

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 1999 – 2000

ΖΕΡΒΑ Α. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΖΕΡΒΑ Ι. ΟΥΡΑΝΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ
(ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ) ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ
(ΤΥΡΙΑ – ΓΙΑΟΥΡΤΗ)

HO

Επιβλέποντες: Κος Ν. Ανδρικόπουλος
Κος Ν. Καλογερόπουλος

Τριμελής επιτροπή: Κος Ν. Ανδρικόπουλος
Κος Γ. Γιαννάκης
Κος Γ. Δεδούσης

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2000

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
2. ΟΡΟΛΟΓΙΑ	5
3. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	5
4. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΔΙΑΒΗΤΗΣ	6
5. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ	6
6. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	7
7. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	7
8. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	10
9. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	12
10. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	13
11. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	14
12. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	15
13. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	16
14. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ	19
15. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΣΤΕΡΟΛΗΪΑ	21
16. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΙΣΟΥΝ ΤΗΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ	21
17. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ - ΠΑΡΑΛΛΗΛΗ	22
18. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΣΤΕΡΟΛΗΪΑ ΑΠΟ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΡΧΑΙΑ	23
19. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΠΟΤΗΡΙΩΝ ΠΑΡΑΤΕΙΝΩΝ ΣΤΕΡΟΛΗΪΑ	24
20. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	25
21. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΤΗΣ ΠΕΡΙΜΑΤΩΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	27
22. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΤΩΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	29
23. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ ΤΩΝ ΤΥΡΙΑ - ΤΥΡΙΑ	29
24. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	30
25. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	30
26. ΧΟΛΗΤΕΡΟΛΗΪΑ	31

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ.....	6
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΣΤΕΡΟΛΩΝ - ΣΗΜΑΣΙΑ.....	6
2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ - ΔΟΜΗ ΣΤΕΡΟΛΩΝ	6
2.3 ΡΟΛΟΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ	8
2.3.1 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ	8
2.3.2 ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ	10
2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ.....	11
2.4.1 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ	11
2.4.2 ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ	14
2.4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ - ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΩΝ.....	15
2.5 ΠΗΓΕΣ	17
2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	19
2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ	21
2.7.1 ΕΙΔΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΧΟΥΝ ΓΙΝΕΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΕΡΟΛΩΝ.....	21
2.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ - ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ.....	22
2.7.3 ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΟΛΙΚΑ ΛΙΠΙΔΙΑ.....	23
2.7.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ.....	24
2.7.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	25
3. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	27
4.1 ΕΙΔΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	29
ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΤΥΡΙΑ – ΓΙΑΟΥΡΤΗ	29
4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	30
4.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ	30
4.4 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	31

4.4α ΓΕΝΙΚΑ.....	31
4.4β ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΜΕ GC	33
4.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	33
4.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	34
4.7 ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΗ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ.....	35
Α. ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	35
Β. ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	35
4.8 ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ.....	35
4.8α ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	36
4.8β ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ	40
4.9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ	43
4.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΩΝ ΜΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΗ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΩΝ.....	45
4.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	48
4.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΦΡΑΣ	48
4.13 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΑΤΟΣ.....	49
4.14 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	49
4.15 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΥΣ.....	50
ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	50
4.16 ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΥΣ.....	51
ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	51
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
5.1 ΥΓΡΑΣΙΑ – ΛΙΠΟΣ – ΠΡΩΤΕΪΝΗ – ΤΕΦΡΑ – ΑΛΑΤΙ	52
5.2 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ΣΕ mg/100g ΤΡΟΦΙΜΟΥ.....	58
5.2.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΝΩΠΩΝ ΚΑΙ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΤΗΣ.....	61
5.2.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ - ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΤΗΣ. 62	

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά το Ακαδημαϊκό Έτος 1999-2000.

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την τριμελή επιτροπή της πτυχιακής μας μελέτης, τους κ.κ. Ανδρικόπουλο Νικόλαο, Δεδούση Γεώργιο και Γιαννάκη Ιωάννη και ιδιαιτέρως τους επιβλέποντες κ.κ. Ανδρικόπουλο Νικόλαο και Καλογερόπουλο Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθειά τους, τόσο στο πειραματικό μέρος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσης εργασίας.

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης εργασίας, είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας προσαρμοσμένης στις δυνατότητες του Εργαστηρίου Τροφίμων για τον προσδιορισμό χοληστερόλης σε Ελληνικά τρόφιμα, δεδομένου ότι σε αυτά δεν υπάρχει συστηματική μελέτη χοληστερόλης. Τρεις διαφορετικές τεχνικές εφαρμόστηκαν σε νωπά δείγματα τυριών εμπορίου και σε λυοφιλιωμένα δείγματα τυριών και γιαούρτης. Η παραλαβή της χοληστερόλης έγινε με:

- 1) Απευθείας σαπωνοποίηση λυοφιλιωμένων δειγμάτων εν θερμώ.
- 2) Απευθείας σαπωνοποίηση νωπών δειγμάτων με ήπιες συνθήκες.
- 3) Εκχύλιση λιπαρών από νωπό τρόφιμο και εν συνεχεία σαπωνοποίηση.

Η χοληστερόλη προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία (συσκευή ανάλυσης GC) κάτω από ειδικές λειτουργικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρατίθενται σε ανάλογους πίνακες και γίνεται ανάλυση και σύγκριση των αποτελεσμάτων τόσο μεταξύ τους, όσο και σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Τέλος, επιχειρείται μια αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και της πειραματικής μεθόδου γενικότερα.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

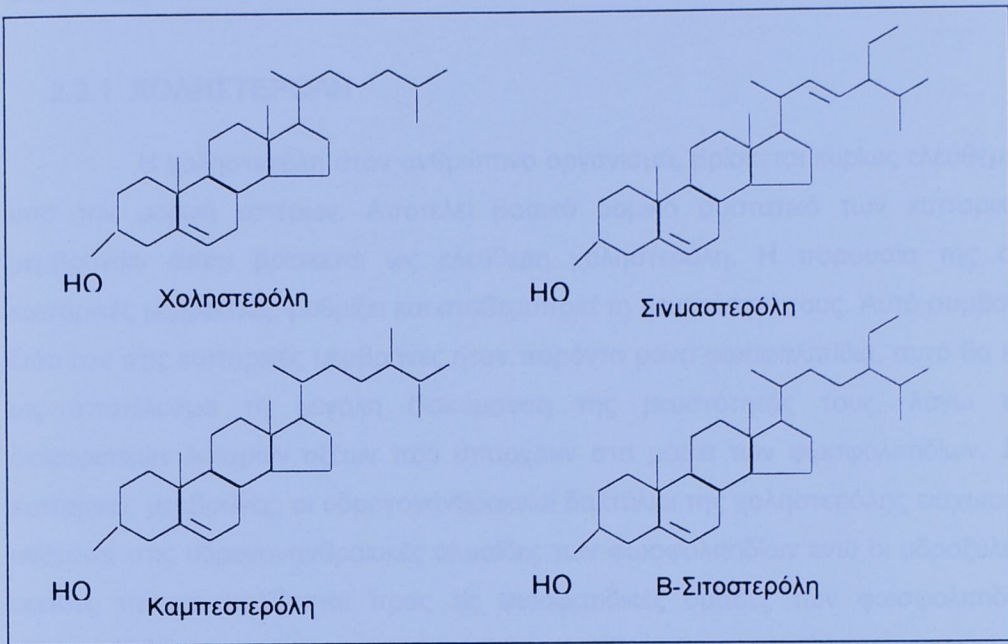
2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΣΤΕΡΟΛΩΝ - ΣΗΜΑΣΙΑ

Η μελέτη και ο προσδιορισμός των στερολών (ζωικών-φυτικών) σε εδώδιμα προϊόντα, αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας, δεδομένου ότι τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα είναι ένας από τους τεκμηριωμένους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Στις μέρες μας εξάλλου, τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν το κύριο αίτιο θανάτου στις περισσότερες ανεπτυγμένες και σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες. Τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα μπορούν να μειωθούν με διατροφή φτωχή σε κεκορεσμένα λίπη, πλούσια σε πολυακόρεστα και χαμηλή σε χοληστερόλη. Παράλληλα, έχει επισημανθεί και ο ευεργετικός ρόλος των φυτικών στερολών που αποτελούν φυσικά συστατικά των φυτικών ελαίων. Πράγματι, οι φυτοστερόλες έχουν αναγνωριστεί εδώ και τουλάχιστον τέσσερις δεκαετίες, για τη δυνατότητα επίδρασής τους στη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα.

