



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

**Ελαιοκορωνάλη και Ελαιομισσιονάλη: Νέα συστατικά
του έξτρα παρθένου ελαιολάδου- Αποσαφήνιση της
δομής και της παρουσίας τους στο ελαιόλαδο**

Διαμαντάκος Παναγιώτης

Χημικός Μηχανικός

Υπεύθυνος: Αναπληρωτής καθηγητής Προκόπιος Μαγιάτης

Αθήνα 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία είναι το αποτέλεσμα της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα του Φαρμακευτικού Τμήματος Αθηνών, στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας επετεύχθη χάρη στην πολύτιμη συμβολή φίλων και συνεργατών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως για την συμβολή αυτή:

- Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά, την καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, οι οποίοι δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.
- Τους καθηγητές κ. Λέανδρο Σκαλτσούνη, Βασίλειο Ρούσση και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ.Μ. Κουλάδη που μου έδωσαν την ευκαιρία να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών Προϊόντων.
- Τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Προκόπιο Μαγιάτη, για την ανάθεση του θέματος, την διαρκή παρακολούθηση και καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια των δύο αυτών χρόνων.
- Την ΕΔΙΠ κ. Ελένη Μέλλιου για την επιστημονική και ψυχολογική συμβολή της στην εκπόνηση της εργασίας και για την ευρύτερη συνεργασία.
- Τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών Προϊόντων για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά την διάρκεια των μαθημάτων και τις συμβουλές τους κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στον Τομέα.
- Τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Αθανάσιο Γκιμίση από το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την συνεργασία του και την συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.
- Τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Παλαιοπαναγιάς Λακωνίας για την παραχώρηση των εγκαταστάσεων του καθώς και μεγάλων ποσοτήτων ελαιόκαρπου.
- Την μεταπτυχιακό Ευγενία Μουσούρη για την ανιδιοτελή συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση κατά τον πρώτο χρόνο παρουσίας μου στο εργαστήριο.
- Την διδάκτορα Νικητία Μέξια για τις πολύτιμες συμβουλές της
- Τους φίλους μου Αννια, Χρυσάνθη, Ηλιάνα, Σωτήρη, Κατερίνα, Γιώργο, Πάολα, Μαρία για την φιλία τους και για τις ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε στο εργαστήριο.

- Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του τμήματος για το ευχάριστο κλίμα
- Την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την διαρκή υλική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	7
1.Εισαγωγή.....	9
1.1 Ελιά.....	10
Βοτανική ταξινόμηση.....	10
1.2 Ελαιόλαδο.....	11
1.2.1 Η παραγωγή του ελαιολάδου στην αρχαιότητα	11
1.2.2 Τα σύγχρονα ελαιοτριβεία	13
1.2.3 Παραγωγή ελαιολάδου.....	14
1.3 Χημική σύσταση του ελαιολάδου.....	14
2. Ανάλυση ελαιολάδου.....	17
Απομόνωση και Προσδιορισμός Φαινολικών συστατικών στο Παρθένο Ελαιόλαδο.....	17
2.1 Απομόνωση Φαινολικών συστατικών στο Ελαιόλαδο.....	17
Εκχύλιση φαινολικών συστατικών από ελαιόλαδο.	
2.1.1 Υγρή – υγρή εκχύλιση.	18
2.1.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction).....	20
2.1.3 Εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης.....	21
Μικροεκχύλιση	
2.2 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στο Ελαιόλαδο.....	23
2.2.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός: πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	23
2.2.2 Από το Folin-Denis στο Folin-Ciocalteu.....	24
2.2.3 Χρωματογραφικός προσδιορισμός του φαινολικού προφίλ	25
2.2.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).	26
2.2.5 Ανάλυση με GC και GC-MS των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.....	26
2.2.6 Ανάλυση HPLC και LC-MS.....	28

2.2.7 Capillary Electrophoresis: Μια χρήσιμη τεχνική για την ανάλυση των ελαιόλαδων.....31

3. Πειραματικό μέρος.....32

3.1 Πειραματικές μέθοδοι.....33

3.2 Ελευρωπεΐνη και Λιγκστροσίδη.34

3.3 Άγλυκο της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκστροσίδη.....35

3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός.....38

3.4.1 Πρωτόκολλο εκχύλισης και φασματοσκοπικός προσδιορισμός.....38

3.4.2 Απομόνωση ενώσεων.....40

3.4.3 Εκχύλιση του ελαιολάδου.....41

3.4.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.42

3.5 Ανάλυση ζωνών πλάκας χρωματογραφίας..... 43

3.5.1 Προσδιορισμός δομής ενώσεων “Ζώνης Α”44

 Εξέταση αλδεϋδική περιοχής.44

 Χαρακτηριστικά πρωτόνια ενολικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη.....54

3.6.1 Περιγραφή των ισομερών του άγλυκου της ελευρωπεΐνης.....59

3.6.2 Σύνθεση του άγλυκου της ελευρωπεΐνης.....60

3.6.3 Προσδιορισμός δομής του συνθετικού μίγματος.....62

 Περιγραφή διαλδεϋδικών μορφών.....62

4. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....76

Χρήση επιλεκτικού παλμού NMR.....77

5. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των ισομερών ελευρωπεΐνης και λιγκστροσίδη.....83

6. Στατιστική ανάλυση.....88

7. Συμπεράσματα.....95

8. Βιβλιογραφία.....96

➤ Δημοσίευση

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην διπλωματική εργασία που παρουσιάζουμε γίνεται μελέτη συστατικών του ελαιολάδου που προέρχονται από τους δευτερογενείς μεταβολίτες ελευρωπεΐνη και λιγκστροσίδη. Το ελαιόλαδο περιέχει σημαντικές ποσότητες πολικών φαινολικών συστατικών. Η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των ενώσεων αποτελούν εστέρες της τυροσόλης και της υδροξυ-τυροσόλης συνδεδεμένα με σεκοϊριδοειδή προερχόμενα από την ελευρωπεΐνη και τον λιγκστροσίδη.

Η διαδικασία απομόνωσης και χαρακτηρισμού των ενώσεων που εμπεριέχονται στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου αποτελεί ένα πλατύ πεδίο ερευνάς τις τελευταίες δεκαετίες, εξαιτίας των ιδιαιτεροτήτων και της πολυπλοκότητας των ενώσεων αυτών. Αυτός είναι και ο λόγος που πολλές φορές επικρατεί σύγχυση γύρω από την ακριβή δομή κάποιων ενώσεων αλλά και της ονομασίας τους.

Η διπλωματική εργασία που παρουσιάζουμε σε πρώτο στάδιο ασχολείται με τον χαρακτηρισμό ενός αριθμού νέων ή ατελώς περιεγραμμένων μορφών του άγλυκου του λιγκστροσίδη και του άγλυκου της ελευρωπεΐνης. Δύο από αυτές που είναι σταθερές ενολικές μορφές, περιγράφονται για πρώτη φορά ως συστατικά προερχόμενα από το ελαιόλαδο αν και η ύπαρξή τους έχει αποτελεσει αντικείμενο προηγούμενων υποθέσεων.

Σε δεύτερο στάδιο θα προσπαθήσουμε να ξεδιαλύνουμε το τοπίο γύρω από τα σύνθετα ονόματα των ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των άγλυκων λιγκστροσίδη και ελευρωπεΐνης. Τα προβλήματα που δημιουργούνται από τα πολύπλοκα ονόματα αυτά δεν αφορούν μόνο την δυσκολία χρήσης των ονομασιών αυτών, αλλά πολλές φορές οδηγούν σε λανθασμένες περιγραφές μορίων που εντοπίζονται σε εκχυλίσματα. Έτσι προτείνουμε τις ονομασίες ελαιοκορωνάλη και ελαιομιοσιονάλη για δύο από τα ισομερή των άγλυκων που εντοπίζονται στο ελαιόλαδο.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές κατά την διάρκεια χρωματογραφίας τόσο κανονικής όσο και αντίστροφης φάσης μετασχηματίζονται στις γνωστές μονοαλδεϋδικές κυκλικές μορφές των άγλυκων της ελευρωπεΐνης και λιγκστροσίδη. Η αδυναμία απομόνωσης των ενώσεων αυτών με μεγάλο αριθμό τεχνικών που αναφέρονται στην εργασία, εξηγεί το γεγονός ότι αυτές οι ουσίες δεν είχαν περιγραφεί έως τώρα. Η

ύπαρξη τους στο ελαιόλαδο επιβεβαιώθηκε με άμεση παρατήρηση σε NMR με την χρήση επιλεκτικού παλμού συντονισμού και απουσία οποιουδήποτε διαλύτη.

Ύστερα από ανάλυση περισσότερων από 800 δειγμάτων από την βάση δεδομένων του εργαστηρίου προέκυψε ότι σε αρκετές περιπτώσεις οι ενώσεις αυτές αποτελούσαν το κυρίαρχο μεταξύ άλλων, φαινολικό συστατικό. Ξεκινώντας από τις ποικιλίες Κορωνέικη και Mission και επεκτεινόμενοι στην συνέχεια και σε άλλες ποικιλίες οι ενώσεις αυτές αποτελούν σταθερό συστατικό του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την ανάγκη παρουσίασης μιας ορθής δομής και ονομασίας των μελετούμενων ενώσεων.

Τέλος παρουσιάζουμε μια χαρτογράφηση των ελληνικών ελαιολάδων, μέσα από μια στατιστική ανάλυση που αφορά ένα πλήθος περισσότερων από 800 δειγμάτων ελαιολάδου. Η ανάλυση έχει ως επίκεντρο το άθροισμα των φαινολικών ενώσεων που σχετίζονται με την οδηγία της Ε.Ε. περί υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου.

1.Εισαγωγή

Το ελαιόλαδο είναι το προϊόν επεξεργασίας του καρπού της ελιάς. Αποτελεί βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής και ένα πολύ σημαντικό εμπορικό προϊόν τόσο για την Ελλάδα όσο και για τις χώρες της Μεσογείου ευρύτερα. Από το φυτό της ελιάς παράγονται ένα πλήθος βιοδραστικών μεταβολιτών τα οποία κατ' επέκταση μεταφέρονται και στο ελαιόλαδο μαζί με άλλα συστατικά που παράγονται κατά την διάρκεια της ελαιοποίησης του καρπού.

Η μεγάλη σημασία των βιολογικών δράσεων των συστατικών αυτών καθώς και η υψηλή περιεκτικότητα των ενώσεων αυτών στο ελαιόλαδο ενισχύουν τον ισχυρισμό περί υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου. Μάλιστα, η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ 432/2012) με βάση την επιστημονική γνώμη του EFSA επέτρεψε πρόσφατα συγκεκριμένους ισχυρισμούς υγείας που σχετίζονται με τα επίπεδα των συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στο ελαιόλαδο [1].

Τα συστατικά τα οποία είναι υπεύθυνα για τον συγκεκριμένο ισχυρισμό υγείας περί "προστασίας των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες" είναι η τυροσόλη, η υδρόξυ-τυροσόλη και τα παράγωγά αυτών. Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η ακριβής γνώση της χημικής ταυτότητας όλων αυτών των συστατικών καθώς και ο ποσοτικός τους προσδιορισμός μέσα στο ελαιόλαδο. Επί του παρόντος δεν υπάρχει επίσημη υιοθετημένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών που σχετίζονται με τον ισχυρισμό υγείας λόγω γνωστών τεχνικών δυσκολιών.

Στο παρακάτω κεφάλαιο θα παρουσιάσουμε στοιχεία σχετικά με το ελαιόδεντρο καθώς και το προϊόν εκχύλισης του καρπού της ελιάς, το ελαιόλαδο.

1.1 Ελιά

Το ελαιόδεντρο, ή ελιά, είναι ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργήσιμα είδη στον πλανήτη. Η καλλιέργεια του ελαιόδεντρου χρονολογείται πρώτη φορά περίπου το 7000πΧ . Η καλλιέργεια δε του ελαιόδεντρου για εμπορικούς λόγους αναφέρεται από την εποχή των ιστορικών χρόνων στον Μινωικό πολιτισμό περίπου το 3000πΧ [2]. Από την ίδια περίοδο προέχονται και αρχαιολογικά ευρήματα που σχετίζονται με την αξιοποίηση του καρπού του ελαιόδεντρου. Οι θεραπευτικές ιδιότητες των προϊόντων της ελιάς ήταν ήδη γνωστές από την αρχαιότητα. Συχνά αναφέρεται η χρήση του ελαιόλαδου για την περιποίηση του δέρματος καθώς και η χρήση εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς για την θεραπεία της ελονοσίας στην αρχαία Αίγυπτο.

Βοτανική ταξινόμηση.

Το φυτό με συστηματική βοτανική ονομασία *Olea europaea*, ανήκει στην οικογένεια των Ελαιδών (*Oleaceae*). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 22 γένη και πάνω από 500 είδη. Χαρακτηριστικά γένη που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι τα *Fraxinus*, *Ligustrum* και *Forsythia*. Το πιο σημαντικό βέβαια γένος αποτελεί το γένος *Olea*, καθώς αριθμεί περίπου 40 είδη. Το πιο διαδεδομένο και πιο σημαντικό είδος εξ αυτών, όσο αφορά τόσο το επιστημονικό όσο και το οικονομικό ενδιαφέρον, είναι το είδος *Olea europaea*. Όσο αφορά στα Ταχα που υπάγονται στο είδος *Olea europaea*, αυτά τα διακρίνουμε στις καλλιεργούμενες ποικιλίες οι οποίες συνιστούν το υποείδος *Olea europaea* var. *Sativa*. Πολλοί βοτανολόγοι θεωρούν την αγριελιά ξεχωριστό είδος με την ονομασία *Olea sylvestris* εντούτοις οι περισσότεροι κατατάσσουν την αγριελιά ως υποείδος ή αυτόνομη ποικιλία με το όνομα *sylvestris* εντός του είδους *europaea*.

Πίνακας 1. Βοτανική ταξινόμηση ελιάς

Βασίλειο	Plantae
Διάρθρωση	Magnoliophyta
Κλάση	Magnoliopsida
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Oleaceae
Υποοικογένεια	Oleoideae
Γένος	Olea

Πρόκειται για δέντρο αειθαλές, που φτάνει μέχρι και ύψος 20 μέτρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις βέβαια λόγω του κλαδέματος το ύψος του δεν ξεπερνά τα 5 μέτρα. Ο μέσος όρος

ζωής για το δέντρο της ελιάς είναι 500 χρόνια εντούτοις στην περιοχή της Μεσογείου εντοπίζονται και ελαιόδεντρα 1500 ετών ενώ το αρχαιότερο στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι είναι ηλικίας 5000 ετών. Παρουσιάζει πλούσιο ριζικό σύστημα που της επιτρέπει την στήριξη του δέντρου αλλά και την πρόσληψη θρεπτικών μέσων από το έδαφος ακόμα και σε ξηρά κλίματα [3].

1.2 Ελαιόλαδο

1.2.1 Η παραγωγή του ελαιολάδου στην αρχαιότητα

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό συστατικό της διατροφής του ανθρώπου εδώ και χιλιάδες χρόνια λόγω της θρεπτικής του αξίας. Η παραγωγή του ελαιολάδου χρονολογείται πριν από τα ιστορικά χρόνια. Συγκεκριμένα στον Ελλαδικό χώρο έχουν βρεθεί αρχαιολογικά ευρήματα όπως πιεστήρια παραγωγής ελαιολάδου καθώς και πιθάρια αποθήκευσής του, που αποδεικνύουν την οργανωμένη παραγωγή του στα προϊστορικά χρόνια.

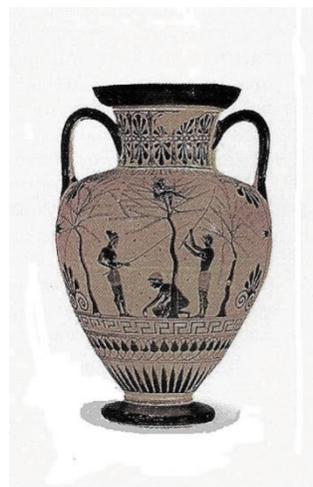
Σύμφωνα με ανασκαφές που πραγματοποιήθηκαν στο πρωτοκυκλαδικό νεκροταφείο Σπεδού το 1903 (2.700-2.300 π.Χ.) μεταξύ των άλλων ευρημάτων αναφέρεται ένα επάργυρο πήλινο αγγείο το οποίο έφερε ίχνη αλλοιωμένου ελαιολάδου [4] [5]. Η παραγωγή του ελαιολάδου στην αρχαιότητα γινόταν με την βοήθεια μυλοπετρών. Το σύστημα αυτό αποτελούταν αρχικά από μια και μεταγενέστερα δύο παράλληλες μυλόπετρες (Τραπητής) το οποίο κυλούσε πάνω σε μια τραχιά πέτρινη λεκάνη στην οποία βρίσκονταν οι ελιές.



Εικόνα 1: Αρχαίο ελαιοτριβείο με μυλόπετρες

Μετά την πρώτη σύνθλιψη στο μύλο και αφού απομακρύνονταν τα κουκούτσια της ελιάς ο πολτός βυθίζονταν σε ζεστό νερό και έπειτα υποβάλλονταν σε μία δεύτερη πίεση, με την πρέσα τύπου δοκού σύνθλιψης. Έτσι το λάδι μαζί με τους υπόλοιπους χυμούς που ξεχωρίζονταν από τον πολτό, συγκεντρώνονταν σε αγγεία για να «ηρεμήσει».

Ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από τους υπόλοιπους χυμούς γινόταν με διάφορες τεχνικές που βασιζόνταν στην βαρύτητα καθώς το ελαιόλαδο είχε την ιδιότητα να είναι ελαφρύτερο από άλλα συστατικά και να επιπλέει. Έτσι το ελαιόλαδο με απλή απόχυση απομακρύνεται από τις δεξαμενές που βρίσκεται μαζί με τον πολτό ή σε μεταγενέστερες εποχές το λάδι απομακρύνεται με ειδικά αγγεία – διαχωριστήρες που έφεραν στο κάτω μέρος τους κοντά στο ύψος της βάσης, μία προχοή για τη διαδοχική απελευθέρωση των υγρών. Τα φυτικά υγρά ως βαρύτερα από το λάδι έρεαν πρώτα, ενώ στη συνέχεια έρεε το λάδι που συλλέγονταν πάλι μέσω της προχοής σε αγγείο ή δεξαμενές για περαιτέρω καθαρισμό [6].



Εικόνα 2: Αγγεία που απεικονίζουν την ελαιοκομική διαδικασία

Μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε ότι στην αρχαιότητα απουσιάζει η διαδικασία της μάλαξης του πολτού. Η μόνη μάλαξη που υφίσταται ο καρπός είναι μόνο κατά την διάρκεια της έκθλιψης της ελιάς όπου η μυλόπετρα κυλά πάνω στον πολτό δημιουργώντας ένα είδος μάλαξης.

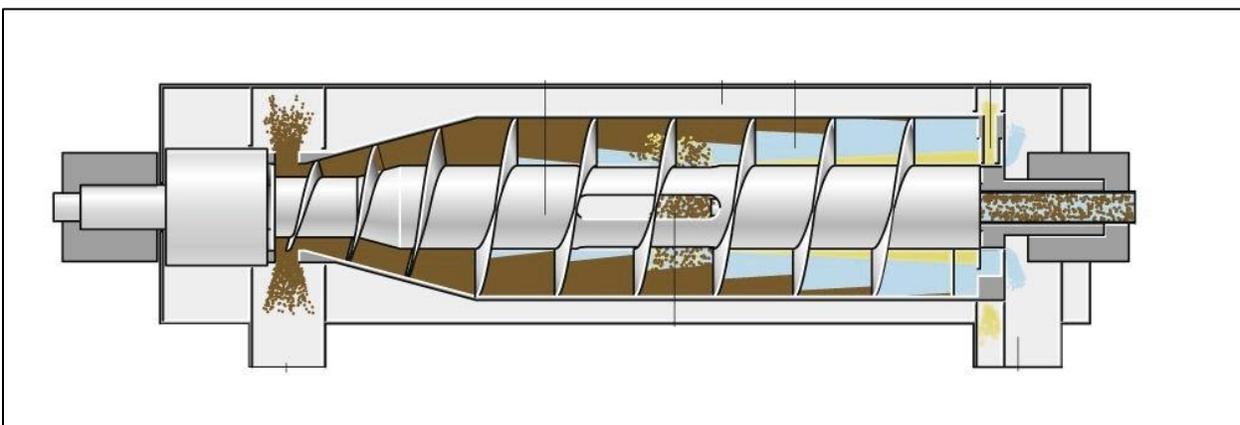
1.2.2 Τα σύγχρονα ελαιοτριβεία

Στα σύγχρονα ελαιοτριβεία δύο και τριών φάσεων το λάδι παράγεται με την βοήθεια της τεχνολογίας κάτω από συγκεκριμένες προδιαγραφές.

Η παραγωγή του ελαιολάδου ξεκινάει με την απομάκρυνση των φύλλων της ελιάς και των κλαδιών με την βοήθεια αέρα και στην συνέχεια ο καρπός πηγαίνει στο “πλυντήριο”. Εκεί με την βοήθεια νερού απομακρύνονται από το καρπό ξένες προσμίξεις.

Ο καρπός εισέρχεται στον σπαστήρα. Εκεί πολτοποιείται και διέρχεται από μεταλλικό κόσκινο με σπές συγκεκριμένου διαμέτρου με σκοπό να πολτοποιείται ομοιόμορφα. Ο πολτός ελιάς εισέρχεται στους μαλακτήρες όπου ξεκινάει η διαδικασία της μάλαξης. Η μάλαξη συνήθως γίνεται σε πολλές περιπτώσεις παρουσία θερμοκρασίας που κυμαίνεται από 25-35 °C και διαρκεί για χρονικό διάστημα που επίσης ποικίλει από 30 min έως και 60 min.

Στην συνέχεια ο πολτός ελιάς εισέρχεται στο decanter παρουσία ή απουσία νερού, έναν διαχωριστή που χρησιμοποιεί την φυγόκεντρο για να διαχωρίσει το ελαιόλαδο από τα υπόλοιπα συστατικά του.



Εικόνα 3:Λειτουργία ενός φυγοκεντρωτή για τον διαχωρισμό του ελαιολάδου από την σάρκα της ελιάς

Στην έξοδο του φυγοκεντρωτή παραλαμβάνεται το ελαιόλαδο το οποίο για περαιτέρω καθαρισμό περνά και από δεύτερο κάθετο φυγοκεντρωτή και προκύπτει το τελικό προϊόν.

Το ελαιόλαδο φυλάσσεται σε ανοξειδωτες δεξαμενές απουσία οξυγόνου με σκοπό την αποθήκευσή του και τον καθαρισμό του από διάφορα ιζήματα που παραμένουν μετά την παραγωγική του διαδικασία.

1.2.3 Παραγωγή ελαιολάδου.

Ο καρπός της ελιάς ωριμάζει στα μέσα προς τέλη του φθινοπώρου, οπότε και ξεκινάει η συγκομιδή και ελαιοποίηση του καρπού. Ιδανικά η ελαιοκομική περίοδος ξεκινάει τον Οκτώβρη και τελειώνει τους μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο. Η απόδοση του ελαιολάδου εκτεφρασμένη ως κιλά ελαιολάδου ανά κιλά ελαιόκαρπου, αυξάνεται όσο ωριμάζει ο καρπός της ελιάς.

1.3 Χημική σύσταση του ελαιολάδου.

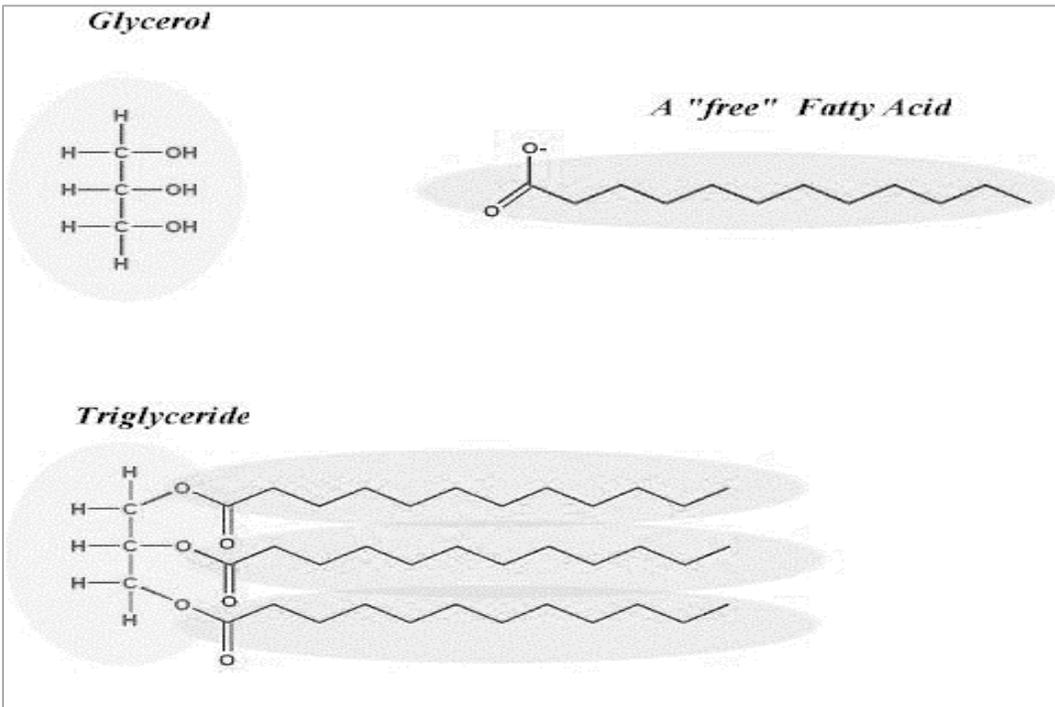
Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα σύνθετο μίγμα συστατικών. Η χημική σύσταση του ελαιόκαρπου και κατ' επέκταση του ελαιολάδου εξαρτάται κατά κύριο λόγο από γενετικούς παράγοντες, ωστόσο παράγοντες όπως το κλίμα, η καλλιέργεια, η μέθοδος ελαιοποίησης και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού θεωρούνται ότι επηρεάζουν σημαντικά την σύσταση του ελαιολάδου [7].

Τα χημικά συστατικά του ελαιολάδου έχουν αποτελέσει πεδίο έρευνας εδώ και πολλά χρόνια λόγω των πολύτιμων συστατικών του ελαιολάδου και τον ρόλο αυτού στην μεσογειακή διατροφή.

Το ελαιόλαδο αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια και λίπη, και περιέχει μικρές ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων, γλυκερόλης, φωσφατίδια, χρωστικές και αρωματικές ενώσεις, στερόλες καθώς και μικροσκοπικών κομματιών της ελιάς.

Λιπαρά οξέα.

Οι τριάκυλο-γλυκερόλες που είναι και το κύριο συστατικό του ελαιολάδου, αποτελούν βασική αποταμιευτική μονάδα ενέργειας για τα ζώα και τα φυτά. Από χημική σκοπιά οι ενώσεις αυτές προέρχονται από την φυσική εστεροποίηση τριών μορίων λιπαρού οξέος με ένα μόριο γλυκερίνης. Το μόριο της γλυκερόλης που προκύπτει είναι σχηματισμού "Ε", με το λιπαρό οξύ να είναι μια υδρογονανθρακική αλυσίδα αποτελούμενη από 12 έως 24 μόρια άνθρακα.



Εικόνα 4: Σχηματισμός τριάκυλο- γλυκερολών

Τα λιπαρά οξέα που συνθέτουν τα τριγλυκερίδια έχουν γενικό χημικό τύπο $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ όπου η ένας αριθμός μεταξύ 12 και 22. Εάν κανένας διπλός δεσμός δεν εμφανίζεται στο μόριο τότε η ένωση αυτή λέγεται κορεσμένο λιπαρό οξύ. Στις περιπτώσεις που εμφανίζονται λιπαρά οξέα τότε αυτά τα ονομάζουμε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Αναλόγως τον αριθμό των διπλών δεσμών που εντοπίζονται στην ανθρακική αλυσίδα διακρίνουμε τα λιπαρά οξέα σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο είναι το ελαϊκό οξύ, το λινελαϊκό οξύ, το παλμιτικό οξύ, το στεατικό οξύ και το λινολενικό οξύ.

Πίνακας 2. Κύρια λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο

Ελαϊκό οξύ C18:1 (Ω9)		55-83%
Λινελαϊκό οξύ C18:2 (Ω6)		3,5-21%
Παλμιτικό οξύ C16:0		7,5-20%
Στεατικό οξύ C18:0		0,5-5%
Λινολενικό οξύ C18:3 (Ω3)		0-1,5%

Οι τριάκυλο-γλυκερόλες συντίθενται από τρία μόρια λιπαρών οξέων τα οποία εστεροποιούν ένα μόριο γλυκερίνης. Η πιο συνήθης σύνθεση είναι αυτή όπου τρία μόρια ελαϊκού οξέος ενώνονται με το μόριο της γλυκερίνης (OOO). Με μικρότερη συχνότητα εντοπίζονται δυο μόρια ολειακού οξέος μαζί με ένα μόριο παλμιτικού οξέος (POO), ενώ με ακόμη μικρότερη συχνότητα θα συναντήσουμε τα μόρια του λινολενικού και στεατικού οξέος. Το ελαιόλαδο περιέχει μεγαλύτερα ποσοστά ελαϊκού οξέος από ότι λινολενικού και λινελαϊκού οξέος σε σχέση με άλλα έλαια. Κατά συνέπεια στα μόρια των λιπαρών οξέων εμφανίζονται λιγότεροι διπλοί δεσμοί καθιστώντας το ελαιόλαδο περισσότερο ανθεκτικό στην θερμότητα, την ακτινοβολία κλπ.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που εντοπίζονται στο ελαιόλαδο, αξίζει να σημειωθεί ότι είναι cis λιπαρά οξέα. Στο ελαιόλαδο δεν εντοπίζονται trans λιπαρά οξέα.

Ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Στο ελαιόλαδο πέρα από τα λιπαρά οξέα που αναφέραμε παραπάνω, υπάρχουν και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προέρχονται από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών ως αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι είτε λόγω ασθενειών του ελαιόκαρπου είτε λόγω της κακής μεταχείρισης του ελαιόκαρπου πριν και μετά την διαδικασία της ελαιοποίησης. Το ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων συνθέτουν τον όρο της οξύτητας του ελαιολάδου [8].

Υπεροξειδία

Πέρα από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που οφείλονται στην υδρόλυση των λιπαρών οξέων, στο ελαιόλαδο εντοπίζουμε και τα προϊόντα οξειδωσης του ελαιολάδου. Τα υπεροξειδία είναι τα πρωτογενή προϊόντα διάσπασης του ελαιολάδου λόγω της εκτεταμένης επαφής του ελαίου με το οξυγόνο ή με την ακτινοβολία.

Φαινολικά συστατικά.

Στο ελαιόλαδο περιέχονται πλήθος φαινολικών ενώσεων. Το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου έχει αποτελέσει για πολλά χρόνια αντικείμενο μελέτης.

2. Ανάλυση ελαιολάδου

Απομόνωση και Προσδιορισμός Φαινολικών συστατικών στο Παρθένο Ελαιόλαδο

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται μια ανασκόπηση των κυριότερων μεθόδων που αφορούν την μελέτη του φαινολικού κλάσματος του έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

Η μελέτη αυτή ξεκινάει με τις μεθόδους εκχύλισης του φαινολικού κλάσματος. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την παραλαβή του φαινολικού κλάσματος με κυριότερες εκ των οποίων η μέθοδος της υγρής-υγρής εκχύλισης, η εκχύλιση στερεής φάσης καθώς και διάφορες παραλλαγές αυτών των τεχνικών, ενώ νέες σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι όπως η εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στα χέρια των ερευνητών.

2.1 Απομόνωση Φαινολικών συστατικών στο Ελαιόλαδο

Το στάδιο της απομόνωσης φαινολικών συστατικών από ένα δείγμα παρθένου ελαιολάδου αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο για μια ορθή μετέπειτα ανάλυση. Το ελαιόλαδο και τα φυτικά εκχυλίσματα εν γένει, εμπεριέχουν πολύ συχνά ένα ιδιαίτερος πολύπλοκο και ετερογενές μίγμα πολυφαινολικών συστατικών, πολλές φορές άγνωστης δομής, γεγονός που καθιστά την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης ένα κρίσιμο στάδιο. Στόχος είναι η απομόνωση των επιθυμητών κλασμάτων του συνολικού εκχυλίσματος στην υψηλότερη δυνατή απόδοση, και η αποφυγή πιθανών δομικών αλλαγών που μπορεί να συμβούν στις ενώσεις που αρχικά υπάρχουν στο εκχύλισμα, όπως η υδρόλυση, η οξειδωση ή η ισομερίωση. [9]

Για την απομόνωση πολυφαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο έχουν προταθεί πολλές μέθοδοι οι περισσότερες εκ των οποίων βασίζονται στην μέθοδο της υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) και την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE). Οι συγκεκριμένες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές παραλλαγές από τους διάφορους ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποιούν ποικίλα συστήματα διαλυτών στις εκχυλίσεις ανάλογα με τον στόχο της κάθε μελέτης. Οι διαφορές στον τρόπο λειτουργίας των μεθόδων, βέβαια, δεν αφορούν μόνο τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην υγρή – υγρή εκχύλιση και την εκχύλιση στερεής φάσης, αλλά και στις ποσότητες των αρχικών δειγμάτων που λαμβάνονται για ανάλυση, καθώς και οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων στην διάρκεια της ανάλυσης.

2.1.1 Υγρή – υγρή εκχύλιση.

Η μέθοδος της υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) συνίσταται στην μεταφορά μιας ή περισσότερων διαλυμένων ουσιών που περιέχονται σε ένα αρχικό διάλυμα, σε ένα άλλο μη αναμίξιμο υγρό, τον διαλύτη, ο οποίος πλέον αποτελεί το εκχύλισμα. Η μέθοδος της υγρής – υγρής εκχύλισης βασίζεται στην διαφορετική σχετική διαλυτότητα μιας ουσίας σε δύο, μη αναμίξιμα, υγρά. Συνήθως τα δύο υγρά είναι το νερό και κάποιος οργανικός διαλύτης. [10]

Η μέθοδος της υγρής - υγρής εκχύλισης έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν πολύ συχνά για την εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου. Σε ένα τυπικό πρωτόκολλο, τα φαινολικά κλάσματα του ελαιολάδου εκχυλίζονται από ένα δείγμα ελαιολάδου με διάλυση μιας ποσότητας ελαιολάδου σε λιπόφιλο διαλύτη, συνήθως εξάνιο, το οποίο περιέχει σημαντικά ποσοστά μεθανόλης ή μίγματος μεθανόλης/νερού (συγκέντρωση νερού από 0 έως 40%). Η εκχύλιση γίνεται είτε με απλή ανάδευση είτε με χρήση υπερήχων για μερικά λεπτά. Μετά την εκχύλιση γίνεται διαχωρισμός της λιπόφιλης και της υδατικής φάσης με φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 3min. Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική φάση εξατμίζεται στους 35 °C σε συσκευή απόσταξης rotary evaporator. Το εκχύλισμα στην συνέχεια εκχυλίζεται άλλες δύο φορές με εξάνιο για να επιτευχθεί καλύτερη απολίπανση και το εκχύλισμα εξατμίζεται ξανά. Η χρήση του κατάλληλου συστήματος διαλυτών είναι ένα στάδιο που επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της μεθόδου, καθώς τόσο η φύση των διαλυτών που επιλέγονται όσο και οι σχετικές αναλογίες μεταξύ των διαλυτών καθορίζουν την ανάκτηση των πολυφαινολικών στο τελικό εκχύλισμα. Επίσης, άλλοι διαλύτες όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας και το χλωροφόρμιο έχουν προταθεί [11, 12]. Ωστόσο, η προσθήκη εξανίου ή άλλων οργανικών διαλυτών στο ελαιολάδο πριν την εκχύλιση, δεν οδήγησε σε σημαντική βελτίωση τουλάχιστον όσο αφορά την αύξηση της ανάκτησης των πολυφαινολικών συστατικών.

Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σύστημα διαλυτών τετραϋδροφουράνιο/νερό και στην συνέχεια φυγοκέντρηση, καθώς και εκχύλιση με N,N-dimethylformamide.

Η χρήση των υπερήχων συγκριτικά με την απλή ανάδευση μελετήθηκε από τους T. Jerman Kleu, B. Mozetic, Vodopivec [13]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αν και η απλή ανάδευση δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα, η χρήση υπερήχων κατά την διάρκεια της εκχύλισης έχει ως αποτέλεσμα την βέλτιστη ανάκτηση του φαινολικού κλάσματος. Στην ίδια εργασία παρουσιάζεται και μια παραλλαγή της μεθόδου αυτή με ψύξη του δείγματος (2-3 ώρες στους -25°C) κατά την οποία επιτυγχάνεται καλύτερη απομάκρυνση του μη πολικού κλάσματος.

Στην ερευνητική εργασία των Montedoro et al 1992, εξετάστηκαν οι μέθοδοι εκχύλισης για απλά και υδρολύσιμα φαινολικά συστατικά στο παρθένο ελαιολάδο, δοκιμάζοντας

διαφορετικούς διαλύτες σε διαφορετικά συστήματα , και διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων [14]. Το συμπέρασμα ήταν ότι το βέλτιστο σύστημα διαλυτών ήταν το μεθανόλη/νερό (80:20 v/v) σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Ωστόσο, λίγα χρόνια αργότερα, Angerosa et al. παρουσίασαν αντίθετα αποτελέσματα. Η ατελής ανάκτηση κάποιων συστατικών και η δημιουργία γαλακτώματος ανάμεσα στο νερό και την μεθανόλη τους οδήγησε στο να διαλέξουν καθαρή μεθανόλη για την εκχύλιση [15].

Ο Cortesi et al δοκίμασαν εκχύλιση των πολικών συστατικών του ελαιολάδου με τετραϋδροφουράνιο (80:20 v/v) και στην συνέχεια φυγοκέντρηση, και έφτασαν στο συμπέρασμα πως για την συγκεκριμένη μέθοδο η ανάκτηση ήταν πέντε φορές μεγαλύτερη για την υδροξυτυροσόλη και δύο φορές για την τυροσόλη σε σχέση με το σύστημα μεθανόλη/νερό (60:40 v/v). Η χρήση N,N-dimethylformamide έδειξε να έχει ενδιαφέροντα αποτελέσματα στα επίπεδα της ανάκτησης πολυφαινολικών συστατικών [16].

Μετά την διαδικασία της υγρής – υγρής εκχύλισης και με σκοπό την απομόνωση των επιθυμητών αναλυτών από παρεμποδιστικές ουσίες, το υπολειπόμενο έλαιο απομακρύνεται με φύλαξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ένα βράδυ, και φυγοκέντρηση ή επιπλέον εκχύλιση με εξάνιο.

Σε πρόσφατη μελέτη οι Karkoula et al χρησιμοποίησαν για την εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου κύκλο-εξάνιο ως λιπόφιλο διαλύτη και ακετονιτρίλιο. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο 5g ελαιολάδου διαλύονται σε 20 ml Chex και το διάλυμα αναδεύεται για 1min. Στην συνέχεια προστίθενται 25ml ACN και το μίγμα αναδεύεται για άλλο ένα λεπτό. Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων γίνεται με φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 5 min [17].

Ένα συχνό πρόβλημα που παρατηρείται κατά την προσπάθεια απομόνωσης του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου με τις διάφορες μεθόδους είναι οι αντιδράσεις που επιτελούνται μεταξύ κάποιων φαινολικών συστατικών και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται και που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό προϊόντων που δεν υπάρχουν στο αρχικό εκχύλισμα.

