 1967.
- [89] Nurulhidayha, A.F. et. al., Authentication analysis of butter from beef fat using Fourier Transform Infraed (FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics, International Food Research Journal 20(3): 1383-1388 (2013)
- [90] Dimitrios Triantafillou et.al. Fatty acid content of margarines in the Greek market (including trans-fatty acids): a contribution to improving consumers' information,

International Journal of Food Sciences and Nutrition (2003) 54, 135-141

[91] Αρχές της ενόργανης ανάλυσης – SKOOG, HOLLER, NIEMAN (2002)

[92] A. Kafatos et. al., Fatty acids composition of Greek margarines. Margarine consumption by the population of Crete and its relationship to adipose tissue analysis, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (1994) 45, 107-1 14

[93] PENELOPE KROUSTALLAKI, GEORGE TSIMPINOS, CONSTANTINE I. VARDAVAS, & ANTHONY KAFATOS, Fatty acid composition of Greek margarines and their change in fatty acid content over the past decades, *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (2011) 62(7): 685–691

[94] Wagner KH, Plasser E, Proell C, Kanzler S. 2008. Comprehensive studies on the trans fatty acid content of Austrian foods: Convenience products, fast food and fats. *Food Chem* 108: 1054 – 1060.

[95] Lake R, Thomson B, Devane G, Scholes P. 1996. Trans fatty acid content of selected New Zealand foods. *J Food Comp Anal* 9:365 – 374.

[96] Saunders D, Jones S, Devane GJ, Scholes P, Lake RJ, Paulin SM. 2007. Trans fatty acids in New Zealand food supply. *J Food Comp Anal* 21:320–325.

[97] Maylet et. al., Fatty Acid Profile Including Trans Fatty Acid Content of Margarines Marketed in Mexico, *J Am Oil Chem Soc* (2011) 88:1485–1495

[98] FAROOQ ANWAR et. al., FATTY ACID COMPOSITION OF DIFFERENT MARGARINES AND BUTTERS FROM PAKISTAN WITH SPECIAL EMPHASIS ON TRANS UNSATURATED CONTENTS, *Journal of Food Quality* 29 (2006) 87–96.

[99] Hulshof et al. Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: The TRANSFAIR study, *European Journal of Clinical Nutrition* (1999) 53, 143-157

[100] van Poppel G, on behalf of the TRANSFAIR Study Group. Intake of *trans* fatty acids in western Europe; the TRANSFAIR study. *Lancet* 1998;351:1099

[101] Hormoz Azizianand John K.G. Kramer, A Rapid Method for the Quantification of Fatty Acids in Fats and Oils with Emphasis on *trans* Fatty Acids Using Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy (FT-NIR), AOCS Press, Vol. 40, no. 8 (2005)

[102] Z. Keménya, K. Recsega, G. Hénon, K. Kovári, and F. Zwobada **JAOCs, Vol. 78, no. 9 (2001)**