2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ - ΔΟΜΗ ΣΤΕΡΟΛΩΝ

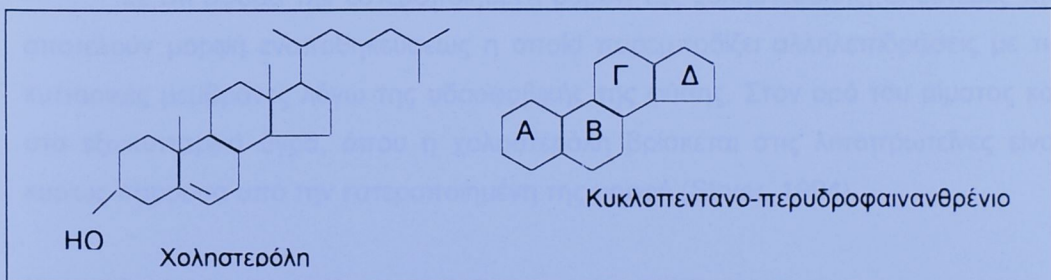
Οι στερόλες είναι ευρύτατα διαδεδομένες στη φύση και παράγονται τόσο από ζωικούς όσο και από φυτικούς οργανισμούς. Είναι δυνατόν να βρίσκονται στη φύση είτε ελεύθερες είτε με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιδίων. Όλες οι στερόλες έχουν μια ειδική χημική δομή, δηλαδή ένα παρόμοιο σκελετό αποτελούμενο από τέσσερις στεροειδείς δακτυλίους και μια αλκοολική ομάδα. Ανάλογα με τη δομή τους αυτή, μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες ομάδες: 4-δεσμεθυλστερόλες (χωρίς μεθυλομάδες), 4-μονομεθυλστερόλες (μια μεθυλομάδα), 4,4-διμεθυλστερόλες (δύο μεθυλομάδες). Η χοληστερόλη ανήκει στην ομάδα των 4-διμεθυλστερολών, όπως και οι πιο κοινές φυτοστερόλες που απαντώνται στα τρόφιμα και ειδικότερα η β-σιτοστερόλη, η καμπεστερόλη και η σιγμαστερόλη (βλ. σχήμα 1).

Σχήμα 1 : Οι συχνότερα απαντώμενες στερόλες στα τρόφιμα.



Στις λιπαρές ύλες βρίσκονται στερόλες (χοληστερόλη, φυτοστερόλες) με 27 έως 29 συνήθως άτομα άνθρακα. Όλες οι στερόλες αυτές έχουν OH στον άνθρακα 3 και είναι παράγωγα του κυκλοπεντανο-περυδροφαινανθρενίου (βλ. σχήμα 2). Άλλο χαρακτηριστικό τους είναι ότι οι δακτύλιοι Β και Γ είναι συνδεδεμένοι με μορφή ανακλίντρου - με τον trans τρόπο - προς τους δακτυλίους Α και Δ.

Σχήμα 2 : Χημική δομή χοληστερόλης και κυκλοπεντανο-περυδροφαινανθρενίου.



Τέλος οι στερόλες είναι μόνο κατά 2% περίπου λιποδιαλυτές και πρακτικά αδιάλυτες στο νερό καθώς αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ασαπωνοποιήτων συστατικών σε πολλά λίπη και έλαια (Gunstone et al, 1994).

2.3 ΡΟΛΟΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ

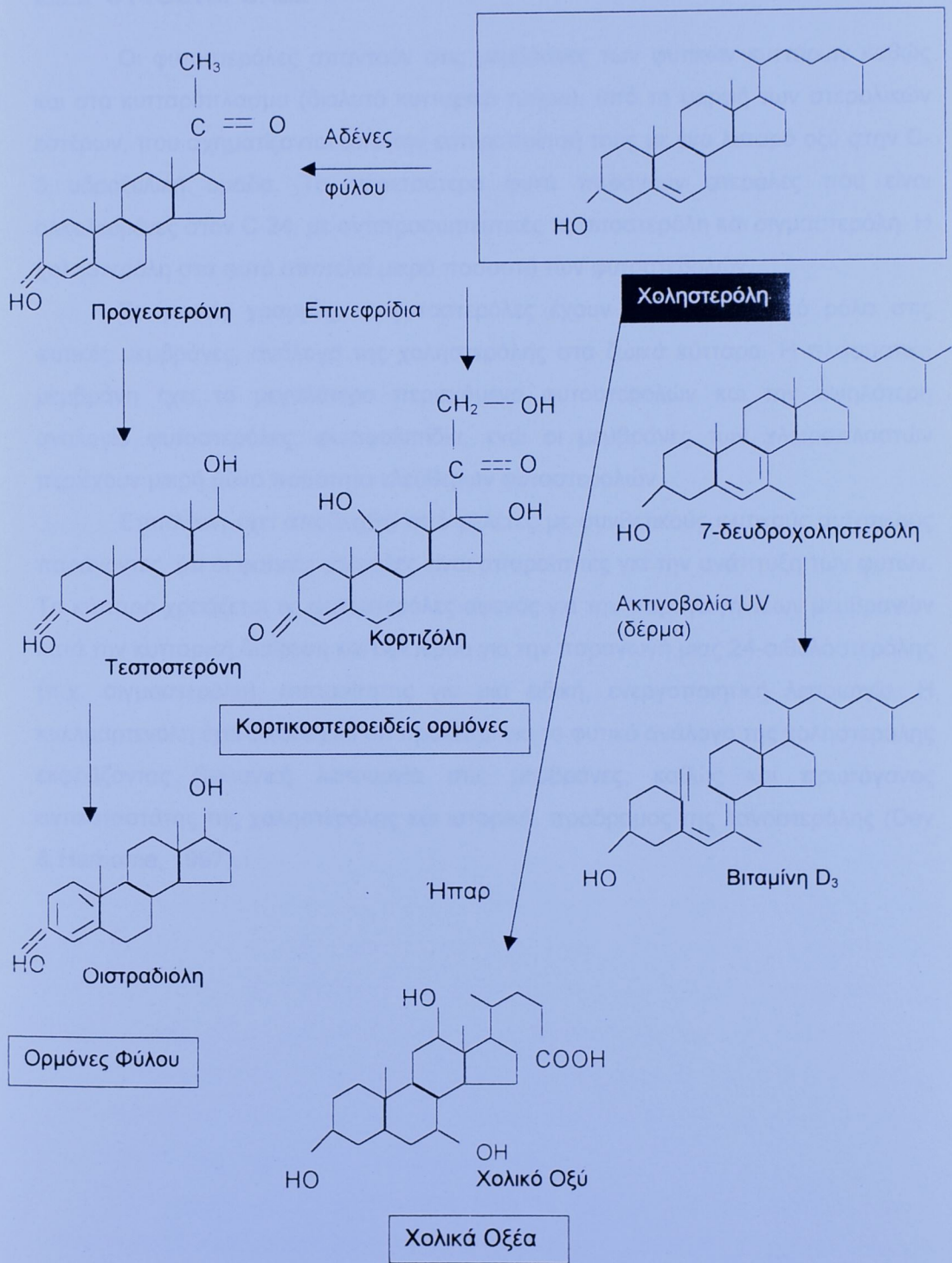
2.3.1 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