Σε μελέτη που έγινε για την εξακρίβωση της επίδρασης του διαλύτη στις ουσίες που εμπεριέχονται στο φαινολικό κλάσμα, προκύπτει ότι τόσο η ελαιοκανθάλη όσο και η ελαιασίνη κατά την διάλυση τους σε μεθανόλη καθώς και σε υδατικό διάλυμα μεθανόλης, αντιδρούν και προκύπτουν ημιακετάλες ή ακετάλες. Αντίθετα με την χρήση ακετονιτρίλιου καμία αλλαγή δεν παρουσιάζεται στο τελικό εκχύλισμα. Συχνό επίσης είναι το φαινόμενο ισομερίωσης των ενώσεων όπως παρουσιάστηκε σε πρόσφατη εργασία [18]

2.1.2 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction).

Η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) είναι μια διαδικασία διαχωρισμού κατά την οποία τα συστατικά τα οποία είναι διαλυμένα σε κάποιο διάλυμα είναι δυνατόν να διαχωριστούν βάσει των διαφορετικών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Η μεγάλη ευελιξία της SPE οδήγησε τους ερευνητές στο να χρησιμοποιήσουν την τεχνική αυτήν για την ανάκτηση φαινολικών συστατικών από το παρθένο ελαιόλαδο. Η ευρεία χρήση της τεχνικής αυτής είχε ως αποτέλεσμα να προταθούν πολλά συστήματα διαλυτών, τόσο για το στάδιο της απομόνωσης, όσο και για το στάδιο του καθαρισμού ενός εκχυλίσματος.

Η εκχύλιση στερεής φάσης περιλαμβάνει δύο καταστάσεις λειτουργίας, την λειτουργία κανονικής φάσης και την λειτουργία αντίστροφης φάσης. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την SPE είναι με χρήση silica C8 (κανονική φάση) και C18 (αντίστροφη φάση).

Το 2001 οι Liberatore et al χρησιμοποίησαν στήλες με silica C-18 σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο: 1 g ελαιολάδου διαλύεται σε 10 ml εξανίου και τοποθετείται σε μία στήλη η οποία προηγουμένως είχε εκλουσθεί με 2x10 ml μεθανόλης και 2x10 ml εξανίου. Στην συνέχεια η στήλη εκλούεται με 4x10 ml εξανίου ώστε να απομακρυνθούν οι λιπόφιλες ενώσεις. Το φαινολικό κλάσμα και όποιες πολικές ενώσεις έχουν παραμείνει στην στήλη ανακτώνται με έκλυση με 4x10 ml μεθανόλης. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν πλήρως με εκείνες της εκχύλισης υγρού-υγρού [19].

Οι στήλες C-18 έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές φορές για την απομόνωση φαινολικών ενώσεων από τα παρθένα ελαιόλαδα. Οι στήλες ιοντικής ανταλλαγής, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση φαινολικών κλασμάτων από διάφορα έλαια, αλλά οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν ήταν αρκετά χαμηλές (53-62%). Ακόμα, πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα παρουσίασαν οι Mateos et al που δούλεψε με στήλη αμίνης η οποία έδειξε αποτελέσματα ανάκτησης μεγαλύτερη του 90% σε όλα τα φαινολικά συστατικά.

Τέλος, και όσο αφορά την στήλη που θα επιλέξει ο εκάστοτε ερευνητής για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος, χρήσιμο εργαλείο αποτελούν οι στήλες diol-bonded, οι οποίες αποτελούν την μέση οδό μεταξύ silica κανονικής και αντίστροφης φάσης, ενώ είναι συμβατές με μεγάλο εύρος διαλυτών [20] [21].

Συνοψίζοντας όλα αυτά που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο αυτό, μπορούμε να πούμε ότι η στήλη C-18 είναι μια αξιόπιστη μέθοδος για την απομόνωση απλών φαινολικών ουσιών. Ωστόσο, παρουσιάζεται χαμηλή ανάκτηση στην περίπτωση σεκοϊριδοειδικών παραγώγων και κυρίως των διαλδεΐδικών μορφών τους. Σε μια πρόσφατη μελέτη, 15 φαινολικά συστατικά απομονώθηκαν με σκοπό την μελέτη των ανακτήσεων του κάθε αναλύτη, και έδειξε ότι η

υγρή – υγρή εκχύλιση έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε βαθμούς ανάκτησης των φαινολικών από δείγμα φαινολών που προστέθηκε σε έλαιο άλλης πηγής πέρα του ελαιολάδου [19].

2.1.3 Εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης

Μικροεκχυλιση.

Η υγρή – υγρή μικροεκχύλιση βασίζεται στην ταχεία έγχυση ενός κατάλληλου μίγματος δύο διαλυτών – έναν διαλύτη που λειτουργεί ως διαλύτης εκχύλισης και ένα που λειτουργεί ως διαλύτης διασποράς – σε ένα δείγμα με την βοήθεια σύριγγας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός θολού μίγματος το οποίο περιέχει μικρά σταγονίδια εκχυλίσματος πλήρως διασκορπισμένα στην υδατική φάση και τέλος την φυγοκέντρηση που έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των σταγονιδίων εκχύλισης στον πυθμένα του δοχείου εκχύλισης [22] .

Στην μέθοδο υγρής-υγρής μικρο-εκχύλισης (DLLME) η αποτελεσματική εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, εκ των οποίων οι πιο σημαντικοί είναι ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση και ο διαλύτης διασποράς καθώς και οι συγκεντρώσεις τους.

Μια τυπική χρήση της DLLME είναι με χλωριωμένους διαλύτες μη αναμίξιμους με το νερό (χλωροβενζόλιο, διχλωρομεθάνιο κ.α.) ενώ ο διαλύτης διασποράς είναι ένας διαλύτης αναμίξιμος με το νερό (ακετόνη, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη κ.α) [23]. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης αποτελεί ίσως την πιο σημαντική παράμετρο της μεθόδου. Λαμβάνοντας υπόψιν τα προηγούμενα και εστιάζοντας στην εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος ενός δείγματος ελαιολάδου, ο διαλύτης εκχύλισης θα πρέπει να έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτή του δείγματος ελαιολάδου (με σκοπό κατά την φυγοκέντρηση να είναι εφικτός ο διαχωρισμός και η εναπόθεσή του στον πάτο του δοχείου εκχύλισης), να μπορεί να διαλύσει το φαινολικό κλάσμα ώστε να επιτευχθεί η εκχύλιση, καθώς και μικρή διαλυτότητα στα υπόλοιπα κλάσματα του ελαιολάδου. Σχετικά με τον διαλύτη διασποράς, θα πρέπει να είναι διαλυτός στον διαλύτη εκχύλισης και αναμίξιμος με το ελαιολάδο επιτρέποντας έτσι την διασπορά του διαλύτη εκχύλισης υπό την μορφή σταγονιδίων στην φάση του ελαιολάδου και τον σχηματισμό του θολού μίγματος (Ελαιολάδο, διαλύτης διασποράς, διαλύτης εκχύλισης).

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής συγκαταλέγονται η χρήση μικρών συγκεντρώσεων οργανικών διαλυτών για την εκχύλιση, ο σημαντικός εμπλουτισμός του φαινολικού εκχυλίσματος, ο μικρός χρόνος εκχύλισης, η απλότητα της όλης μεθόδου καθώς και το χαμηλό κόστος της.

Σε μια προσπάθεια σύγκρισης των μεθόδων που βασίζονται στην υγρή-υγρή εκχύλιση και την εκχύλιση στερεής φάσης, οι M. Luz Pizarro et al σύγκριναν τις μεθόδους SPE, LLE, LLME και εκχύλιση με υπερήχους (USE). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά την εκχύλιση με υπερήχους (USE) είχαμε το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης, Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές από τα αντίστοιχα αποτελέσματα της μεθόδου LLME δεν ήταν σημαντικές. Συνυπολογίζοντας ότι στην μικρο-εκχύλιση έχουμε μικρότερη κατανάλωση διαλυτών και πραγματοποιείται σε μικρότερο χρόνο η χρήση της μεθόδου αυτής καθίσταται η πλέον κατάλληλη για την εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του Ελαιολάδου. [24].

2.2 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών στο Ελαιόλαδο

Το επόμενο στάδιο της ανάλυσης του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου είναι ο ποιοτικός η/και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του κλάσματος. Οι διάφορες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται σε φασματοφωτομετρικά ή χρωματογραφικά δεδομένα που λαμβάνουμε από την επεξεργασία του εκχυλίσματος.

2.2.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός: πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο, βασίζεται στην αντίδραση αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu με τις υδρόξυ ομάδες των φαινολικών συστατικών [25] [26]. Η μέθοδος περιλαμβάνει βαθμονόμηση με μια καθαρή ουσία, εκχύλιση των φαινολών από το δείγμα, και μέτρηση της απορρόφησης μετά από την χρωματική αντίδραση. Η ευρεία χρήση της μεθόδου αυτής αποδίδεται στην απλότητα της, την ευκολία και την ταχύτητα της αντίδρασης [27].

Το κύριο μειονέκτημα της χρωματομετρικής μεθόδου αυτής, είναι η χαμηλή επιλεκτικότητα της, καθώς η χρωματική αντίδραση πραγματοποιείται με οποιαδήποτε υδρόξυ ομάδα των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου. Πρόσφατα, παρουσιάστηκε μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τα συνολικά εκχυλίσμα φαινολικά συστατικά από διάφορα δείγματα που προέρχονταν από προϊόντα διατροφής, παρέχοντας συγκριτικά στοιχεία για τις διάφορες χρωματογραφικές και φασματοφωτομετρικές μεθόδους, λαμβάνοντας υπ' όψιν την πιθανή επίδραση που έχουν αυτές πάνω στις ουσίες που εξετάζονται [28].

Ωστόσο, οι Singleton et al έδειξαν ότι η μοριακή απορρόφηση ανά αντίδραση με μια υδρόξυ ομάδα μπορεί να συγκριθεί σε ενώσεις με, κατά τα άλλα, παρόμοια δομή. [29] Ως εκ τούτου, η μοριακή απορρόφηση ενός φαινολικού συστατικού του ελαιολάδου, εξαρτάται πρωταρχικά από τον αριθμό των υδρόξυ ομάδων, με τα μονό-φαινολικά συστατικά να οδηγούν στο ήμισυ του σχηματισμού χρωματικού συμπλόκου σε σύγκριση με τις διφαινολικές ενώσεις και ως εκ τούτου εμφανίζουν περίπου το ήμισυ της μοριακής απορρόφησης.

Το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu είναι φωσφορομολυβδαινικό και φωσφοβολφραμικό μίγμα που συμμετέχει σε μία αντίδραση οξειδωσης. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση το αντιδραστήριο καταναλώνεται και προκύπτει ένα προϊόν με μπλε χρώμα που μετράται στα 500-750 nm. Σύμφωνα με αυτή την διαδικασία υπό τις συνθήκες της αντίδρασης οξειδώνονται όλες οι ενώσεις που δύναται να οξειδωθούν μέσα στο διάλυμα. Αυτό δεν

μπορεί να αποκλείσει την συμμετοχή των αλδευδών στην ίδια αντίδραση. Επιπλέον, η έκφραση των αποτελεσμάτων ως γαλλικό οξύ ή ισοδύναμα καφεϊκού οξέος είναι αυθαίρετη και δεν μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με τις απαιτήσεις του ισχυρισμού υγείας της ΕΕ.

2.2.2 Από το Folin-Denis στο Folin-Ciocalteu.

Η αρχική εργασία των Folin-Denis περιέγραψε τα σημαντικά κομμάτια της διαδικασίας αυτής με την χρήση του αντιδραστήριου Folin-Denis. Πολλές λειτουργίες της μεθόδου αυτής θα μπορούσαν να θεωρηθούν ασαφείς και να προκαλέσουν διαφωνίες σε σχέση με την ορθότητα και την αποτελεσματικότητά τους. Το κορεσμένο ανθρακικό νάτριο ποικίλλει σε σύνθεση με τη θερμοκρασία, και η ισορροπία δεν επιτυγχάνεται γρήγορα από την υπερκορεσμένη κατάσταση. Ο νόμος του Beer είναι πιθανό να μην επαληθεύεται σε ένα επαρκώς μεγάλο εύρος και τα, ιδιαιτέρως, ασυνήθιστα χαμηλά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν τα δείγματα που παρουσίασαν πολύ μεγάλη απορρόφηση αραιώθηκαν με ένα τυφλό διάλυμα αντί να επαναληφθεί ολόκληρη η μέθοδος από την αρχή. Εάν τα δείγματα ήταν ανεπαρκώς αναμειγμένα μεταξύ των διαφόρων προσθηκών ή αν τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν προστέθηκαν σε λάθος συγκεντρώσεις, τα αποτελέσματα είναι ακανόνιστα. Αναλόγως την θερμοκρασία και άλλους παράγοντες, το μπλε χρώμα της απορρόφησης μπορεί να μεταβληθεί έως και να εξαφανιστεί σε σημαντικό βαθμό, μετά από χρόνο τριάντα λεπτών και έχει ως αποτέλεσμα ασαφή αποτελέσματα. Το πιο σημαντικό από όλα, είναι ότι μπορεί να εμφανιστεί σταδιακή καθίζηση η οποία θα επηρεάσει τα αποτελέσματα σε περίπτωση που δεν απομακρυνθεί το ίζημα.

Για όλους αυτούς τους λόγους, αυτές τις μελέτες ακολούθησαν πολλές άλλες από τον Folin και τους συνεργάτες του, καθώς και άλλους ερευνητές, παρατηρώντας τα διάφορα προβλήματα που προκύπτανε από την συγκεκριμένη μέθοδο και προτείνοντας βελτιώσεις στην αρχική μέθοδο. Οι μετατροπές στο φαινολικό αντιδραστήριο, κορυφώθηκαν με την μελέτη των Folin – Ciocalteu [30]. Οι μετατροπές επί της διαδικασίας αναφέρονται κυρίως σε μια μεγαλύτερη διάρκεια θέρμανσης, την παρουσία υδροχλωρικού οξέος, και την προσθήκη του θειικού λιθίου.

Το αντιδραστήριο Folin-Denis περιέχει δύο κατηγορίες συστατικών, μια πιο ευαίσθητη στην αναγωγή (reduction) σε σχέση με την άλλη, λαμβάνοντας υπόψιν ότι το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu έχει καλύτερη ενσωμάτωση του μολυβδαινίου στο μίγμα, δίνοντας έτσι μεγάλη ευαισθησία στο δείγμα. Το αντιδραστήριο των Folin – Ciocalteu αποτελείται από ένα μίγμα ετεροπολικών οξέων, φωσφομολυβδενικού και φωσφοβολφραμικού οξέος, στα οποία το μολυβδαίνιο και το βολφράμιο είναι στον βαθμό 6+. Κατά την αναγωγή με διάφορους

αναγωγικούς παράγοντες, σχηματίζεται το λεγόμενο μπλε το βολφραμίου και το μπλε του μολυβδαινίου, όπου ο βαθμός οξειδωσης είναι μεταξύ 5 και 6. Όσο το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu έχει αποκτήσει μετά την αναγωγή το μπλε χρώμα, είναι δυνατόν να γίνει ο προσδιορισμός του σε φασματογράφο σε ένα μήκος κύματος από 500-750nm. Το αντιδραστήριο Folin – Ciocalteu έχει επικρατήσει του αντιδραστηρίου Folin-Denis.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός του φαινολικού κλάσματος με την χρήση αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu παρουσιάστηκε πιο πάνω. Σε ένα τυπικό πρωτόκολλο της μεθόδου αυτής ένα κλάσμα του υδατικού-μεθανολικού διαλύματος των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν από το ελαιόλαδο, διαλύεται σε 6 ml νερού, και στην συνέχεια προστίθεται 0,5 του αντιδραστηρίου Folin – Ciocalteu. Μετά από ένα λεπτό στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται 2ml ανθρακικού νατρίου (15%w/v) και αραιώνεται το μίγμα με νερό σε τελικό όγκο 10 ml. Η απορρόφηση του μίγματος μετράται μετά από δύο ώρες στα μήκη κύματος που προαναφέρθηκαν [31].

2.2.3 Χρωματογραφικός προσδιορισμός του φαινολικού προφίλ του παρθένου ελαιολάδου.

Η ανάγκη για την μελέτη του φαινολικού προφίλ των ελαιόλαδων, καθώς και για την ταυτοποίηση μεμονωμένων φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο, απαιτεί την αντικατάσταση των παραδοσιακών μεθόδων από υψηλής απόδοσης χρωματογραφικών τεχνικών. Ο διαχωρισμός συνήθως επιτυγχάνεται με την μέθοδο της HPLC, αν και η αέριος χρωματογραφία ακόμα χρησιμοποιείται σε κάποιες περιπτώσεις. Ο πιο συχνός τρόπος λειτουργίας διαχωρισμού χρησιμοποιεί συστήματα αντίστροφης φάσης σε στήλες C-18 και ποικίλες κινητές φάσεις. Η ανίχνευση συνήθως γίνεται με την μέτρηση της υπεριώδους απορρόφησης.

Συνδυασμένες μέθοδοι, ιδιαιτέρως διαφόρων μεθόδων μάζας, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο αν και η συλλογή αναλυτών με την χρήση παρασκευαστικής HPLC .

2.2.4 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

Η χρωματογραφία κάρτου και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, έχουν επινοηθεί και αξιοποιηθεί για προκαταρτικούς διαχωρισμούς και για το στάδιο του καθαρισμού του φαινολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου.

Παλαιότερα η χρωματογραφία κάρτου και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, είχε μικρή εφαρμογή στον διαχωρισμό των φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου. [32] Ωστόσο, ο διαχωρισμός περίπου 20 φαινολικών συστατικών ή συγκεκριμένων φαινολικών ομάδων από το ελαιόλαδο με την χρήση silica σε TLC, κυτταρίνης, και πολυαμιδίου, έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Η έκλουση των συστατικών του πολικού εκχυλίσματος του ελαιολάδου έχει γίνει και με δισδιάστατη TLC με την χρήση διαφόρων συστημάτων.

n-βουτανόλη/οξικό οξύ/νερό (5:4:1) (σύστημα A) και νερό (σύστημα B) ; τολουένιο /ethyl formate /φορμικό οξύ (5:4:1) (σύστημα A) και οξικό οξύ 2% (σύστημα B) βενζένιο/μεθανόλη/νερό(80:1:1)(σύστημα A) βενζένιο/μεθανόλη/νερό (45:8:4) (σύστημα B).

Οι Ragazzi et al χρησιμοποίησαν πλάκες TLC με κυτταρίνη και πολυαμίδιο για στατικές φάσεις. Στην πρώτη περίπτωση, η κινητή φάση ήταν: χλωροφόρμιο/οξικό οξύ/νερό (8:2:1) ενώ στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε σύστημα μεθανόλη/ακετόνη/νερό (3:1:1) ή μεθανόλη/ακετόνη/νερό (6:1:1) [33].

Σήμερα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για καθαρισμό εκχυλισμάτων και όχι για ποιοτικό έλεγχο.

2.2.5 Ανάλυση με GC και GC-MS των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου μπορεί να πραγματοποιηθεί με την χρήση της μεθόδου αέριας χρωματογραφίας (GC). Γενικά στην μέθοδος GC υποθέτουμε ότι τα συστατικά που εγχύονται στον τριχοειδή σωλήνα είναι πτητικά σε θερμοκρασία ανάλυσης και δεν αποσυντίθενται στην θερμοκρασία που γίνεται η έγχυση ή η μετέπειτα ανάλυση. Σε διάφορες τυποποιημένες αναλυτικές μεθόδους, οι ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (FID) είναι οι πιο συνηθισμένοι. Η φασματοφωτομετρία μάζας επιτρέπει την ανάκτηση δεδομένων μοριακής μάζας, πληροφορίες δομής, και ταυτοποίησης συστατικών.

Η πρώτη εργασία που αφορούσε τον διαχωρισμό φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο με την μέθοδο GC δημοσιεύτηκε από τους Janer del Valle et al [34]. Το 1987, οι Solinas et al

δημοσίευσαν μια εργασία πάνω στην ανάπτυξη μιας μεθόδου GC για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου από διαφορετικές καλλιέργειες και διαφορετικούς βαθμούς ωρίμανσης [35]. Σε αυτήν την εργασία, συγκεκριμένα συστατικά φάνηκαν σε όλες τις αναλύσεις, αν και οι ποσότητές τους διέφεραν από ποικιλία σε ποικιλία. Οι αναλογίες μεταξύ κάποιον από αυτά τα συστατικά, φάνηκε να είναι σταθερές καθ' όλα τα σημεία της ωρίμανσης, κάτι που τα καθιστά σταθερές για τις διάφορες ποικιλίες. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει υγρή-υγρή εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος, καθαρισμός του μεθανολικού εκχυλίσματος ακολουθούμενο από αζεοτροπική απόσταξη για να απομακρυνθούν οι διαλύτες, χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος, και τελικά, τριχοειδής αέριος χρωματογράφηση των παραγώγων του TMS. Αν και η μέθοδος επέτρεπε τον χαρακτηρισμό απλών συστατικών, άλλες παρεμφερείς φαινόλες οι οποίες μάλιστα υπήρχαν σε μεγάλες ποσότητες δεν εντοπίζονται.

Βελτιώσεις της μεθόδου αυτής αναπτύχθηκαν με πιο εξελιγμένες αναλυτικές τεχνικές όπως το GC-MS και GC-MS/MS [36], [37].

Συνδυαζόμενα απευθείας με φάσματα μάζας, τα δεδομένα που προκύπτουν από το GC-MS, σε γενικές γραμμές, παρουσιάζουν τα ίδια τυπικά χαρακτηριστικά αλλά με μικρές διαφορές. Σε περιπτώσεις που οι κλασσικές τεχνικές φασματοφωτομετρίας μάζας με μεθόδους ιονισμού όπως η EI και CI δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν, (όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις πολικών, μη πτητικών, θερμοευαίσθητων φαινολών), η χημική παραγοντοποίηση που συνήθως περιλαμβάνει σιλυλοποίηση, μπορεί να παρακάμψει αυτούς τους περιορισμούς αλλά μπορεί να δημιουργήσει άλλες δυσκολίες αυξάνοντας την μοριακή μάζα του αναλύτη πάνω από το όριο του ανιχνευτή.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου με την μέθοδο του GC έχει χρησιμοποιηθεί και σε αναλυτικές και εφαρμοσμένες εργασίες. Βέβαια οι υπόλοιπες χρωματογραφικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται πιο συχνά γιατί αποφεύγουν την χρήση παραγοποιών αντιδραστηρίων. Ένα άλλο πρόβλημα της τεχνικής αυτής, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι πως η χρήση υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να καταστρέψει τους αναλυτές

2.2.6 Ανάλυση HPLC και LC-MS

Η περιορισμένη πτητικότητα πολλών φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου έχει περιορίσει την χρήση της μεθόδου GC για τον διαχωρισμό τους, και οδήγησε την χρήση της μεθόδου HPLC ως πιο δημοφιλή και αξιόπιστη τεχνική για την ανάλυση των πολυφαινολών του ελαιολάδου.

Η μέθοδος HPLC συνήθως χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πτητικών, υψηλού μοριακού βάρους ενώσεων, είτε σε λειτουργεία απορρόφησης, είτε κλασμάτωσης. Η χρωματογραφία απορρόφησης, η αλλιώς κανονικής φάσης, χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό συστατικών βάσει της φύσης και του αριθμού των πολικών δομικών ομάδων. Στην HPLC κανονικής φάσης το προσροφητικό μέσο είναι η silica gel και το υλικό έκλουσης είναι κάποιος μη πολικός διαλύτης. Έγιναν αρχικά πειράματα για την σωστή λειτουργία της μεθόδου, αλλά την ίδια περίοδο τα καλύτερα αποτελέσματα, απαντήθηκαν στην χρήση της αντίστροφης φάσης σε βαθμούς επαναληψιμότητας, χρόνου κατακράτησης και διαχωρισμού των πιο πολικών συστατικών. [38] [39]

Η HPLC αντίστροφης φάσης, η οποία βασίζεται στην χρωματογραφία διαχωρισμού, χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό συγκεκριμένων συστατικών που ανήκουν σε μια συγκεκριμένη ομάδα ενώσεων. Σε αυτήν την περίπτωση, η στατική φάση αποτελείται από τον μη-πολικό C-18, ενώ η κινητή φάση είναι κάποιος πολικός διαλύτης.

Οι στήλες έχουν συνήθως μήκος 100-300mm με κόκκους διαμέτρου 10μm ή 5μm, με προτίμηση στις μικρότερες στήλες.

Σε κάποιες περιπτώσεις, η ισοκρατική έκλυση έδωσε ευκρινή αποτελέσματα λόγω της επίδρασης της επιλεκτικότητας ενός ή περισσοτέρων συστατικών (πχ ακετονιτρίλιο) της κινητής φάσης, αν και η χρήση της κλασματικής έκλυσης θεωρείται απαραίτητη για την ταυτοποίηση - αναγνώριση της πολυπλοκότητας του φαινολικού προφίλ των περισσοτέρων δειγμάτων. Πολυάριθμες κινητές φάσεις έχουν χρησιμοποιηθεί, αλλά τα δυαδικά συστήματα που αποτελούνται από ένα υδατικό συστατικό και ένα λιγότερο πολικό οργανικό συστατικό όπως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη παραμένουν τα πιο συνήθη. Οξέα (οξικό, φορμικό, φωσφορικό) συνήθως προστίθενται και στα δύο συστατικά για να διατηρήσουν σταθερή την συγκέντρωση των οξέων κατά την διάρκεια της κλασμάτωσης. Η μείωση του pH βοηθά στην αποφυγή της διάσπασης των φαινολικών συστατικών, βελτιώνοντας παράλληλα στην μορφή των ζωνών και μειώνοντας το πλάτος τους.

Για παράδειγμα, μια κατάλληλη μέθοδος για την ανάλυση του φαινολικού κλάσματος είναι η αντίστροφης φάσης HPLC με ισοκρατική έκλυση με υδατικό διάλυμα θειικού οξέος/ακετονιτριλίου ή μεθανόλη /υδατικού οξικού οξέος. Η τεχνική, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχει επίσης εφαρμοστεί με κλασματική έκλυση με σύστημα μεθανόλη /υδατικού οξικού οξέος ή ακετονιτριλίου /υδατικού οξικού οξέος [40], [41].

Η ανίχνευση με HPLC βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης την ακτινοβολίας UV-Vis στα 250, 240 ή 280 nm. Μερικά φαινολικά συστατικά εμφανίζουν πολλά μέγιστα απορρόφησης. Αυτό δημιουργεί αρκετά προβλήματα στην ποσοτικοποίηση όπως σχολιάστηκε στην ερευνητική εργασία της Tsimidou et al οι οποίοι ταξινόμησαν τις διάφορες φαινόλες σε τέσσερις ομάδες και χρησιμοποίησαν ένα απλό πρότυπο βαθμονόμησης για της φαινόλες της κάθε ομάδας [42]. Το πιο σύνθετες μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση είναι τα 280nm το οποίο και αποτελεί μια βολική αντιπροσωπευτική τιμή, αν και η ανίχνευση σε άλλα μήκη κύματος και σε διπλού μήκους κύματος ανίχνευση έχει επίσης προταθεί.

Η ταυτοποίηση των πολυφαινολών από το έκλουσμα της HPLC (και του GC) βασίζονται στον συσχετισμό των τιμών κατακράτησης με ένα κατάλληλο πρότυπο. Η περιορισμένη διαθεσιμότητα κατάλληλων προτύπων για τον ποσοτικό προσδιορισμό είναι ένα εμπόδιο το οποίο μπορεί να ξεπεραστεί, εν μέρει, με την σύνθεση σχετικών συστατικών. Εναλλακτικά, τα σχετικά συστατικά που απομονώνονται από παρασκευαστική χρωματογραφία μπορούν να χρησιμεύσουν για τον σκοπό αυτό [43].

Σε πολλές περιπτώσεις ο ποσοτικός προσδιορισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιούνται καμπύλες αναφοράς "σχετικών ουσιών όπως η τυροσόλη και η ελευρωπεΐνη [12].

Ωστόσο, όλες οι φαινόλες κατέχουν ένα ισχυρό χρωμοφόρο σύστημα. Τα φάσματα απορρόφησης των φαινολικών ουσιών είναι ιδιαίτερος κατατοπιστικά, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την δομή τους, οι οποίες μπορούν φανερώσουν την κατηγορία στην οποία ανήκουν και το οξειδωτικό τους μοντέλο.

Η συμπληρωματική φύση της ανίχνευσης φθορισμού έχει αποδειχθεί. Στην πραγματικότητα, τα λιγνάνια δείχνουν μια καλή ανταπόκριση στην διέγερση φθορισμού, και αυτή η τεχνική μελετήθηκε από τους Brenes et al για την ανάλυση αυτών των φαινολών στο ελαιόλαδο. [44] Αν και η ανίχνευση φθορισμού εμφανίζει κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με αυτή της UV, όσο αφορά την βελτιωμένη επιλεκτικότητα και ευαισθησία, υπάρχουν φαινολικά συστατικά που δεν φθορίζουν.

Συστοιχία κουλομετρικών ηλεκτροδίων έχει επίσης συνδυαστεί με την μέθοδο HPLC και έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο[44]. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, εκτός από την εύκολη προετοιμασία του

δείγματος, είναι η πιθανότητα διαχωρισμού συνεκλούμενων συστατικών με διαφορετικό δυναμικό [45]. Ο ανιχνευτής μετράει τα διαφορετικά δυναμικά στα οποία τα φαινολικά συστατικά οξειδώνονται.

Παρά τις προφανείς επιτυχίες της μεθόδου GC-MS, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με το MS ήταν αυτός που έφερε την μεγάλη αλλαγή στον τρόπο που γίνονται οι αναλύσεις των μη πολικών συστατικών του ελαιολάδου, όπως αποδεικνύεται από τον αριθμό των εργασιών που χρησιμοποιούν αυτήν την τεχνική.

Ο συνδυασμός LC και MS έχει επιτευχθεί με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Ωστόσο, η χρήση της μεθόδου API ήταν αυτή που εδραίωσε την χρήση του LC-MS. Η API είναι μια ελαφρά πηγή ιονισμού για την ανάλυση των πολικών, μη πτητικών, θερμοευαίσθητων και υψηλού μοριακού βάρους ενώσεων όπως οι φαινόλες των φυτών [46]. Αν και η API εδραίωσε την χρήση της LC-MS, κάποια προβλήματα παραμένουν, με κύριο περιορισμό την ισχυρή εξάρτηση της συμπεριφοράς της φύσης του αναλύτη και της κινητής φάσης. Έτσι, η δημιουργία βιβλιοθηκών δεδομένων φασμάτων μάζας είναι δύσκολη. Επιπλέον, είναι δύσκολη η βελτιστοποίηση των συνθηκών μιας τυπικής εκχύλισης η οποία περιέχει μεγάλο εύρος διαλυτών, αν και τα σύγχρονα μηχανήματα έχουν την δυνατότητα ηλεκτρονικού προγραμματισμού των φασματοσκοπικών συνθηκών.

Τα φάσματα μάζας API περιλαμβάνουν πρωτονιομένα ιόντα $[M+H]^+$ ή ιόντα προσθήκης $[M+Na]^+$ σε ανιοντική κατάσταση, ή αποπρωτονιομένα μοριακά ιόντα, $[M-H]^-$ σε κατιοντική κατάσταση. Σε σπάνιες περιπτώσεις, η μέθοδος LC-MS μπορεί να παρέχει επαρκή δεδομένα για την πλήρη δομή μια ουσίας, αλλά γενικά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της ένωσης και για τον καθορισμό της κατανομής των υποκαταστατών επί του φαινολικού δακτυλίου.

Η HPLC συνδεδεμένη διαδοχικά με φασματοφωτομετρία μάζας (LC-MS-MS) και η αρνητική APCI έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φαινολικών οξέων, τυροσόλης και παραγώγων ελευρωπαΐνης. [47]

Η αρνητική ESI ήταν πιο ευαίσθητη για την πλειοψηφία των φαινολών. Έτσι, οι μοριακές μάζες των διαχωρισμένων φαινολικών συστατικών λαμβάνονται μέσω ιόντων $[M-H]^-$ για τα περισσότερα συστατικά.

Υπάρχουν πολλά παραδείγματα εργασιών που γίνεται χρήση των μεθόδων MS και MS-MS για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών του λαδιού και των καρπών της ελιάς.

Για όλους τους λόγους που εξηγήσαμε προηγουμένως, η HPLC είναι μια τεχνική που συνήθως εφαρμόζεται για την ανάλυση του πολικού κλάσματος του ελαιολάδου. Ωστόσο, η HPLC και η GC θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές τεχνικές. Στην πραγματικότητα,

σε πολλές πρόσφατες εργασίες, η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των φαινολικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου έχει γίνει με την εφαρμογή των δύο αυτών μεθόδων.

2.2.7 Capillary Electrophoresis: Μια χρήσιμη τεχνική για την ανάλυση των ελαιόλαδων.

Υπάρχουν πολλές εργασίες στην βιβλιογραφία, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι οποίες προσδιορίζουν τις ολικές φαινόλες στο ελαιόλαδο με φασματοφωτομετρικές αναλύσεις και ο χαρακτηρισμός τους γίνεται με τριχοειδή αέριο χρωματογραφία CGC και κυρίως με αντίστροφης φάσης HPLC. Ακόμα και αν για τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου η μέθοδος της HPLC αρκούσε σαν μέθοδος, αυτή η αναλυτική μέθοδος απαιτεί ακριβή προετοιμασία του δείγματος και γενικά είναι μια χρονοβόρος διαδικασία. Για την ακρίβεια, στην χειρότερη περίπτωση, ολόκληρη η ανάλυση των πολυφαινολών του ελαιολάδου με HPLC μπορεί να διαρκέσει πάνω από 90min

Ως εκ τούτου, η χρήση ταχύτερων αναλυτικών μεθόδων και εργαλείων, που επιτρέπει άμεσο προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, θεωρείται απαραίτητη. Η CE μπορεί να παρουσιάσει αποτελέσματα που συνδυάζουν τον γρήγορο χρόνο ανάλυσης και τον ικανοποιητικό βαθμό χαρακτηρισμού του φαινολικού κλάσματος.

Η CE αποτελεί μια εναλλακτική ή συμπληρωματική μέθοδος της HPLC. Η ταχύτητα, η διακριτική ικανότητα, και η εύκολη χρήση σε συνδυασμό με το μικρό κόστος της συσκευής, καθιστούν αυτήν την τεχνική μια χρήσιμη επιλογή στα χέρια των ερευνητών για την ανάπτυξη και βελτίωση των μεθόδων ανάλυσης προϊόντων διατροφής. Η CE προσφέρει στο ερευνητή έναν μεγάλο αριθμό σημαντικών πλεονεκτημάτων για την ανάλυση συστατικών των προϊόντων διατροφής. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί μιας υψηλής ευκρίνειας τεχνική και έχει εφαρμοστεί επιτυχώς στην ανάλυση των φαινολικών συστατικών μια μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων (όπως εκχυλίσματα φυτών, κρασιού, μύρας, τσαγιού, φρούτων λαχανικών χυμών) που χρειάζεται πολύ μικρές ποσότητες αρχικών δειγμάτων. Υπάρχει μια εργασία η οποία αναφέρεται στην χρήση της μεθόδου που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ελαιοκανθάλης και ελαιασίνης [48].

3. Πειραματικό μέρος.

Στο πειραματικό κομμάτι της παρούσας εργασίας ασχοληθήκαμε με το φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου. Συγκεκριμένα μελετήσαμε μια συγκεκριμένη ομάδα ενώσεων που προέρχονται από τις ενώσεις άγλυκο της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκστροσίδη. Το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε αυτήν την κατηγορία ενώσεων καθώς από την βιβλιογραφία προκύπτει να υπάρχει ένα έλλειμα ολοκληρωμένης αντίληψης για το σύνολο των ενώσεων που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Παράλληλα υπήρχαν ισχυρότατες ενδείξεις για την ύπαρξη ενώσεων που δεν έχουν περιγραφεί στο παρελθόν καθώς και ενώσεων που είτε δεν έχουν περιγραφεί ολοκληρωμένα είτε δεν έχουν αναφερθεί ως συστατικά του ελαιολάδου.

Η συγκεκριμένη μελέτη ήταν αποτέλεσμα της επισταμένης παρατήρησης του φαινολικού προφίλ τουλάχιστον 1000 δειγμάτων ελαιολάδου. Σε κάποια από αυτά τα δείγματα παρατηρήσαμε μια ομάδα ασυνήθιστων κορυφών που δεν αντιστοιχούσαν σε κάποια ήδη γνωστή ένωση. Οι ενώσεις αυτές έμοιαζε να έχουν παρόμοια δομή με αυτές των ήδη γνωστών φαινολικών ενώσεων με κάποιες μικρές διαφορές. Η διαπίστωση μάλιστα ότι σε πολλές περιπτώσεις οι ενώσεις αυτές αποτελούσαν το κυρίαρχο συστατικό, έστρεψε το ενδιαφέρον στην απομόνωση των ενώσεων αυτών.

Για την απομόνωση των ενώσεων αυτών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι, όπως υγρή-υγρή εκχύλιση και εκχύλιση στερεής φάσης καθώς και συνδυασμός αυτών. Το κύριο πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε κατά την διαδικασία απομόνωσης είναι ότι οι ενώσεις αυτές σε πολύ μεγάλο βαθμό μετασχηματίζονται κατά την επαφή τους με την γέλη πυριτίου που χρησιμοποιείται στην χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πολύ μεγάλο βαθμό. Έτσι πολλές φορές κατέστη αδύνατο να απομονώσουμε αυτές τις ουσίες και αντί αυτών να παραλαμβάνουμε μεγάλες ποσότητες γνωστών παραπροϊόντων όπως το άγλυκο της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκστροσίδη.

Επομένως η ταυτοποίηση των ενώσεων χρειάστηκε να γίνει μέσα από ιδιαιτέρως πολύπλοκα φάσματα NMR τα οποία αφορούσαν μίγματα ενώσεων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν και φάσματα από συνθετικά κατασκευασμένα μόρια ενώ για την πλήρη ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν και φάσματα επιλεκτικού παλμού απευθείας σε δείγματα ελαιολάδου απουσία διαλύτη.

3.1 Πειραματικές μέθοδοι

Στο παρόν κεφάλαιο αναφέρουμε τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των ενώσεων καθώς και για την απόδοση δομής και επιβεβαίωσής της. Η αρχική επιλογή των δειγμάτων έγινε από την βάση δεδομένων του εργαστηρίου που αφορά περισσότερα από 2000 δείγματα ελαιολάδου.

1. Υγρή- υγρή εκχύλιση ελαιολάδου.

Η εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο εκχύλισης που δημοσιεύτηκε πρόσφατα από τους Karkoula E. et al. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση ελαιολάδου είναι το κυκλοεξάνιο (cHex) και το ακετονιτρίλιο (ACN).

2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό ενώσεων καθώς και για ποιοτικό έλεγχο των παραλαμβανόμενων προϊόντων

3. Φασματοσκοπία NMR.

Για την ταυτοποίηση της δομής των ενώσεων που εκχυλίσαμε χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο φασματοσκοπίας NMR. Συγκεκριμένα ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR αλλά και φάσματα 2 διαστάσεων όπως COSY, HMBC και HSQC σε φασματογράφους διαφορετικών μαγνητικών πεδίων (400 και 600 MHz στην Αθήνα και 700 MHz στο Virginia Commonwealth University των ΗΠΑ).

4. Φασματοσκοπία NMR με χρήση επιλεκτικού παλμού.

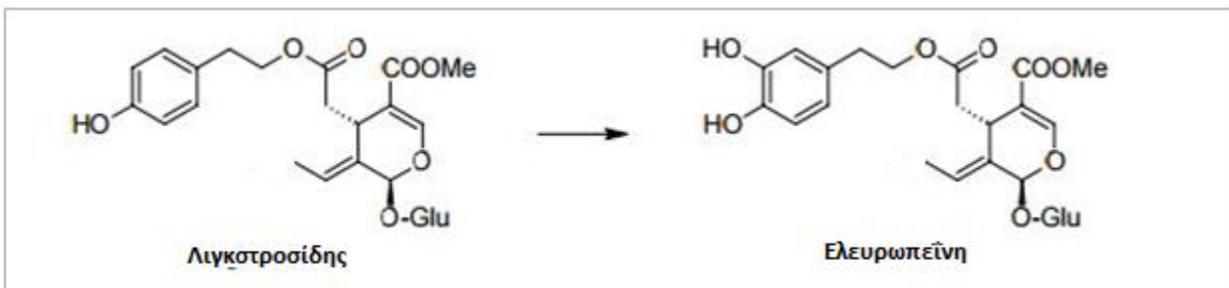
Για την επιβεβαίωση της δομής χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία του επιλεκτικού παλμού στην φασματοσκοπία NMR που επιτρέπει την παρατήρηση κορυφών που αντιστοιχούν σε πρωτόνια ενώσεων πολύ χαμηλής συγκέντρωσης σε σχέση με τα κυρίαρχα συστατικά όπως τα λιπίδια.

3.2 Ελευρωπεΐνη και Λιγκστροσίδη.

Η ελευρωπεΐνη και ο λιγκστροσίδη είναι σεκοΐριδοειδείς γλυκοσίδες που εντοπίζονται σε πολλά είδη της οικογένειας Oleaceae. Αποτελούν τα βασικά φαινολικά συστατικά του είδους *Olea europaea* απ' όπου πήρε και την ονομασία της η Ελευρωπεΐνη. Εντοπίζονται τόσο στον καρπό της ελιάς όσο και στα φύλλα του ελαιόδεντρου σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση των δύο αυτών ενώσεων είναι μεγαλύτερη σε πρώιμους καρπούς. Η ελευρωπεΐνη μπορεί να φτάνει σε πρώιμο στάδιο το 14% επί του ξηρού βάρους, ενώ με την ωρίμανση του καρπού της ελιάς η συγκέντρωση περιορίζεται σημαντικά. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι τα επίπεδα της ελευρωπεΐνης είναι αυξημένα σε ποικιλίες που έχουν μικρό καρπό. Η Ελευρωπεΐνη προσδίδει στον πρώιμο καρπό μια έντονη πικρή γεύση [49].

Η ελευρωπεΐνη και ο λιγκστροσίδη προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων. Συγκεκριμένα αποτελούν εστέρες της υδρόξυ-τυροσόλης και της τυροσόλης αντίστοιχα και η βιοσύνθεσή τους εντάσσεται στην βιοσυνθετική οδό του μεβαλονικού οξέος. Κατά το βιοσυνθετικό αυτό μονοπάτι, παράγονται ολεοσίδες από το μεβαλονικό οξύ, οι οποίοι οδηγούν στον σχηματισμό σεκοΐριδοειδών.



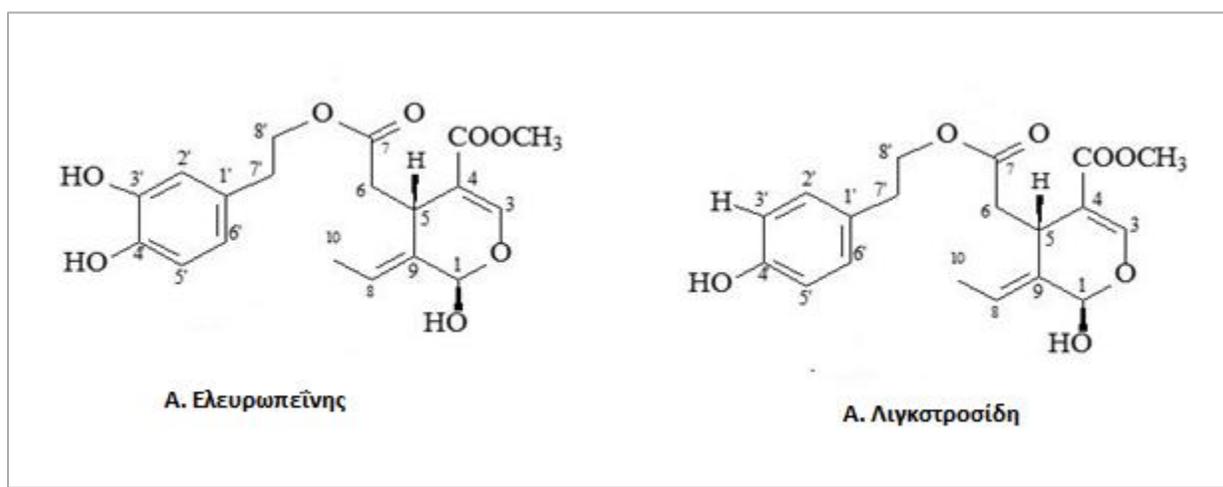
Εικόνα 5: Τα μόρια Λιγκστροσίδη και Ελευρωπεΐνης

Τόσο η Ελευρωπεΐνη όσο και ο Λιγκστροσίδη παρουσιάζουν ιδιαίτερα σημαντικές βιολογικές δράσεις όπως καρδιοπροστατευτική αντιοξειδωτική δράση [50], αντιφλεγμονώδη δράση, αντικαρκινική δράση [51], αντιμικροβιακές ιδιότητες [52] και νευροπροστατευτική δράση.

Πολλές από αυτές τις δράσεις είναι γνωστές εδώ και αρκετές δεκαετίες και μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις έχουν δημιουργηθεί και εμπορικά σκευάσματα με τις ουσίες αυτές. Η δυναμική των ουσιών αυτή είναι μεγάλη όχι μόνο λόγω των φαρμακευτικών ιδιοτήτων αυτών των ενώσεων όσο και για τις φαρμακολογικές ιδιότητες των παραγώγων τους.

3.3 Άγλυκο της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκτροσίδη

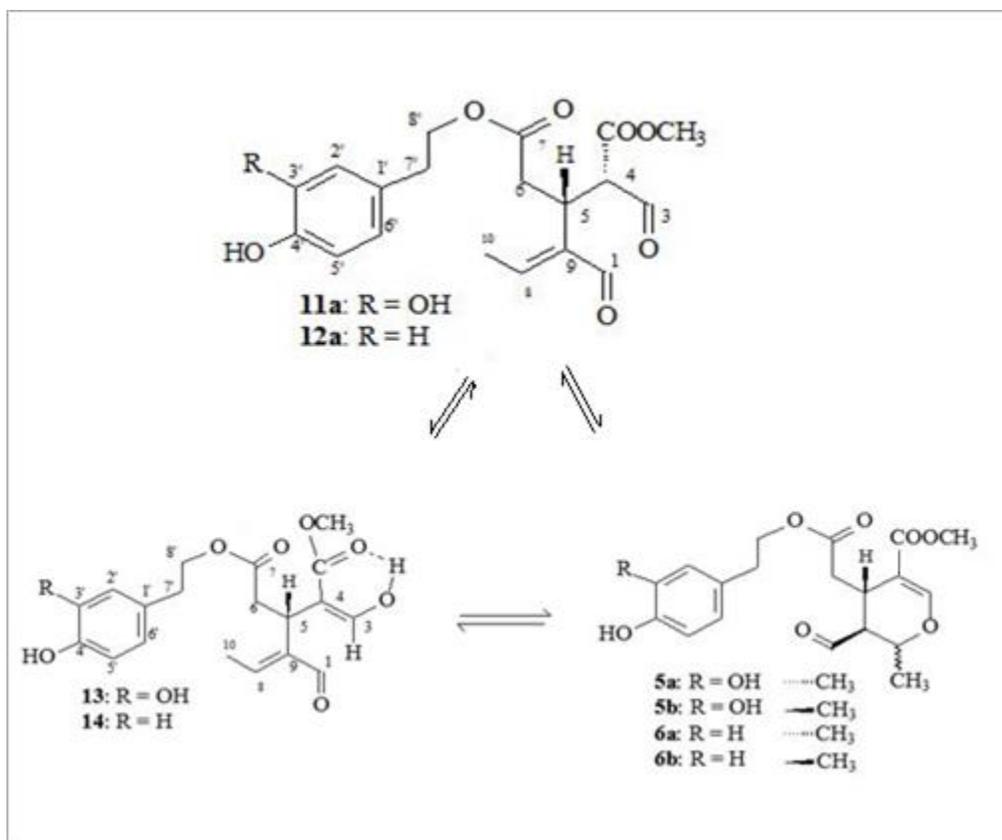
Η ελευρωπεΐνη και ο λιγκτροσίδης βρίσκονται σε ειδικά διαμερίσματα μέσα στον καρπό της ελιάς και είναι προστατευμένα από διάφορα ένζυμα που βρίσκονται μέσα στον καρπό. Κατά την διαδικασία της ελαιοποίησης ο καρπός συνθλίβεται και απελευθερώνονται μέσα από τον καρπό τα μικροσταγονίδια του ελαιολάδου και μαζί ουσίες και ένζυμα που εμπεριέχονται στον καρπό. Κατά την διάρκεια της μάλαξης της ελιάς στο ελαιοτριβείο το ένζυμο β-γλυκοσιδάση έρχεται σε επαφή με τις ενώσεις Ελευρωπεΐνη και Λιγκτροσίδη και προκαλούν την υδρόλυσή τους. Αποτέλεσμα της υδρόλυσης αυτής είναι η απελευθέρωση στο ελαιόλαδο των άγλυκο της Ελευρωπεΐνης και άγλυκο του Λιγκτροσίδη [53].



Εικόνα 6: Ασταθείς μορφές των άγλυκων λιγκτροσίδη και ελευρωπεΐνης

Αυτές οι δύο παραπάνω μορφές είναι αρκετά ασταθείς και είναι δυνατόν να παρατηρηθούν σε πολύ συγκεκριμένες συνθήκες. Αντίθετα στο χημικό περιβάλλον του ελαιολάδου και γενικά σε μη υδατικές συνθήκες οι παραπάνω δομές δεν είναι δυνατόν να υπάρξουν και μετασχηματίζονται με αναδιάταξη σε πιο σταθερές μονοαλδεϋδικές κυκλικές μορφές ή σε μη κυκλικές διαλδεϋδικές μορφές. [54]

Έτσι από τα πραγματικά άγλυκα της Ελευρωπεΐνης και Λιγκτροσίδη αρχικά ανοίγει ο δακτύλιος στον άνθρακα της θέσης 1 και με αναδιάταξη το πρωτόνιο της θέσης 8 ξανακλείνει τον δακτύλιο οδηγώντας σε μια πιο σταθερή κυκλική δομή. Στην περίπτωση αυτή δημιουργούνται δύο στερεοϊσομερή ανάλογα με την θέση που παίρνει το μεθύλιο στον χώρο.

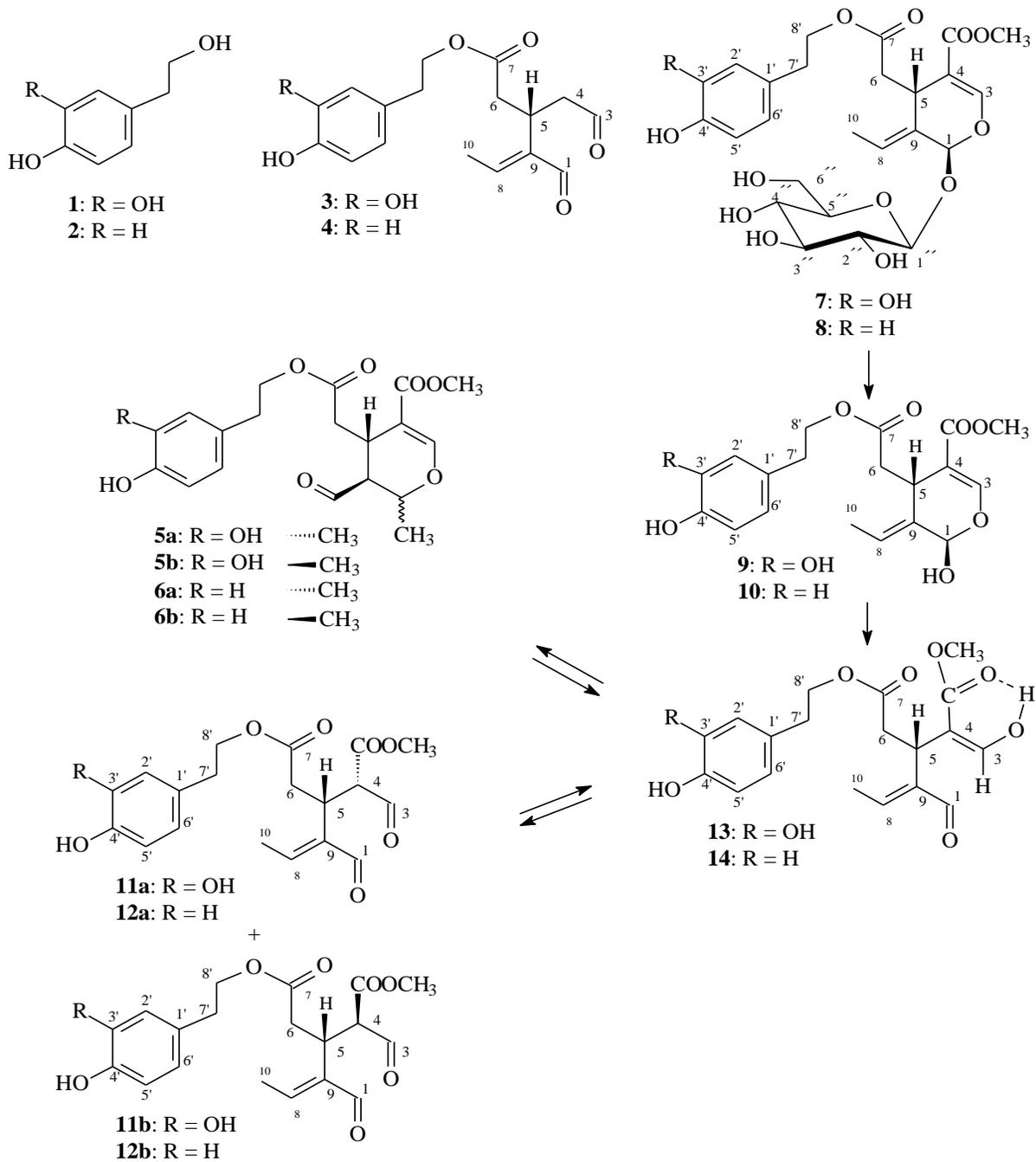


Εικόνα 7: Μονοαλδεϋδικές και διαλδεϋδικές μορφές των άγλυκων λιγκοτροσίδη και ελευρωπεΐνης

Σε πρόσφατη δημοσίευση μάλιστα αναφέρεται ότι τα στερεοϊσομερή που επικρατούν στο χημικό περιβάλλον του ελαιολάδου είναι τα 5a και 6a [55]. Αυτές είναι και οι μορφές στις οποίες αναφέρονται οι διάφοροι ερευνητές όταν αναφέρουν τους όρους Άγλυκο της Ελευρωπεΐνης και Άγλυκο του Λιγκοτροσίδη. Πέρα από αυτές και άλλες μορφές έχουν αναφερθεί [56]. Τα δύο ισομερή που αντιστοιχούν στις ενώσεις 5b και 6b είναι στερεοϊσομερή που έχουν το μεθύλιο πάνω από το επίπεδο του σκελετού του μορίου, και στην πραγματικότητα απαντώνται σε πολύ μικρό βαθμό μέσα στο ελαιόλαδο ή πολλές φορές απουσιάζουν πλήρως. Στο φαινολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου βέβαια είναι δυνατόν να εντοπισθούν ποσότητες των μορφών αυτών αλλά αυτό είναι αποτέλεσμα τεχνητής αύξησής τους κατά την διάρκεια της εκχύλισης και της χρωματογραφικής επεξεργασίας που έχει ως αποτέλεσμα την ισομερίωση των μορφών 5a και 6a. [57]

Εναλλακτικά αντί για την κυκλική δομή είναι δυνατόν να προκύψουν διαλδεϋδικές μορφές του άγλυκου. Οι διαλδεϋδικές μορφές που προκύπτουν και αυτές με την σειρά τους εντοπίζονται σε δύο στερεοϊσομερή αυτή φορά αναλόγως με την θέση της καρβομεθοξυλικής ομάδας στον χώρο.

Συνοπτικά παρακάτω παρουσιάζεται το βιοσυνθετικό μονοπάτι των ισομερών του άγλυκου του λιγκτροσίδη και τα Ελευρωπεΐνης.



3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός.

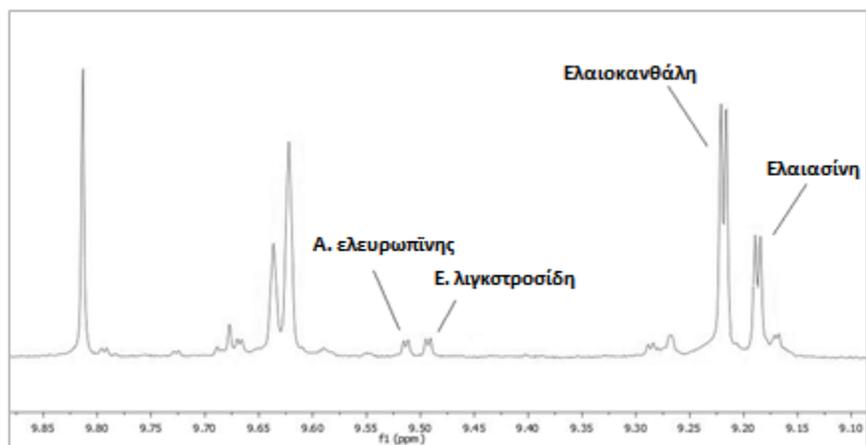
Σε πρόσφατη εργασία δημοσιεύτηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης και ποσοτικού προσδιορισμού των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου άγλυκο της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκστροσίδη μαζί με την ελαιοκανθάλη και ελαιασίνη [17]. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο παρουσιάστηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μορφών 5a και 6a. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου και ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των τεσσάρων ενώσεων με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού qNMR. Χρησιμοποιήσαμε το συγκεκριμένο πρωτόκολλο σε εκατοντάδες δείγματα ελαιολάδου με σκοπό την συλλογή πληροφοριών για τις υπόλοιπες δομές των άγλυκων.

3.4.1 Πρωτόκολλο εκχύλισης και φασματοσκοπικός προσδιορισμός.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δημοσιεύτηκε [17] 5g ελαιολάδου ζυγίζονται και διαλύονται σε 20ml κυκλοεξάνιο (cHex). Το διάλυμα αναδεύεται για 1 min και στην συνέχεια προστίθενται 25ml ακετονιτρίλιο (ACN) και αναδεύουμε για 1min. Το μίγμα τοποθετείται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 4000rpm με σκοπό να διαχωριστούν οι δύο φάσεις ακετονιτριλίου και κυκλοεξανίου. Συλλέγουμε 25ml από την φάση του ακετονιτριλίου και προσθέτουμε 1ml διάλυμα συριγγαλδεΐδης (0,5mg/ml) σε ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα εξατμίζεται με την βοήθεια rotary evaporator μέχρι ξηρού. Το εκχύλισμα διαλύεται σε 750μl δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και παραλαμβάνουμε 550 μl τα οποία και τοποθετούμε σε σωληνάκι NMR.

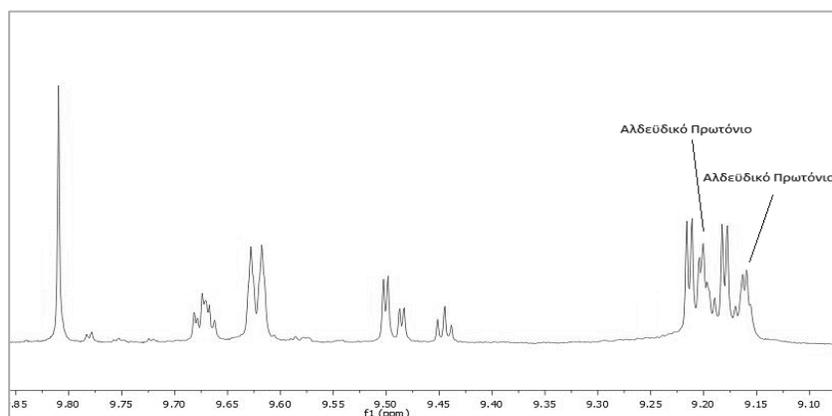
Τα φάσματα πρωτονίου NMR ελήφθησαν σε 700 MHz (Bruker Avance 700). Ελήφθησαν 50 scans σε 32K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time 1.7 s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε exponential weighing factor 0.3 Hz. Η διόρθωση της φάσης του φάσματος καθώς και οι ολοκληρώσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MestRenova.

Το παραπάνω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε εκατοντάδες δείγματα ελαιολάδου. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων ελαιολάδου οι κορυφές ολοκλήρωσης που αφορούσαν τον ποσοτικό προσδιορισμό των τεσσάρων φαινολικών συστατικών ήταν στα 9,19ppm (ελαιασίνη) 9,23ppm (ελαιοκανθάλη) 9,52ppm (άγλυκο λιγκστροσίδη) 9,55 (άγλυκο ελευρωπεΐνης). Σε ένα πολύ μεγάλο αριθμό φασμάτων που εξετάσαμε ήταν δυνατόν να διακρίνουμε στην συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος τις κορυφές αυτές ξεκάθαρα και να μπορέσουμε να ολοκληρώσουμε ώστε να ολοκληρωθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός.



Εικόνα 8: Ένα τυπικό φαινολικό προφίλ ελαιολάδου που συναντήσαμε στις αναλύσεις

Υπήρξαν όμως και πολλές περιπτώσεις όπου το φαινολικό προφίλ των δειγμάτων ελαιολάδου που εξετάσαμε διαφοροποιούταν αρκετά από το παραπάνω μοτίβο και εμφανίστηκαν κάποιες κορυφές στην ίδια περιοχή που δεν αντιστοιχούσαν σε κάποια ήδη γνωστή ένωση. Οι κορυφές αυτές μάλιστα από την στιγμή που εμφανίζονταν στην συγκεκριμένη περιοχή θα έπρεπε να αντιστοιχούν σε αλδεϋδικά πρωτόνια. Αυτό μας οδήγησε στην υπόθεση ότι τα σήματα αυτά που εμφανίζονται στην αλδεϋδική περιοχή θα πρέπει να αντιστοιχούν σε κάποια ισομερή των άγλυκων της Ελευρωπεΐνης και Λιγκαστροσίδη.



Εικόνα 9: Διαφοροποιημένο φαινολικό προφίλ ελαιολάδου με επιπλέον σήματα στην Αλδεϋδική περιοχή

Η υπόθεση αυτή σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι σε πολλές περιπτώσεις οι ενώσεις στις οποίες ανήκουν τα συγκεκριμένα σήματα ήταν οι κυρίαρχες ενώσεις στο φαινολικό κλάσμα, μας οδήγησε στην προσπάθεια να απομονώσουμε και να χαρακτηρίσουμε την δομή των ενώσεων αυτών.

3.4.2 Απομόνωση ενώσεων.

Η προσπάθεια απομόνωσης των ενώσεων αυτών ξεκίνησε από δύο δείγματα ελαιολάδου τα οποία, το ένα προερχόταν από ελαιόδεντρα ποικιλίας Κορωνέικη, και το προμηθευτήκαμε από τον Αγροτικό Συνεταιρισμό Παλαιοπαναγιάς από την περιοχή της Λακωνίας. Το δεύτερο προερχόταν από την ποικιλία Μίσσιον, μια ποικιλία που εντοπίζεται στην περιοχή της Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Οι ποικιλίες αυτές επιλέχθηκαν γιατί κατά την ανάλυση δειγμάτων που είχαμε έμοιαζε να έχουν μια μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης αυτών των κορυφών και μάλιστα σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Για την απομόνωση των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές χρωματογραφίας στήλης αλλά και χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) τόσο κανονικής όσο και αντίστροφης φάσης. Σε όλες τις περιπτώσεις τα προϊόντα που παραλαμβάναμε ήταν οι ήδη γνωστές μορφές του άγλυκου της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκστροσίδη 5a,b και 6a,b. Το παράδοξο επίσης ήταν ότι στα αρχικά φάσματα του φαινολικού κλάσματος ελαιολάδου, προτού δηλαδή το εκχύλισμα υποβληθεί σε χρωματογραφική επεξεργασία, οι συγκεντρώσεις των δομών 5a,b και 6a,b ήταν πολύ μικρές. Επίσης δεν εμφανιζόταν κάποιο προϊόν στο οποίο να μπορούμε να αποδώσουμε τα αλδεϋδικά πρωτόνια που εντοπίσαμε στο αρχικό φάσμα. Βασιζόμενοι σε αυτήν την παρατήρηση υποθέσαμε ότι κατά την χρωματογραφική επεξεργασία του ελαιολάδου κάποιες ενώσεις μετατρέπονται στις ήδη γνωστές δομές 5a,b και 6a,b.

Πιο προσεκτική παρατήρηση των ζωνών από πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας όμως έδωσε σημαντικές απαντήσεις για τον μετέπειτα προσδιορισμό της δομής των ενώσεων αυτών. Παρακάτω θα παρουσιάσουμε την διαδικασία εκχύλισης των συστατικών που αναζητούσαμε από την αρχή με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

3.4.3 Εκχύλιση του ελαιολάδου

Η εκχύλιση των δύο δειγμάτων ελαιολάδου έγινε, όπως αναφέραμε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δημοσιεύτηκε πρόσφατα από τους E. Karkoula et al. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο 100g ελαιολάδου διαλύθηκαν σε 400ml κυκλοεξάνιο (cHex). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη 1L και το αναδεύσαμε για 1 min. Στην συνέχεια προσθέσαμε ποσότητα ακετονιτριλίου (ACN) 500ml και αναδεύσαμε το μίγμα για 1 min. Στην συνέχεια το μίγμα μοιράστηκε δόσεις των 50 ml και με την βοήθεια συσκευής φυγόκεντρου Heraeus Multifuge 35 (Thermo), η οποία λειτουργούσε για 5 min στις 4000 rpm, διαχωρίστηκαν οι δύο φάσεις. Παραλάβαμε την ακετονιτριλική φάση και εξατμίσαμε μέχρι ξηρού στους 40°C με την βοήθεια συσκευής απόσταξης rotary evaporator (Buchi R114).

Με την μέθοδο της υγρής-υγρής εκχύλισης επιτύχαμε την απομάκρυνση μεγάλου μέρους μη πολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο και κυρίως μακρομοριακές ενώσεις όπως τα λιπαρά οξέα. Είναι όμως πρακτικά αδύνατο να φτάσουμε σε ένα τελικό εκχύλισμα στο οποίο θα απουσιάζουν παντελώς οι ενώσεις αυτές. Για αυτό το λόγο εφαρμόσαμε και εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος. Σε μια στήλη 20x1 cm τοποθετήσαμε silica gel αντίστροφης φάσης και τοποθετήσαμε το εκχύλισμα. Στην συνέχεια έγινε έκπλυση την στήλη με διαλύτη ακετονιτρίλιο 100%.

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού με την βοήθεια συσκευής απόσταξης rotary evaporator. Με την βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας εξετάσαμε σε ποιο κλάσμα έχουμε το εκχύλισμα χωρίς την παρουσία λιπιδίων. Σε πλάκες αντίστροφης φάσης τοποθετήσαμε μικροποσότητα του εκχυλίσματος και αναπτύξαμε τις πλάκες σε σύστημα H₂O:ACN 60:40.

Ο έλεγχος έγινε με οπτική παρατήρηση στα 254nm

3.4.4 Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας.

Το φαινολικό εκχύλισμα στην συνέχεια το υποβάλαμε σε επεξεργασία διαχωρισμού με την μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.

Σε ένα θάλαμο ανάπτυξης πλάκας TLC τοποθετήσαμε μίγμα ACN:H₂O σε αναλογία 40:60. Ο θάλαμος σφραγίστηκε αεροστεγώς και περιμέναμε για 30min μέχρι στο εσωτερικό περιβάλλον του θαλάμου να επιτευχθεί κορεσμός από τους υδρατμούς. Σε μια πλάκα TLC αλουμινίου αντίστροφης φάσης 20x20 τοποθετήσαμε 20mg του φαινολικού εκχυλίσματος που παραλάβαμε με την διαδικασία που αναφέραμε προηγουμένως. Η πλάκα τοποθετήθηκε στον θάλαμο μέχρι να αναπτυχθεί πλήρως.

Μετά το πέρας της διαδικασίας ανάπτυξης της πλάκας, η πλάκα στεγνώνεται και γίνεται ποιοτικός προσδιορισμός των ζωνών σε ακτινοβολία UV στα 254 nm.

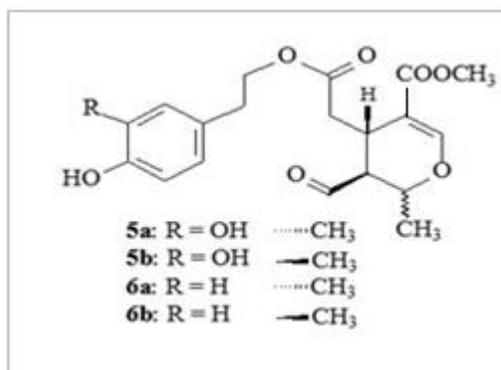
Οι ζώνες που αποξέστηκαν από την πλάκα και εκχυλίστηκαν για 20 min στους υπέρηχους με διαλύτη ακετονιτρίλιο (ACN). Η ίδια διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε για άλλη μια φορά με διαλύτη ακετονιτρίλιο για 20 min. Το συνολικό ακετονιτριλιακό εκχύλισμα εξατμίστηκε στους 40 °C με την βοήθεια rotary evaporator μέχρι ξηρού.

Τα ξηρά εκχυλίσματα διαλύονται σε 600μl δευτεριωμένου χλωροφορμίου (CDCl₃) και το διάλυμα μεταφέρεται σε σωληνάκια NMR για την λήψη φασμάτων NMR.

Τα φάσματα πρωτονίου NMR ελήφθησαν σε 700 MHz (Bruker Avance 700). Ελήφθησαν 50 scans σε 32K και εύρος 0-16 ppm με relaxation delay 1 s και acquisition time of 1.7 s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε exponential weighing factor 0.3 Hz . Η διόρθωση της φάσης του φάσματος καθώς και οι ολοκληρώσεις πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα MestRenova.

3.5 Ανάλυση ζωνών πλάκας χρωματογραφίας.

Όπως συζητήσαμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο από την ανάλυση των ζωνών της πλάκας χρωματογραφίας, είδαμε ότι ως κύριο προϊόν της εκχύλισης ήταν εκείνες οι μορφές που αφορούν τις κυκλικές δομές του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης και άγλυκο του Λιγκοτροσίδη 5a,b και 6a,b



Εικόνα 10: Κυκλικές μονοαλδεϊδικές μορφές των άγλυκων Λιγκοτροσίδη και Ελευρωπεΐνης.

Η παράδοση αυτή εικόνα μας οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχουν κάποιες ενώσεις στο φαινολικό εκχύλισμα του ελαιολάδου οι οποίες κατά την διαδικασία εκχύλισης με μεθόδους χρωματογραφίας μετατρέπονται στις παραπάνω δομές.

Προσεκτική παρατήρηση των ζωνών που προέρχονται από την πλάκα χρωματογραφίας έδειξε ότι υπάρχουν δύο μικρές ζώνες Α (1.0 mg/ rf = 0.5) και Β (1.5 mg/ rf = 0.7) οι οποίες περιέχουν ποσότητα των ενώσεων που υπήρχαν αρχικά στο εκχύλισμα πριν την χρωματογραφική επεξεργασία.

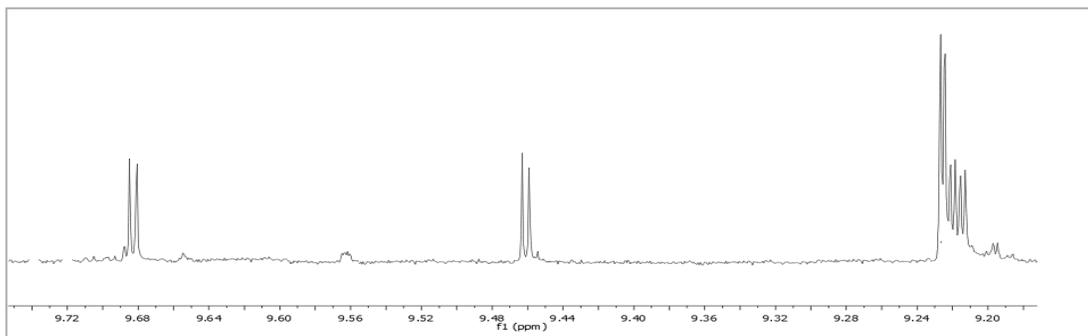
Ζώνες Χρωματογραφίας	Rf	Βάρος(mg)
A	0.5	1.0
B	0.7	1.5

Από τα φάσματα πρωτονίου που ελήφθησαν για τις παραπάνω ζώνες προέκυψε ότι και στις δύο περιπτώσεις πρόκειται κάθε φορά για μίγμα τριών ενώσεων τα οποία είναι αδύνατο να διαχωριστούν με οποιαδήποτε από τις προαναφερθείσες μεθόδους διαχωρισμού. Έτσι, η απόδοση της δομής των ενώσεων που απομονώθηκαν από τις δύο ζώνες έπρεπε να γίνει μέσα από τα δύο σύνθετα μίγματα και για αυτό το λόγο ελήφθησαν φάσματα NMR μιας και δύο διαστάσεων.

3.5.1 Προσδιορισμός δομής ενώσεων “Ζώνης Α”

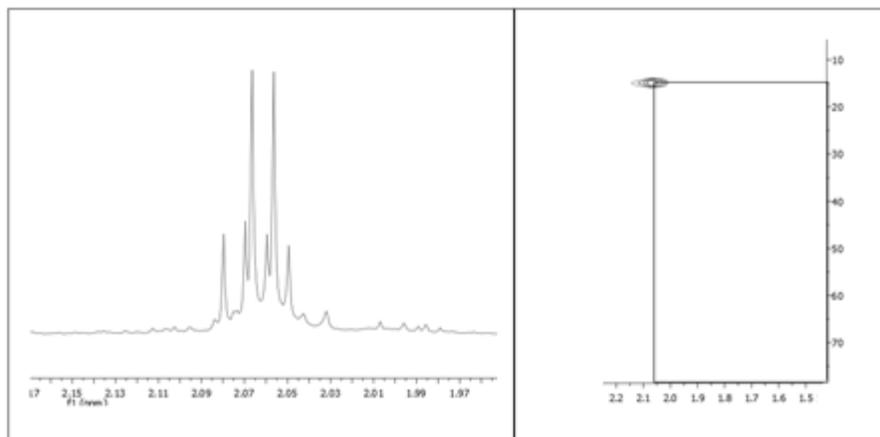
Εξέταση αλδεϋδικής περιοχής.

Στην συνέχεια θα εστιάσουμε το ενδιαφέρον μας στην αλδεϋδική περιοχή του φάσματος πρωτονίου. Τα αλδεϋδικά πρωτόνια γενικά αναμένουμε να τα δούμε στην περιοχή 9-10 ppm του φάσματος πρωτονίου. Μια προσεκτική παρατήρηση στο φάσμα πρωτονίου θα δούμε ότι στην αλδεϋδική περιοχή υπάρχουν 3 διπλές κορυφές στα 9.212ppm, 9.218ppm και 9.225ppm τα οποία ύστερα από ολοκλήρωση βλέπουμε ότι βρίσκονται σε αναλογία 1:1:2. Οι κορυφές αυτές είναι διπλές με σχάση ~2Hz. Σε λίγο χαμηλότερα πεδία αλλά πάλι στην αλδεϋδική περιοχή βρίσκουμε άλλες δύο διπλές κορυφές στα 9.68 και 9.46ppm επίσης με σχάση ~ 2Hz οι οποίες ολοκληρώνουν για 1 ενώ απουσιάζει τρίτο αλδεϋδικό πρωτόνιο. Αυτό ενισχύει την πεποίθηση ότι πρόκειται για ένα μίγμα τριών ενώσεων εκ των οποίων οι δύο ενώσεις είναι δυαλδεϋδικές μορφές ενώ η άλλη είναι μονοαλδεϋδική και βρίσκεται σε διπλάσια αναλογία από τις άλλες δύο.



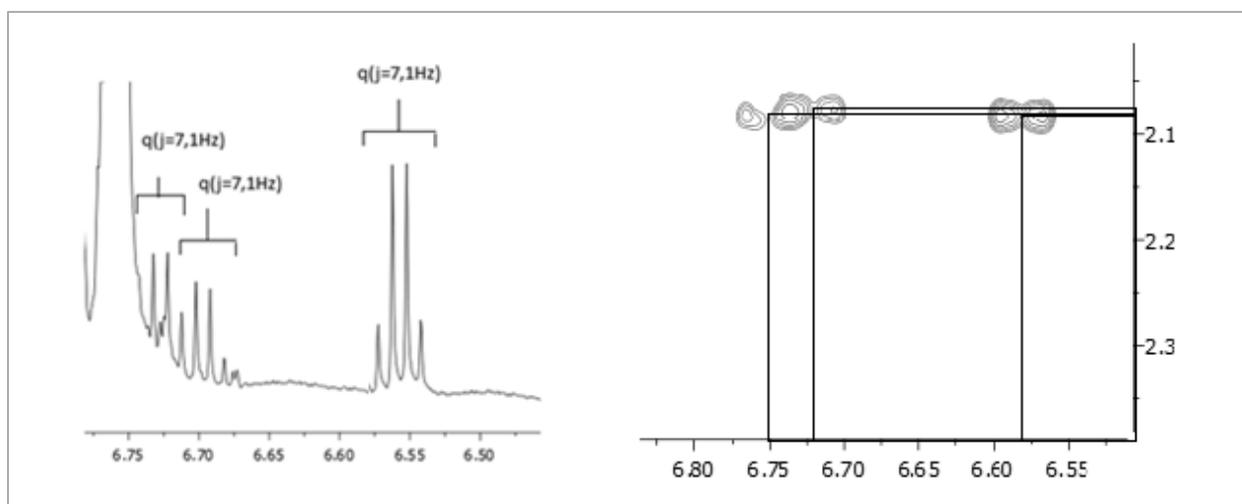
Εικόνα 11: Φάσμα ^1H NMR, Αλδεϋδική περιοχή.

Στο φάσμα πρωτονίου επίσης, μπορούμε να δούμε τα χαρακτηριστικά σήματα μεθυλίου πάνω σε διπλό δεσμό τα οποία μάλιστα βρίσκονται δίπλα σε ολεφινικό πρωτόνιο. Τα σήματα αυτά θα πρέπει να βρίσκονται περίπου στα 2 ppm και να εμφανίζουν σχάση κοντά στα 8Hz. Πράγματι τα σήματα αυτά βρίσκονται 2.055 ppm, 2.075 ppm και 2.062 ppm. Και σε αυτή την περίπτωση μπορούμε να δούμε ότι υπάρχει μια αναλογία αντίστοιχη με τις αλδεϋδες 1:1:2. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα δύο μεθύλια που ολοκληρώνουν για 1 θα ανήκουν στις διαλδεϋδικές μορφές ενώ το τρίτο μεθύλιο θα ανήκει στην μονοαλδεϋδική δομή. Από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι τα μεθύλια αυτά βρίσκονται πάνω σε άνθρακες με χημική μετατόπιση 15.20ppm



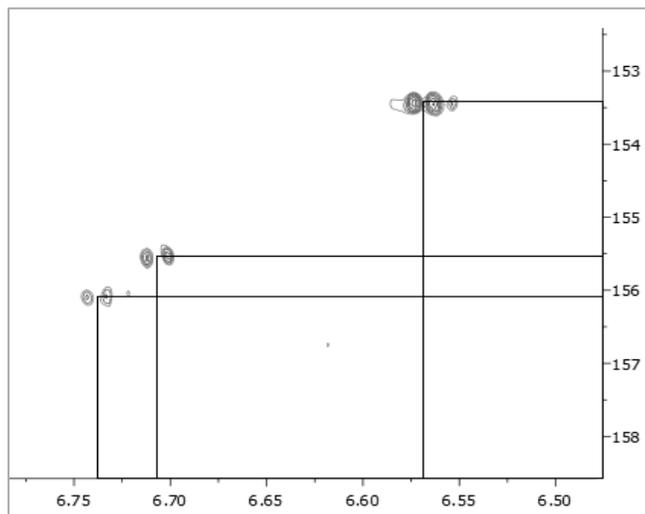
Εικόνα 12: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα μεθυλιών σε διπλό δεσμό – Φάσμα HMQC άνθρακες μεθυλιών.