Η χοληστερόλη στον ανθρώπινο οργανισμό, βρίσκεται κυρίως ελεύθερη ή υπό την μορφή εστέρων. Αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών όπου βρίσκεται ως ελεύθερη χοληστερόλη. Η παρουσία της στις κυτταρικές μεμβράνες, ρυθμίζει και σταθεροποιεί τη ρευστότητά τους. Αυτό συμβαίνει διότι εάν στις κυτταρικές μεμβράνες ήταν παρόντα μόνο φωσφολιπίδια, αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διακύμανση της ρευστότητάς τους, λόγω των διαφορετικών λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα μόρια των φωσφολιπιδίων. Στις κυτταρικές μεμβράνες, οι υδρογονανθρακικοί δακτύλιοι της χοληστερόλης εισχωρούν ανάμεσα στις υδρογονανθρακικές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων ενώ οι υδροξυλικές ομάδες προσανατολίζονται προς τις φωσφατιδικές ομάδες των φωσφολιπιδίων (Stryer, 1994).

Μια άλλη λειτουργία της χοληστερόλης στον οργανισμό, είναι η συμμετοχή της στη σύνθεση στεροειδών ενώσεων. Η χοληστερόλη αποτελεί πρόδρομη ουσία για τη σύνθεση: α) χολικών οξέων, τα οποία διευκολύνουν τη γαλακτωματοποίηση και απορρόφηση του λίπους β) ορμονών αναπαραγωγής, όπως οιστρογόνα, ανδρογόνα και προγεστερόνη, οι οποίες ρυθμίζουν ποικίλες λειτουργίες του οργανισμού γ) αδρενοκορτικοειδών ορμονών (κορτιζόλη) και δ) βιταμίνης D₃ (σχήμα 3) (Groff et al, 1995).

Σε ότι αφορά την εστεροποιημένη μορφή της χοληστερόλης, οι εστέρες της αποτελούν μορφή εναποθηκεύσεως η οποία παρεμποδίζει αλληλεπιδράσεις με τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω της υδροφοβικής της φύσης. Στον ορό του αίματος και στα εξωκυτταρικά υγρά, όπου η χοληστερόλη βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες είναι κυρίως παρούσα υπό την εστεροποιημένη της μορφή (Stryer, 1994).

Σχήμα 3 : Ο σχηματισμός των σημαντικότερων στεροειδών από την χοληστερόλη



2.3.2 ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ

Οι φυτοστερόλες απαντούν στις μεμβράνες των φυτικών κυττάρων καθώς και στο κυτταρόπλασμα (διαλυτό κυτταρικό τμήμα), υπό τη μορφή των στερολικών εστέρων, που σχηματίζονται από την εστεροποίησή τους με ένα λιπαρό οξύ στην C-3 υδροξυλική ομάδα. Τα περισσότερα φυτά παράγουν στερόλες που είναι αλκυλιωμένες στον C-24, με αντιπροσωπευτικές τη σιτοστερόλη και σιγμαστερόλη. Η χοληστερόλη στα φυτά αποτελεί μικρό ποσοστό των φυτοστερολών.

Σε γενικές γραμμές, οι φυτοστερόλες έχουν κυρίαρχα δομικό ρόλο στις φυτικές μεμβράνες, ανάλογο της χοληστερόλης στα ζωικά κύτταρα. Η πλασματική μεμβράνη έχει το μεγαλύτερο περιεχόμενο φυτοστερολών και την υψηλότερη αναλογία φυτοστερόλες: φωσφολιπίδια, ενώ οι μεμβράνες των χλωροπλαστών περιέχουν μικρή μόνο ποσότητα ελεύθερων φυτοστερολών.

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί από μελέτες με συνθετικούς φυτικούς αυξητικούς παράγοντες, ότι οι φυτικές στερόλες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των φυτών. Το κύτταρο χρειάζεται τις φυτοστερόλες αφενός για την παραγωγή νέων μεμβρανών κατά την κυτταρική διαίρεση και αφετέρου για την παραγωγή μιας 24-αιθυλοστερόλης (π.χ. σιγμαστερόλη), απαραίτητης για μια ειδική, ενεργοποιητική λειτουργία. Η κυκλοαρτενόλη έχει αποδειχτεί ότι πρόκειται για το φυτικό ανάλογο της χοληστερόλης εκφράζοντας βιολογική λειτουργία στις μεμβράνες, καθώς και πρωτόγονος αντικαταστάτης της χοληστερόλης και ιστορικά, πρόδρομος της λανοστερόλης (Dey & Harborne, 1997).

2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

2.4.1 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

Η μέση ημερήσια πρόσληψη χοληστερόλης στη Δυτική διατροφή κυμαίνεται μεταξύ 250-500mg/dl ημερησίως. Η πέψη και η απορρόφησή της σχετίζεται με εκείνες του λίπους. Τα σφαιρίδια του λίπους κατακερματίζονται σε μικρότερους σχηματισμούς με τη μάσηση, τις μυϊκές συσπάσεις του εντερικού τοιχώματος και τη γαλακτωματοποίηση από φωσφολιπίδια (2% του λίπους στη τροφή). Αυτό επιτρέπει στα τριγλυκερίδια (ο κύριος τύπος λίπους στη τροφή), να υποβληθούν στη διαδικασία της πέψης από το λιπολυτικό ένζυμο λιπάση, παρουσία και χολικών αλάτων, προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων, μονογλυκεριδίων και γλυκερόλης.

Ποσοστό 10-15% της διαιτητικής χοληστερόλης είναι στη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των εστέρων χοληστερόλης μετατρέπεται από την παγκρεατική εστεράση της χοληστερόλης σε ελεύθερη χοληστερόλη, πριν την απορρόφηση, αν και μικρό κλάσμα των εστέρων της χοληστερόλης μπορεί να απορροφηθεί χωρίς προηγούμενη υδρόλυση. Το 1/3 της χοληστερόλης στον εντερικό αυλό προέρχεται από τη διατροφή, ενώ το υπόλοιπο προέρχεται από τη χοληστερόλη του χολικού υγρού και από απεκκρινόμενα ή αποβαλλόμενα εντερικά κύτταρα. Η χοληστερόλη που προέρχεται από τις δυο τελευταίες πηγές, δεν είναι εστεροποιημένη.

Η πρόσληψη λίπους, οδηγεί στην έκκριση ορμονών, όπως η χολοκυστοκινίνη που προκαλούν την έκκριση χολής από τη χοληδόχο κύστη, εντός του 12δακτύλου. Η χολή, αποτελείται από νερό, ηλεκτρολύτες, φωσφολιπίδια, σωματίδια χολής, χοληστερόλη και άλατα των χολικών οξέων (μεταβολίτες της χοληστερόλης). Τα χολικά άλατα, είναι απαραίτητα για τη μεταφορά της χοληστερόλης και των προϊόντων της πέψης των λιπών μέσω της υδάτινης στιβάδας που καλύπτει τα κύτταρα του εντέρου. Το ένα άκρο της δομής των χολικών αλάτων είναι πολικό, ενώ το άλλο δεν είναι (Guyton, 1990).