Τα σήματα για τα μεθύλια αυτά για να είναι πάνω σε διπλό δεσμό και να εμφανίζονται και ως διπλές κορυφές θα πρέπει να υπάρχει πάνω στον διπλό δεσμό κάποιο πρωτόνιο. Πράγματι από το φάσμα COSY εντοπίζουμε σήματα που δείχνουν την συσχέτιση των ολεφινικών πρωτονίων των τριών ενώσεων με τα μεθύλια. Τα πρωτόνια αυτά εμφανίζονται ως τετραπλές κορυφές στα 6.70ppm, 6.72ppm δυαλδεϊδικές μορφές και 6,56 ppm για την μονοαλδεϊδική.



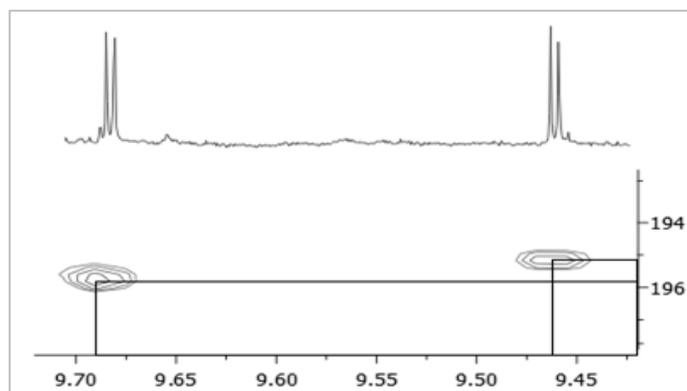
Εικόνα 13: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα ολεφινικών πρωτονίων – Φάσμα COSY συσχέτιση μεθυλιών με ολεφινικά πρωτόνια.

Χρησιμοποιώντας φάσμα HSQC DEPT μπορούμε να δούμε ότι τα ολεφινικά πρωτόνια αυτά ανήκουν πάνω στους άνθρακες 156.11ppm, 155.74ppm και 153.53ppm.



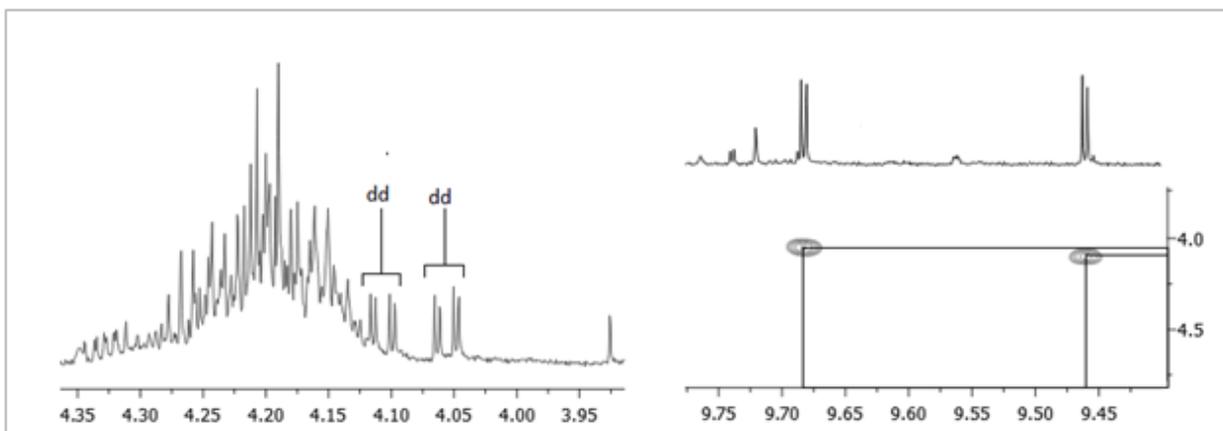
Εικόνα 14: Φάσμα HSQC DEPT, Σήματα ανθράκων που συμμετέχουν στον διπλό δεσμό.

Το σήμα στα 9.68ppm είδαμε ότι πρόκειται για μια αλδεϋδική ομάδα. Δίνει διπλή κορυφή λόγω της συσχέτισης, όπως θα δούμε παρακάτω με το πρωτόνιο στα 4.06ppm (H-4). Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται πάνω σε άνθρακα που φέρει ένα οξυγόνο με το οποίο συνδέεται με διπλό δεσμό. Επομένως περιμένουμε να δούμε τον άνθρακα αυτό στην περιοχή 180-200ppm. Πράγματι από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι βρίσκεται πάνω στον άνθρακα στα 195,72ppm. Ομοίως το σήμα στα 9.46ppm αποτελεί το αλδεϋδικό πρωτόνιο της δευτερης διαλδεϋδικής μορφής. Και αυτό εμφανίζεται ως διπλή κορυφή λόγω της συσχέτισης του με το πρωτόνιο H-4 της δεύτερης ισομερούς διαλδεϋδικής μορφής στα 4.11 ppm και συσχετίζεται με τον άνθρακα της θέσης 3 στα 195.08 ppm.



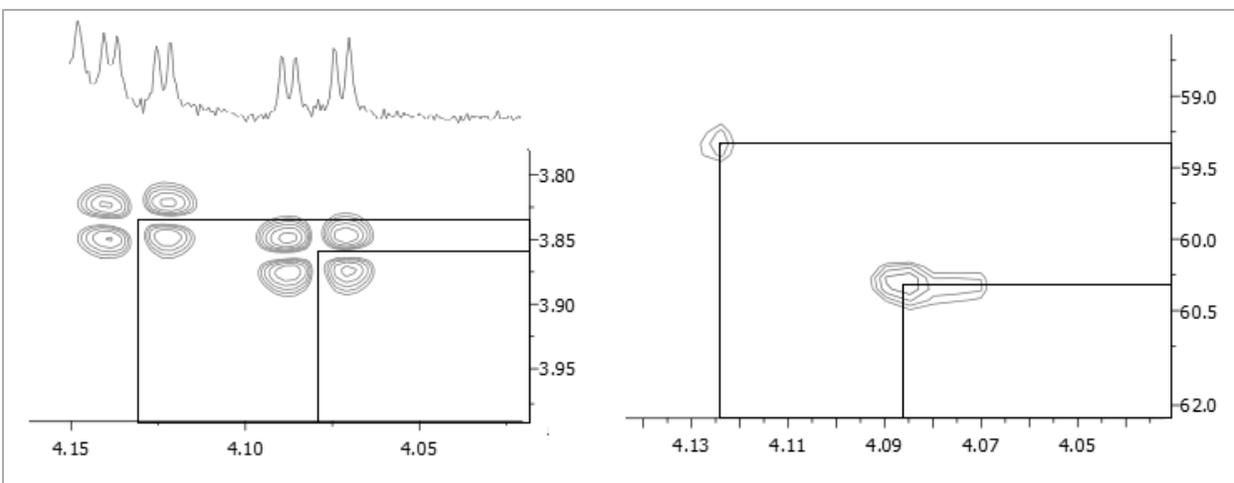
Εικόνα 15: Φάσμα HMQC, Σήματα ανθράκων που συμμετέχουν στην αλδεϋδομάδα.

Από το φάσμα COSY είναι δυνατό να βρούμε την συσχέτιση του πρωτονίου στα 9.68 με το πρωτόνιο στα 4,06ppm και του αλδεϊδικού πρωτονίου της δεύτερης διαλδεϊδικής μορφής στα 9.46 ppm με το πρωτόνιο στα 4.11 ppm. Τα πρωτόνια αυτά εμφανίζονται στο φάσμα πρωτονίου ως dd κορυφές με σχάση 10,5 και 2,7Hz λόγω της σύζευξης με το πρωτόνιο στα 9.68ppm και 9.46 ppm και άλλη μια μικρότερη σχάση λόγω ύπαρξης και κάποιου άλλου πρωτονίου.



Εικόνα 16: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα πρωτονίων θέσης 4 – Φάσμα COSY αλδεϊδικών πρωτονίων με H-4

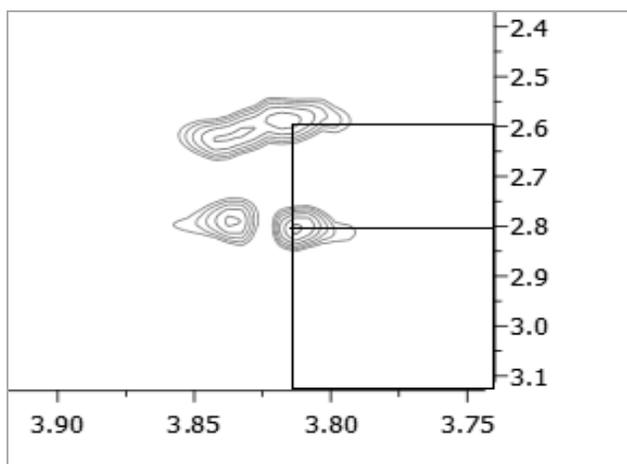
Το πρωτόνιο στα 4.06 ppm από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι βρίσκεται πάνω στον άνθρακα στα 60.27ppm ενώ το πρωτόνιο στα 4.11 ppm πάνω στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 59.30 ppm. Το πρωτόνιο αυτό ολοκληρώνει για 1 σε σχέση με το αλδεϊδικό πρωτόνιο και εμφανίζει συσχέτιση τόσο με το αλδεϊδικό πρωτόνιο στα 9,68 που περιγράψαμε πριν στην μια περίπτωση και με το πρωτόνιο στα 9.46ppm στην άλλη αλλά και άλλη μία με ένα πρωτόνιο και στις δύο περιπτώσεις στα 3.83 ppm. Οι δυο συσχετίσεις παρουσιάζουν διαφορετικές σχάσεις και για αυτό το πρωτόνιο στα 4,06ppm και 4.11 ppm εμφανίζεται ως dd κορυφή.



Εικόνα 17: Φάσμα COSY συσχέτιση H-4 με H-5 - Φάσμα HMQC, Συσχέτιση H-5 με C-5.

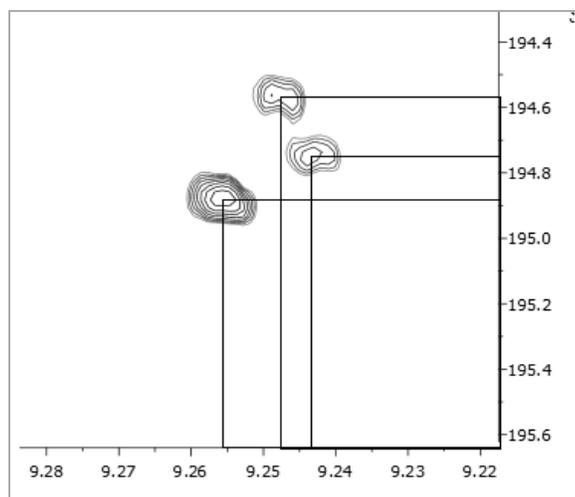
Το σήμα στα 3,83 ppm το εντοπίζουμε στο φάσμα πρωτονίου ως μια πολλαπλή κορυφή λόγω πολλαπλών συσχετίσεων και επικαλύψεων στην περιοχή.

Αυτό που μπορούμε να δούμε όμως είναι από το φάσμα COSY την συσχέτιση του τόσο με το πρωτόνιο στα 4.06 και 4.11 (συσχέτιση που περιγράψαμε και απεικονίσαμε προηγουμένως) όσο και με κάποια σήματα στα 2,81 ppm. Πίσω στο φάσμα πρωτονίου θα δούμε ότι στα 2,81 και 2,62 ppm, 2.82 ppm και 2.58 ppm έχουμε την εμφάνιση πολλαπλών κορυφών. Τα σήματα αυτά προέρχονται από δύο διαφορετικά πρωτόνια που ανήκουν στον ίδιο άνθρακα για κάθε μία από τις διαλδευδικές μορφές.



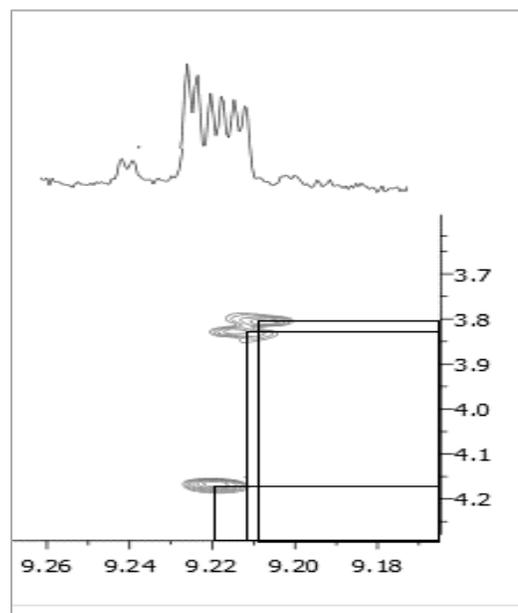
Εικόνα 18: Φάσμα COSY. Η δεύτερη συσχέτιση H-5 με το H-6a και H-6b.

Τα αλδεϋδικά πρωτόνια στα 9.212ppm, 9.218ppm και 9.225 ppm από το φάσμα HSQC DEPT μπορούμε να διακρίνουμε ότι βρίσκεται πάνω στους άνθρακες 194.75ppm, 194.56 ppm και 194.88 ppm.



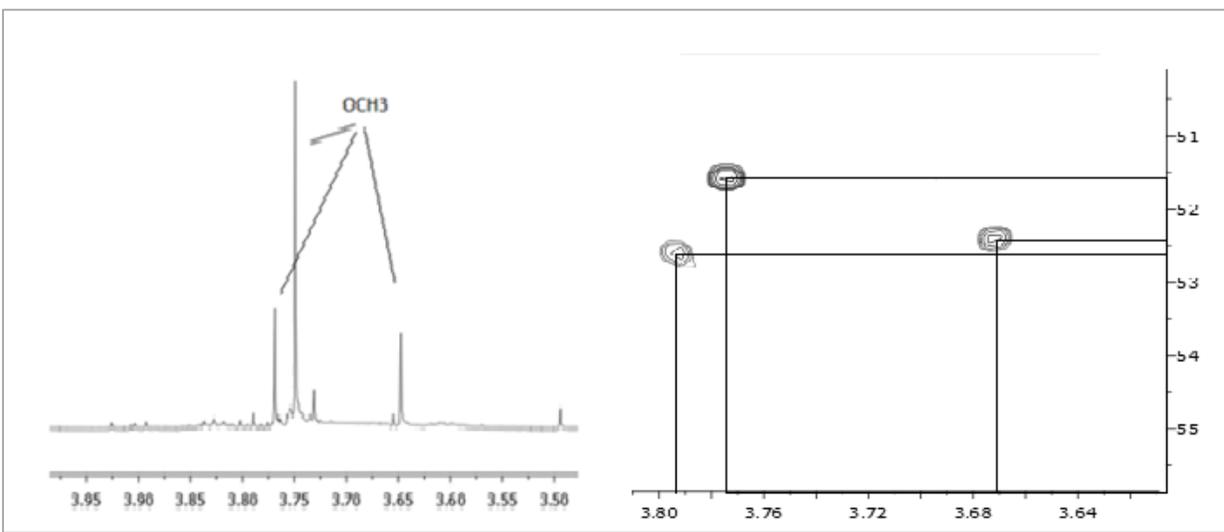
Εικόνα 19: Φάσμα HSQC DEPT. Η συσχέτιση των αλδεϋδικών πρωτονίων με τους αντίστοιχους άνθρακες.

Τα αλδεϋδικά αυτά πρωτόνια έχουν συσχέτιση με το πρωτόνιο της θέσης 5. Η συσχέτιση αυτή εξηγεί γιατί η κορυφή των αλδεϋδομάδων είναι διπλή κορυφή με σχέση $J=2\text{Hz}$ και μπορούμε να την δούμε στο φάσμα COSY παρακάτω. Στο φάσμα θα δούμε την συσχέτιση του πρωτονίου στα 3.83 ppm με το αλδεϋδικό πρωτόνιο στα 9.218ppm καθώς και την συσχέτιση του πρωτονίου στα 3.83 ppm με το αλδεϋδικό πρωτόνιο της δεύτερης διαλδεϋδικής μορφής στα 9.212 ppm σαν ένα σήμα καθώς και την συσχέτιση του πρωτονίου H-5 ενολικής μορφής με το αντίστοιχο αλδεϋδικό πρωτόνιο της ενολικής μορφής (9.225 ppm) με το αντίστοιχο πρωτόνιο της θέσης 5 στα 4.16 ppm.



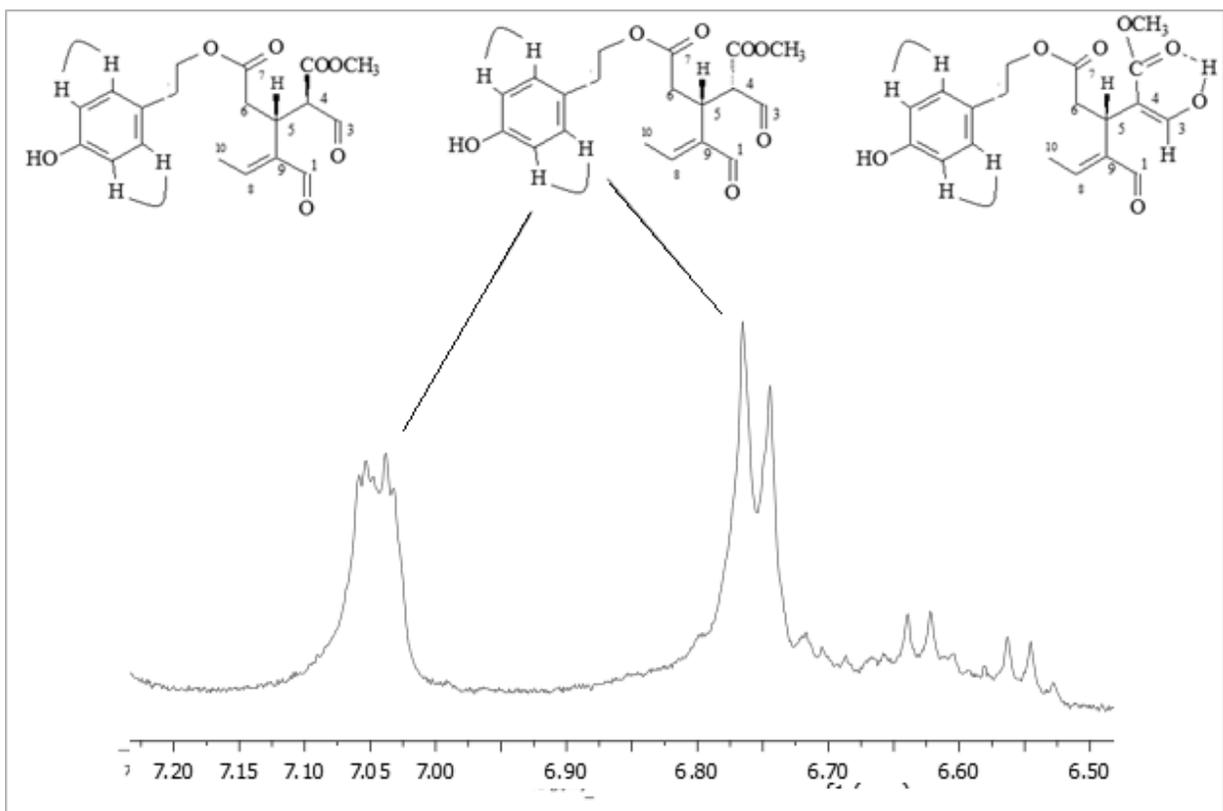
Εικόνα 20: Φάσμα COSY. Η συσχέτιση αλδεϋδικών πρωτονίων με ολεφινικό

Στο φάσμα πρωτονίου θα βρούμε χαρακτηριστικά σήματα μεθυλίου δίπλα σε οξυγόνο. Τα σήματα αυτά θα είναι σε χαμηλότερα πεδία από τα απλά μεθύλια, στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος (3-4ppm). Πράγματι στο φάσμα πρωτονίου εντοπίζουμε 3 απλές κορυφές στα 3.65ppm, 3.77ppm και 3.75ppm. Αντίστοιχα με την περίπτωση των αλδεϋδομάδων και των άλλων μεθυλίων και εδώ θα δούμε να υπάρχει αναλογία 1:2:1. Τα μεθύλια αυτά από το φάσμα HSQC DEPT μπορούμε να δούμε ότι ανήκουν στους άνθρακες στα 52.38 ppm, 52.61ppm και 51.59 ppm.



Εικόνα 21: Φάσμα ¹H NMR, Σήματα ομάδας OCH₃ – Φάσμα COSY. Συσχέτιση καρβόξυ μεθυλίων με αντίστοιχους άνθρακες.

Στην ζώνη A είναι εμφανή τα χαρακτηριστικά σήματα που δίνει ο φαινολικός δακτύλιος της τυροσόλης. Πρόκειται για δυο διπλές κορυφές στα 6,76ppm και 7,05ppm. Στο φάσμα θα παρατηρήσουμε ότι τα σήματα που εμφανίζονται δεν είναι 1 αλλά υπάρχει πολλαπλή επικάλυψη από τους συνολικά 3 δακτυλίους που υπάρχουν για τις τρεις διαφορετικές ενώσεις που έχουμε στο εκχύλισμα. Κάθε αρωματικός δακτύλιος τυροσόλης έχει συνολικά 4 πρωτόνια ανά δύο χημικά ισοδύναμα και έχουν σύζευξη όρθο θέσης. Τα σήματα αυτά βρίσκονται στην αρωματική περιοχή. Η θεωρητική σχάση των κορυφών αυτών είναι περίπου τα 8Hz αλλά λόγω των επικαλύψεων δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί η σχάση των κορυφών αυτών.



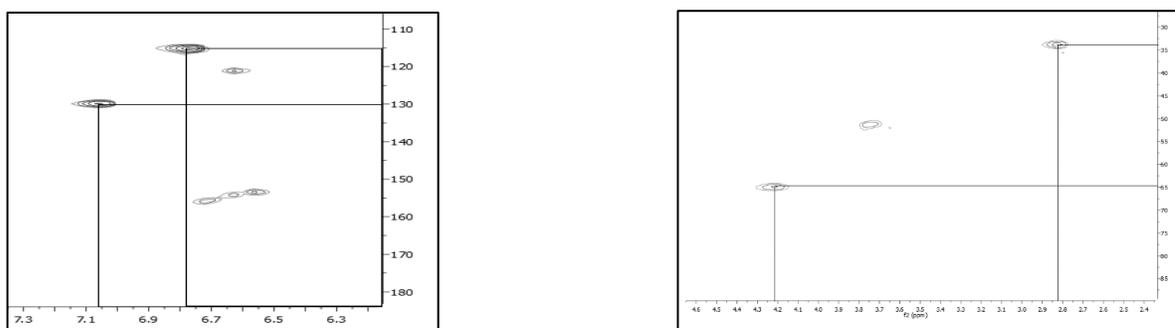
Εικόνα 22: Φάσμα ^1H NMR, αρωματική περιοχή – Σήματα τυροσόλη (NMR 400Hz).

Αντίστοιχα σήματα εμφανίζονται και στα φάσματα δύο διαστάσεων. Από τα φάσματα HMQC μπορούμε να δούμε ότι και στις τρεις περιπτώσεις οι άνθρακες οι οποίοι φέρουν τα παραπάνω πρωτόνια έχουν μετατόπιση C-5',7' 115,29 ppm και C-4',8' 130,03 ppm.

Το κοινό κομμάτι των 3 ισομερών που βρίσκονται στην ζώνη A και αφορά το κομμάτι της τυροσόλης, ολοκληρώνεται με τα δύο πρωτόνια 1' και 2'. Τα σήματα αυτά θα ολοκληρώνουν για 2 πρωτόνια και θα εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές λόγω συσχέτισης του κάθε πρωτονίου με 3 πρωτόνια με διαφορετική πυρηνική σχάση το καθένα. Τα μεν 1' θα είναι

σχετικά αποθωρακισμένα λόγω της παρουσίας οξυγόνου δίπλα τους και αναμένεται να είναι στην περιοχή 4-5ppm ενώ τα 2' τα περιμένουμε σε υψηλότερα πεδία. Πράγματι εντοπίζουμε δύο πολλαπλές κορυφές στα 2,81ppm όπου αντιστοιχούν στα πρωτόνια 2' και άλλες δύο πολλαπλές κορυφές στα 4,18 και 4,20 ppm.

Από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι τα πρωτόνια αυτά βρίσκονται πάνω σε άνθρακες που έχουν την ίδια χημική μετατόπιση και στα 3 μόρια. Έτσι τα δύο πρωτόνια της θέσης 1' βρίσκονται πάνω στους άνθρακες στα 65,24 ppm ενώ τα δύο πρωτόνια της θέσης 2' βρίσκονται πάνω στους άνθρακες με χημική μετατόπιση 34,02 ppm.



Εικόνα 24: Φάσματα HMQC. Αριστερά η συσχέτιση των αρωματικών πρωτονίων με δύο άνθρακες και δεξιά οι συσχετίσεις των πρωτονίων 1' και 2' με δύο άνθρακες.

Η ταυτοποίηση του αρωματικού δακτυλίου της τυροσόλης τέλος επιβεβαιώνεται με το φάσμα HMBC όπου βλέπουμε ότι τα πρωτόνια 4',8' τα οποία είναι πιο αποθωρακισμένα από τα 5',7', συσχετίζονται εκτός από τον άνθρακα στα 130,03 ppm στον οποίο όπως είδαμε και πιο πριν ανήκουν, με τον διπλανό αρωματικό άνθρακα στα 115,29 ppm που έχει το έτερο πρωτόνιο του δακτυλίου (H-5'), εμφανίζει όμως και συσχέτιση με έναν άλλον άνθρακα αρκετά αποθωρακισμένο στα 154,13ppm οποίος δεν δίνει σήμα στο HMQC. Αυτό συμβαίνει διότι φέρει επάνω του ένα υδροξύλιο.

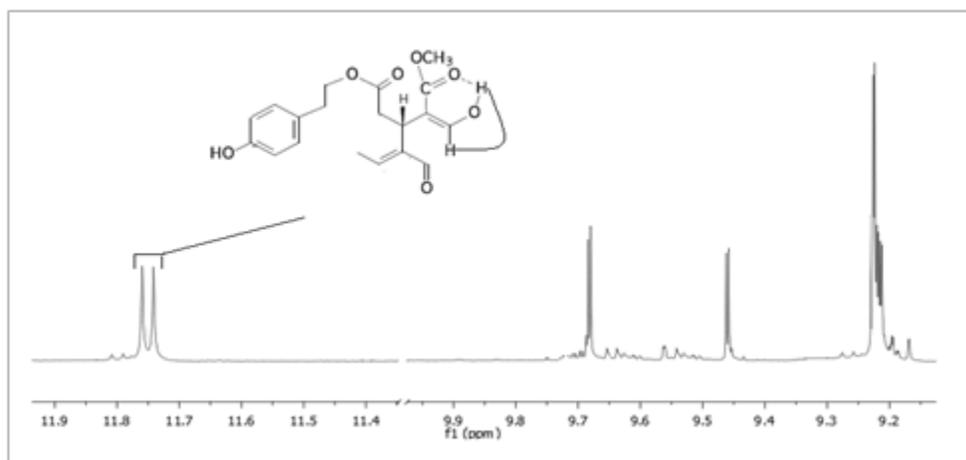
Με αυτά τα σήματα ολοκληρώνεται η περιγραφή του τμήματος της τυροσόλης στις ενώσεις που περιλαμβάνονται στις ενώσεις που συνθέτουν το μίγμα της ζώνης Α.

Χαρακτηριστικά πρωτόνια ενολικής μορφής του άγλυκου του λιγκστροσίδη.

Από την μέχρι τώρα ανάλυση των φασμάτων μιας και δύο διαστάσεων NMR που εξετάσαμε είδαμε όλα τα σήματα που αφορούν την διαλδευδική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη. Στην συνέχεια θα παρουσιάσουμε τα χαρακτηριστικά σήματα που αφορούν την ενολική μορφή του άγλυκου του λιγκστροσίδη. Όπως είδαμε οι τρεις ενώσεις έχουν πολλές ομοιότητες και επομένως είναι δυνατόν να βρούμε πολλά όμοια σήματα στα φάσματα NMR. Μάλιστα είδαμε τις χαρακτηριστικές περιπτώσεις μεθυλίων και αλδεϋδομάδων αλλά και όλων των άλλων σημάτων, από όπου εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι τρεις ενώσεις αυτές εμφανίζονται σε αναλογία 1:2:1.

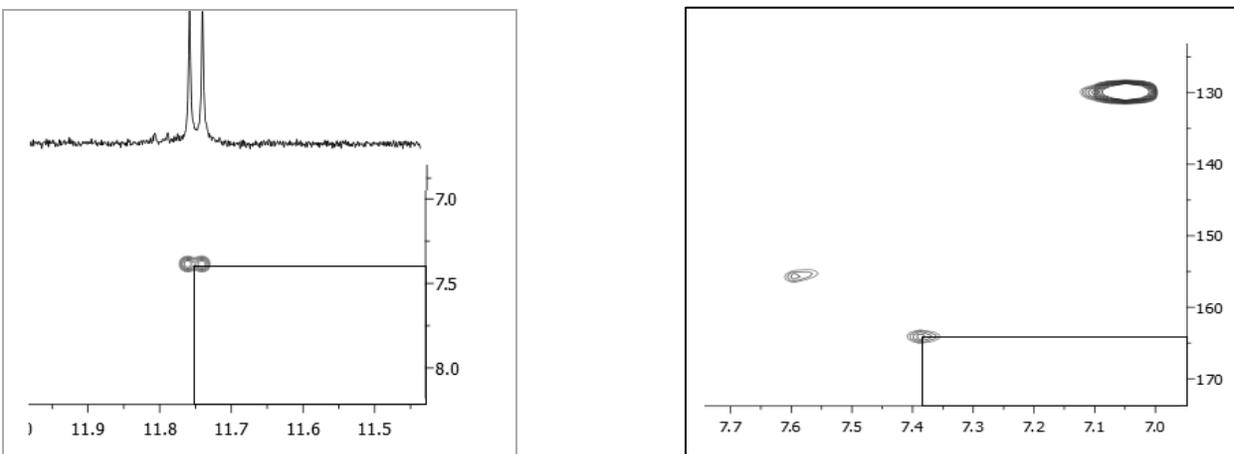
Πέρα από τα σήματα που εξετάσαμε και τα οποία είναι όμοια για τις τρεις ισομερείς ενώσεις υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά σήματα για την ενολική μορφή.

Στο φάσμα πρωτονίου θα παρατηρήσουμε ένα χαρακτηριστικό σήμα πολύ αποθωρακισμένο στα 11.75 ppm. Το σήμα αυτό είναι μια διπλή κορυφή με σχάση 12.6 Hz. Στην περιοχή αυτή του φάσματος 10-12ppm συναντάμε ενολικά υδροξύλια.



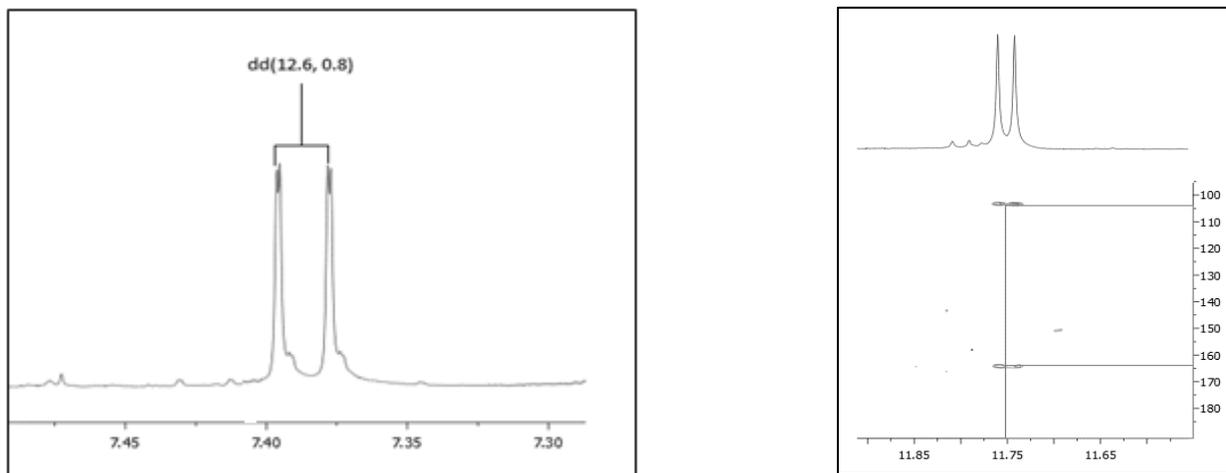
Εικόνα 26: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα ενολικού υδροξυλίου στα 11.75ppm

Το ενολικό αυτό υδροξύλιο συσχετίζεται με ένα πρωτόνιο στα 7,386ppm. Αυτός είναι και ο λόγος που εμφανίζεται ως διπλή κορυφή. Την συσχέτιση αυτή μπορούμε να την δούμε στο φάσμα COSY παρακάτω. Από το φάσμα HMQC θα δούμε ότι το πρωτόνιο στα 7.386 ppm βρίσκεται πάνω στον άνθρακα στα 164.23 ppm



Εικόνα27: Φάσμα COSY. Συσχέτιση ενολικού υδροξυλίου με H-3. – Φάσμα HMQC, συσχέτιση H-3 με C3.

Από το φάσμα HMBC μπορούμε να δούμε ότι το ενολικό υδροξύλιο συσχετίζεται με δύο άνθρακες. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι το υδροξύλιο αυτό συνδέεται με έναν άνθρακα με χημική μετατόπιση 164.23 ppm και γειτονικά υπάρχει κι άλλος άνθρακας με χημική μετατόπιση 103,33 ppm.

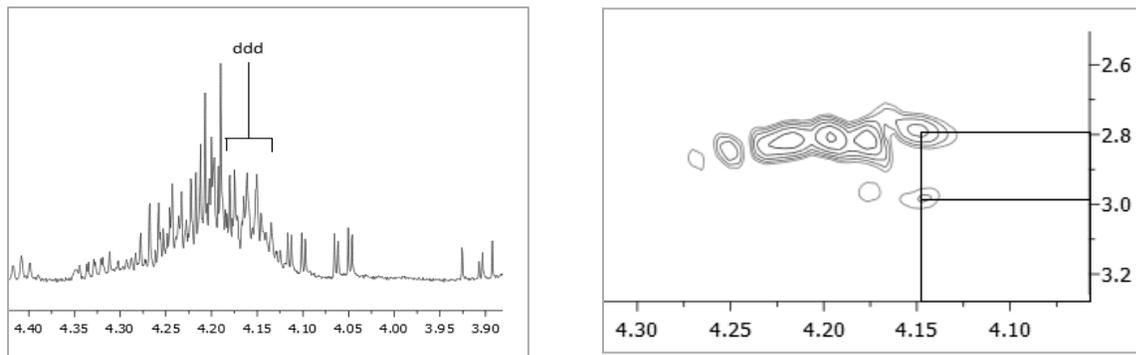


Εικόνα 28: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα H-3 ενολικής μορφής στα 7.38 ppm – Φάσμα HMBC συσχέτιση ενολικού υδροξυλίου με δύο άνθρακες

Από το φάσμα HMBC βλέπουμε ότι το ενολικό πρωτόνιο συνδέεται με τον άνθρακα στα 103,33 ppm. Διατρέχοντας το φάσμα οριζόντια θα δούμε ότι ο άνθρακας αυτός συσχετίζεται με το πρωτόνιο στα 7,286 ppm (συσχέτιση που την είδαμε παραπάνω) αλλά και με ένα

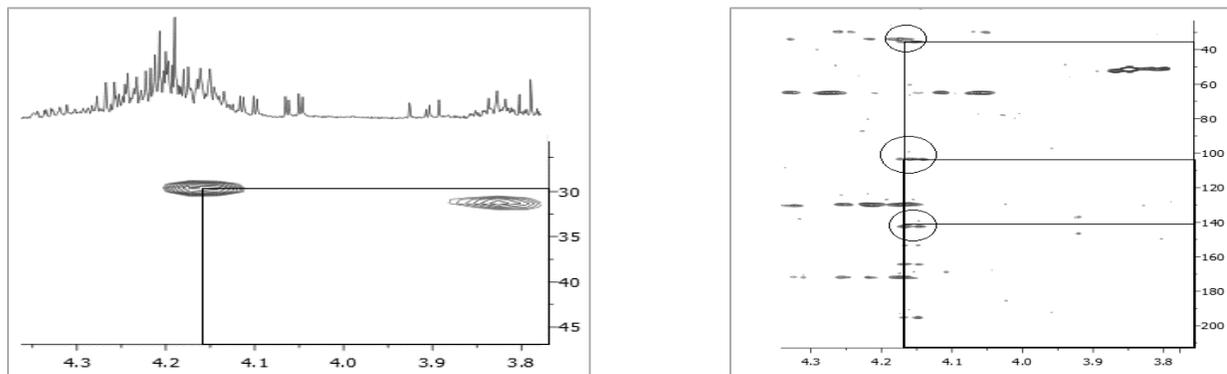
πρωτόνιο στα 4.16 ppm. Το πρωτόνιο αυτό είναι που δημιουργεί και την δεύτερη σχάση (0.8Hz) στο σήμα του αλδεϋδικού πρωτονίου.

Το πρωτόνιο στα 4.16 ppm όπως θα δούμε και στο φάσμα H^1 παρακάτω εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή. Το πρωτόνιο αυτό από το φάσμα COSY μπορούμε να δούμε ότι συσχετίζεται με ένα πρωτόνιο στα 2.97 ppm και ένα στα 2.78 ppm.



Εικόνα 29: Φάσμα 1H NMR, Επικαλυπτόμενα σήματα H-5 – Φάσμα COSY συσχέτιση H-5 με τα δύο πρωτόνια της θέσης 6

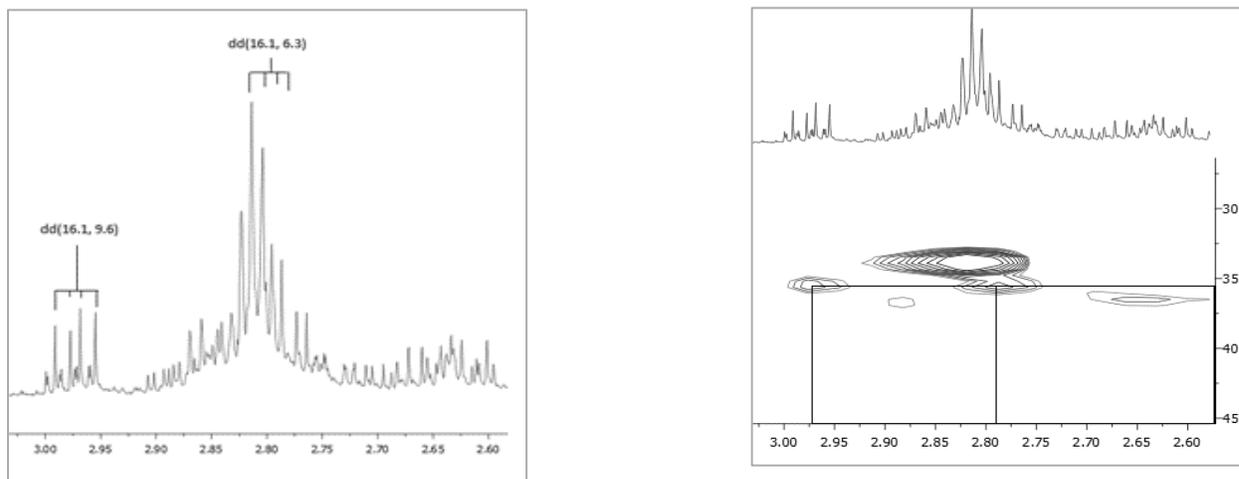
Το πρωτόνιο στα 4.16 ppm μπορούμε να δούμε από το φάσμα HMQC ότι ανήκει στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 29.95 ppm. Από το φάσμα HMBC βλέπουμε όλες τις συσχετίσεις του πρωτονίου αυτού. Έτσι στα 4.16 ppm με κάθετη γραμμή βλέπουμε ότι συσχετίζεται με τον άνθρακα στα 103.33 ppm, τον άνθρακα στα 35.61 ppm και τον άνθρακα στα 142.68 ppm.



Εικόνα 30: Φάσμα COSY. Συσχέτιση H-5 με τον αντίστοιχο άνθρακα της θέσης 5 – Φάσμα HMBC συσχετίσεις H-5 ενολικής μορφής με 3 άνθρακες.

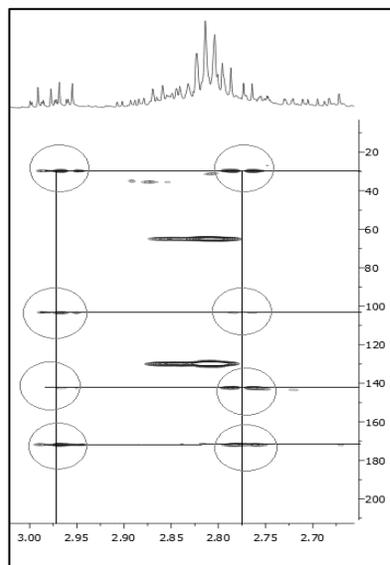
Τα δύο σήματα που εμφανίζονται στα 2.78 και 2.97 ppm είναι δύο πρωτόνια που εμφανίζονται ως dd κορυφές λόγω της συσχέτισής τους τόσο μεταξύ τους όσο και με το

πρωτόνιο στα 4.16 ppm, συσχέτιση που δείξαμε προηγουμένως. Από το φάσμα HMQC βλέπουμε ότι τα δύο αυτά πρωτόνια ανήκουν στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 35.61 ppm



Εικόνα 31: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα των δύο πρωτονίων της θέσης 6 – Φάσμα HMQC Τα δυο πρωτόνια της θέσης 6 βρίσκονται στον ίδιο άνθρακα στα 35.61 ppm.

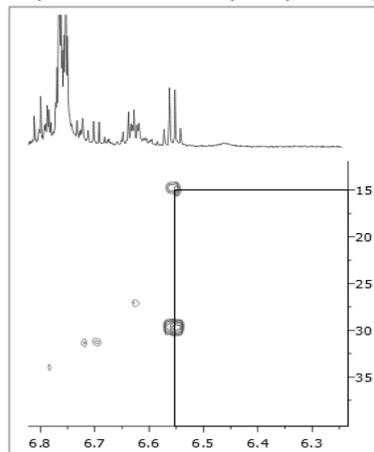
Θα χρησιμοποιήσουμε στην συνέχεια το φάσμα HMBC για να δούμε με ποιους άνθρακες συσχετίζεται τα πρωτόνια στα 2.97 και 2.78 ppm. Έτσι λοιπόν τα πρωτόνια αυτά συσχετίζονται αρχικά με τον άνθρακα στα 29.95 ppm άνθρακα που είδαμε προηγουμένως. Στην συνέχεια μπορούμε να δούμε ότι υπάρχει συσχέτιση των πρωτονίων αυτών με τον άνθρακα στα 103.33 ppm. Είναι εκείνος ο άνθρακας που δεν φέρει κάποιο πρωτόνιο και συσχετίζεται με το ενολικό πρωτόνιο που παρουσιάσαμε πιο πάνω. Βλέπουμε επίσης την συσχέτιση των πρωτονίων αυτών με τον άνθρακα στα 171.98 ppm. Πρόκειται για έναν άνθρακα που δεν φέρει ούτε αυτός κάποιο πρωτόνιο. Η χημική μετατόπιση του συγκεκριμένου άνθρακα είναι αρκετά μεγάλη και αυτό δηλώνει ότι φέρει επάνω του ένα οξυγόνο σε σύνδεση με διπλό δεσμό. Τέλος με ένα πιο ασθενές σήμα το οποίο εξηγείται και λόγω της μεγαλύτερης απόστασης θα εντοπίσουμε συσχέτιση των πρωτονίων στα 2.97 και 2.78 ppm με τον άνθρακα στα 142.68 ppm. Και αυτός ο άνθρακας δεν φέρει κάποιο πρωτόνιο. Η χημική μετατόπιση αυτού του άνθρακα οφείλεται στη σύνδεση του άνθρακα αυτού με διπλό δεσμό με κάποιον γειτονικό του.



Εικόνα 32: Φάσμα HMBC, συσχετίσεις H-6a και H-6b με συνολικά 4 άνθρακες.

Σε προηγούμενο στάδιο της ανάλυσης μας αναφερθήκαμε στα αλδεϋδικά πρωτόνια. Έτσι είδαμε το χαρακτηριστικό πρωτόνιο της ενολικής μορφής του άγλυκου του λιγκτροσίδη βρίσκεται στα 9.225 ppm, εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σχάση 1.7 ppm λόγω της συσχέτισης του με το πρωτόνιο της θέσης 4 και βρίσκεται πάνω στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 194.88 ppm.

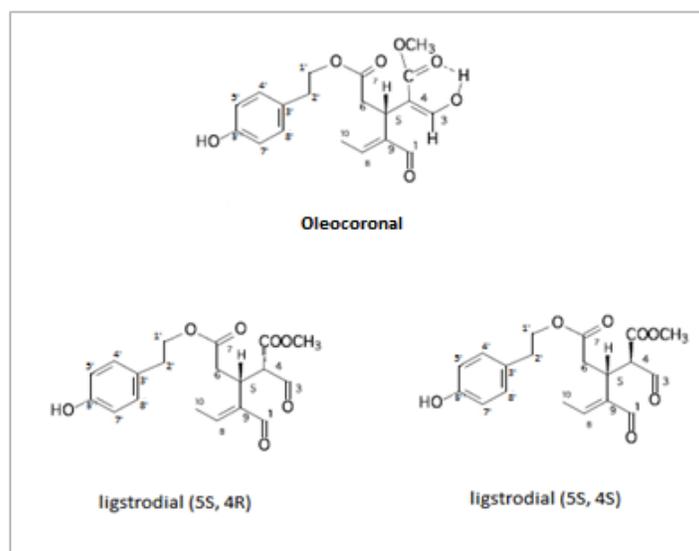
Είδαμε επίσης τα χαρακτηριστικά σήματα των μεθυλίων. Παρουσιάσαμε το μεθύλιο στα 2.062 ppm το οποίο ανήκει πάνω στον άνθρακα στα 15.62 ppm. Από το φάσμα HMBC μπορούμε να δούμε ότι ο άνθρακας στον οποίο ανήκουν τα μεθύλια και έχει χημική μετατόπιση 15.20 ppm εμφανίζει συσχέτιση με το ολεφινικό πρωτόνιο της ενολικής μορφής του άγλυκου του λιγκτροσίδη. Όπως παρουσιάσαμε και προηγουμένως το ολεφινικό πρωτόνιο βρίσκεται πάνω στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 153.53 ppm.



Εικόνα 33: Φάσμα HMBC, συσχέτιση ολεφινικού πρωτονίου με τον άνθρακα των μεθυλίων της θέσης 10.

Τέλος στην ενολική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη εμφανίζεται ένα χαρακτηριστικό σήμα μεθυλίου προσδεμένο πάνω σε ένα οξυγόνο. Πρόκειται για το μεθύλιο που παρουσιάσαμε και προηγουμένως στα 3.75 ppm που εμφανίζονται ως απλές κορυφές.

Με την παρουσίαση όλων των σημάτων ολοκληρώνεται η περιγραφή των 3 ισομερών ενώσεων της Ελαιοκορωνάλης, της 5S,4R λιγκτροδιάλης και 5S,4S λιγκτροδιάλης .



Εικόνα 34: Οι τρεις ισομερείς ενώσεις του άγλυκου του Λιγκτροσίδη

Συνοπτικά παρουσιάζουμε όλα τα σήματα στα οποία αναφερθήκαμε για όλες τις ισομερείς μορφές του άγλυκου του Λιγκστροσίδη που εξετάσαμε.

Πίνακας: Δεδομένα φάσματος $^1\text{H-NMR}$ για την Ελαιοκορωνάλη (14) και τις Λιγκστροδιάλες (12a,b) σε συγκέντρωση 3mg/0.6ml. Ως κορυφή αναφοράς για το CDCl_3 επιλέχθηκε η κορυφή στα 7.26 ppm

	12a (5S,4R)	12b (5S,4S)	14
1	9.212, d, 2.0	9.218, d, 2.0	9.225, d, 1.7
3	9.68, d, 2.7	9.46, d, 2.7	7.386, dd, 12.6, 0.8
4	4.06, dd, 10.5, 2.7	4.11, dd, 10.5, 2.7	-
5	3.83, m, (overlap)	3.83, m (overlap)	4.16, ddd (overlap)
6a	2.81, (overlap)	2.82 (overlap)	2.97, dd, 16.1, 9.6
6b	2.62, (overlap)	2.58 (overlap)	2.78, dd, 16.1, 6.3
8	6.70, q, 7.1	6.72, q, 7.1	6.56, q, 7.1
10	2.055, d, 7.0	2.062, d, 7.1	2.062, d, 7.0
3-OH	-	-	11.75, d, 12.6
OCH3	3.65, s	3.77, s	3.75, s
1'	4.20, m	4.18, m	4.18, m
2'	2.81, m	2.81, m	2.81, m
4', 8'	7.05, d (overlap)	7.05, d (overlap)	7.05, d, (overlap)
5', 7'	6.76, d (overlap)	6.76, d (overlap)	6.76, d (overlap)

Πίνακας: Δεδομένα φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ για την Ελαιοκορωνάλη (14) και τις Λιγκστροδιάλες (12a,b) σε συγκέντρωση 3mg/0.6ml. Ως κορυφή αναφοράς για το CDCl_3 επιλέχθηκε η κορυφή στα 177.16 ppm

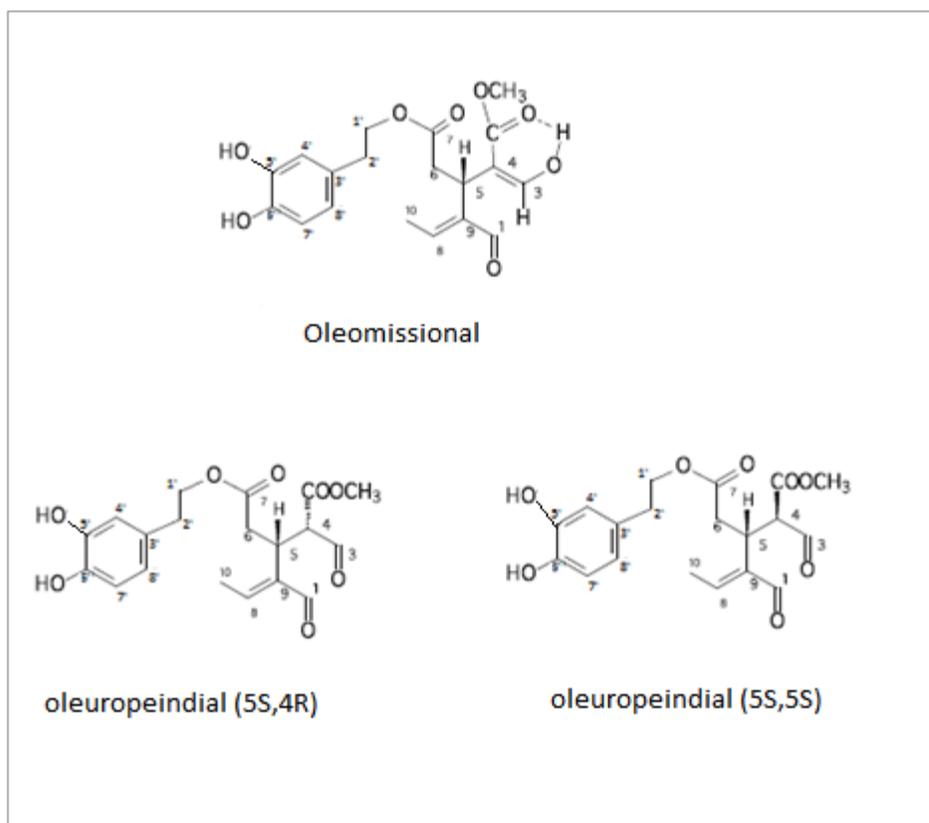
	12a (5S,4R)	12b (5S,4S)	14
1	194.75	194.56	194.88
3	195.72	195.08	164.23
4	60.27	59.30	103.33
5	34.42	31.42	29.95
6	34.52	34.98	35.61
7	172.07	171.33	171.98
8	156.11	155.74	153.53
9	142.40	141.87	142.68
10	15.20	15.20	15.20
11	168.18	168.55	172.18
OCH3	52.38	52.61	51.59
1'	65.24	65.24	65.24
2'	34.02	34.02	34.02
3'	129.88	129.88	129.95
4', 8'	130.03	130.03	130.05
5', 7'	115.29	115.29	115.29
6'	154.16	154.13	154.13

3.6.1 Περιγραφή των ισομερών του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης.

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως από την πλάκα χρωματογραφίας προέκυψαν δύο ζώνες A και B. Στην ζώνη A περιγράψαμε ότι υπάρχουν 3 ενώσεις οι οποίες αποτελούν 3 ισομερή του άγλυκου του λιγκστροσίδη. Δυο δυαλδεϊδικές μορφές και μια ενολική μορφή η οποία μάλιστα βρίσκεται σε διπλάσια αναλογία από τις άλλες δύο ενώσεις.

Κάτι αντίστοιχο περιμένουμε να δούμε και στα συστατικά της ζώνης B. Τα σήματα που υπάρχουν όμως στα φάσματα της ζώνης B είναι ακόμα πιο περίπλοκα από της ζώνης A.

Πράγματι ύστερα από ανάλυση της ζώνης B, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι αποτελεί ένα αντίστοιχο μίγμα 3 ισομερών ενώσεων αυτή την φορά όχι του άγλυκου του Λιγκστροσίδη αλλά του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης. Και αυτή την φορά ήταν δυνατό να διακρίνουμε ότι είχαμε δύο διαλδεϊκές μορφές και μια ενολική μορφή σε αναλογία 1:2:1. Το μίγμα αυτό είναι όπως και στην περίπτωση του μίγματος της ζώνης A είναι ένα μη διαχωρίσιμο μίγμα και η περιγραφή των ενώσεων πρέπει να γίνει μέσα από αυτό το ιδιαίτερα πολύπλοκο μίγμα.



Εικόνα 35: Οι τρεις ισομερείς ενώσεις του άγλυκου της Ελευρωπαΐνης,

Για να ξεπεράσουμε το πρόβλημα των επικαλύψεων από ξένες προσμίξεις, αλλά και της μικρής συγκέντρωσης των ενώσεων στο εκχύλισμα αποφασίσαμε να δημιουργήσουμε το μίγμα αυτό συνθετικά και να το περιγράψουμε και στη συνέχεια να εξακριβώσουμε ότι όντως πρόκειται για τις ίδιες ενώσεις.

3.6.2 Σύνθεση του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης.

Όπως αναφέραμε, το βιοσυνθετικό κομάτι της ελευρωπεΐνης ξεκινά από την βιοσυνθετική οδό του μεβαλονικού οξέος. Η ελευρωπεΐνη σχηματοποιείται ως γλυκοσίδη και παραμένει σε μικροδιαμερίσματα του καρπού της ελιάς διαχωρισμένος από ένζυμα. Η ελευρωπεΐνη εντοπίζεται σε αυτή την μορφή σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις και στα φύλλα της ελιάς.

Για την σύνθεση του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης σημαντικό ρόλο παίζουν τα ένζυμα και κυρίως αυτό της β-γλυκοσιδάσης. Την ενζυματική αυτή αντίδραση χρησιμοποιήσαμε και εμείς για την παρασκευή του μίγματος.

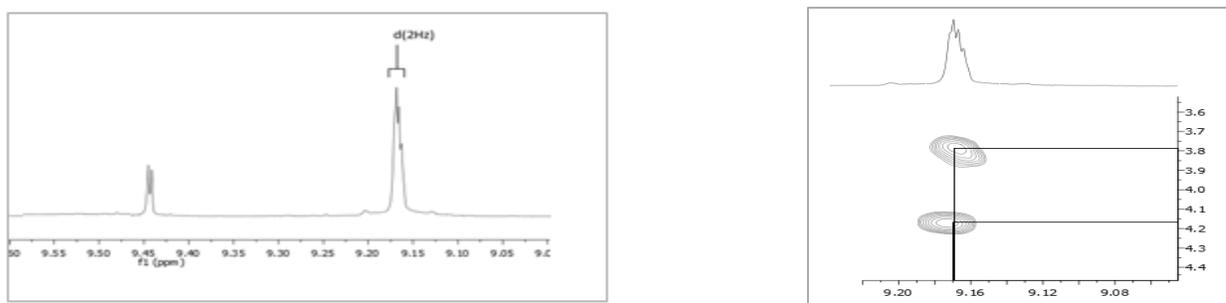
Η σύνθεση του μίγματος έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και χρησιμοποιήσαμε το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Σε μια κωνική φιάλη χωρητικότητας 25 ml τοποθετήσαμε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος (pH=5, 5ml) και διαλύσαμε 100 mg ελευρωπεΐνης. Στο διάλυμα προσθέσαμε 5 ml χλωροφορμίου και το διφασικό μίγμα αναδεύτηκε απαλά. Στο μίγμα προστέθηκε ποσότητα ενζύμου β-γλυκοσιδάση (3.4 Units/mg, 70 mg). Στην συνέχεια αφήσαμε το μίγμα να αναδεύεται απαλά για 20 h στους 30 °C ώστε να πραγματοποιηθεί η ενζυματική αντίδραση. Η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας όπου παρακολουθήσαμε τα επίπεδα της Ελευρωπεΐνης σε σύστημα 12% μεθανόλη (MeOH) σε διχλωρομεθάνιο. Μόλις η κηλίδα της ελευρωπεΐνης εξαφανιζόταν τελείως υπήρχε και πλήρης κατανάλωση της Ελευρωπεΐνης μέσα στο μίγμα της αντίδρασης. Μετά το πέρας της αντίδρασης διαχωρίστηκε πλήρως η οργανική φάση από την υδατική. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε τρεις φορές με 5 ml χλωροφορμίου. Τα τρία οργανικά εκχυλίσματα που παραλάβαμε από την παραπάνω διαδικασία εκπλύθηκαν με 20ml διάλυμα NaCl και ξηράθηκαν με θειικό νάτριο. Στην συνέχεια το μίγμα φιλτραρίστηκε και το διήθημα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό κενό με την βοήθεια συσκευής εξάτμισης rotary evaporator. Το τελικό προϊόν (66 mg, 94%) αναλύθηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR.

3.6.3 Προσδιορισμός δομής του συνθετικού μίγματος.

Περιγραφή διαλδεϋδικών μορφών

Στο φάσμα πρωτονίου μπορούμε να δούμε τα χαρακτηριστικά σήματα των πρωτονίων που ανήκουν σε αλδεϋδικές ομάδες. Στην “αλδεϋδική” περιοχή του φάσματος (9-10ppm) θα δούμε τρία επικαλυπτόμενα σήματα στα 9.17 ppm. Τα σήματα αυτά εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σχάση 2Hz. Από το φάσμα COSY μπορούμε να δούμε την συσχέτιση του συγκεκριμένου πρωτονίου με κάποια πρωτόνια στα 3.84 ppm, 3.80 ppm και 4.17 ppm. Η συσχέτιση αυτή είναι η συσχέτιση του κάθε αλδεϋδικού πρωτονίου με πρωτόνια της θέσης 5 των τριών ενώσεων.



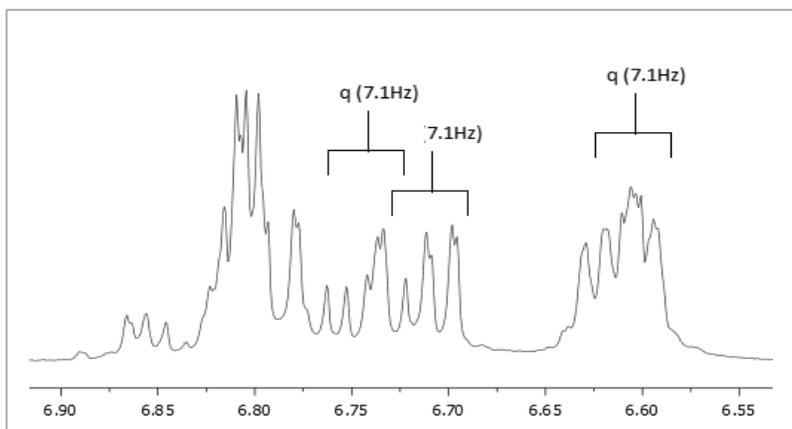
Εικόνα 36: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα αλδεϋδικών πρωτονίων – Φάσμα COSY συσχέτιση αλδεϋδικών πρωτονίων με τα πρωτόνια της θέσης 5 .

Από το φάσμα HMQC εντοπίζουμε τα αλδεϋδικά πρωτόνια στα 9.17 ppm βρίσκοντα πάνω σε άνθρακες με χημική μετατόπιση 195.53 ppm 195.65 ppm και 196.04 ppm. Από το φάσμα HMBC φαίνονται οι συσχετίσεις του αλδεϋδικού πρωτονίου με 3 άνθρακες. Πρόκειται για τους άνθρακες των θέσεων 9, 5 και 8. Οι άνθρακες αυτοί βρίσκονται στα 141.14ppm 140.52ppm και 142.40 ppm για την θέση 9 και ο οποίος δεν φέρει καποιο πρωτόνιο, στα 156.78 ppm, 157.29 ppm και 155.05 ppm για την θέση 8 και στα 31.58 ppm, 31.97 ppm, και 30.14 ppm.



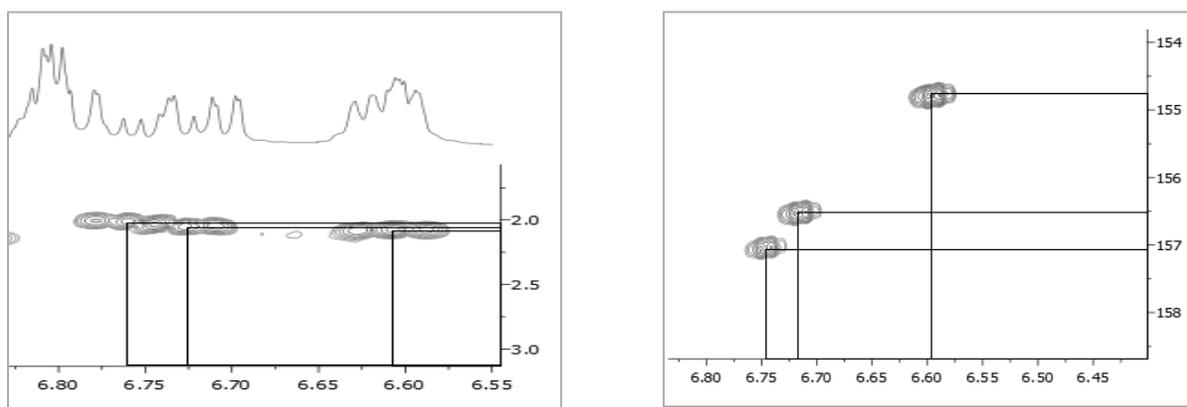
Εικόνα 37: Φάσμα HMQC, συσχέτιση αλδεϋδικών πρωτονίων με τους αντίστοιχους άνθρακες – Φάσμα HMBC συσχέτιση των αλδεϋδικών πρωτονίων με τρεις άνθρακες.

Στο φάσμα πρωτονίου θα εντοπίσουμε στα 6.59 ppm, 6.70 ppm και 6.73 ppm. Τα πρωτόνια αυτά είναι αρκετά αποθωρακισμένα και όπως θα δούμε στο φάσμα πρωτονίου εμφανίζονται ως τετραπλές κορυφές λόγω της συσχέτισης του με ένα μεθύλιο. Τα πρωτόνια αυτά βρίσκονται πάνω σε διπλό δεσμό και για αυτό και εμφανίζονται τόσο αποθωρακισμένα.



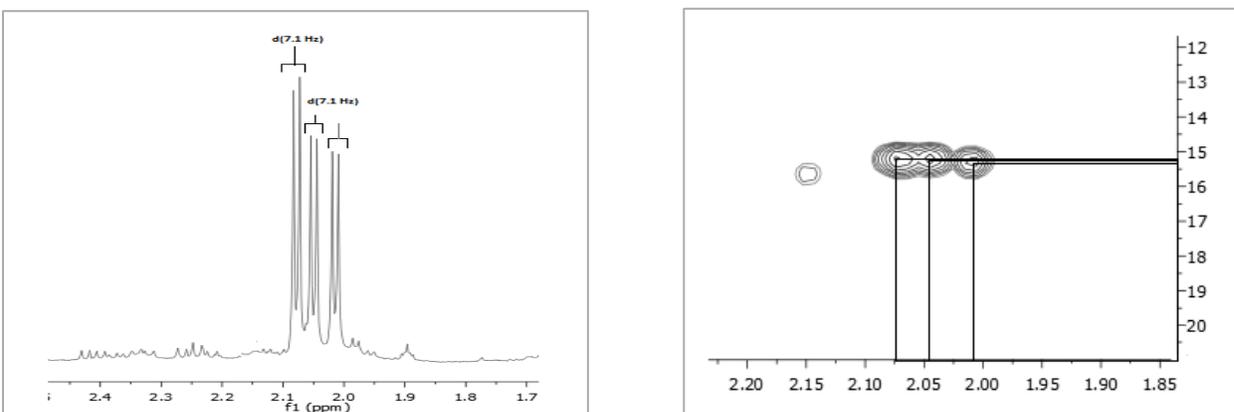
Εικόνα 38: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα πρωτονίων θέσης 8.

Από το φάσμα COSY θα δούμε ότι τα πρωτόνια αυτά εμφανίζουν συσχέτιση, με πρωτόνια στις θέσεις 2.02 ppm, 1.99 ppm και 2.05 ppm. Συγκεκριμένα βλέπουμε συσχέτιση του ολεφινικού πρωτονίου στα 6.59 ppm με το πρωτόνιο στα 2.05 ppm, του πρωτονίου στα 6.73 ppm με το πρωτόνιο στα 1.99 ppm και του ολεφινικού πρωτονίου στα 6.70 ppm με το πρωτόνιο στα 2.02 ppm. Από το φάσμα HMQC βρίσκουμε ότι το πρωτόνιο που βρίσκεται στα 6.70 ppm βρίσκεται στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 156.78 ppm, το πρωτόνιο στα 6.73 ppm βρίσκεται στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 157.29 ppm και το πρωτόνιο στα 6.59 ppm βρίσκεται στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 155.05 ppm.



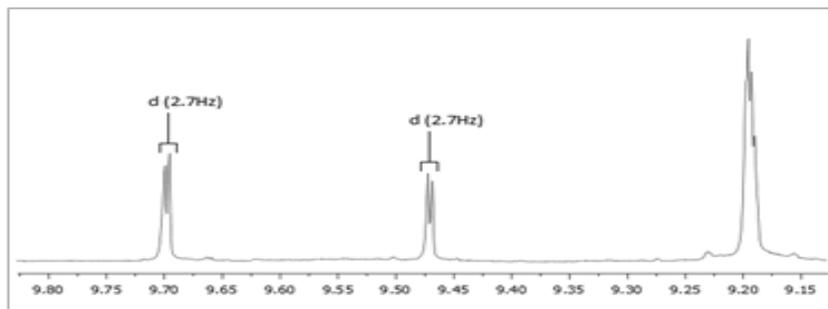
Εικόνα 39: Φάσμα COSY, συσχέτιση πρωτονίων θέσης 8 με ολεφινικά μεθύλια – Φάσμα HMQC συσχέτιση πρωτονίων θέσης 8 με αντίστοιχους άνθρακες.

Τα πρωτόνια στα 2.02 ppm, 1.99 ppm και 2.05 ppm μπορούμε να δούμε από το φάσμα πρωτονίου ότι εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σχάση 7.1 Hz. Επίσης θα δούμε ότι ολοκληρώνουν για τρία σε σχέση με το ολεφινικό πρωτόνιο της θέσης 8. Αυτό το στοιχείο σε συνδυασμό με την χημική μετατόπιση η οποία είναι στην περιοχή των 2 ppm μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα σήματα αυτά αναφέρονται σε μεθύλια. Η αποθωράκιση που έχουν αυτά τα μεθύλια εξηγείται από τον διπλό δεσμό που υπάρχει μεταξύ της θέσης 8 και 10. Το γεγονός ότι πρόκειται για μεθύλια εξηγεί και το γιατί το σήμα του ολεφινικού πρωτονίου εμφανίζεται και ως τετραπλή κορυφή. Από το φάσμα HMQC μπορούμε να εντοπίσουμε τα τρία αυτά μεθύλια πάνω στους άνθρακες της κάθε μιας από τις τρεις ενώσεις με χημική μετατόπιση 15.40 ppm, 15.49 ppm και 15.41 ppm. Η θέση του μεθυλίου στην θέση 10 μπορεί να επαληθευθεί και από το φάσμα HMBC όπου εμφανίζονται οι συσχετίσεις τόσο με τον ολεφινικό άνθρακα όσο και με τον άνθρακα της θέσης 9 αλλά και τον αλδεϋδικό της θέσης 1.



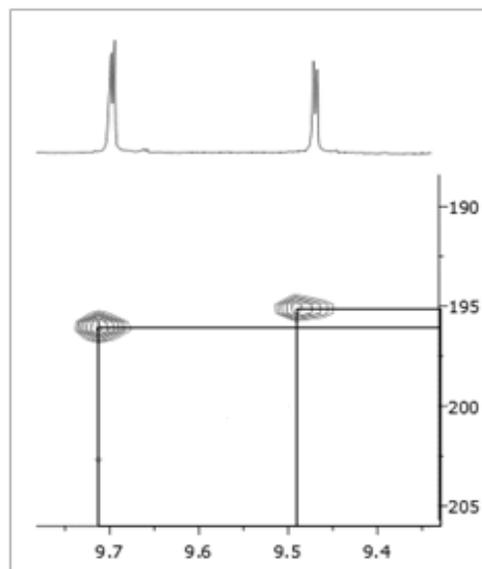
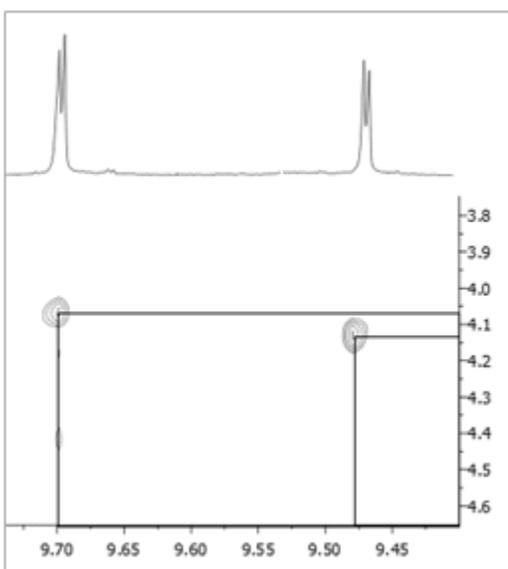
Εικόνα 40: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα πρωτονίων μεθυλίων δίπλα σε διπλό δεσμό – Φάσμα HMQC συσχέτιση πρωτονίων μεθυλίου με τους αντίστοιχους άνθρακες.

Θα δούμε τώρα τα χαρακτηριστικά αλδεϋδικά πρωτόνια τα οποία βρίσκονται μόνο στις διαλδεϋδικές μορφές. Τα πρωτόνια αυτά τα εντοπίζουμε στην αλδεϋδική περιοχή του φάσματος πρωτονίου στα 9.67 ppm και στα 9.44 ppm και εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σκάση 2.7 Hz.



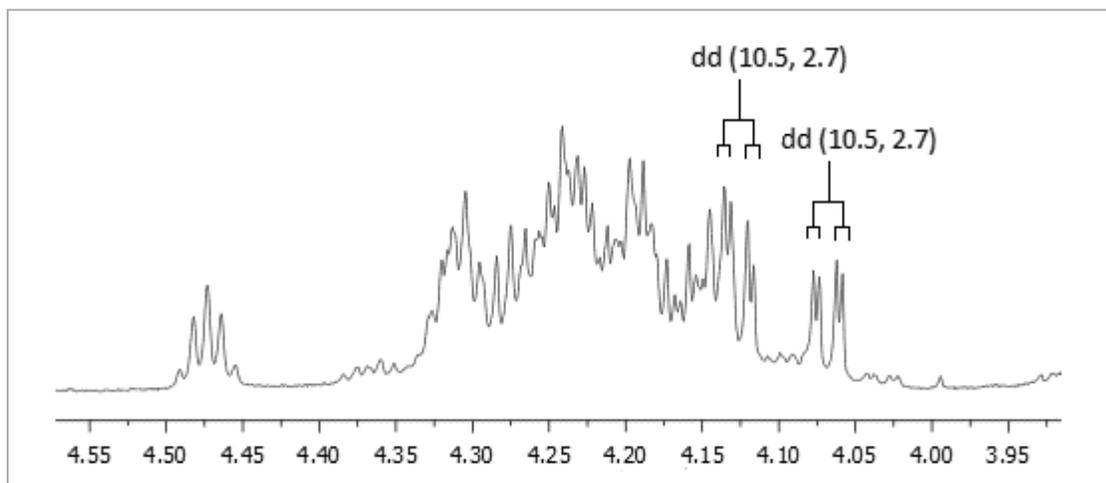
Εικόνα 41: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα αλδεϋδικών πρωτονίων διαλδεϋδικών μορφών.

Από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι αυτά τα δύο αλδεϋδικά πρωτόνια εμφανίζουν συσχέτιση με τους άνθρακες με χημική μετατόπιση 196.24 ppm και 195.41 ppm. Από το φάσμα COSY μπορούμε να δούμε τις συσχετίσεις των δύο αυτών πρωτονίων



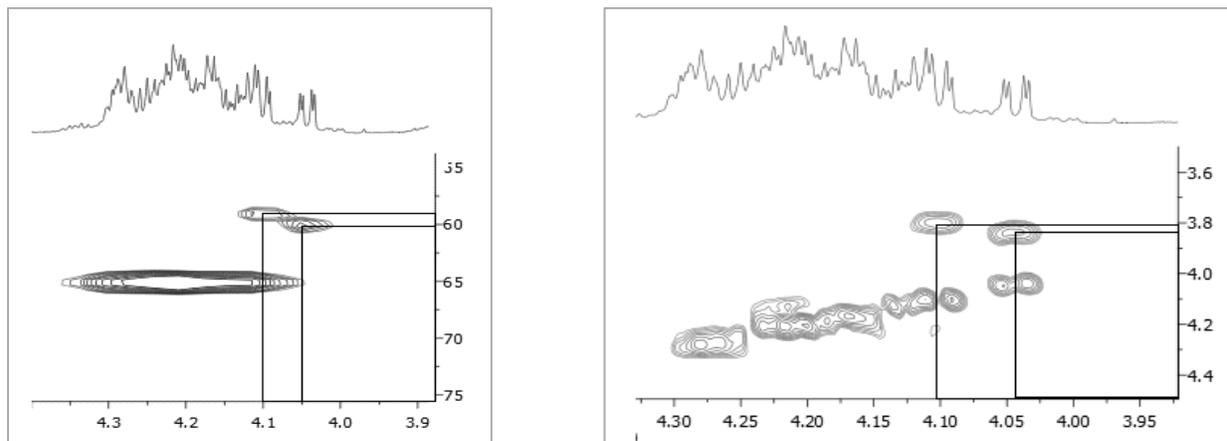
Εικόνα 42: Φάσμα HMQC, συσχέτιση αλδεϋδικών πρωτονίων με αντίστοιχους άνθρακες - Φάσμα COSY συσχέτιση αλδεϋδικών πρωτονίων με τα πρωτόνια της θέσης 5 .

Το πρωτόνιο της θέσης 4 για την κάθε ένωση όπως θα δούμε και από το φάσμα πρωτονίου εμφανίζεται στα 4.04 ppm και στα 4.10 ppm εμφανίζονται ως dd κορυφές με σχάση 10.5 Hz και 2.7 Hz.



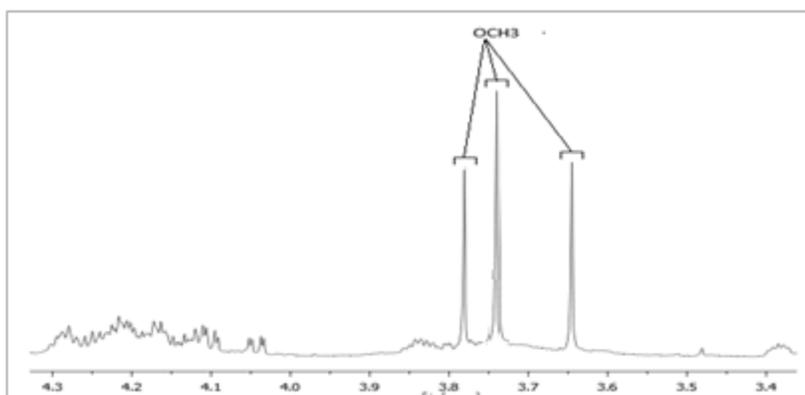
Εικόνα 43: Φάσμα ^1H NMR, σήματα πρωτονίων H-4.

Το πρωτόνιο της θέσης 4 με χημική μετατόπιση 4.04 ppm χρησιμοποιώντας το φάσμα HMQC θα βρούμε ότι ανήκει στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 60.45 ppm ενώ το ίδιο πρωτόνιο της έτερης διαλδευδικής ένωσης στα 4.10 ppm ανήκει στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 59.50 ppm. Ο άνθρακας αυτός μέχρις στιγμής έχουμε δει ότι συνδέεται με τον άνθρακα που φέρει το αλδεϊδικό πρωτόνιο και με ένα πρωτόνιο. Από το φάσμα COSY θα δούμε ότι το πρωτόνιο αυτό συσχετίζεται εκτός από το αλδεϊδικό και με άλλο ένα πρωτόνιο σε κάθε ένωση. Συγκεκριμένα βλέπουμε το πρωτόνιο στα 4.04 ppm να συσχετίζεται με πρωτόνιο που εμφανίζεται στα 3.84 ppm και το πρωτόνιο στα 4.10 ppm να συσχετίζεται με πρωτόνιο που εμφανίζεται στα 3.80 ppm.



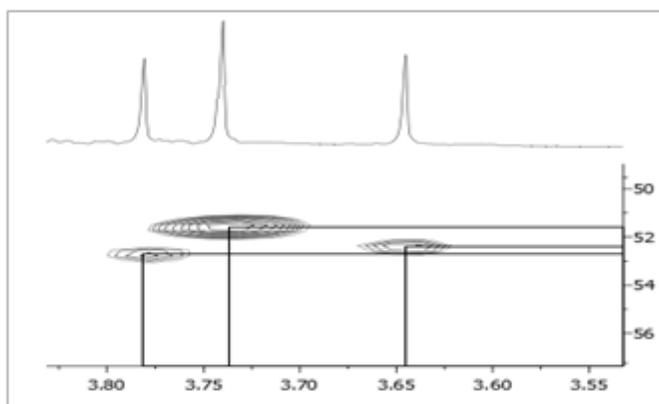
Εικόνα 44: Φάσμα HMQC, συσχέτιση πρωτονίων θέσης 4 με αντίστοιχους άνθρακες – Φάσμα COSY συσχέτιση πρωτονίων θέσης 4 με τα πρωτόνια της θέσης 5.