Το σημείο της απορρόφησης είναι το άνω τμήμα της νήστιδας, με τα μονογλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα να απορροφώνται πριν από τη χοληστερόλη. Η

χολικής προέλευσης χοληστερόλη, μπορεί να απορροφάται καλύτερα από ότι η διαιτητική χοληστερόλη, επειδή η πρώτη είναι ήδη διαλυμένη εντός των μικκυλίων όταν εκκρίνεται χολή. Ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς της χοληστερόλης και των λιπιδίων εντός των εντερικών κυττάρων είναι άγνωστος. Τα λιπιδικά μόρια, πιθανώς μεταφέρονται από ένα μεικτό μικκύλιο σε άλλο, μέσω μιας διεργασίας που πιθανώς υποβοηθείται από μια διαβάθμιση του ΡΗ (οξύτητα) από το κέντρο του εντερικού αυλού προς τα κύτταρα. Τα μικτά μικκύλια, δεν απορροφώνται ακέραια. Τα λίπη συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, περνούν στα κύτταρα μέσω της ψυκτροειδούς παρυφής (brush border) του εντέρου, πιθανώς μετά από πρωτεϊνική δέσμευση και τη μεσολάβηση μηχανισμών παθητικής μεταφοράς. Περισσότερο από το 95% των χολικών αλάτων επαναπορροφώνται στο τελικό τμήμα του ειλεού, απ' όπου μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας μεταφέρονται πίσω στο ήπαρ για επαναχρησιμοποίηση (εντεροηπατική κυκλοφορία).

Εντός των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου, λαμβάνει χώρα εστεροποίηση της χοληστερόλης με λιπαρά οξέα - σε ποσοστό 70-90% - και σχηματισμός τριγλυκεριδίων από μονογλυκερίδια και λιπαρά οξέα. Οι εστέρες της χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια, συνενώνονται με απο-πρωτεΐνες προς σχηματισμό λιποπρωτεϊνών των χυλομικρών. Αυτές, εκκρίνονται στη συνέχεια εντός του λεμφικού συστήματος και μεταφέρονται στο θωρακικό πόρο, απ' όπου εισάγονται στη κυκλοφορία του αίματος για μεταβολισμό.

Ποσοστό 30-50% της διαιτητικής χοληστερόλης, απορροφάται πλήρως. Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση της χοληστερόλης περιλαμβάνονται: η κινητικότητα του εντέρου, γενετικοί παράγοντες (π.χ. φαινότυποι της απολιποπρωτεΐνης E) και η πρόσληψη λιπών, χοληστερόλης και φυτικών στερολών κατά τη θρέψη. Το ποσό της απορροφούμενης χοληστερόλης, λειτουργεί ως αρνητικός βιοαναδραστικός παράγοντας πάνω στο ρυθμό σύνθεσης της χοληστερόλης από το οργανισμό, δηλαδή όσο μεγαλύτερες ποσότητες χοληστερόλης απορροφώνται τόσο λιγότερες συντίθενται και αντιστρόφως. Συνεπώς, η μείωση της πρόσληψης διαιτητικής χοληστερόλης, έχει περιορισμένη επίδραση επί του επιπέδου της χοληστερόλης στο αίμα (Guyton, 1984 - Mahan et al, 1994).

Η χοληστερόλη που συντίθεται στον ανθρώπινο οργανισμό, προέρχεται από το ακέτυλο-CoA, το οποίο με τη σειρά του προκύπτει από τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων ή από τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων ή από τον καταβολισμό των υδατανθράκων. Η σύνθεση της χοληστερόλης πραγματοποιείται στο ήπαρ μέσω μιας πολύπλοκης πορείας που περιλαμβάνει τη δράση περισσότερων από 30 ενζύμων. Περιληπτικά, στα αρχικά στάδια, 3 μόρια ακέτυλου-CoA συμπυκνώνονται προς σύνθεση μεβαλονικού οξέος. Περαιτέρω συμπυκνώσεις, έχουν σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση του σκουαλενίου. Η ανθρακική αλυσίδα του σκουαλενίου κυκλοποιείται και κατ' αυτό το στάδιο συντίθεται η λανοστερόλη η οποία σε μεταγενέστερα στάδια μετατρέπεται σε χοληστερόλη. Το κυριότερο ένζυμο στη σύνθεση χοληστερόλης, είναι αυτό που καταλύει την αντίδραση προς σύνθεση μεβαλονικού από το HMG-CoA (3'υδροξυ3-μεθυλογλουτάρυλ-συνενζύμοA) και ονομάζεται HMG-CoA ρεδουκτάση. Αυτό το ένζυμο υπεισέρχεται σε μηχανισμό ανάδρασης κατά τον οποίο όταν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης αυξάνεται, η σύνθεση και η δραστηριότητα του ενζύμου μειώνονται, ενώ όταν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης είναι χαμηλή, η σύνθεση και η δραστηριότητά του αυξάνεται (Metzler, 1997).

Στο αίμα, τόσο η ενδογενής όσο και η διαιτητική χοληστερόλη μεταφέρονται υπό μορφή συμπλόκων λιποπρωτεϊνών που ποικίλουν ανάλογα με τη λειτουργία και τη πυκνότητά τους. Περίπου το 70% της ολικής χοληστερόλης αίματος μεταφέρονται από το ήπαρ προς τους ιστούς εντός λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Τα αυξημένα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας καρδιοπάθειας. Οι LDL, μπορούν να προσληφθούν από την κυκλοφορία μέσω υποδοχέων που εκφράζονται επί της επιφάνειας των κυττάρων. Το ποσό της χοληστερόλης που ήδη βρίσκεται εντός του κυττάρου καθορίζει τον αριθμό / αποτελεσματικότητα αυτών των υποδοχέων. Την ίδια επίδραση έχουν, επίσης, οι γενετικοί παράγοντες και η διατροφή.

Οι LDL που έχουν τροποποιηθεί μέσω οξειδώσεως απομακρύνονται από την κυκλοφορία εντός μακροφάγων, μέσω της "οδού εκκάθαρσης". Αυτή η οδός της τροποποιημένης LDL χοληστερόλης πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη συσσώρευση των αθηρωματικών πλάκων που εν μέρει ευθύνονται για την απόφραξη των αιμοφόρων

αγγείων της καρδιάς. Μεγάλο μέρος του υπολοίπου 30% της χοληστερόλης του αίματος μεταφέρεται από τους ιστούς του οργανισμού (π.χ. αρτηριακό τοίχωμα, μύες) προς το ήπαρ εντός λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), για να μεταβολισθεί ή να αποβληθεί στη χολή. Αυτή η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, είναι το μέσο με το οποίο οργανισμός αποβάλλει την υπερβάλλουσα ποσότητα κυτταρικής χοληστερόλης. Τα υψηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης συσχετίζονται με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας καρδιοπάθειας. Τα φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα είναι <200mg/dL (Groff et al, 1995 - Mahan et al, 1994).

2.4.2 ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ

Η απορρόφηση των προσλαμβανόμενων φυτοστερολών στη κυκλοφορία του αίματος είναι πολύ χαμηλή, για παράδειγμα η απορρόφηση της β-σιτοστερόλης είναι λιγότερο από 5%. Όμως, πιστεύεται ότι το ποσοστό της απορρόφησης μειώνεται καθώς αυξάνεται η πρόσληψη των φυτικών στερολών. Για παράδειγμα, η κατά 10 φορές αύξηση της πρόσληψης φυτοστερολών (δηλαδή πρόσληψη περίπου 3gr/ημέρα) έχει συσχετιστεί με μόνο κατά δυο φορές αύξηση των επιπέδων στο αίμα, χωρίς να αναφέρονται ανεπιθύμητες παρενέργειες. Οι φυτοστερόλες αποτελούν ποσοστό <1% του συνολικού ποσού στερολών στο αίμα (η χοληστερόλη είναι η κυριότερη στερόλη στο αίμα) (Child, 1987).