Η τέταρτη σύνδεση του άνθρακα της θέσης 4 γίνεται με μια καρβομεθοξυλιακή ομάδα. Τα χαρακτηριστικά σήματα των μεθυλίων που είναι προσδεμένα πάνω σε οξυγόνο θα τα βρούμε και για τις τρεις ισομερείς ενώσεις στο φάσμα πρωτονίου ως απλές κορυφές στα 3.65 ppm, 3.78 ppm και 3.74 ppm.



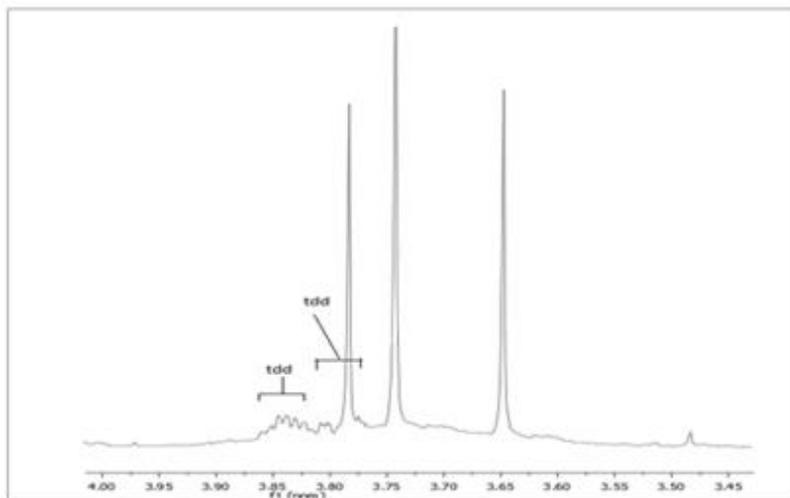
Εικόνα 45: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα καρβομεθοξυλιακών ομάδων.

Τα πρωτόνια αυτά ολοκληρώνουν για 3 σε σχέση με τα αλδεϋδικά πρωτόνια και από το φάσμα HMQC μπορούμε να τα βρούμε πάνω στους άνθρακες με χημική μετατόπιση 52.69 ppm για το πρωτόνιο στα 3,65 ppm, 53.02 ppm για το πρωτόνιο στα 3.78 ppm και 51.86 ppm για το πρωτόνιο στα 3.74 ppm.



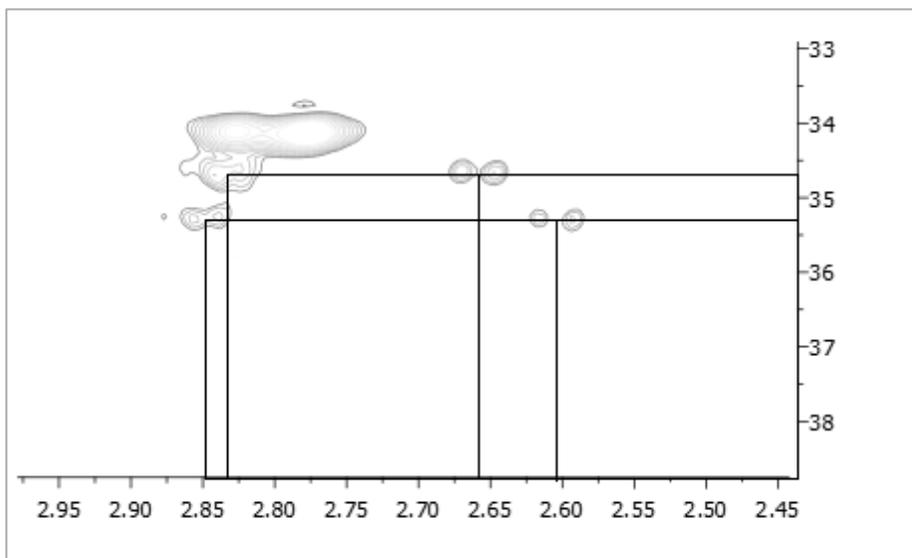
Εικόνα 46: Φάσμα HMQC συσχέτιση πρωτονίων OCH_3 με αντίστοιχους άνθρακες..

Επιστρέφοντας στο πρωτόνιο της θέσης 4, είδαμε ότι εμφανίζει συσχέτιση με το πρωτόνιο της θέσης 5. Τα πρωτόνια αυτά και για τις δύο ισομερείς διαλδεϋδικές ενώσεις εμφανίζονται στο φάσμα πρωτονίου ως πολλαπλές κορυφές.



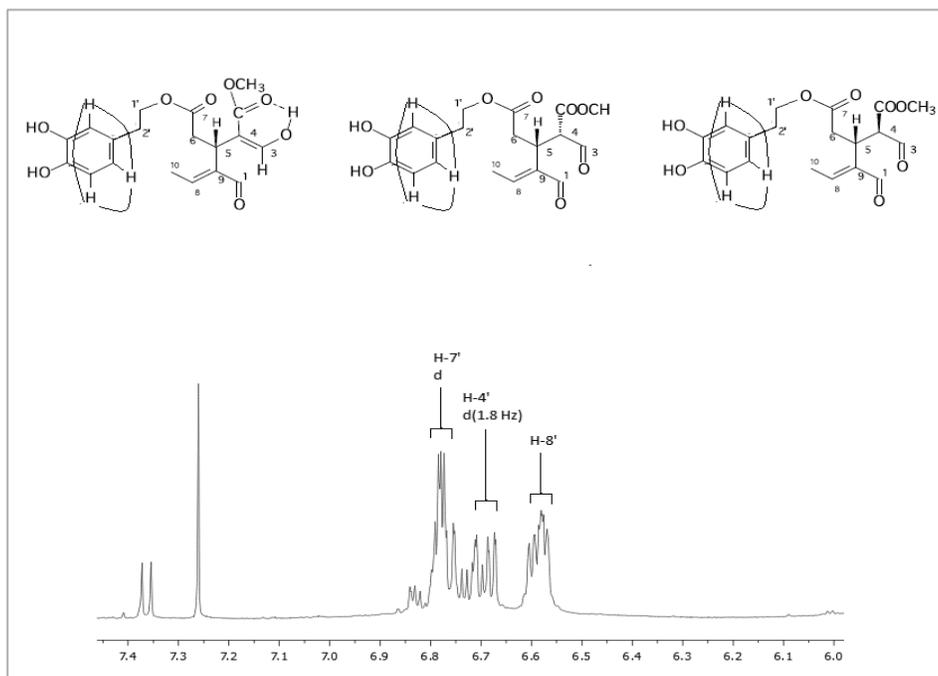
Εικόνα 47: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα πρωτονίων της θέσης 5.

Τα πρωτόνια αυτά βλέπουμε ότι εμφανίζουν πολλαπλές κορυφές. Αυτό οφείλεται στην συσχέτιση τους τόσο με το πρωτόνιο της θέσης 4 που είδαμε προηγουμένως, αλλά και στην συσχέτιση τους με τα 2 πρωτόνια της θέσης 6. Τα δύο πρωτόνια της θέσης 6 μπορούμε να δούμε από το φάσμα HMQC ότι ανήκουν στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 34.80 ppm και στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 35.44 ppm.



Εικόνα 48: Φάσμα HMQC, συσχετίσεις των πρωτονίων των θέσεων 6a και 6b με τους αντίστοιχους άνθρακες.

Σε αυτό το μίγμα ενώσεων δεν εντοπίζουμε το κομμάτι της τυροσόλης όπως στην προηγούμενη περίπτωση αλλά αυτό της υδρόξυ-τυροσόλης. Έτσι αναμένουμε να δούμε πρωτόνια στην αρωματική περιοχή του φάσματος σε διαφορετικούς συνδυασμούς. Συγκεκριμένα στον δακτύλιο της υδρόξυ-τυροσόλης έχουμε για το πρωτόνιο της θέσης 4' μια μέτα- σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 8'. Το πρωτόνιο της θέσης 7' έχει μια όρθο- σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 8'. Τέλος το πρωτόνιο της θέσης 8' αναμένεται να έχει μια όρθο-σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 7' και μια μέτα- σύζευξη με το πρωτόνιο της θέσης 4'. Πράγματι στην αρωματική περιοχή του φάσματος θα βρούμε τέτοια σήματα αλλά για την ακριβή απόδοση του κάθε σήματος στον σωστό δακτύλιο θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε φάσματα ΗΜQC και να βρούμε τους άνθρακες στους οποίους ανήκουν τα πρωτόνια.



Εικόνα 49: Φάσμα ¹H NMR, Χαρακτηριστικά σήματα υδρόξυ τυροσόλης στην αρωματική περιοχή.

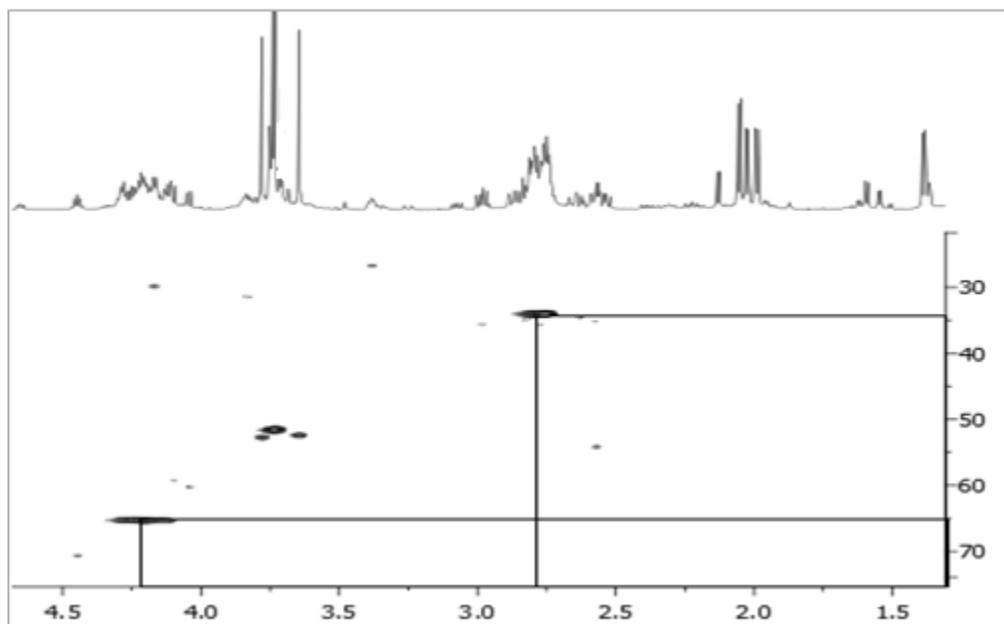
Λόγω των πολλών, σχεδόν χημικά όμοιων αρωματικών δακτυλίων της υδρόξυ-τυροσόλης δεν είναι δυνατόν να προσδιορίσουμε ακριβώς όλες τις σχέσεις μεταξύ των συσχετίσεων αυτών καθότι υπάρχουν πολλές επικαλύψεις.

Επίσης μπορούμε να δούμε τα χαρακτηριστικά πρωτόνια 1' και 2' τα οποία εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές λόγω της μεταξύ τους συσχέτισης και της μη χημικής ισοδυναμίας των πρωτονίων που βρίσκονται πάνω στον ίδιο άνθρακα. Σε κάθε έναν από τους δύο άνθρακες 1' και 2' αντιστοιχούν 2 πρωτόνια και οι δύο άνθρακες συνδέονται μεταξύ τους με απλό δεσμό. Τα πρωτόνια αυτά εντοπίζονται στις θέσεις 2.75 ppm και 4.41 ppm του φάσματος. Τα πρωτόνια της θέσης 1' είναι εμφανώς πιο αποθωρακισμένα καθότι ο άνθρακας στον οποίο είναι προσδεμένα συνδέεται, εκτός από τον άνθρακα C-2' και με ένα οξυγόνο. Για αυτό το

λόγο θα δούμε το σήμα των πρωτονίων της θέσης 1' να βρίσκεται στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος.

Στην περίπτωση των πρωτονίων της θέσης 1' και 2' δεν είναι δυνατόν και πάλι να προσδιορίσουμε τον τύπο της σχάσης που πραγματοποιείται λόγω των πολλαπλών επικαλύψεων από τους 3 δακτυλίους.

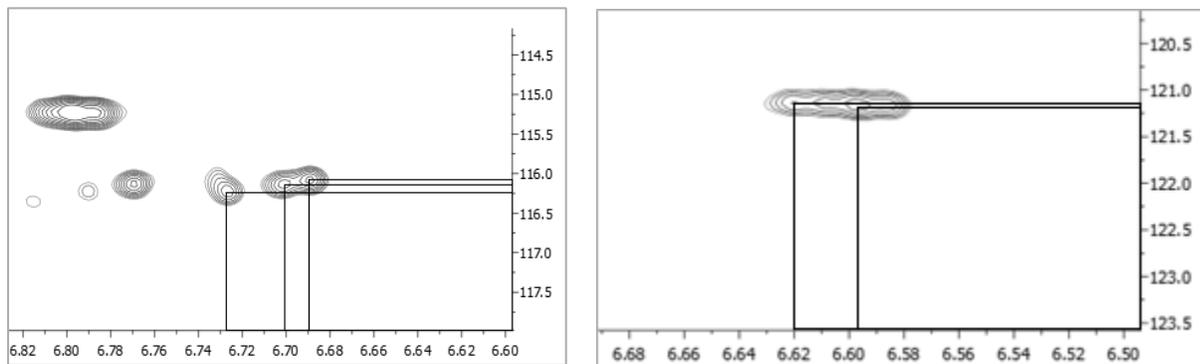
Από το φάσμα HMQC μπορούμε να προσδιορίσουμε τους άνθρακες στους οποίους ανήκουν αυτά τα τέσσερα πρωτόνια. Έτσι μπορούμε να δούμε την συσχέτιση που έχουν τα πρωτόνια της θέσης 1' (4.21 ppm) με τον άνθρακα στα 65.52 ppm και τα πρωτόνια της θέσης 2' (2.75 ppm) με τον άνθρακα στα 34.28 ppm. Στο φάσμα COSY μπορούμε να δούμε και τις συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων της θέσης 1' και 2'.



Εικόνα 51: Φάσμα HMQC, συσχέτιση πρωτονίων 1' και 2' με τους αντίστοιχους άνθρακες.

Από το φάσμα HMQC επίσης θα προσδιορίσουμε και την χημική μετατόπιση των ανθράκων που φέρουν πρωτόνιο και βρίσκονται στον αρωματικό δακτύλιο. Ξεκινώντας από το πρωτόνιο της θέσης 4' από το φάσμα πρωτονίου μπορούμε να βρούμε τρεις κορυφές με σχάση κοντά στα 2Hz. Αυτές οι κορυφές εμφανίζονται στα 6.68ppm, 6.67 ppm και στα 6.71 ppm. Από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι για αυτές τις χημικές μετατοπίσεις αντιστοιχούν τρεις άνθρακες με χημική μετατόπιση 116.29 ppm, 116.24 ppm και 116.38 ppm.

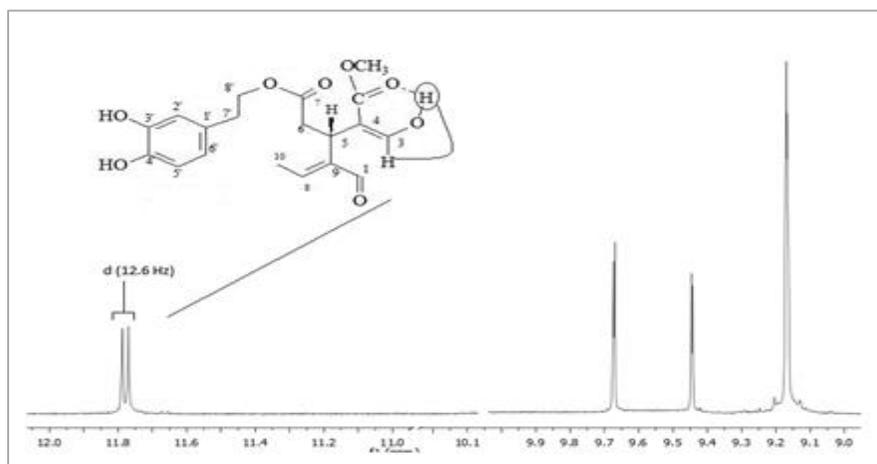
Αντίστοιχα για τα πρωτόνια της θέσης 8' από το φάσμα πρωτονίου μπορούμε να πούμε ότι εμφανίζονται δύο επικαλυπτόμενες στην θέση 6.58 ppm και μια υπο την μορφή dd στα 6.60. στο φάσμα HMQC θα δούμε ότι υπάρχει ένα έντονο σήμα στα 121.27 ppm στο οποίο πρέπει να αλληλεπικαλύπτονται δύο σήματα και άλλο ένα στα 121.33 ppm.



Εικόνα 52: Φάσμα HMQC, συσχέτιση αρωματικών πρωτονίων θέσης 4' για τους τρεις διαφορετικούς δακτυλίους με τους αντίστοιχους άνθρακες – Ομοίως για τα πρωτόνια της θέσης 8'.

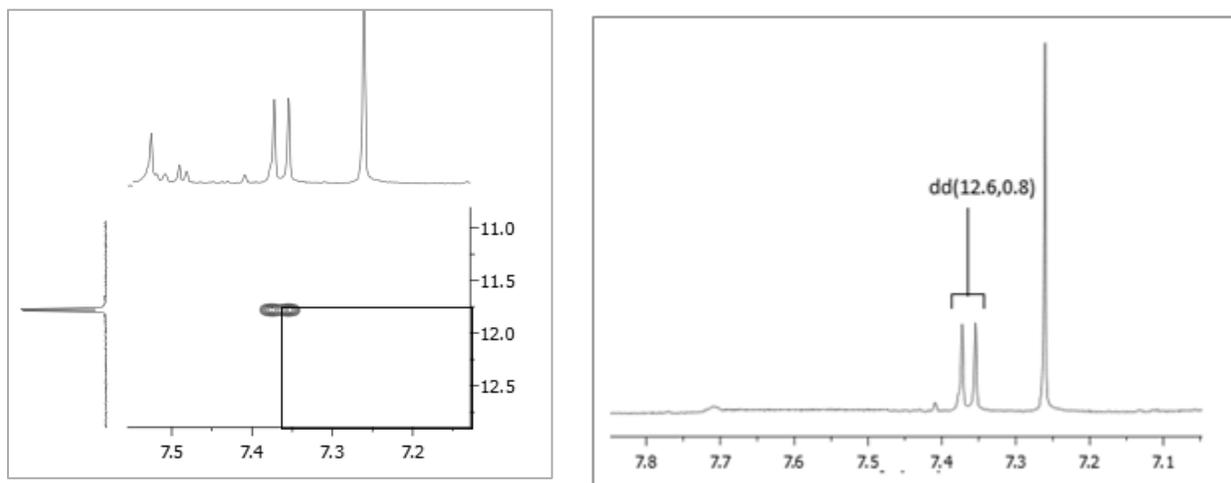
Με αυτά τα σήματα ολοκληρώνεται η περιγραφή όλων των πρωτονίων και των ανθράκων των δυο διαλδεΐδικών μορφών. Παρακάτω θα παρουσιάσουμε και τα τελευταία σήματα της ενολικής μορφής.

Στο μόριο της ενολικής μορφής του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης (ολεομιοσιονάλη) θα δούμε το χαρακτηριστικό σήμα ενός πρωτονίου το οποίο εμφανίζεται στα 11.78 ppm. Το σήμα αυτό είναι μια διπλή κορυφή με σχάση 12.6 Hz. Στην περιοχή αυτή του φάσματος 10-12ppm συναντάμε ενολικά πρωτόνια.



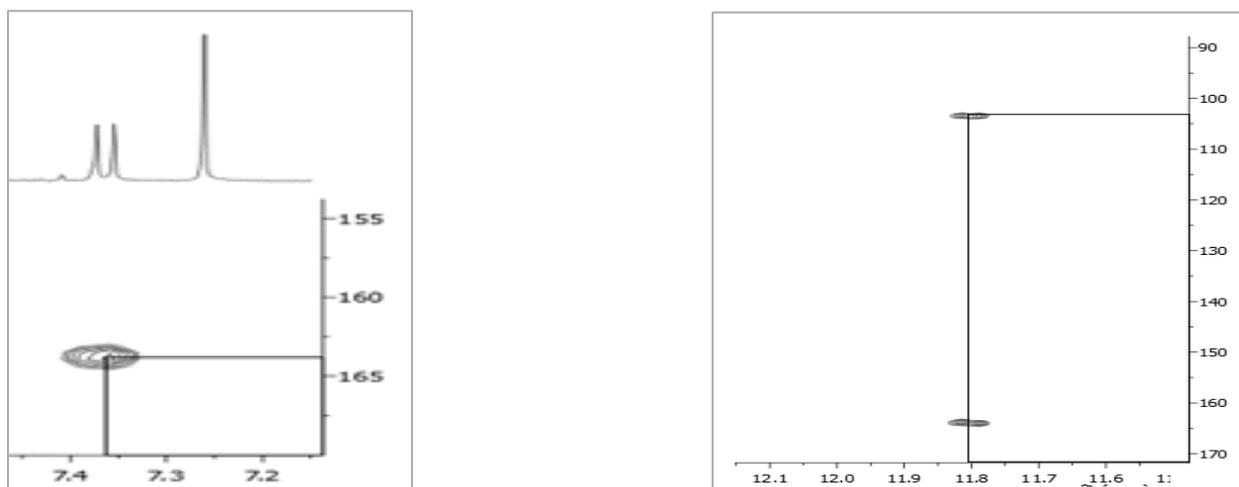
Εικόνα 53: Φάσμα ^1H NMR, σήμα ενολικού υδροξυλίου ενολικής μορφής.

Το πρωτόνιο αυτό θα δούμε από το φάσμα COSY ότι συσχετίζεται με ένα πρωτόνιο που εμφανίζεται στα 7.36 ppm. Έτσι εξηγείται η διπλή κορυφή του σήματος στα 11.78 ppm. Το πρωτόνιο στα 7.36 ppm θα δούμε ότι εμφανίζεται στο φάσμα πρωτονίου ως dd κορυφή.



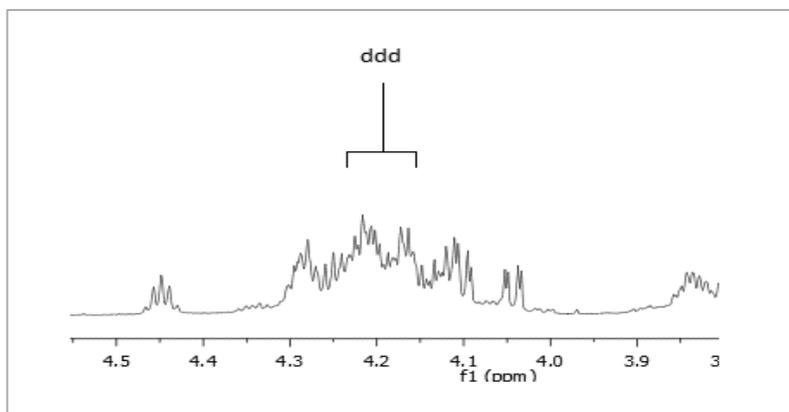
Εικόνα 54: Φάσμα COSY, συσχέτιση πρωτονίου θέσης 3 με το ενολικό υδροξύλιο - Φάσμα ^1H NMR, σήμα πρωτονίου θέσης 3 ενολικής μορφής.

Από το φάσμα HMQC μπορούμε να δούμε ότι το πρωτόνιο στα 7.36 ppm βρίσκεται πάνω στον άνθρακα με χημική μετατόπιση 164.07 ppm. Από το φάσμα HMBC μπορούμε να δούμε ότι το ενολικό πρωτόνιο στα 11.78 ppm συσχετίζεται τόσο με τον άνθρακα στα 164.07 ppm στον οποίο και ανήκει όσο και με τον άνθρακα στα 103.69 ppm.



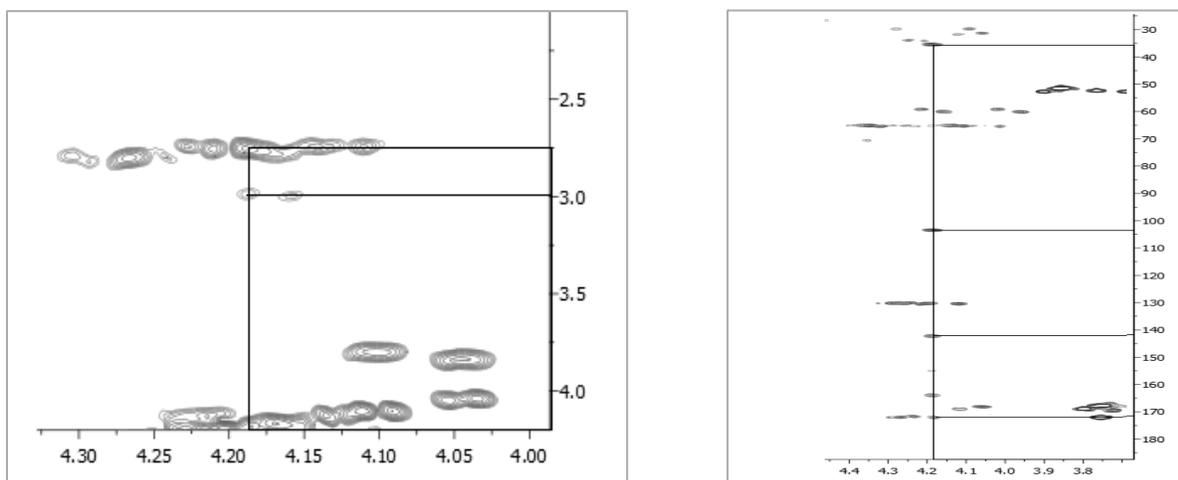
Εικόνα 55: Φάσμα HMQC, συσχέτιση ενολικού υδροξυλίου με άνθρακα θέσης 3 - Φάσμα HMBC συσχέτιση ενολικού υδροξυλίου με δύο άνθρακες.

Αντίστοιχα με τις άλλες δύο ισομερείς μορφές του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης και εδώ εντοπίζουμε το πρωτόνιο της θέσης 5. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή επικαλυπτόμενη στα 4.17 ppm.



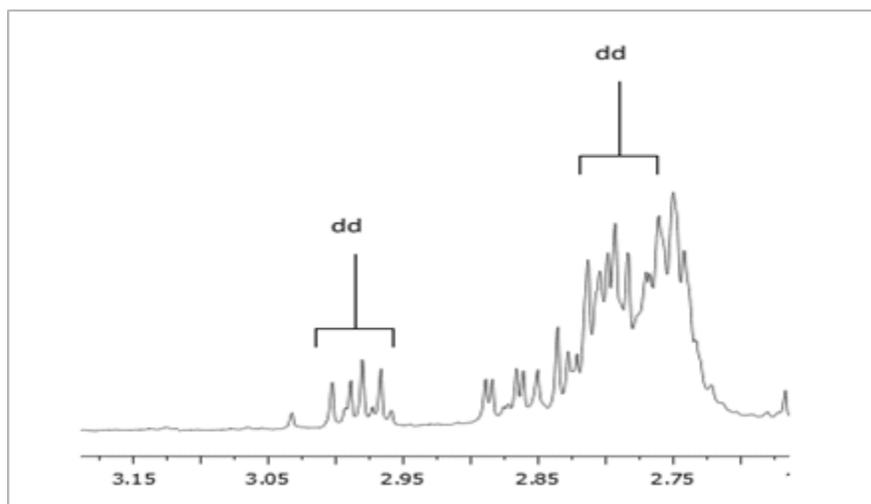
Εικόνα 56: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα αλδεϋδικών πρωτονίων – Φάσμα COSY συσχέτιση αλδεϋδικών πρωτονίων με τα πρωτόνια της θέσης 5.

Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζει πολλαπλές σχάσεις λόγω των συσχετίσεων του με τα δύο πρωτόνια της θέσης 6. Τις συσχετίσεις αυτές θα τις δούμε παρακάτω στο φάσμα COSY. Από το φάσμα HMBC θα δούμε τις συσχετίσεις του πρωτονίου στα 4.17 ppm με όλους τους γειτονικούς του άνθρακες των θέσεων 4 (103.69 ppm), 6 (35.92 ppm), 9 (142.40 ppm) αλλά και πιο απομακρυσμένους όπως αυτός της θέσης 7 (172.18 ppm).



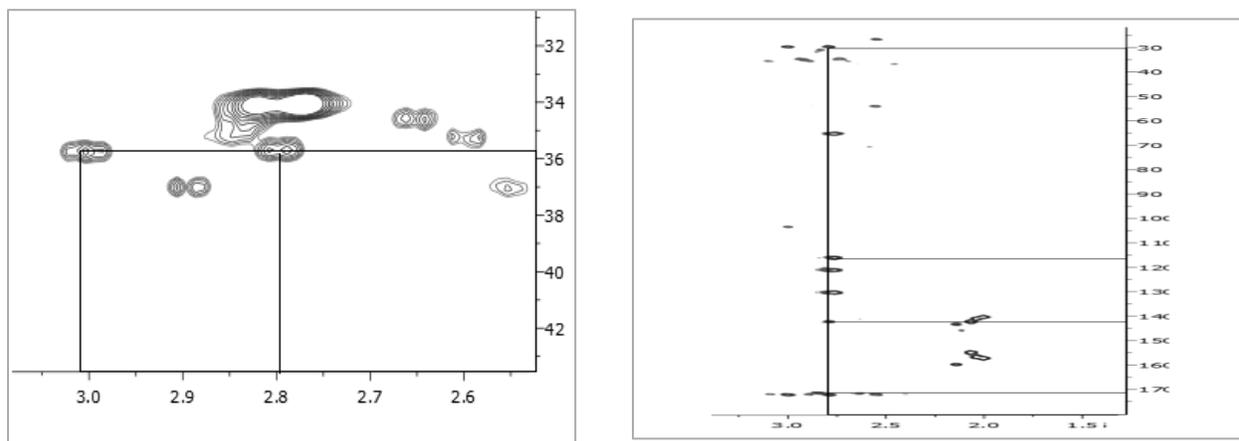
Εικόνα 57: Φάσμα COSY συσχέτιση του πρωτονίου της θέσης 5 με τα δύο πρωτόνια της θέσης 6 – Φάσμα HMBC, συσχετίσεις πρωτονίου θέσης 5 με 4 άνθρακες.

Τέλος αναφερθήκαμε προηγουμένως στα συσχετίση του πρωτονίου στα 4.17 ppm με δύο πρωτόνια της θέσης 6. Τις συσχετίσεις αυτές τις είδαμε στο φάσμα COSY. Στο φάσμα πρωτονίου θα δούμε ότι τα πρωτόνια αυτά εμφανίζονται ως dd κορυφές.



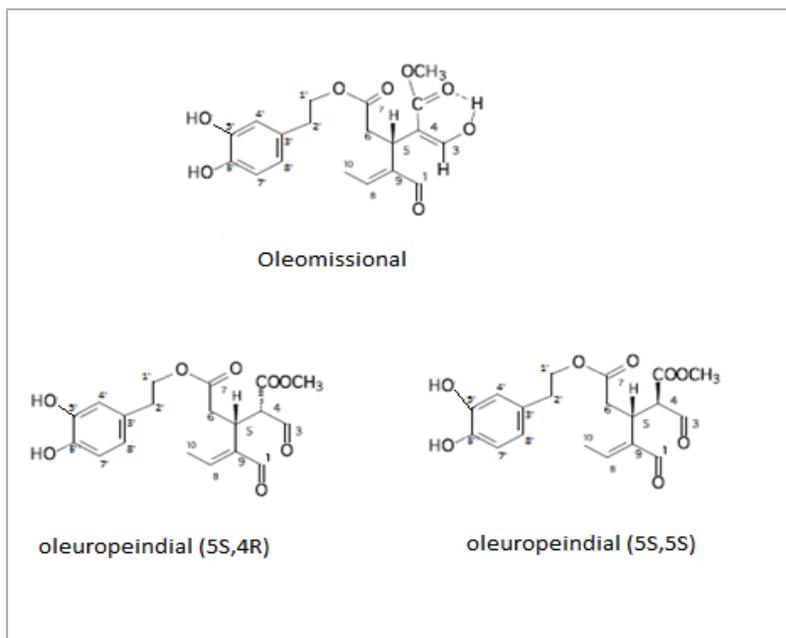
Εικόνα 58: Φάσμα ^1H NMR, Σήματα πρωτονίων θέσης 6.

Από το φάσμα HSQC – DEPT μπορούμε να δούμε ότι τα δύο αυτά πρωτόνια της θέσης 6 ανήκουν πάνω στον άνθρακα που εντοπίσαμε και προηγουμένως ως γειτονικό της θέσης 5 στα 35.92 ppm. Και από την θέση 6 μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το φάσμα HMBC για να εντοπίσουμε ότι τα πρωτόνια της θέσης 6 συσχετίζονται με τους γειτονικούς άνθρακες των θέσεων 9 (142.40ppm), 5 (30.14 ppm) αλλά και των πιο απομακρυσμένων 7 (172.18ppm) και 4 (103.69 ppm)



Εικόνα 59: Φάσμα HSQC DEPT, συσχετίση πρωτονίων της θέσης 6 με αντίστοιχο άνθρακα- Φάσμα HMBC πρωτονίου H-6α με 4 άνθρακες .

Με την περιγραφή όλων των παραπάνω σημάτων ολοκληρώνεται η απόδοση της δομής των τριών ισομερών του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης. Παρακάτω θα παρουσιάσουμε συνοπτικά όλα τα στοιχεία για τις τρεις αυτές ενώσεις.



Εικόνα 60: Ισομερείς ενώσεις άγλυκου Ελευρωπαΐνης.

Πίνακας: Δεδομένα φάσματος $^1\text{H-NMR}$ για την Ελαιομισσιονάλη (13) και τις Ελαιωρωπεινδιάλες (11a,b) σε συγκέντρωση 20mg/0.6ml. Ως κορυφή αναφοράς για το CDCl_3 επιλέχθηκε η κορυφή στα 7.26 ppm

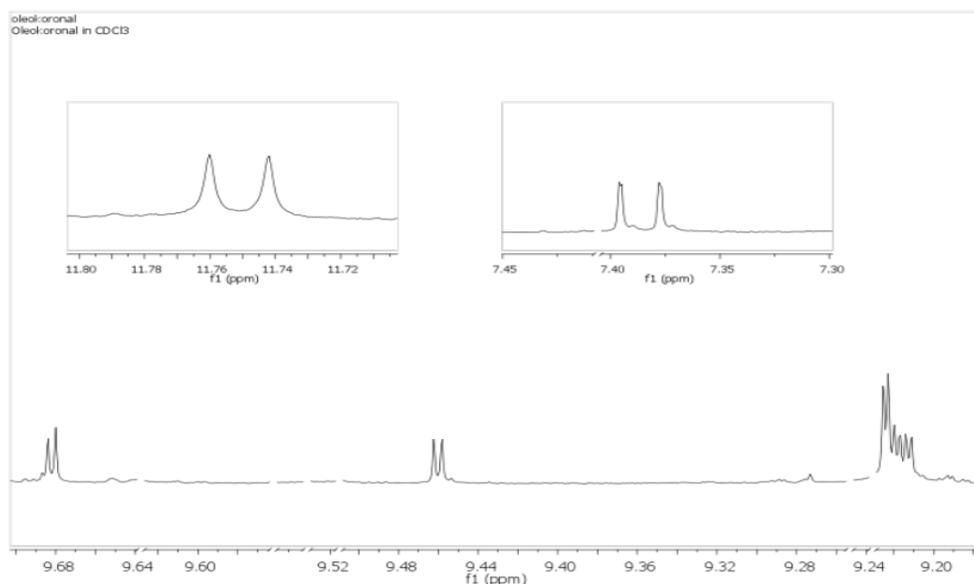
	11a (5S,4R)	11b (5S,4S)	13
1	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0	9.17, d, 2.0
3	9.67, d, 2.7	9.44, d, 2.7	7.36, dd, 12.6, 0.8
4	4.04, dd, 10.5, 2.7	4.10, dd, 10.5, 2.7	-
5	3.84, tdd, 10.5, 4.7, 2	3.80, tdd, 10.5, 4.3, 2.0	4.17, ddd (overlap)
6a	2.82, dd, 16.0, 10.5	2.83, dd, 15.8, 10.5	2.98, dd, 15.8, 9.6
6b	2.63, dd, 16.0, 4.7	2.58, dd, 15.8, 4.3	2.77, dd, (overlap)
8	6.70, q, 7.1	6.73, q, 7.1	6.59, q, 7.1
10	2.02, d, 7.1	1.99, d, 7.1	2.05, d, 7.1
3-OH	-	-	11.78, d, 12.6
OCH3	3.65, s	3.78, s	3.74, s
1'	4.21, m	4.12, m	4.16, m
2'	2.75, m	2.75, m	2.75, m
4'	6.68, d 1.8	6.67, d, 1.8	6.71, d, 1.8
7'	6.78, d (overlap)	6.78, d (overlap)	6.78, d (overlap)
8'	6.58	6.58	6.58

Πίνακας: Δεδομένα φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ για την ελαιομισσιονάλη (13) και τις ελευρωπεινδιάλες (11a,b) σε συγκέντρωση 20mg/0.6ml. Ως κορυφή αναφοράς για το CDCl_3 επιλέχθηκε η κορυφή στα 7.26 ppm

	12a (5S,4R)	12b (5S,4S)	14
1	195.53	195.65	196.04
3	196.24	195.41	164.07
4	60.45	59.50	103.69
5	31.58	31.97	30.14
6	34.80	35.44	35.92
7	171.71	171.46	172.18
8	156.78	157.29	155.05
9	141.14	140.52	142.40
10	15.40	15.49	15.41
11	168.23	169.02	172.12
OCH3	52.69	53.02	51.86
1'	65.52	65.52	65.52
2'	34.28	34.28	34.28
3'	130.46	130.46	130.53
4'	116.29	116.24	116.38
5'	143.60	143.65	143.68
6'	143.05	143.00	142.92
7'	115.39	115.39	115.39
8'	121.27	121.33	121.27

4. Συζήτηση αποτελεσμάτων.

Η πλήρης απόδοση της δομής των ενώσεων που περιέχονται στις ζώνες A και B και που παρουσιάσαμε παραπάνω ανέδειξε ότι το κυρίαρχο συστατικό σε κάθε ζώνη ήταν μια μονοαλδεϊδική μορφή, ενώ οι άλλες δύο ήταν δύο διαλδεϊδικές μορφές. Από την ανάλυση προέκυψε ότι η αναλογία μεταξύ των ισομερών ενώσεων και στις δύο περιπτώσεις ήταν 1:1:2. Το πρώτο μίγμα συστατικών που εμφανίζεται στην ζώνη A παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά σήματα της τυροσόλης. Με την χρήση φασμάτων H^1NMR , HSQC, HMBC, COSY μπορέσαμε να αποδώσουμε όλα τα σήματα και των τριών ενώσεων που εμφανίζονται στα φάσματα. Και οι τρεις ενώσεις είχαν τα χαρακτηριστικά σήματα μεθυλίου προσδεμένο σε άνθρακα που συμμετέχει σε διπλό δεσμό με την ύπαρξη ολεφινικού πρωτονίου σε γειτονικό άνθρακα καθώς και όλα εκείνα τα σήματα που περιμένουμε από μια δομή όπως αυτή του ελενολικού οξέος εστεροποιημένο με μια ομάδα τυροσόλης. Τα δύο συστατικά που βρίσκονται σε μικρότερη αναλογία αντιστοιχούν στα 4R,5S και 4S,5S ζευγάρια της μη κυκλικής διαλδεϊδικής μορφής του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης και άγλυκου του λιγκστροσίδη 11a,b και 12a,b.



Εικόνα 61: Φάσμα $^1H NMR$ της αλδεϊδικής και ολεφινικής περιοχής για το μίγμα της Ελαιοκορωνάλης και του μίγματος 4S/4R Λιγκστροδιάλης

Το τρίτο συστατικό, το οποίο είναι και το κυρίαρχο σε κάθε μίγμα, αντιστοιχεί σε μια πολύ παρόμοια δομή με μια βασική διαφορά, την απουσία δεύτερης αλδεΐδομάδας. Αντίθετα, αντί για την δεύτερη αλδεΐδη κάθε ένωση εμφάνισε ένα πολύ αποθωρακισμένο σήμα μιας διπλής κορυφής στα 11.8 ppm το οποίο στο φάσμα HMBC δεν έδειχνε συσχέτιση με κανέναν

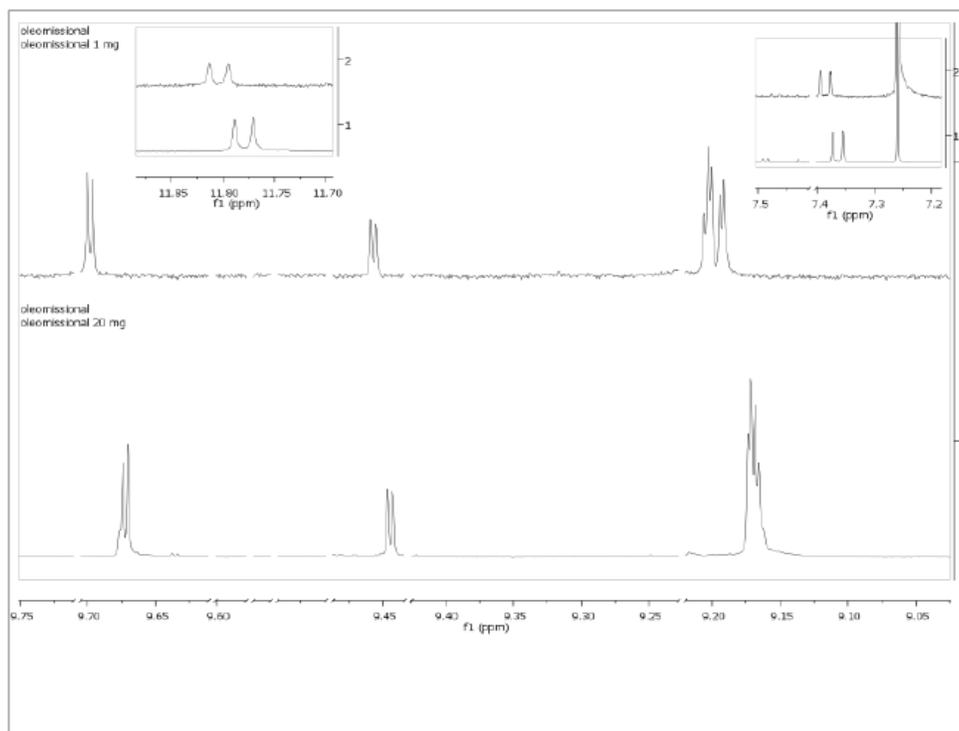
άνθρακα. Επιπλέον εντοπίστηκε και ένα ολεφινικό πρωτόνιο στα 7.3 ppm με διπλή κορυφή ($J=16$ Hz) το οποίο συσχετίζεται με την διπλή κορυφή στα 11.8 ppm. Το ολεφινικό αυτό πρωτόνιο στο φάσμα HMBC έδειξε συσχέτιση με μια καρβομεθόξυ ομάδα. Από αυτά τα στοιχεία κατέστη προφανές ότι το κυρίαρχο συστατικό σε κάθε ζώνη απομόνωσης ήταν η ενολική μορφή των διαλδευδών 11a,b και 12a,b. Αντίθετα από ότι θα περίμενε κανείς, οι ενολικές μορφές 13 και 14 ανεδείχθησαν σταθερές, λόγω του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ενολικού υδροξυλίου και του γειτονικού καρβονυλίου της της καρβομεθόξυ ομάδας.

Η ύπαρξη της ενολικής μορφής του άγλυκου του λιγκτροσίδη (14), έχει υποτεθεί και στο παρελθόν [58]. Ωστόσο, είναι αδιαμφισβήτητα η πρώτη φορά που η ενολική αυτή μορφή αναφέρεται ως φυσικό προϊόν και ως συστατικό του ελαιολάδου και για αυτό τον λόγο προτείνουμε την ονομασία **Ελαιοκορωνάλη**.

Οι διαλδευδικές μορφές του άγλυκου του λιγκτροσίδη 12a,b έχουν αναφερθεί αρκετές φορές στο παρελθόν χρησιμοποιώντας όμως ως μέθοδο ταυτοποίησης των ενώσεων την φασματοσκοπία Μάζας MS [59]. Αντίθετα η απόδοση δομής με φασματοσκοπία NMR δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα. Ομοίως, οι διαλδευδικές μορφές με ταυτοποίηση μέσω φασματοσκοπία μάζας έχουν αναφερθεί ως συστατικά αποβλήτων ελαιοτριβείου από τους Sanchez de Medina (2011) και την ονόμασαν p-HPEA-FA [60]. Σε κάποιες περιπτώσεις αναφέρονται στην διαλδευδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη αλλά στην πραγματικότητα αναφέρονται στην p-HPEA-EDA ή αλλιώς ελαιοκανθάλη, η οποία μπερδεύεται σε κάποιες περιπτώσεις με την διαλδευδική μορφή του δεκαρβομεθόξυ άγλυκου του λιγκτροσίδη [61]. Για να περιορίσουμε την χρήση μεγάλων περιγραφικών και ασαφών ονομασιών, προτείνουμε ότι η πιο κατάλληλη ονομασία για τις διαλδευδικές μορφές 12a,b να είναι **4R/4S- Λιγκτροδιάλη**, που περιέχει την ρίζα Λιγκτροάλ- που αναφέρεται στην κυκλική μονοαλδευδική μορφή του άγλυκου του λιγκτροσίδη 6a,b [62].

Η ενολική μορφή του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης (13) δεν έχει αναφερθεί ποτέ ως συστατικό του ελαιολάδου παρά μόνο ως συστατικό του ακατέργαστου καρπού της ελιάς [63] ή σαν προϊόν της ενζυματικής υδρόλυσης της Ελευρωπεΐνης [64]. Ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις όμως υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις στα δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί για την περιγραφή της δομής του συστατικού αυτού στα φάσματα NMR [63] [64] οι οποίες πρέπει να επανεξεταστούν. Συγκεκριμένα αναφέρουμε ότι οι συντάκτες της εργασίας αυτής δεν αναφέρουν την χαρακτηριστική κορυφή του ενολικού υδροξυλίου στα 11.78 ppm. Επίσης αναφέρουν ότι η χημική μετατόπιση του ολεφινικού άνθρακα που είναι συνδεδεμένος με την καρβομεθόξυ ομάδα είναι 130.37 ppm ενώ εμείς τον εντοπίσαμε στα 103.69 ppm. Το ενολικό ολεφινικό πρωτόνιο της διαλδευδικής μορφής του άγλυκου της ελευρωπεΐνης στα 7.36 ppm εμφανίζεται στο φάσμα πρωτονίου ως διπλή κορυφή με σχάση τα 6 Hz ενώ στην πραγματικότητα η σχάση είναι 16 Hz και προφανώς δεν υπάρχει σήμα υδροξυλίου -OH στα 7.40 ppm όπως έχει επίσης αναφερθεί. Υπάρχουν ακόμα αρκετές αποκλίσεις στα δεδομένα από τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR καθώς επίσης και απουσία πολλών σταθερών σύζευξης. Όλα αυτά καθιστούν τον επαναπροσδιορισμό της ακριβούς δομής από την αρχή απαραίτητο.

Πρέπει να αναφέρουμε επίσης ότι τα δεδομένα που λαμβάνουμε για την ενολική μορφή αλλά και για τις διαλδευδικές μορφές των άγλυκων λιγκτροσίδη και ελευρωπεΐνης παρουσιάζουν αρκετά σημαντικές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις που εμφανίζονται στα φάσματα πρωτονίου, ανάλογα με την συγκέντρωση των ουσιών αυτών στο δείγμα όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 62: Φάσμα ^1H NMR της αλδευδικής και ολεφινικής περιοχής της Ελαιομισσιονάλης και του μίγματος 4S/4R Ελευρωπεΐνδιάλης. (Επάνω: 1 mg/0.6 ml, Κάτω: 20 mg/0.6 ml).

Αυτό μπορεί να εξηγήσει κάποιες διαφορές που εντοπίζονται σε βιβλιογραφικά δεδομένα αλλά σίγουρα η πλειοψηφία των αποκλίσεων που εντοπίσαμε απαιτούν επανεξέταση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι σε παράλληλη εργασία που δημοσιεύθηκε την ίδια περίοδο από τους ίδιους ερευνητές [65] οι κορυφές που εμφανίζονται στα 11.79 και 11.83 ppm αποδίδονται σε οξειδωτικά παράγωγα (αλδεύδη σε καρβοξύλιο) που εμφανίζονται σταδιακά λόγω της παρουσίας των ενώσεων στο περιβάλλον του δευτεριωμένου χλωροφορμίου CDCl_3 . Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα οι κορυφές αυτές δεν είναι αποτέλεσμα οξειδωτικών διεργασιών αλλά λόγω της ισορροπίας που τελικά αποκαθίσταται μεταξύ των διαλδευδικών μορφών και της ενολικής μορφής.

Η ίδια σύγχυση φαίνεται να επικρατεί και στην εργασία των Paiva-Martins & Gordon (2001) όπου οι δύο κορυφές στα 11.78 ppm και 11.82 ppm αποδίδονται στις καρβοξυλομάδες των δύο στερεοϊσομερών του προκύπτουν από την υδρόλυση των καρβομεθόξυ ομάδων της μορφής 13 [66]. Ομοίως με προηγουμένως, η αιτία δεν είναι η υδρόλυση ή η οξείδωση αλλά

η ισορροπία των αλδεϋδικών και της ενολικής μορφής. Επομένως η δομή που προτείνουν οι συγκεκριμένοι ερευνητές πρέπει να τεθεί υπό αμφισβήτηση. Οι ίδιοι ερευνητές στην ίδια εργασία περιγράφουν επίσης την μη κυκλική διαλδεϋδική μορφή 11a,b την οποία και απομόνωσαν από φύλλα ελιάς, ωστόσο τα δεδομένα από τα φάσματα NMR που παρουσίασαν είναι ελλιπή και απουσιάζουν αρκετές σταθερές σύζευξης. Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις υπάρχει σύγχυση στα δεδομένα από τα φάσματα ^{13}C μεταξύ των ανθράκων που αποδίδονται σε κάθε στερεοϊσομερές.

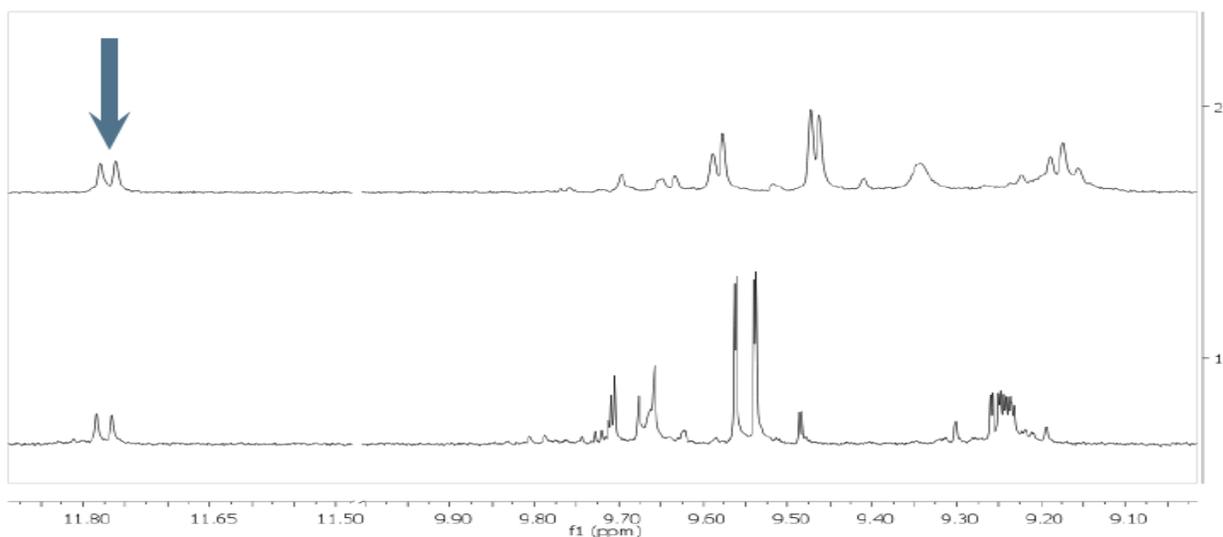
Τα συστατικά 11a,b έχουν αναφερθεί ως συστατικά του ελαιολάδου από τον De Nino (2000) [59], ωστόσο η περιγραφή μέσω φασματοσκοπίας NMR είναι αρκετά παραπλανητική και περιέχει αρκετές αποδόσεις που αποκλίνουν από την πραγματικότητα και οπωσδήποτε χρειάζεται επανεξέταση. Η περιγραφή από τους Bianco et al (1999a) της υδρόλυσης της ελευρωπεΐνης είναι αρκετά πιο ακριβής, αλλά υπάρχουν ακόμα αρκετές κορυφές οι οποίες δεν αποδίδονται (όπως για παράδειγμα στα 56 ppm) ή εντοπίζονται σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις (>5ppm διαφορά για τον άνθρακα που συνδέεται με την καρβομεθύξυ ομάδα) ή περιγραφή του μοντέλου συσχετίσεων και των αντίστοιχων σταθερών συσχετίσεων είναι ελλιπής. Η πιο ακριβής περιγραφή ως τώρα έχει γίνει από τους Christophoridou & Dais (2009) σε ένα κομμάτι της εργασίας τους που ασχολείται με την ενζυματική υδρόλυση της ελευρωπεΐνης, ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν αρκετές διαφορές στα φασματοσκοπικά δεδομένα καθώς επίσης δεν παρουσιάζονται καθόλου φασματοσκοπικά δεδομένα για τους άνθρακες των ενώσεων [54].

Για την αποφυγή των παρερμηνειών και για την απλοποίηση του ονόματος του ενολικού ισομερούς του άγλυκου της ελευρωπεΐνης (13), προτείνουμε την ονομασία **Ελαιομισσιονάλη** αντί του δύσχρηστου αλλά και λανθασμένου ενολοελευρωπεΐνδιάλη (Bianco et al 1999a). Για την μη κυκλική διαλδεϋδική μορφή του άγλυκου της ελευρωπεΐνης η πιο ακριβής ονομασία θα μπορούσε να είναι η 4S/4R- ελευρωπεΐνδιάλη κατά το πρότυπο που έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Bianco et al 1999).

Χρήση επιλεκτικού παλμού NMR

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η Ελαιοκορωνάλη είναι πραγματικό συστατικό του ελαιολάδου και δεν πρόκειται για κάποιο προϊόν που σχηματίζεται κατά την διάρκεια της εκχύλισης του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου ή της διάλυσης του εκχυλίσματος σε δευτεριωμένο διαλύτη CDCl_3 που απαιτείται για την φασματοσκοπική ανάλυση, εφαρμόσαμε πείραμα επιλεκτικού παλμού διέγερσης σε ένα δείγμα ελαιολάδου χωρίς την παρουσία οποιουδήποτε διαλύτη με τις παραμέτρους που περιγράψαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Το φάσμα που λάβαμε με επιλεκτικό παλμό το συγκρίναμε με το αντίστοιχο φάσμα πρωτονίου που λήφθηκε από το εκχύλισμα του ίδιου ελαιολάδου διαλυμένο σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 . Η χρήση επιλεκτικού παλμού διέγερσης επιτρέπει την παρατήρηση κορυφών που αντιστοιχούν σε συστατικά μικρής συγκέντρωσης παρουσία άλλων συστατικών πολύ μεγαλύτερης συγκέντρωσης όπως για παράδειγμα λιπιδίων. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει περιγραφεί λεπτομερώς από τους Melliou et al 2015 [67].

Στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε ήταν δυνατό να παρατηρήσουμε το αποθωρακισμένο ενολικό υδροξύλιο στα 11.78 ppm της ενολικής μορφής του άγλυκου του Λιγκστροσίδη τόσο στο εκχύλισμα του ελαιολάδου όσο και απευθείας στο ελαιόλαδο αυτούσιο χωρίς οποιαδήποτε επεξεργασία. Αυτό αποδεικνύει ότι η Ελεοκορωνάλη αποτελεί πραγματικό συστατικό του ελαιολάδου και δεν είναι προϊόν που δημιουργείται κατά την επεξεργασία του εκχυλίσματος. Η παρατηρούμενες διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των υπόλοιπων κορυφών που παρατηρούνται στο φάσμα του αυτούσιου ελαιολάδου οφείλονται στην παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης λιπιδίων στο ελαιόλαδο.

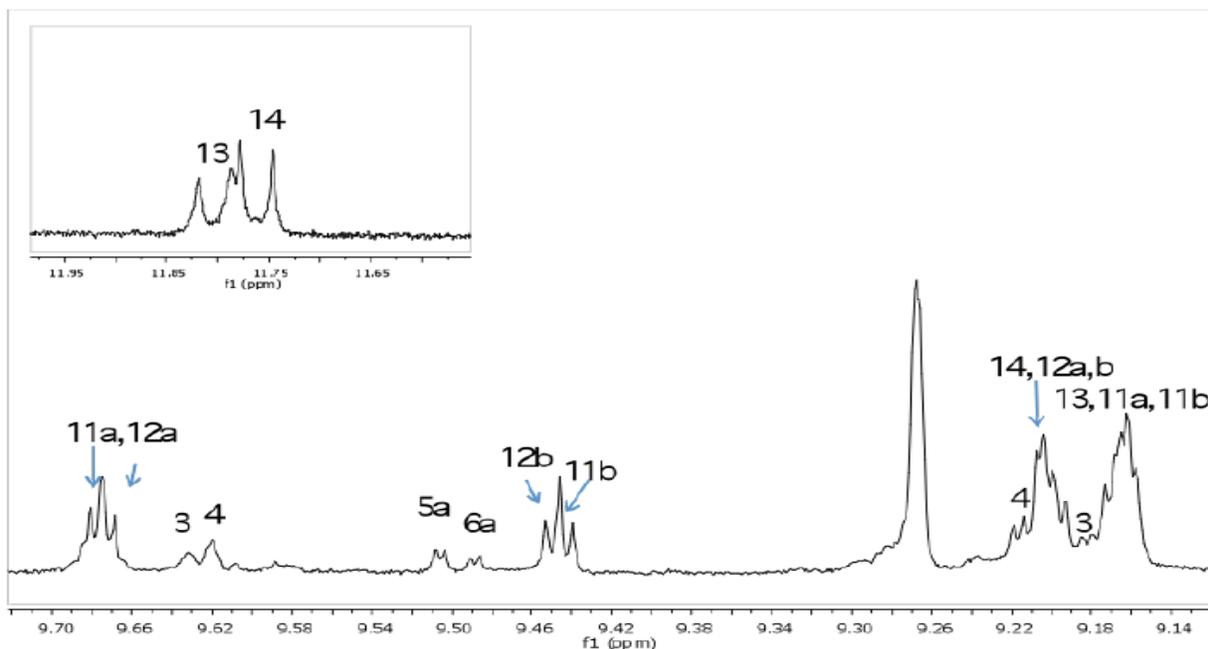


Εικόνα 63: Φάσμα ^1H -NMR επιλεκτικού παλμού ακατέργαστου ελαιολάδου (πάνω) – Εκχύλισμα ελαιόλαδου διαλυμένο σε CDCl_3 (κάτω). Η κορυφή της Ελαιοκορωνάλης στα 11.78 ppm παρατηρείται και στις δύο περιπτώσεις δείχνοντας ότι η Ελαιοκορωνάλη είναι πραγματικό συστατικό

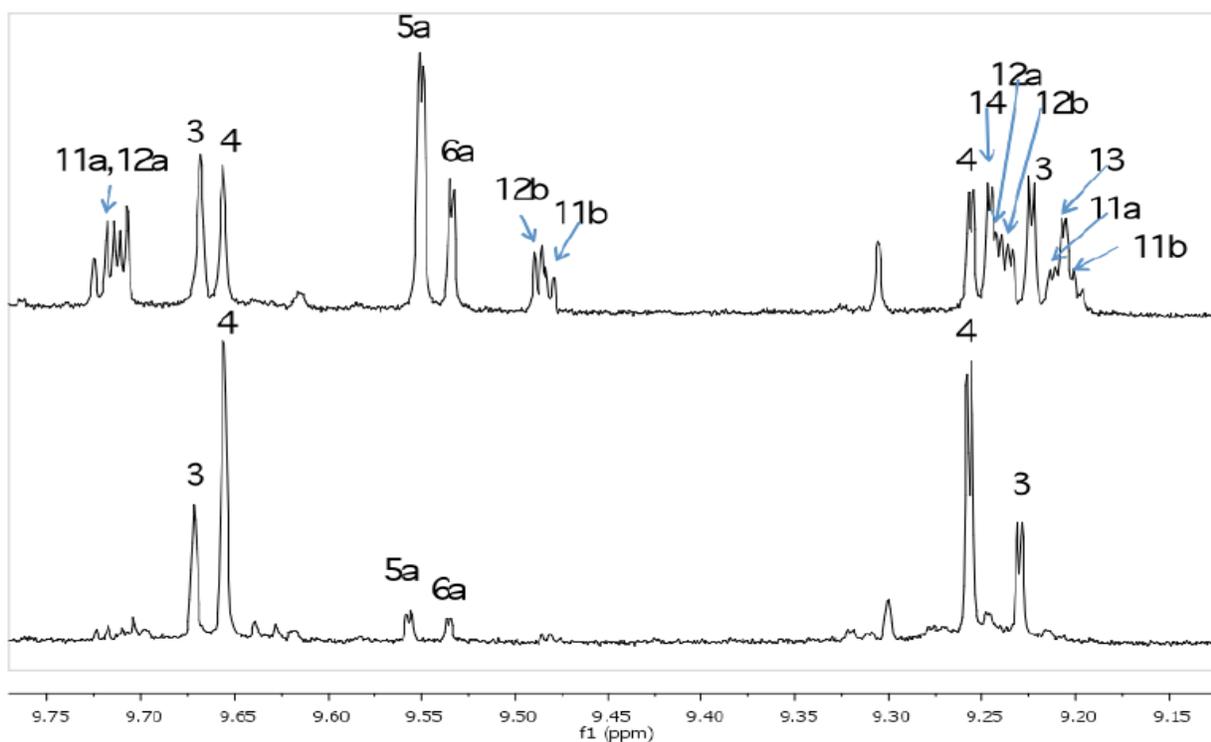
Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των προτεινόμενων δομών πραγματοποιήσαμε ενζυματικό μετασχηματισμό της Ελευρωπεΐνης στις μη κυκλικές μορφές. Κάτω από κατάλληλες συνθήκες pH κατέστη δυνατό να ελαχιστοποιήσουμε τον μετασχηματισμό της Ελευρωπεΐνης στην κυκλική μορφή του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης 5a και να προχωρήσουμε στον απευθείας σχηματισμό των μη κυκλικών μορφών. Το μίγμα προϊόντων που προέκυψε απέδωσε τελικά ακριβώς τα ίδια σήματα με το εκχύλισμα που απομονώθηκε από το ελαιόλαδο με χρωματογραφικές μεθόδους. Και σε αυτή την περίπτωση το κυρίαρχο συστατικό ήταν η ενολική μορφή 13 ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση υπήρχαν τα δύο στερεοϊσομερή 11a και 11b.

Όσο αφορά τον ποσοτικό προσδιορισμό του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης και άγλυκου του Λιγκοτροσίδη από προηγούμενη εργασία, παρουσιάστηκε μια μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυκλικών μονοαλδεϊδικών μορφών 5 και 6 (Karkoula et al. 2014). Ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία και τις ίδιες καμπύλες αναφοράς είναι δυνατόν να παρουσιάσουμε ποσοτικά δεδομένα για κάθε μια από τις διαλδεϊδικές και ενολικές μορφές. Ο πλήρης διαχωρισμός των κορυφών μπορεί να επιτευχθεί μόνο σε συσκευές NMR υψηλού μαγνητικού πεδίου (>600 MHz). Ωστόσο, ακόμα και με την χρήση NMR μαγνητικού πεδίου 400MHz, η ολοκλήρωση στα φάσματα πρωτονίου ολόκληρης της αλδεϊδικής περιοχής μπορεί να προσδώσει ποσοτικά δεδομένα για όλες τις μη κυκλικές δομές των άγλυκων σαν σύνολο.

Όσο αφορά τα επίπεδα της Ελαιοκορωνάλης και της Ελαιομισσιονάλης, πρέπει αρχικά να αναφέρουμε ότι τα πρώτα δείγματα ελαιολάδου στα οποία εντοπίσαμε τις ενώσεις αυτές επρόκειτο για δείγματα που προέρχονταν από ποικιλίες Κορωνέικη και Μίσσιον. Επίσης, στα περισσότερα από τα δείγματα ελαιολάδου που εξετάσαμε τα επίπεδα της Ελαιοκορωνάλης και της Ελαιομισσιονάλης αλλά και των διαλδεϊδικών μορφών που αναφέραμε, ήταν μικρότερα από αυτά της ελαιοκανθάλης και της ελαιασίνης και σε πολλές περιπτώσεις απουσίαζαν εντελώς. Ωστόσο, φαίνεται ότι σε συγκεκριμένες ποικιλίες, αλλά και κάτω από συγκεκριμένες παραμέτρους ελαιοποίησης, η Ελαιοκορωνάλη και η Ελαιομισσιονάλη μπορεί να αποτελούν το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό του ελαιολάδου. Περισσότερα δεδομένα πάνω σε αυτόν τον ισχυρισμό καθώς και πλήρης ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων αυτών θα αποτελέσει θέμα μελλοντικής εργασίας.



Εικόνα 64: Φάσμα ^1H NMR – αλδεϋδική περιοχή εκχυλίσματος ελαιολάδου από Κορωνέικη ποικιλία που παρήχθη σε χαμηλή θερμοκρασία και μικρό χρόνο μάλαξης. (Λήψη στα 400MHz)



Εικόνα 65: Φάσμα ^1H NMR – αλδεϋδική περιοχή εκχυλίσματος ελαιολάδου από την ποικιλία Μίσσιον που αποδίδονται οι κορυφές των ενώσεων 3, 4, 5a, 6a, 11a,b, 12a,b, 13, 14. (Πάνω) – Τυπικό δείγμα Κορωνέικης ποικιλίας. (Κάτω).

5. Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των ισομερών ελευρωπεΐνης και λιγκστροσίδη.

Η Ελαιοκορωνάλη και η Ελαιομισσιονάλη όπως αναφέραμε είναι δύο συστατικά του ελαιολάδου που αρχικά εντοπίστηκαν σε ελαιόλαδα τα οποία προέρχονταν από δείγματα ποικιλίας Κορωνέικη και Μίσσιον. Η διαπίστωση αυτή είναι αποτέλεσμα επισταμένης παρατήρησης του φαινολικού προφίλ εκατοντάδων δειγμάτων ελαιολάδου από διάφορες ποικιλίες. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων ενώσεων και μάλιστα στις ποικιλίες αυτές είδαμε και τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα είδαμε και δείγματα ελαιολάδου όπου οι ενώσεις αυτές αποτελούσαν το κυρίαρχο φαινολικό συστατικό. Μεγάλη σημασία έχει όμως το γεγονός ότι η εμφάνιση των ενώσεων αυτών δεν περιορίζεται σε αυτές τις δύο ποικιλίες αλλά επεκτείνεται και σε άλλες. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ποικιλία του ελαιόκαρπου αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για την ύπαρξη ή μη των συγκεκριμένων ενώσεων αλλά δηλώνει παράλληλα ότι οι ενώσεις αυτές δεν αποτελούν μεταβολίτες που ανήκουν αποκλειστικά σε κάποιες ποικιλίες.

Επίδραση θερμοκρασία και χρόνου μάλαξης.

Ένα σημαντικό στοιχείο που είδαμε από την ανάλυση των δειγμάτων ελαιολάδου, ήταν ότι δείγματα ελαιολάδου που προέρχονταν από την ίδια περιοχή και πολλές φορές μάλιστα από τον ίδιο παραγωγό, που συνεπάγεται ίδιες κλιματικές συνθήκες, τύπος καλλιέργειας, βαθμός ωρίμανσης κ.α., εμφάνισαν διαφορές στο φαινολικό τους προφίλ. Συγκεκριμένα είδαμε περιπτώσεις που τα επίπεδα των μελετώμενων ισομερών ελευρωπεΐνης και λιγκστροσίδη ήταν τελείως διαφορετικά σε παρόμοια δείγματα ελαιολάδου και μάλιστα σε μερικές ακραίες περιπτώσεις είδαμε ότι σε δείγματα ελαιολάδου που προέρχονταν από τα ίδια ελαιόδεντρα μερικές φορές είχαμε σημαντικές ποσότητες των ενώσεων αυτών ενώ σε άλλα υπήρχε πλήρης απουσία.

Η διαπίστωση αυτή μας οδήγησε στην υπόθεση ότι σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των ενώσεων αυτών παίζουν οι συνθήκες ελαιοποίησης του καρπού της ελιάς όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία μάλαξης. Την υπόθεση αυτή ενίσχυσε το γεγονός ότι, όπως εξηγήσαμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η βιοσύνθεση όλων των ισομερών του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης και Λιγκστροσίδη ξεκινάει από την ενζυματική υδρόλυση των μορίων της ελευρωπεΐνης και

λιγκτροσίδη που βρίσκονται στον καρπό της ελιάς, από το ένζυμο β-γλυκοσιδάση κατά την διάρκεια της μάλαξης [52].

Με βάση τα παραπάνω επιχειρήσαμε να δούμε την επίδραση που μπορεί να έχει ο χρόνος μάλαξης στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου. Για τον σκοπό αυτό βρεθήκαμε στον Αγροτικό Συνεταιρισμό Παλαιοπαναγιάς Λακωνίας όπου επιχειρήσαμε να λάβουμε δείγματα ελαιολάδου για διαφορετικούς χρόνους μάλαξης.

Η διαδικασία ελαιοποίησης

Η διαδικασία της ελαιοποίησης ξεκινά με την παραλαβή του ελαιόκαρπου από τους παραγωγούς. Οι παραγωγοί φέρνουν την συγκομιδή τους στο ελαιοτριβείο όπου οι ελιές αποθηκεύονται σε πλαστικές παλέτες σε σκεπαστό χώρο μέχρις ότου να παραληφθεί επαρκής ποσότητα για να λειτουργήσει η μονάδα παραγωγής ελαιολάδου. Ο χρόνος αναμονής είναι από μερικές ώρες μέχρι, σε ελάχιστες περιπτώσεις, 2 μέρες. Η απαραίτητη ποσότητα για να γεμίσει ο ένας μαλακτήρας είναι από 800 κιλά έως 1 τόνο ελιάς. Όταν η απαραίτητη ποσότητα ελιάς συγκεντρώνεται στο ελαιοτριβείο ξεκινάει η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου. Οι ελιές αφού περνάνε από το πλυντήριο εισέρχονται στον σπαστήρα και ξεκινάει στους μαλακτήρες η διαδικασία της μάλαξης.

Τα 10 πρώτα λεπτά της διαδικασίας που απαιτούνται για να γεμίσει ο μαλακτήρας τα θεωρήσαμε ως νεκρό χρόνο και δεν συνυπολογίζονται στον ολικό χρόνο μάλαξης. Από την στιγμή που γεμίσει ο μαλακτήρας ξεκινάει ο χρόνος που έχουμε ορίσει ως ο χρόνος μάλαξης. Η θερμοκρασία στους μαλακτήρες ρυθμίζεται με αύξηση ή μείωση της παροχής ζεστού νερού στο εσωτερικό των τοιχωμάτων του μαλακτήρα. Το νερό θερμαίνει τα πλάγια τοιχώματα του μαλακτήρα μεταφέροντας έτσι στην πάστα ελιάς την απαραίτητη θερμότητα ώστε να φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία. Η μέτρηση της θερμοκρασίας γίνεται απευθείας στην πάστα ελιάς με την χρήση θερμομέτρου χειρός σε διάφορα σημεία της επιφάνειας της πάστας ελιάς κατά την διάρκεια της μάλαξης. Στην συνέχεια η πάστα ελιάς μεταφέρεται μέσω σωλήνων στον πρώτο φυγοκεντρωτή (ντεκάντερ) όπου γίνεται ο πρώτος διαχωρισμός του ελαιολάδου από την σάρκα της ελιάς. Ο φυγοκεντρωτής δουλεύει σταθερά στις 4000 rpm. Το ελαιόλαδο στην συνέχεια υποβάλλεται σε δύο διαδοχικούς καθαρισμούς σε μικρότερους φυγοκεντρωτές όπου μικρή ποσότητα νερού αναμιγνύεται με το ελαιόλαδο και με φυγοκέντρηση κατευθείαν διαχωρίζεται. Στο τέλος του δεύτερου φυγοκεντρωτή έχουμε το τελικό προϊόν όπου γίνεται η παραλαβή του σε γυάλινα μπουκάλια.

Λήψη δειγμάτων ελαιολάδου.

Η λήψη δειγμάτων ελαιολάδου επιλέχθηκε να γίνει κατά την ελαιοπαραγωγική διαδικασία όπου σε ένα μαλακτήρα ελαιολάδου έχει τοποθετηθεί ποσότητα ελαιόκαρπου βάρους 1tn ποικιλίας Κορωνέικη. Κατά την διάρκεια της μάλαξης του ελαιόκαρπου επιλέχθηκαν 3 χρονικά σημεία κατά τα οποία η διαδικασία της μάλαξης διακόπτεται και ξεκινάνε οι διαδικασίες διαχωρισμού του ελαιολάδου από την σάρκα της ελιάς με διαδοχικούς φυγοκεντρικούς διαχωρισμούς. Μετρώντας τον χρόνο από την στιγμή που γεμίζει ο μαλακτήρας επιλέξαμε τις χρονικές στιγμές 30,40 και 70min όπου διακόπτουμε την διαδικασία της μάλαξης και παίρνουμε το δείγμα ελαιολάδου που προκύπτει από την διαδικασία διαχωρισμού. Ο μαλακτήρας θερμάνθηκε σε υψηλή θερμοκρασία και οι απευθείας μετρήσεις στον μαλακτήρα έδειξαν ότι είχαμε μέση θερμοκρασία 33 °C.

Με την παραπάνω διαδικασία ήταν δυνατό να παραλάβουμε τρία δείγματα ελαιολάδου που προέρχονταν από το ίδιο αρχικό υλικό, τις ίδιες δηλαδή ελιές, να πραγματοποιήσουμε την διαδικασία ελαιοποίησης στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και να μεταβάλουμε μόνο τον παράγοντα ης χρονικής διάρκειας της μάλαξης.

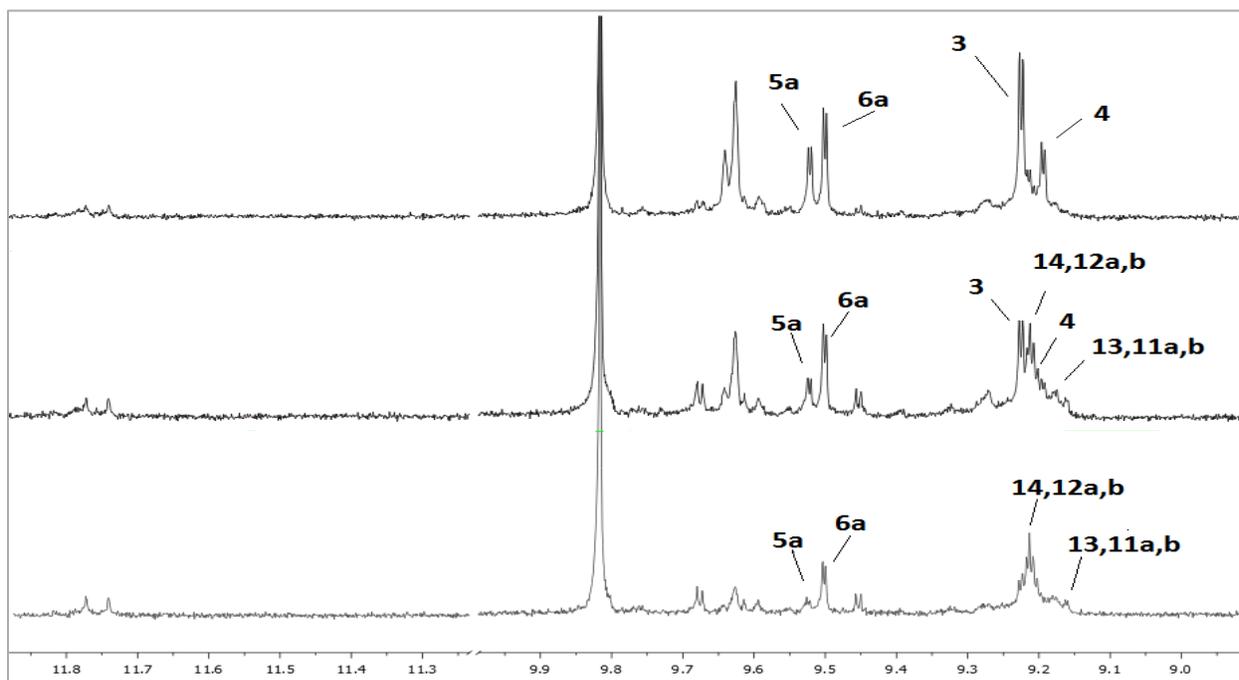
	Θερμοκρασία (OC)	Χρόνος (min)
Κορωνέικη	34	30
	34	45
	34	70

Τα τρία δείγματα ελαιολάδου που παραλάβαμε εκχυλίζονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου συριγγαλδεΐδης 0,5 mg/ml . Μετά την εκχύλιση του ελαιολάδου γίνεται λήψη φασμάτων ¹HNMR με σκοπό την σύγκριση του φαινολικού προφίλ των τριών δειγμάτων ελαιολάδου.

Σύγκριση φαινολικού προφίλ των τριών δειγμάτων.

Από την λήψη των φασμάτων πρωτονίου για τα τρία δείγματα ελαιολάδου που παραλάβαμε θα παρατηρήσουμε ότι συντελούνται σημαντικές μεταβολές στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου κατά την διάρκεια της μάλαξης.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζουμε τα τρία φαινολικά προφίλ που παραλάβαμε. Ξεκινώντας από κάτω βλέπουμε το φαινολικό προφίλ του δείγματος ελαιολάδου στο οποίο πραγματοποιήθηκε μάλαξη για 30 min. Στο προφίλ αυτό θα παρατηρήσουμε την εμφάνιση των κορυφών που αντιστοιχούν στις ισομερείς μορφές 11a,b, 12a,b, 13, 14 δηλαδή όλων εκείνων των ισομερών που παρουσιάζουμε στην παρούσα εργασία. Αντίστοιχα θα δούμε ότι οι κορυφές 3, 4, 5a, 6a δηλαδή της Ελαιοκανθάλης, Ελαιασίνης και των δύο γνωστών μορφών των άγλυκων λιγκστροσίδη και ελευρωπεΐνης είναι πολύ μειωμένες.



Εικόνα 65: Φάσμα ^1H NMR – αλδεϋδική περιοχή εκχυλίσματος ελαιολάδου από την κορωνέικη ποικιλία για διαφορετικούς χρόνους μάλαξης 30min(κάτω) 45min και 70.

Στο δεύτερο φάσμα (μέση) παρουσιάζεται το φαινολικό προφίλ του δείγματος του ελαιολάδου στο οποίο η διαδικασία της μάλαξης διήρκεσε 40min. Στο φαινολικό προφίλ αυτό βλέπουμε την σταδιακή εμφάνιση των κορυφών της Ελαιοκανθάλης και της Ελαιασίνης (3 και 4) με ταυτόχρονη συνύπαρξη και των άλλων ισομερών ενώσεων.