Οι φυτοστερόλες οι οποίες έχουν απορροφηθεί, μεταφέρονται εντός χυλομικρών μαζί με τους εστέρες της χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια και παραμένουν στα υπολείμματα των χυλομικρών όταν τα τριγλυκερίδια προσλαμβάνονται από τους ιστούς του οργανισμού. Στη συνέχεια τα υπολείμματα των χυλομικρών προσλαμβάνονται από το ήπαρ και οι φυτοστερόλες μαζί με ορισμένες ποσότητες χοληστερόλης αποβάλλονται εντός της χολής. Στην πράξη οι φυτοστερόλες αποβάλλονται εντός της χολής πιο αποτελεσματικά απ' ότι η χοληστερόλη. Η αποβολή των φυτικών στερολών μέσω αυτής της οδού είναι

εξαιρετικά αποτελεσματική, καθώς οδηγεί σε αποβολή του συνόλου σχεδόν της διαιτητικής πρόσληψης δια μέσου των κοπράνων.

Μια πολύ σπάνια παθολογική κατάσταση που σχετίζεται με το μεταβολισμό των φυτοστερολών είναι η φυτοστερολαιμία. Οι πάσχοντες παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα απορρόφησης φυτικών στερολών και μειωμένη ικανότητα αποβολής τους μέσω της χολής, συνεπώς, έχουν πολύ υψηλά επίπεδα φυτοστερολών στο αίμα και είναι ευαίσθητοι σε πρόωρη αθηροσκλήρωση (Child, 1987 - Ling et al, 1995).

2.4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ - ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΩΝ

Έχει παρατηρηθεί από διάφορες μελέτες, ότι η κατανάλωση φυτικών ελαίων οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα απ' ότι θα δικαιολογούσε η σύνθεσή τους σε λιπαρά οξέα. Αργότερα, αποδείχτηκε ότι το γεγονός αυτό οφείλεται στις φυτοστερόλες που περιέχουν τα φυτικά έλαια.

Οι φυτοστερόλες, μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα μέσω της μείωσης της απορρόφησής της από το έντερο. Η αναστολή της απορρόφησης της χοληστερόλης από τις φυτοστερόλες, σχετίζεται με τις ομοιότητες τους όσον αφορά στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Πιστεύεται γενικά, ότι η απορρόφηση της χοληστερόλης αναστέλλεται από τις φυτοστερόλες μέσω δυο πιθανών μηχανισμών:

1. Καθίζηση της χοληστερόλης και των φυτικών στερολών
2. Ανταγωνισμός για χώρο στα μεικτά μικκύλια (Jones et al, 1997).

Στον εντερικό αυλό, η χοληστερόλη συνυπάρχει σε διάλυμα με άλλα λιπαρά. Όμως, καθώς τα μονογλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα απορροφώνται από το έντερο, αυξάνει η συγκέντρωση των ουσιών που απορροφούνται δυσκολότερα, π.χ. των στερολών. Όταν η συγκέντρωσή τους φτάνει σε ένα κρίσιμο επίπεδο, μπορεί να απομακρυνθούν από το διάλυμα σχηματίζοντας κρυστάλλους (δηλαδή να καθιζήσουν). Αυτό μπορεί να συμβεί με τη χοληστερόλη και τις φυτοστερόλες λόγω της παρόμοιας δομής τους. Τόσο η χοληστερόλη όσο και οι φυτοστερόλες στην ελεύθερη κατάσταση δεν έχουν μεγάλη διαλυτότητα, ούτε στα λίπη, ούτε στα μεικτά μικκύλια (Child, 1987).

Στην πραγματικότητα, η παρουσία της μιας κατηγορίας στερολών περιορίζει τη διαλυτότητα της άλλης. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα των φυτοστερολών (σημείωση: οι φυτοστερόλες σχεδόν δεν απορροφώνται), τόσο χαμηλότερη είναι η διαλυτότητα και ίσως υψηλότερη η καθίζηση της χοληστερόλης. Να σημειωθεί, ότι η χοληστερόλη στην κρυσταλλική της μορφή δεν απορροφάται.

Επιπλέον, υπάρχει περιορισμένη χωρητικότητα στα μικκύλια για τη μεταφορά της χοληστερόλης. Ενώσεις με δομή παρόμοια με αυτή της χοληστερόλης, την ανταγωνίζονται για την κατάληψη αυτού του χώρου. Κατά συνέπεια τα αυξανόμενα ποσά των φυτικών στερολών, έχουν ως αποτέλεσμα όλο και χαμηλότερα ποσά χοληστερόλης στα μεικτά μικκύλια και επομένως μειωμένη απορρόφηση της χοληστερόλης (Jones et al, 1997 - Wester, 2000).

Σε ότι αφορά την επίδρασή τους στα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών του αίματος, οι φυτοστερόλες δεν προκαλούν μείωση της HDL - χοληστερόλης, ενώ μειώνουν τα επίπεδα της LDL - χοληστερόλης, γεγονός πολύ σημαντικό για τη μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων, δεδομένου ότι όσο χαμηλότερος είναι ο λόγος LDL / HDL χοληστερόλης, τόσο καλύτερη είναι η προστασία του οργανισμού έναντι των καρδιοπαθειών. Η μείωση της LDL - χοληστερόλης, μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων μηχανισμών που πιθανώς σχετίζονται με τη σύνθεση της χοληστερόλης (Wester, 2000).

Καθώς οι φυτοστερόλες αναστέλλουν την απορρόφηση της χοληστερόλης, στην πραγματικότητα προκαλούν μια αύξηση της παραγωγής χοληστερόλης από το ήπαρ. Αυτός ο «αντισταθμιστικός» μηχανισμός όμως, σαφώς δεν επαρκεί, καθώς στοιχεία ερευνών σταθερά αποδεικνύουν ότι το συνολικό αποτέλεσμα της αυξημένης πρόσληψης φυτοστερολών είναι η μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα.

Έχει προταθεί, ότι η αυξημένη σύνθεση χοληστερόλης στο ήπαρ η οποία οφείλεται εμμέσως στην πρόσληψη φυτικών στερολών, επιδρά στο μεταβολισμό των απολιποπρωτεϊνών που ανευρίσκονται στις LDL, όπως της απολιποπρωτεΐνης Β. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι επειδή η αυξημένη

σύνθεση χοληστερόλης δεν αντισταθμίζει το μειωμένο ποσό χοληστερόλης στο ήπαρ, η πρόσληψη της LDL από το αίμα στο ήπαρ αυξάνεται και αντίστοιχα αυξάνεται ο αριθμός υποδοχέων LDL που εκφράζονται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων (Jones et al, 1997).

2.5 ΠΗΓΕΣ

Οι πηγές της χοληστερόλης είναι κυρίως τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως κρόκος αυγού, κρέας, ψάρι, πουλερικά και γαλακτοκομικά προϊόντα μη αποβουτυρωμένου γάλακτος. Οι περιεκτικότητες διαφόρων τροφίμων σε χοληστερόλη, δίνονται στον πίνακα 1:

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα διαφόρων τροφών σε χοληστερόλη (Καφάτος και συνεργάτες, 1990)

ΤΡΟΦΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ (mg)
Γαλακτοκομικά προϊόντα:		
Γάλα:		
μη αποβουτυρωμένο	1 φλυτζάνι (240 gr)	33
αποβουτυρωμένο	»	4
Τυρί:		
cheddar	30 gr	30
cottage (με κρέμα)	1 φλυτζάνι	31
cottage (χωρίς κρέμα)	1 φλυτζάνι	10
mozzarella (απο ημιαποβουτυρωμένο γάλα)	30 gr	16
«ελαφριά» τυριά (1% λιπαρά)	30 gr	1.5
Λίπη και έλαια:		
φυστικοβούτυρο	2 κουτ.σούπας	0
μπέικον (ψημένο)	2 φέτες	11
βούτυρο	1 κουτ.σούπας	31
ηλιέλαιο	1 κουτ.σούπας	0
καλαμποκέλαιο	1 κουτ.σούπας	0