Στο τρίτο φάσμα που εμφανίζεται στην κορυφή της εικόνας παρουσιάζει το φαινολικό προφίλ του δείγματος ελαιολάδου στο οποίο η διαδικασία της μάλαξης διήρκησε 70min. Στο φαινολικό προφίλ του συγκεκριμένου ελαιολάδου θα παρατηρήσουμε την ραγδαία συρρίκνωση των κορυφών των 11a,b, 12a,b, 13, 14 με ταυτόχρονη αύξηση των 3, 4, 5a, 6a.

Από το παραπάνω φάσμα μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι κατά την διάρκεια της μάλαξης υπάρχει μια σταδιακή "κατανάλωση" των ισομερών του άγλυκου της Ελευρωπεΐνης και Λιγκστροσίδη με ταυτόχρονη αύξηση των Ελαιοκανθάλη, Ελαιασίνη και των δύο γνωστών μορφών των άγλυκων Λιγκστροσίδη και Ελευρωπεΐνης.

6. Στατιστική ανάλυση.

Χαρτογράφηση του φαινολικού κλάσματος στον ελλαδικό χώρο.

Το ελαιόλαδο έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εδώ και αρκετά χρόνια λόγω των υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων του. Στην βιβλιογραφία θα εντοπίσουμε έναν πολύ μεγάλο αριθμό εργασιών που αναφέρονται συστηματικά στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου και στον ρόλο που παίζει στην διατροφή. Μάλιστα μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι μαζί με το επιστημονικό ενδιαφέρον συμβαδίζει και το ολοένα αυξανόμενο εμπορικό ενδιαφέρον για το ελαιόλαδο και μάλιστα, στα πλαίσια της προώθησης του ελαιολάδου ως ένα προϊόν με ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες.

Στο φαινολικό κλάσμα του ελαιολάδου θα εντοπίσουμε πλήθος ενώσεων κάποιες από τις οποίες μέχρι και σήμερα παραμένουν άγνωστες. Σύμφωνα με τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης και την επιστημονική άποψη του EFSA (EE 432/2012) η τυροσόλη και η υδροξυ-τυροσόλη, καθώς και τα παράγωγα αυτών, ευθύνονται για την προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες.

Ένα κομμάτι της έρευνας αφορά στον προσδιορισμό των παραγόντων εκείνων που επηρεάζουν την συγκέντρωση των συστατικών αυτών στο ελαιόλαδο. Παράγοντες όπως η ποικιλία, οι κλιματικές συνθήκες, οι συνθήκες ελαιοποίησης, το γενετικό προφίλ του ελαιόδεντρου κ.α. είναι παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την συγκέντρωση του φαινολικού κλάσματος χωρίς ωστόσο να υπάρχει μέχρι σήμερα μια ξεκάθαρη εικόνα για το ζήτημα αυτό. Στο κομμάτι αυτό της εργασίας θα παρουσιάσουμε μια στατιστική μελέτη που αφορά την συγκέντρωση κάποιων φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, που περιλαμβάνονται στον κανονισμό της ΕΕ περί υγειοπροστατευτικότητας, και που αφορά 741 δείγματα ελαιολάδου.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν 741 δείγματα ελαιολάδου από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και εφαρμόστηκε με σκοπό να υπολογιστούν τα επίπεδα συγκέντρωσης των ουσιών αυτών στο ελαιόλαδο και να γίνει μια όσο το δυνατόν πληρέστερη χαρτογράφηση της ελληνικής παραγωγής. Τα δείγματα ελαιολάδου αυτά προέρχονται από 7 διαφορετικές ελαιοκομικές περιόδους από το 2009 μέχρι και σήμερα και για τον σκοπό αυτά χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα και από παλαιότερες μελέτες (Karkoula E. Et al 2014). Οι ενώσεις που μελετήθηκαν είναι η ελαιοκανθάλη (4), ελαιασίνη (3), άγλυκο ελευρωπεΐνης (5), άγλυκο λιγκστροσίδη (6), ελαιοκορωνάλη (14), ελαιομισσιονάλη(13), λιγκστροδιάλη(12a,b), ελευρωπεΐνδιάλη (11a,b).

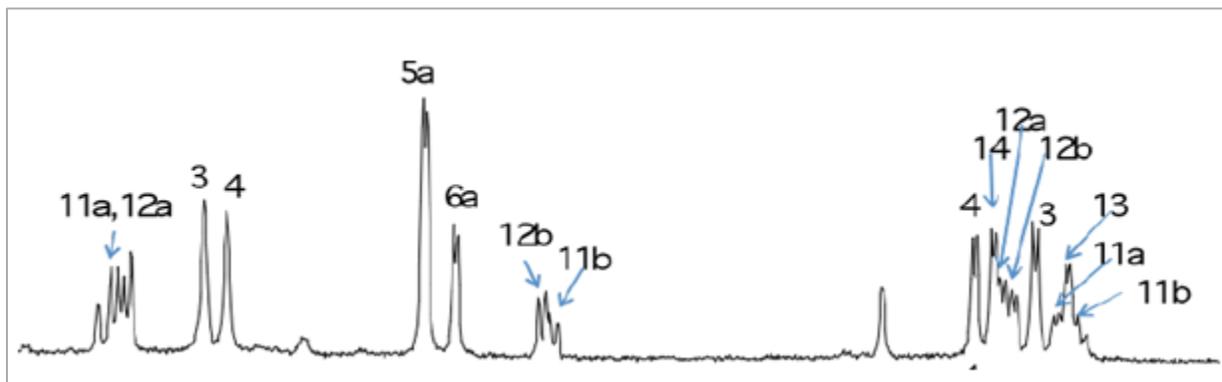
Ποσοτικός προσδιορισμός των παραγώγων τυροσόλης και υδρόξυ-τυροσόλης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι αυτή του μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$, σύμφωνα με την μέθοδο που παρουσιάστηκε από τους Karkoula E. Et al 2014 [57].

Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο 5g ελαιολάδου διαλύονται σε 20 ml Chex και το διάλυμα αναδεύεται για 1min. Στην συνέχεια προστίθενται 25ml ACN και το μίγμα αναδεύεται για άλλο ένα λεπτό. Ο διαχωρισμός των δύο φάσεων γίνεται με φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 5 min. Ο διαχωρισμός των στιβάδων ακετονιτριλίου και κυκλοεξανίου, που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους, έγινε στις 4000 rpm/ 5 min με χρήση της συσκευής Heraus Multifuge 3S Centrifuge. Η λειτουργία της συσκευής βασίζεται στην ανάπτυξη φυγόκεντρου δύναμης η οποία οδηγεί στο διαχωρισμό. Η λήψη των φασμάτων πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ έγινε σε συσκευή NMR Bruker 600 & 400 MHz. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 .

Ως εσωτερική πρότυπη ουσία (IS) χρησιμοποιήθηκε η συριγγαλδεΐδη ή (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde) σε συγκέντρωση 0,5 mg/ ml.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που μελετάμε έγινε ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών στην αλδεΐδική περιοχή όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



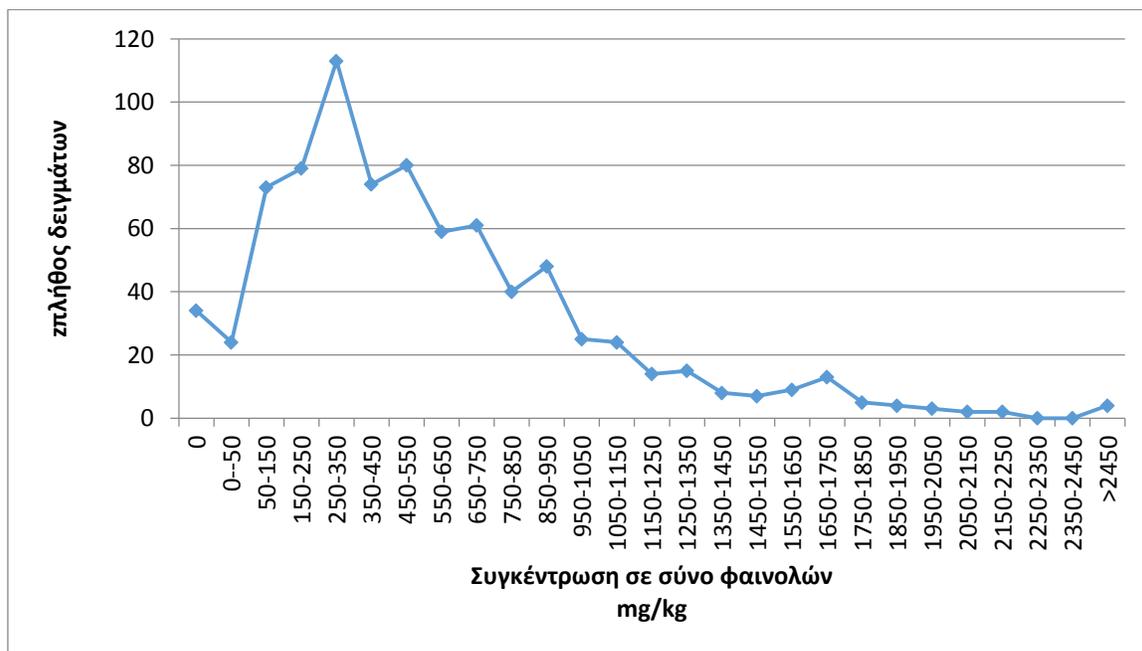
Εικόνα: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ – αλδεΐδική περιοχή εκχυλίσματος ελαιολάδου από την ποικιλία Μίσσιον που αποδίδονται οι κορυφές των ενώσεων 3, 4, 5a, 6a, 11a,b, 12a,b, 13, 14.

Χαρτογράφηση ελληνικής παραγωγής.

Τα δείγματα ελαιολάδου που εξετάστηκαν προέρχονταν από αρκετές περιοχές της Ελλάδας και αφορούσαν διαφορετικές ποικιλίες. Το πλήθος των δειγμάτων μας δίνει την ευκαιρία να ομογενοποιήσουμε τα αποτελέσματα και να φτάσουμε σε ένα αντιπροσωπευτικό στατιστικό αποτέλεσμα.

Το πλήθος των δειγμάτων ελαιολάδου δεν μας επιτρέπει να παρουσιάσουμε πλήρη και αναλυτικά αποτελέσματα για όλα τα δείγματα ελαιολάδου και συγκεκριμένα ποσοτικά στοιχεία για το κάθε δείγμα, για αυτό και παραθέτουμε παρακάτω μερικά στατιστικά στοιχεία που αφορούν το άθροισμα των φαινολικών ενώσεων που μελετάμε τόσο για όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν από όλη την Ελλάδα συγκεντρωτικά όσο και για δύο επιμέρους περιοχές όπου είχαμε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

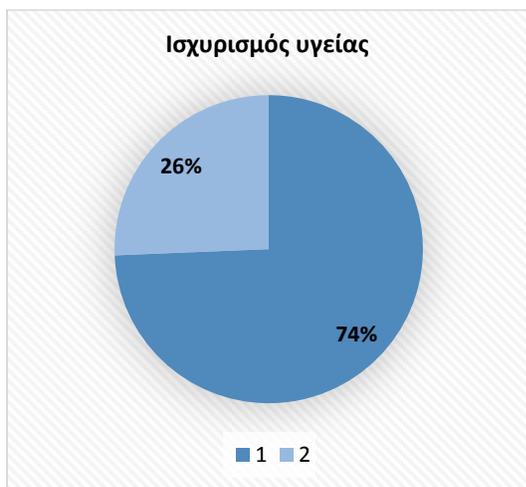
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από όλα τα δείγματα ελαιολάδου, όπως θα δούμε και από το γράφημα παρακάτω, βλέπουμε ότι στα περισσότερα δείγματα ελαιολάδου, το άθροισμα των ουσιών που μελετήσαμε βρίσκεται από 250-350 mg/kg. Όπως θα παρατηρήσουμε ο αριθμός των δειγμάτων με μηδενική περιεκτικότητα στις φαινολικές ενώσεις που μελετάμε είναι αρκετά μικρός γεγονός που ενισχύει την πεποίθηση ότι το ελληνικό ελαιόλαδο επιτυγχάνει υψηλά επίπεδα ποιότητας.



Διάγραμμα 1: Κατανομή συχνότητας του αθροίσματος των μελετούμενων ουσιών συγκεντρωτικά.

Όπως θα δούμε και από τα παρακάτω γραφίσματα το 74% των δειγμάτων ελαιολάδου εμφανίζει περιεκτικότητα φαινολικών ουσιών περισσότερο από 250mg/kg. Αυτό συνδέεται

άμεσα με τον ισχυρισμό υγείας της Ε.Ε. σύμφωνα με τον οποίο τα ελαιόλαδα με περιεκτικότητα σε τυροσόλη, υδροξυ-τυροσόλη και των παραγώγων τους μεγαλύτερη από το όριο αυτό μπορούν να φέρουν τον συγκεκριμένο ισχυρισμό. Παρακάτω θα δούμε επίσης, ότι ο αριθμός των δειγμάτων ελαιολάδου με περιεκτικότητα πάνω από 1000mg/kg παραμένει αρκετά μεγάλος (14%).

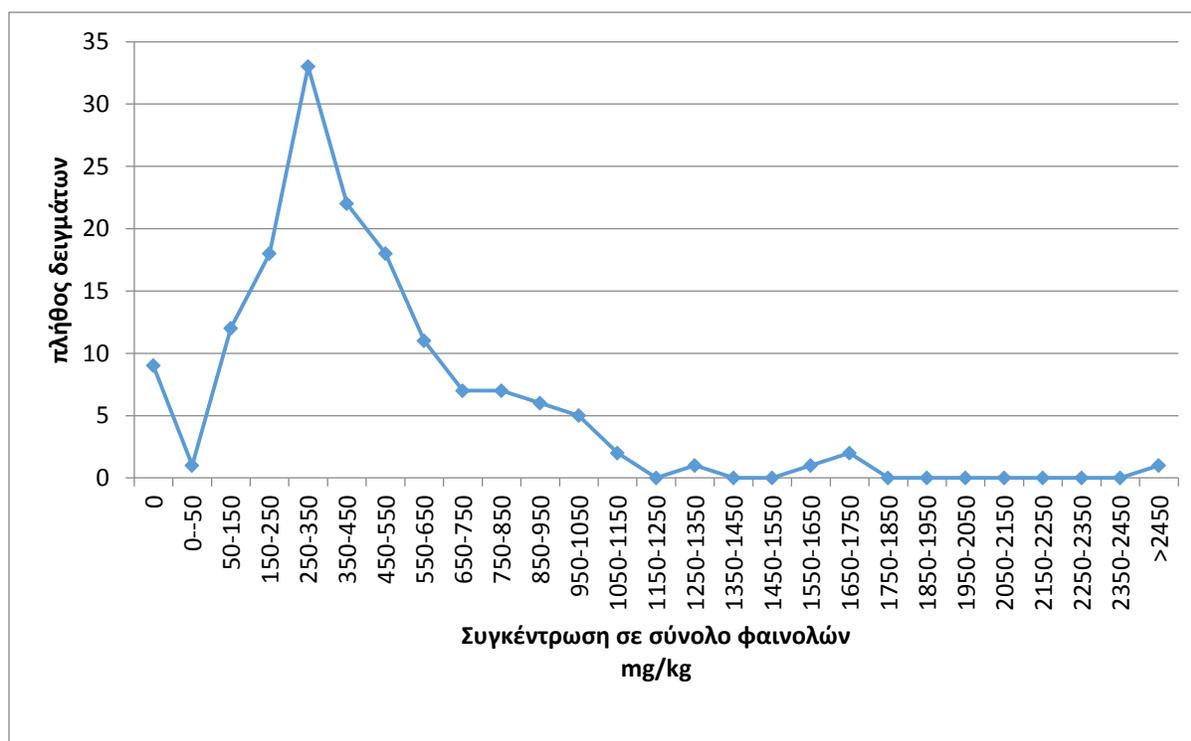


Διάγραμμα 2: Συγκεντρωτικά στατιστικά στοιχεία για περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες.

Στατιστική ανάλυση από τον νομό Λακωνίας.

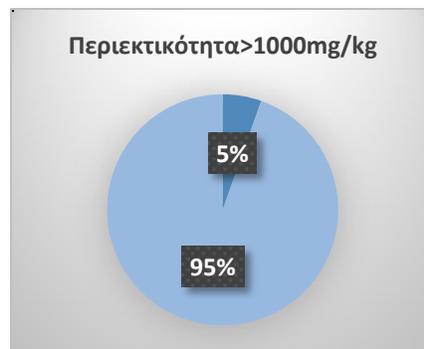
Στην συνέχεια θα παρουσιάσουμε μερικά αποτελέσματα από συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας από τις οποίες είχαμε πολλά δείγματα και μπορούμε να παρουσιάσουμε αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα. Οι περιοχές αυτές είναι ο νομός Μεσσηνίας και ο νομός Λακωνίας από όπου είχαμε συνολικά 294 δείγματα ελαιολάδου.

Για την περιοχή της Λακωνίας μελετήσαμε συνολικά 157 δείγματα ελαιολάδου στην πλειοψηφία τους από κορωνέικη ποικιλία. Από το γράφημα θα δούμε ότι η κατανομή συχνοτήτων έχει παρόμοια μορφή με αυτή του συγκεντρωτικού γραφήματος που παρουσιάσαμε προηγουμένως. Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης για το άθροισμα των φαινολικών ενώσεων είναι και εδώ από 250-350 mg/kg. Το πλήθος των δειγμάτων μειώνεται σημαντικά όσο πηγαίνουμε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ενώ αντίστοιχα με πριν τα ελαιόλαδα με μηδενική περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες είναι εμφανώς περιορισμένα.



Διάγραμμα 3: Κατανομή συχνοτήτων του άθροίσματος των μελετούμενων ουσιών στον ν. Λακωνίας

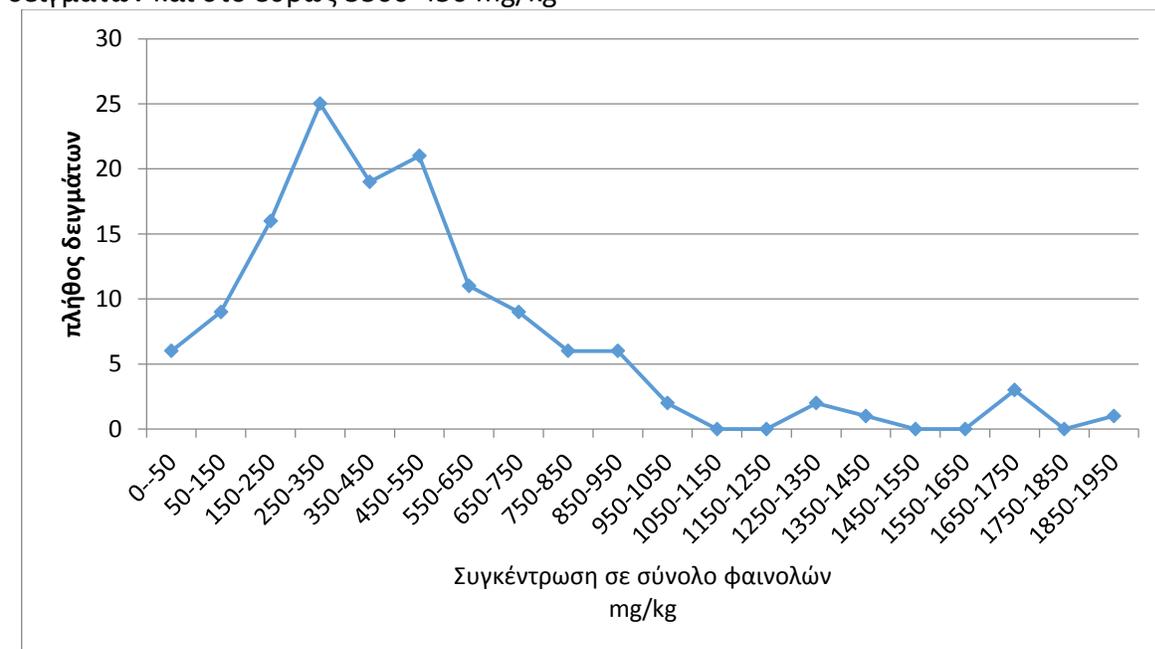
Και για την περιοχή της Λακωνίας μπορούμε να δούμε ότι τα ποσοστά των ελαιολάδων που επιτυγχάνουν το όριο των 250 mg/kg είναι πολύ υψηλό (75%), ενώ μπορούμε να ξεχωρίσουμε μια ομάδα ελαιολάδων με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 1000mg/kg (6%)



Διάγραμμα 4: Στατιστικά στοιχεία για περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες για τονομό Λακωνίας.

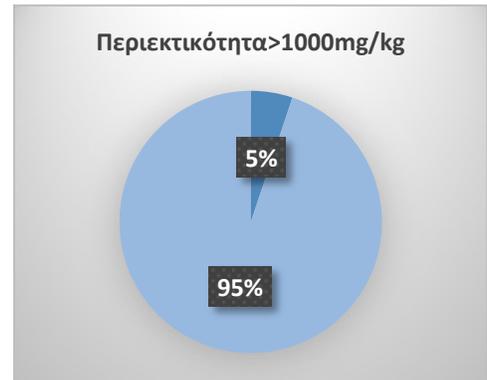
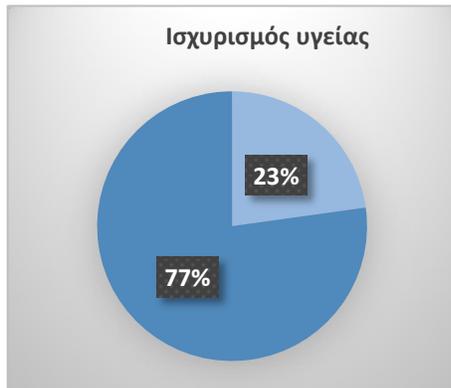
Στατιστική ανάλυση από τον νομό Μεσσηνίας.

Τέλος θα παρουσιάσουμε μερικά για την περιοχή της Μεσσηνίας όπου μελετήσαμε συνολικά 137 δείγματα ελαιολάδου. Από το γράφημα θα δούμε ότι η κατανομή συχνοτήτων έχει παρόμοια μορφή με αυτή του συγκεντρωτικού γραφίσματος και του νομού. Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης για το άθροισμα των φαινολικών ενώσεων είναι και εδώ από 250-350 mg/kg. Θα παρατηρήσουμε ότι στην περιοχή της Μεσσηνίας έχουμε επίσης υψηλό αριθμό δειγμάτων και στο εύρος 3500-450 mg/kg



Διάγραμμα 5: Κατανομή συχνοτήτων του αθροίσματος των μελετούμενων ουσιών στον ν. Μεσσηνίας

Για τον νομό Μεσσηνίας θα δούμε ότι το 77% των δειγμάτων ελαιολάδου έχουν συγκέντρωση μεγαλύτερη από το όριο που θέτει ο κανονισμός της ΕΕ ενώ το 5% των δειγμάτων έχουν περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 1000 mg/kg.



Διάγραμμα 6: Στατιστικά στοιχεία για περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες για το νομό Μεσσηνία.

7. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία παρουσιάσαμε την απομόνωση και περιγραφή με φασματοσκοπία NMR μιας σειράς ενώσεων τα οποία ανήκουν στην οικογένεια του άγλυκου της ελευρωπεΐνης και άγλυκο του λιγκοτροσίδη. Κάποιες από αυτές τις ενώσεις αναφέρονται για πρώτη φορά ως συστατικά του ελαιολάδου. Νέες ονομασίες όπως Ελαιοκορωνάλη, Ελαιομισσιονάλη, Ελευρωπεΐνδιάλη και Λιγκοτροδιάλη προτείνονται με σκοπό τον περιορισμό της σύγχυσης που δημιουργείται από την χρήση δύσχρηστων περιγραφικών και πολλές φορές λανθασμένων ονομασιών. Απευθείας φασματοσκοπική ανάλυση NMR σε ακέραιο ελαιόλαδο χωρίς να έχει προηγηθεί οποιαδήποτε επεξεργασία, αποδεικνύει ότι οι ενολικές μορφές των άγλυκων αποτελούν τα κυρίαρχα φαινολικά συστατικά σε ορισμένα ελαιόλαδα.

Ο πλήρης προσδιορισμός της δομής των νέων ενώσεων αλλά και η ευκολία λήψης δεδομένων ποσοτικού προσδιορισμού, προσδίδουν νέες προοπτικές στον τομέα του ποιοτικού ελέγχου των υγειοπροστατευτικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου. Η χαρτογράφηση της ελληνικής παραγωγής ως προς τις φαινολικές ουσίες επιβεβαιώνει την υψηλή διατροφική του ελληνικού ελαιολάδου.

9. Βιβλιογραφία

- [1] E. COMMISSION, «COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012,» *Official Journal of the European Union*, pp. 136/1-136/40, 2012.
- [2] Κ. Δ. Ε. & Μ. Τεχνολογίας, «Το ελαιόλαδο στον αρχαίο κόσμο,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.noesis.edu.gr/aet/thematic_areas/p40.html.
- [3] R. Ghanbari, F. Anwar, K.M. Alkharfy, A.-H. Gilani, N. Saari, «Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) – a review,» *International Journal of Molecule Science*, τόμ. 13, pp. 3291-3340, 2012.
- [4] Α. εταιρία, «Πρακτικά Αρχαιολογικής Εταιρείας,» pp. 23-24, 1903.
- [5] Α. Εταιρείας, «Πρακτικά Αρχαιολογικής Εταιρείας,» p. 88, 1906.
- [6] Κ. Δ. Ε. & Μ. Τεχνολογίας., «Μηχανισμοί για τη σύνθλιψη του ελαιοκάρπου,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.noesis.edu.gr/aet/thematic_areas/p44.html.
- [7] N. Frega, G. Lercker., «La composizione dei lipidi della drupadi olivo durante la maturazione.,» *Agrochimica* , τόμ. 29, pp. 300-307, 1985.
- [8] Τ. ο. ο. source, «The oliveoil source -chemical-characteristics,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.oliveoilsource.com/page/chemical-characteristics>.
- [9] D. Tura και Κ. Robards, «Sample handling strategies for the determination of biophenols in».
- [10] Wikipedia, «LLE extraction,» [Ηλεκτρονικό]. Available: wikipedia.org.
- [11] O. O. Maria Tasioula-Margari*, «Simultaneous determination of phenolic compounds and,» *Food Chemistry*, τόμ. 74, αρ. 3, pp. 377-383, 2001.
- [12] Pirisi, F. M. Cabras, P. Falqui Cao, C. Migliorini, M. Mugelli, « Phenolic compounds in virgin olive oil.,» *Agric. Food Chem*, τόμ. 48, pp. 1191-1196, 2000.
- [13] J. Klen και M. V. B., «Optimisation of olive oil phenol extraction conditions using a high-power probe ultrasonication.,» *Food Chem.*, τόμ. 134, αρ. 4, pp. 2481-2488, 2012.
- [14] G.F. Montedoro; M. Servilli; M. Bardioli; E. Miniati, *Agric. Food Chem.*, τόμ. 40, pp. 1571-1576, 1992.
- [15] F. Angerosa; N. D'Alessandro; P. Konstantinidou; L. Di Giacinto, *Agric. Food Chem*, τόμ. 43, pp. 1802-1807, 1995.
- [16] N. Cortesi, M. Azzolini, P. Rovellini, E. Fedeli, *Riv. Ital. Sost Grasse* , τόμ. 72, pp. 241-251, 1995.

- [17] E. Karkoula, A. Skantzari, E. Melliou και P. Magiatis, «Direct measurement of oleocanthal and oleacein.,» *J. Agric. Food Chem*, τόμ. 60, pp. 11696-11703, 2012.
- [18] Adhami, H.R., M. Zehl, C. Dangl, Dorfmeister, D., M. Stadler, E. Urban, P. Hewitson, Ignatova και K. L. & S., «Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPLC.,» *Food Chemistry* ,, τόμ. 170, pp. 154-159., 2015.
- [19] Lolita Liberatorea, Giuseppe Procidab, Nicola d'Alessandroa, Angelo Cichellia,, «Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil,» *Food Chemistry*, τόμ. 73, αρ. 1, p. 119–124, 2001.
- [20] J.J. R'ios, M.J. Gil, F. Guti'erez-Rosales, «Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products.,» *J Chromatogr A.*, τόμ. 1093, pp. 167-176, 2005.
- [21] [Ηλεκτρονικό]. Available:
http://www.isco.com/WebProductFiles/Applications/101/Poster_and_Paper_Reprints/Diol_Columns-Pretend_They're_Normal_Phase.pdf.
- [22] Lívia Kocúrová a, ☐, Ioseph S. Balogh b , Jana Šandrejová a , Vasil Andruch, «Recent Advances in Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Using Organic Solvents Lighter than Water. A Review,» *Microchemical Journal*, τόμ. 102, pp. 11-17, 2011.
- [23] Godoy-Caballero MP1,;Acedo-Valenzuela MI; Galeano-Díaz T., «New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromathography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection.,» *J Chromatogr A.*, τόμ. 1313, pp. 291-301, 2013.
- [24] M. Luz Pizarro, Mercedes Becerra, Ana Sayago, María Beltrán, Rafael Beltrán, «Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil,» *Food Analytical Methods*, τόμ. 6, αρ. 1, pp. 123-132, 2012.
- [25] T. Gutfinger, «Polyphenols in olive oils,» *Journal of the American Oil Chemists Society*, τόμ. 58, αρ. 11, pp. 966-968, 1981.
- [26] Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr., «Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.,» *American Society for Enology and Viticulture*, τόμ. 16, pp. 144-158, 1965.
- [27] G.Blekas; E. Psomiadou; M.Tsimidou; D. Boskou, «On the importance of total polar phenol measurement for monitoring the stability of Greek virgin olive oils,» *Eur. J.Lipid sci.*, τόμ. 104, pp. 340-346, 2002.
- [28] González, A. Escarpa και M.C., «Approach to the content of,» *Anal. Chim. Acta*, τόμ. 427, p. 119–127, 2001.

- [29] VL Singleton; R Orthofer; RM Lamuela- Raventos., «Methods in Enzymology,» *Packer L.*, τόμ. 299, pp. 152-178, 1999.
- [30] O. Folin και V. Ciocalteu, «Tyrosine and tryptophan determination in proteins,» *J. Biol. Chem.*, τόμ. 73, pp. 627-650, 1927.
- [31] L Cerretani; A Bendini; B Biguzzi; G Lercker; T G Toschi, «Evaluation of the oxidative stability of extra-virgin olive oils, obtained by different technological plants, with respect to some qualitative parameters,» *Industrie Alimentari*, τόμ. 427, αρ. 42, pp. 706-711, 2003.
- [32] A. V. Roncero, E. Graciani, Constante και R. M. Duran, «Phenolic compounds in olive fruits,» *Grasas Aceites*, τόμ. 25, pp. 269-279, 1974.
- [33] E. Ragazzi και Veronese, «Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation.,» *J. Cromatog.*, τόμ. 77, pp. 369-375, 1973.
- [34] C.Janer del Valle; A. Vazquez-Roncero; *Grasas Aceites*, «A study of the polar compounds in olive oil,» *Grasas Aceites*, τόμ. 31, p. 309–316, 1980.
- [35] M. Forcadelli, M.Cornas, X. Miquel και M. d. I. Torre, *Rev. Fr Corps Gras*, τόμ. 34, pp. 547-549, 1987.
- [36] Saitta M,;Lo Curto S,; Salvo F,; Di Bella G; Dugo G., «Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils,» *Anal. Chim. Acta*, τόμ. 466, pp. 335-344, 2002.
- [37] A. F., N. D’Alessandro, F. Corana και G. Mellerio, «Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry,» *J. Chromatogr. A*, τόμ. 736, p. 195–203, 1996.
- [38] A. C. M Solinas, «GLC and HPLC evaluation of phenolic substances of olive oil. Hypothetical role of tyrosol for the control of virgin olive oil quantity in mixtures with refined oil,» *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment*, τόμ. 11, pp. 223-230, 1982.
- [39] Graciani-Constante, E.; Vazquez-Roncero, A., «A study of the polar compounds in olive oil by high performance liquid chromatography 2. chromatography in inverse phase,» *Grasas y Aceites*, τόμ. 31, αρ. 4, pp. 237-243, 1980.
- [40] R. P, Azzolini M και C. N, «HPLC determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats,» *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, τόμ. 74, pp. 1-5, 1997.
- [41] Nergiz, C., and Unal, K, «Determination of phenolic acids in virgin olive oil,» *Food Chem*, τόμ. 39, p. 237–240, 1991.
- [42] M. Tsimidou, Papadopoulos και G. and Boskou, «Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection,» *Food Chem*, τόμ. 44, pp. 53-60, 1992.

- [43] Mateos R, Espartero JL, Trujillo M, Ríos JJ, León- Camacho M, Alcudia F, Cert , « Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection,» *J. Agr. Food Chem*, τόμ. 49, p. 2185–2192, 2001.
- [44] Brenes M; Garcia A; Rios JJ; García P; Garrido, «Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils.,» *Inter. J. Food Sci. Technol*, τόμ. 37, pp. 615-625, 2002.
- [45] G. Achilli; G.P. Cellerino; P.H. Hamache, *J. Chromatog*, τόμ. 632, pp. 11-117, 1993.
- [46] Kevin Robards¹, Xia Li¹, Michael Antolovich, Stephen Boyd, «Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids,» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, τόμ. 75, pp. 87-101, 1997.
- [47] Bianco, A; Buiarelli, F; Cartoni, G; Coccioli, F; Muzzalupo, I; Polidori, A; Uccella, N , «Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils,» *Anal. Letters*, τόμ. 34, pp. 1033-1051, 2001.
- [48] I. Vulcano, M. Halabalaki, L. Skaltsounis και M. Ganzera, «Quantitative analysis of pungent and anti-inflammatory phenolic compounds in olive oil by capillary electrophoresis.,» *Food Chemistry*, τόμ. 169, pp. 381-386., 2015.
- [49] I. Therios, «Olives-Crop production science in horticulture,» 2009, p. 29.
- [50] Andreadou ; Iliodromitis; E. Mikros; Constantinou; Agalias; Magiatis, P; Skaltsounis A.L; Kamber, E.; Tsantili-Kakoulidou; A.Kremastinos; D.Th.a, «The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits,» *Journal of Nutrition*, τόμ. 136, αρ. 8, pp. 2213-2219, 2008.
- [51] H. Hamdi και R. Castellon, «Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor.,» *Biochem Biophys Res Commun.*, τόμ. 334, αρ. 3, pp. 769-778, 2005.
- [52] Bisignano G; Tomaino A; Lo Cascio R; Crisafi G; Uccella N; Saija A., «On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol.,» *J Pharm Pharmacol*, τόμ. 51, αρ. 8, pp. 971-974, 1999.
- [53] Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou,, «A defence-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent.,» *J. Exp. Bot.*, p. doi:10.1093/jxb/erv002, 2015.
- [54] Christophoridou S. ; Dais, «Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy,» *Anal. Chim. Acta*, τόμ. 633, p. 283–292, 2009.

- [55] Limioli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., and Zetta, L., «¹H and ¹³C NMR characterisation of new oleuropein aglycone.,» *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, τόμ. 1, pp. 1519-1523, 1995.
- [56] Pérez-Trujillo, M., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Parella, «Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycon.,» *J. Agric. Food Chem*, τόμ. 58, pp. 9129-9136, 2010.
- [57] Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., and Magiatis, «Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers.,» *J. Agric. Food Chem.*, τόμ. 62, pp. 600-607, 2014.
- [58] F. Angerosa, C. F. d'Alessandro N. και G. and Mellerio, «Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography- chemical ionization mass spectrometry.,» *J. Chromatogr. A*, τόμ. 736, pp. 195-203, 1996.
- [59] A. De Nino, F. Mazzotti, E. Perri, A. Procopio, A. Raffaelli και G. and Sindona, «Virtual freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from Carolea and Coratina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry.,» *J. Mass Spec*, τόμ. 35, pp. 461-467, 2000.
- [60] Sanchez de Medina, V.; Priego-Capote, F.; Jimenez-Ot, C. ; Luque de Castro, M. D., «Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition.,» *J. Agric. Food Chem.*, τόμ. 59, pp. 11432- 11441, 2011.
- [61] Gomez-del-Campo και J. M. M. and Garcia, «Canopy Fruit Location Can Affect Olive Oil Quality in 'Arbequina' Hedgerow Orchards.,» *J. Am. Oil Chem. Soc.*, τόμ. 89, pp. 123-133, 2012.
- [62] Caliş, I.; Hosny, M.; Khalifa, T.; and Nishibe, S., «Secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*.,» *Phytochem.*, τόμ. 33, pp. 1453-1456, 1933.
- [63] Bianco; A. D. and Uccella, N., «Biophenolic components of olives.,» *Food Res. Intl.*, τόμ. 33, pp. 475-485, 2000.
- [64] Bianco, A. D.; Muzzalupo; I., Piperno; A., Romeo; G. and Uccella N., «Bioactive Derivatives of Oleuropein from Olive Fruits.,» *J. Agric. Food Chem.*, τόμ. 47, pp. 3531- 3534, 1999.
- [65] Bianco A. D.; Piperno, A.; Romeo G. and Uccella, N., «NMR Experiments of Oleuropein Biomimetic Hydrolysis.,» *J. Agric. Food Chem.*, τόμ. 47, pp. 3665-3668, 1999.
- [66] Paiva-Martins, F., Gordon, M. H., « Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) Leaves.,» *J. Agric. Food Chem.*, τόμ. 49, pp. 4214-4219, 2001.

- [67] E. K. K. a. M. P. 2. Melliou, « A New Ultra Rapid Screening Method for Olive Oil Health Claim Evaluation Using Selective Pulse NMR Spectroscopy From the book: Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. Royal Society of Chemistry».
- [68] M.Solinas,A.Cichelli, «Determination of phenolic substances in olive oil by GLC and HPLC. Possible role of tyrosol in the determination of the quantity of olive oil blends with refined oil.,» *Riv Soc. ItalSci. Aliment*, τόμ. 11, pp. 223-230, 1982.
- [69] O. J. o. t. E. Union, "COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012," *Official Journal of the European Union*, 2012.
- [70] E. COMMISSION, «COMMISSION REGULATION (EU) No 432/2012,» *Official Journal of the European Union*, pp. 136/1-136/40, 2012.
- [71] [Ηλεκτρονικό].



Oleokoronal and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil

Panagiotis Diamantakos¹, Angeliki Velkou², K. Brian Killday³, Thanasis Gimisis², Eleni Melliou^{1,4} and Prokopios Magiatis^{1,4,*}

¹ Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis-Zografou, Athens, Greece

² Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis-Zografou, Athens, Greece

³ Bruker BioSpin, Billerica, MA, USA

⁴ Department of Physiology and Biophysics, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

* Corresponding author. Tel.: +30 210 7274052. E-mail: magiatis@pharm.uoa.gr

Abstract

Extra virgin olive oil contains significant quantities of polar phenolic ingredients. The large majority is made up of esters of tyrosol or hydroxytyrosol with secoiridoid derivatives from oleuropein or ligstroside. In the current study we describe a number of new or incompletely characterized forms of ligstroside and oleuropein aglycons. Two of them which are stable enolic forms are described for the first time as real olive oil ingredients although their presence in olive oil had been postulated. To minimize the confusion with the complicated names of the aglycon isomers we propose the names oleokoronal and oleomissional for the two ingredients. After screening 2000 samples of olive oil from most major varieties we were able to identify samples of olive oil in which oleokoronal and oleomissional were the major phenolic ingredients and could be used as starting material for their isolation. Interestingly, during normal or reversed phase chromatography both compounds were transformed to the known forms of monoaldehydic closed ring aglycons, which offers an explanation as to why those compounds had not been identified so far. Their real presence in olive oil was confirmed by direct NMR observation without the use of any solvent.

Key words

Phenolics, secoiridoids, ligstroside aglycon, oleuropein aglycon, olive oil, NMR.