Κρέας, πουλερικά, ψάρια:		
άπαχο βοδινό	90 gr	77
άπαχο χοιρινό και ζαμπόν	90 gr	80
πουλερικά, κρέας χωρίς πέτσα:		
άσπρο κρέας	90 gr	76
κόκκινο κρέας	90 gr	82
ψάρι:		
άπαχο	90 gr	43
λιπαρό	90 gr	40
οστρακοφόρα:		
αστακός	¹ / ₂ φλυτζάνι	90
γαρίδες	¹ / ₂ φλυτζάνι (11 μεγάλες)	96
ψάρι σε κονσέρβα:		
τόνος	90 gr	55
παράγωγα προϊόντα:		
συκώτι βοδινό	90 gr	372
λουκάνικα Φρανκφούρτης	1	27
αυγά ολόκληρα	1 μεσαίο	274

Αντιθέτως, πηγές των φυτοστερολών είναι τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Τα φυτικά έλαια και οι μαργαρίνες αποτελούν τις κύριες πηγές φυτοστερολών στο κλασικό πρότυπο δυτικής διατροφής. Τα όσπρια και ορισμένοι σπόροι (π.χ. ηλιόσπορος και σουσάμι), είναι επίσης καλές πηγές, ενώ άλλα λαχανικά και φρούτα περιέχουν ελαφρώς χαμηλότερες ποσότητες φυτικών στερολών.

Αν και το ψωμί και τα δημητριακά δεν περιέχουν υψηλές ποσότητες, περίπου το 17% των προσλαμβανόμενων φυτοστερολών, προέρχεται από αυτές τις πηγές. Οι περιεκτικότητες διαφόρων φυτικών ελαίων σε φυτοστερόλες απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2):

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις φυτοστερολών (mg/ kg) σε φυτικά έλαια και σπόρους (Gunstone et al, 1994).

ΦΥΤΙΚΟ ΕΛΑΙΟ	ΚΑΜΠΕΣΤΕΡΟΛΗ	ΣΤΙΓΜΑΣΤΕΡΟΛΗ	β-ΣΙΤΟΣΤΕΡΟΛΗ
Αραβοσιτέλαιο	2691	702	7722
Σογιέλαιο	720	720	1908
Λάδι καρύδας	18	296	1322
Φοινικέλαιο	358	204	1894
Φυστικέλαιο	360	2160	1536
Σησαμέλαιο	1170	616	3819
Ηλιέλαιο	313	313	2352
Καστορέλαιο	285	627	1254
Καρδαμέλαιο	452	313	1809
Ελαιόλαδο (Γαλλία)	28	14	1310
Βούτυρο κακάου	266	769	1746
Σπόροι καφέ	3488	3672	9914
Βαμβακόσπορος	170	42	3961
Λιναρόσπορος	1218	378	1932

2.6 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Κατά την επεξεργασία των τροφίμων, παρατηρούνται οι παρακάτω μεταβολές της χοληστερόλης και των φυτοστερολών (βλ. Πίνακα 3):

Πίνακας 3: Μεταβολές στερολών κατά την επεξεργασία των τροφίμων.

ΕΙΔΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ	ΦΥΤΟΣΤΕΡΟΛΕΣ
Τηγάνισμα πατάτας με ηλιέλαιο (Appelqvist et al, 1996)	—	Οξειδωση καμπεστερόλης και σιγμαστερόλης
Τηγάνισμα με φοινικέλαιο και ηλιέλαιο - potato chips (Appelqvist et al, 1997)	—	Οξειδωση καμπεστερόλης και σιτοστερόλης
Ψήσιμο πατάτας Πολτοποίηση » Αφυδάτωση » (Hadziyev et al, 1978)	—	Απώλεια κατά 15% της σιγμαστερόλης και της β-σιτοστερόλης
Μαγείρεμα κοτόπουλου (Esteve et al, 1998)	Οξειδωση - σχηματισμός οξυστερόλης	—
Μικροκύματα, συκώτι μοσχαριού (Asfahany et al, 1992)	Υπεροξειδία χοληστερόλης	—
Παρασκευή βουτύρου Αφυδάτωση πλήρους γάλακτος Παρασκευή τυριού (Finocchiaro et al, 1983)	Οξειδωση χοληστερόλης - σχηματισμός οξειδίων	—
Έκθεση τροφίμων σε οξυγόνο, φως, αφυδάτωση (Careri et al, 1998)	Οξειδωση χοληστερόλης	—
Έκθεση τροφίμων σε υψηλή θερμοκρασία (Angulo et al, 1997)	Οξειδωση χοληστερόλης	—

2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΛΩΝ

2.7.1 ΕΙΔΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΧΟΥΝ ΓΙΝΕΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΕΡΟΛΩΝ.

α) Ο προσδιορισμός χοληστερόλης, έχει πραγματοποιηθεί στα παρακάτω φυσικά και επεξεργασμένα ζωικά τρόφιμα:

Στο **κρέας** (Careri et al, 1998) και πιο συγκεκριμένα σε αρνί (Naeemi et al, 1995) και σε χοιρινό (Arneth et al, 1995), σε **ψαρικά** όπως fish sticks (Ulberth et al, 1992, Hamill et al, 1994) και γαρίδες (Hamill et al, 1994, Naeemi et al, 1995), σε **πουλερικά**, όπως το κοτόπουλο (Naeemi et al, 1995) σε **κρόκους αυγών** (Naeemi et al, 1995 - Hamill et al, 1994 - Oles et al, 1990 - Stewart et al, 1992 - Ulberth et al, 1992), καθώς και σε **αλλαντικά** όπως το σαλάμι (Schmarr et al, 1996).

Επιπλέον, σε **γαλακτοκομικά προϊόντα** και πιο συγκεκριμένα: Σε **γάλα** (Alonso et al, 1997 - Manzi et al, 1996 - Hamill et al, 1994, Stewart et al, 1992) και σε **σκόνη γάλακτος** (Hamill et al, 1994 - Angulo et al, 1997). Σε **τυρί**, όπως ιταλικό τυρί με ντομάτα (Manzi et al, 1996), επαλειφόμενο τυρί (Schmarr et al, 1996), κίτρινα τυριά (Naeemi et al, 1995), τυρί κρέμα (Stewart et al, 1992) και cheddar (Stewart et al, 1992 - Hamill et al, 1994), σε **γιαούρτι** (Stewart et al, 1992) και σε **βούτυρο** (Hamill et al, 1994 - Stewart et al, 1992). Τέλος σε **salad dressings - μαγιονέζα** (Ulberth et al, 1992 - Oles et al, 1990).

β) Ο προσδιορισμός φυτοστερολών, έχει πραγματοποιηθεί στα παρακάτω φυτικά έλαια:

Σε **ελαιόλαδο** (Alonso et al, 1997 - De Blas et al, 1996), σε **ηλιέλαιο** (Alonso et al, 1997 - Naeemi et al, 1995), και σε **φοινικέλαιο** (Alonso et al, 1997).

2.7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ - ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ

α) Για την εκχύλιση των τροφίμων με σκοπό την παραλαβή της χοληστερόλης, έχουν χρησιμοποιηθεί τα παρακάτω μίγματα διαλυτών:

1. Χλωροφόρμιο / Μεθανόλη (2:1) (Folch et al, 1957) στα εξής τρόφιμα:

Σε **κρέας** (Careri et al, 1998), σε χοιρινό (Arneth et al, 1995), σε **σαλάμι** (Schmarr et al, 1996), σε **επαλειφόμενο τυρί** (Schmarr et al, 1996) και σε **σκόνη γάλακτος** (Angulo et al, 1997).

2. Χλωροφόρμιο / Μεθανόλη (Daugherty and Lento 1983) στα εξής τρόφιμα:

Σε **fish sticks**, **κρόκους αυγών** και **salad dressings - μαγιονέζα** (Ulberth et al, 1992).

3. Ισοπροπυλική αλκοόλη - Τολουένιο - Ισοοκτάνιο στα εξής τρόφιμα:

Σε **fish sticks**, **γαρίδες**, **κρόκους αυγών**, **γάλα** και **σκόνη γάλακτος**, σε τυρί **cheddar** και σε **βούτυρο** (Hamill et al, 1994).

4. Χλωροφόρμιο (Panfili et al) στα εξής γαλακτοκομικά προϊόντα:

Σε **γάλα** και σε **ιταλικό τυρί με ντομάτα** (Manzi et al, 1996).

5. Ισοπροπανόλη - Αιθανόλη (Baker et al) στα εξής τρόφιμα:

Σε **κρόκους αυγών** και σε **salad dressings - μαγιονέζα** (Oles et al, 1990).

β) Για την εκχύλιση φυτοστερολών έχει χρησιμοποιηθεί:

Βενζόλιο / Ακετόνη (95:5) σε ελαιόλαδο (De Blas et al, 1996)

2.7.3 ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΟΛΙΚΑ ΛΙΠΙΔΙΑ

α) Η μέθοδος αποδέσμευσης της χοληστερόλης απο τα ολικά λιπίδια, έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση των παρακάτω διαλυτών:

1. Κυκλοεξάνιο στα παρακάτω τρόφιμα:

Σε **αρνί** (Naeemi et al, 1995), σε **fish sticks** (Ulberth et al, 1992) και **γαρίδες** (Naeemi et al, 1995), σε **κοτόπουλο** (Naeemi et al, 1995), σε **κρόκους αυγών** (Naeemi et al, 1995 - Ulberth et al, 1992), σε **κίτρινα τυριά** (Naeemi et al, 1995), και σε **salad dressings - μαγιονέζα** (Ulberth et al, 1992).

2. Εξάνιο στα εξής τρόφιμα:

Σε **χοιρινό κρέας** (Arneth et al, 1995), σε **fish sticks** και **γαρίδες** (Hamill et al, 1994), σε **κρόκους αυγών** (Hamill et al, 1994 - Stewart et al, 1992), σε **γάλα** (Hamill et al, 1994 - Stewart et al, 1992) και **σκόνη γάλακτος** (Hamill et al, 1994), σε **τυρί κρέμα** (Stewart et al, 1992) και **cheddar** (Hamill et al, 1994 - Stewart et al, 1992), σε **γιαούρτι** (Stewart et al, 1992) και σε **βούτυρο** (Hamill et al, 1994 - Stewart et al, 1992).

3. Διαιθυλαιθέρας σε **κρέας** (Careri et al, 1998) και σε **γάλα** (Alonso et al, 1997).

4. Εξάνιο - Διαιθυλαιθέρας (85 + 15) σε **κρόκους αυγών** και σε **salad dressings - μαγιονέζα** (Oles et al, 1990).

5. Μεθανόλη - Βενζόλιο (3:2) σε **σκόνη γάλακτος** (Angulo et al, 1997).

β) Η μέθοδος αποδέσμευσης των φυτοστερολών απο τα ολικά λιπίδια έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση των παρακάτω διαλυτών:

1. Διαιθυλαιθέρας σε ελαιόλαδο, ηλιέλαιο και φοινικέλαιο (Alonso et al, 1997).

2. Κυκλοεξάνιο σε ηλιέλαιο (Naeemi et al, 1995)

3. 0,2 % διάλυμα 2,7 διχλωροφλουορεσκεΐνη σε ελαιόλαδο (De Blas et al, 1996)

2.7.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΣΤΕΡΟΛΩΝ

α) Η παρασκευή πτητικών παραγώγων της χοληστερόλης, κατάλληλων για προσδιορισμό με αέρια χρωματογραφία (GC), έγινε με τη χρησιμοποίηση των παρακάτω μεθόδων:

1. N,O - δις (τριμεθυλσιλυλ) - τριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) στο κρέας (Careri et al, 1998).

2. 4 - Νιτροβενζοϋλοχλωρίδιο (ρ-νιτροβενζοϋλοχλωρίδιο) (PNBC) στα παρακάτω τρόφιμα:

Σε fish sticks και γαρίδες, σε κρόκους αυγών, σε γάλα και σκόνη γάλακτος, σε τυρί cheddar και σε βούτυρο (Hamill et al, 1994).

3. N,N - διμεθυλοφορμαμίδιο και δις (τριμεθυλσιλυλ) - τριφθοροακεταμίδιο στα παρακάτω τρόφιμα:

Σε κρόκους αυγών και σε salad dressings - μαγιονέζα (Oles et al, 1990).

4. Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) στα παρακάτω τρόφιμα:

Σε κρόκους αυγών, σε γάλα, σε τυρί κρέμα, σε γιαούρτι και σε βούτυρο (Stewart et al, 1992).

5. Ξηρή άνυδρη πυριδίνη, N,O - δισ (τριμεθυλσιλυλ) - τριφθοροακεταμίδιο και 1% τριμεθυλχλωροσιλάνιο στα εξής τρόφιμα:
Σε σαλάμι και σε επαλειφόμενο τυρί (Schmarr et al, 1996).

6. Πυριδίνη, εξαμέθυλδισιλαζάνιο (HMDS) και τριμεθυλχλωροσιλάνιο (TMCS) σε σκόνη γάλακτος (Angulo et al, 1997).

β) Η παρασκευή πτητικών παραγώγων φυτοστερολών κατάλληλων για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία, έγινε με τη χρησιμοποίηση:

Πυριδίνη, εξαμέθυλδισιλαζάνιο (HMDS) και τριμεθυλχλωροσιλάνιο (TMCS)
σε ελαιόλαδο (Alonso et al, 1997 - De Blas et al, 1996).

2.7.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

α) Οι αναλυτικές μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης, είναι οι ακόλουθες:

1. Αέρια χρωματογραφία (GC) που έχει εφαρμοστεί στα παρακάτω είδη τροφίμων:

Σε **κρέας** (Careri et al, 1998) και ιδιαιτέρως σε αρνί (Naeemi et al, 1995), σε **ψαρικά** όπως fish sticks (Ulberth et al, 1992 - Hamill et al, 1994) και γαρίδες (Hamill et al, 1994 - Naeemi et al, 1995), σε **πουλερικά**, όπως το κοτόπουλο (Naeem et al 1995), σε **κρόκους αυγών** (Naeemi et al, 1995 - Hamill et al, 1994 - Oles et al, 1990 - Stewart et al, 1992 - Ulberth et al, 1992), καθώς και σε **αλλαντικά** όπως το σαλάμι (Schmarr et al, 1996).

Επιπλέον, σε **γαλακτοκομικά προϊόντα** και πιο συγκεκριμένα: Σε **γάλα** (Alonso et al, 1997 - Hamill et al, 1994 - Stewart et al, 1992) και σε **σκόνη γάλακτος** (Hamill et al, 1994 - Angulo et al, 1997). Σε **τυρί**, όπως επαλειφόμενο τυρί (Schmarr et al, 1996), κίτρινα τυριά (Naeemi et al, 1995), τυρί κρέμα (Stewart et al, 1992) και cheddar (Stewart et al, 1992 - Hamill et al, 1994), σε **γιαούρτι** (Stewart et al, 1992) και σε **βούτυρο** (Hamill et al,

1994, Stewart et al, 1992). Τέλος σε **salad dressings - μαγιονέζα** (Ulberth et al, 1992 - Oles et al, 1990).

2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) που έχει εφαρμοστεί στα παρακάτω είδη τροφίμων:

Σε **χοιρινό κρέας** (Arneth et al, 1995), σε **γάλα** και σε **ιταλικό τυρί με ντομάτα** (Manzi et al, 1996).

β) Η κύρια μέθοδος για τον προσδιορισμό φυτοστερολών σε έλαια, είναι η αέρια χρωματογραφία (GC) και έχει εφαρμοστεί για ανάλυση:

Σε **ελαιόλαδο** (Alonso et al, 1997 - De Blas et al, 1996), **ηλιέλαιο** (Alonso et al, 1997 - Naeemi et al, 1995) και **φοινικέλαιο** (Alonso et al, 1997).

3. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού της χοληστερόλης τροφίμων είναι εκείνη που καταγράφεται από τους Aizetmueller et al (1998), (German Fat Research Association) σε σχετικό άρθρο. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε: σαπωνοποίηση του δείγματος με αιθανολικό διάλυμα ΚΟΗ, διαχωρισμό των στερολών από τα άλλα μη σαπωνοποιήσιμα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), παραγωγοποίηση και ανάλυση στη συσκευή GC.

Σκοπός όμως της εργασίας μας - στα πλαίσια έναρξης προγράμματος σύνθεσης εθνικών πινάκων σύστασης Ελληνικών τροφίμων - είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας αναλυτικού σχήματος:

- I. προσαρμοσμένου στις δυνατότητες του εργαστηρίου τροφίμων
- II. που να καλύπτει το ευρύτερο δυνατό φάσμα τροφίμων
- III. που να είναι ταχύ και αξιόπιστο, δεδομένου ότι η παραπάνω επίσημη μέθοδος είναι χρονοβόρα και απαιτεί λεπτούς χειρισμούς και δεδομένου ότι η ποσοτική απομόνωση και ο προσδιορισμός των στερολών, παρουσιάζει μια σειρά από δυσκολίες.

Έτσι, επιλέχθηκαν και δοκιμάστηκαν 3 μέθοδοι που πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις και οι οποίες περιλαμβάνουν:

- I. Απευθείας σαπωνοποίηση λυοφιλιωμένων δειγμάτων τροφίμων και παραλαβή μη σαπωνοποιήσιμων (Naeemi et al, 1992).
- II. Απευθείας σαπωνοποίηση με ήπιες συνθήκες σε νωπά δείγματα τροφίμων και παραλαβή μη σαπωνοποιήσιμων με εκχύλιση (Lim et al, 1992) και
- III. Εκχύλιση λιπαρών (Folch et al, 1957) και στη συνέχεια σαπωνοποίηση εκχυλίσματος και διαχωρισμός ασαπωνοποιήτων (Naeemi et al, 1992).

IV. Επιπλέον:

- Οι διαλύτες παραλαβής της χοληστερόλης είναι: κυκλοεξάνιο, εξάνιο.
- Η χοληστερόλη προσδιορίζεται με GC, χωρίς παραγωγοποίηση με χρήση εσωτερικού ή εξωτερικού προτύπου.
- Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανάκτησης.

Αποτελέσματα: Συνοψισμός των αποτελεσμάτων των δοκιμών

Α/Α	ΠΡΟΤΥΠΟ	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ (mg/100g)	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)
1	Αλάτι Κόχινος	32.3	9.0
2	Αλάτι Καρότου	31.9	9.0
3	Αλάτι Φασολιάς	38.7	9.0
4	Αλάτι Γαρίφαλων	32.1	9.0
5	Αλάτι Βασιλικού Φυλλώδους	35.2	9.0
6	Αλάτι Καστανιάς	35.3	9.0
7	Αλάτι Θυμαρίδας	34.7	9.0
8	Αλάτι Καρότου	33.1	9.0
9	Αλάτι Μανιτάριας	44.3	9.0
10	Αλάτι Φασολιάς	35.8	9.0
11	Αλάτι Μανιτάριας	72.5	9.0
12	Αλάτι Καρότου	68.8	9.0
13	Αλάτι Μανιτάριας	34.1	9.0
14	Αλάτι Καρότου	35.7	9.0
15	Αλάτι Καρότου	38.1	9.0
16	Αλάτι Μανιτάριας	40.8	9.0
17	Αλάτι Καρότου	48.0	9.0
18	Αλάτι Μανιτάριας	38.8	9.0
19	Αλάτι Καρότου	37.8	9.0
20	Αλάτι Μανιτάριας	35.2	9.0
21	Αλάτι Καρότου	34.1	9.0
22	Αλάτι Καρότου	33.8	9.0
23	Αλάτι Καρότου	34.5	9.0
24	Αλάτι Μανιτάριας	37.8	9.0
25	Αλάτι Καρότου	33.1	9.0
26	Αλάτι Καρότου	38.4	9.0
27	Αλάτι Καρότου	78.0	9.0
28	Αλάτι Αλάτι (Εξωτερικού τύπου)	37.8	9.0
29	Αλάτι Αλάτι (Εξωτερικού τύπου)	79.8	9.0
30	Αλάτι Αλάτι (Εξωτερικού τύπου)	74.2	9.0

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΕΙΔΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ: ΤΥΡΙΑ – ΓΙΑΟΥΡΤΗ

Ι. Λυοφιλωμένα δείγματα τυριών και γιαούρτης, αεροστεγώς κλεισμένα.

No	ΔΕΙΓΜΑ	(%) ΑΡΧΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (g)
1	Φέτα Μακεδονίας	52.3	5.0
2	Φέτα Ηπείρου	53.3	5.0
3	Φέτα Θεσσαλίας	50.7	5.0
4	Φέτα Πελοποννήσου	52.1	5.0
5	Φέτα Στερεάς Ελλάδας	49.1	5.0
6	Τελεμές Μακεδονίας	60.5	5.0
7	Τελεμές Θεσσαλίας	54.7	5.0
8	Τελεμές Θράκης	53.1	5.0
9	Μανούρι Μακεδονίας	44.3	5.0
10	Μανούρι Θεσσαλίας	35.6	5.0
11	Ανθότυρο Μακεδονίας	72.5	5.0
12	Ανθότυρο Ηπείρου	69.5	5.0
13	Μυζήθρα Μακεδονίας	64.1	5.0
14	Μυζήθρα Κρήτης	66.7	5.0
15	Καλαθάκι Λήμνου	58.1	5.0
16	Κασέρι Μακεδονίας	40.9	5.0
17	Κασέρι Νήσων Αιγαίου	46.0	5.0
18	Κεφαλοτύρι Μακεδονίας	36.0	5.0
19	Κεφαλοτύρι Κρήτης	37.8	5.0
20	Κεφαλοτύρι Ηπείρου	35.2	5.0
21	Κεφαλογραβιέρα Στ. Ελλάδας	36.1	5.0
22	Γραβιέρα Κρήτης	33.6	5.0
23	Γραβιέρα Νάξου	31.6	5.0
24	Λαδοτύρι Μυτιλήνης	33.8	5.0
25	ΑΓΝΟ Βικτώρια	33.1	5.0
26	Μετσοβόνε	36.4	5.0
27	Στραγγιστό γιαούρτι	75.0	5.0
28	Γιαούρτι Αγελάδος (Ευρωπαϊκού τύπου)	81.1	5.0
29	Γιαούρτι Αγελάδος (Παραδοσιακό)	79.8	5.0
30	Γιαούρτι Πρόβειο (Παραδοσιακό)	74.9	5.0

II. Νωπά δείγματα τυριών εμπορίου (Super Market)

31. Φέτα Δωδώνης
32. Κασέρι
33. Λαδοτύρι Μυτιλήνης
34. Γραβιέρα Κρήτης
35. Μετσοβόνα
36. Φέτα Λήμνου
37. Τελεμές Τρικάλων
38. Φορμαέλλα
39. Κοπανιστή Τήνου
40. Κεφαλοτύρι Γρεβενών

4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Διαλύτες αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (μεθανόλη, χλωροφόρμιο, εξάνιο, κυκλοεξάνιο, ισοπροπυλική αλκοόλη).
- Πρότυπο 5α-χολεστανό (SIGMA CHEMICALS), 0.412μg/mL σε κυκλοεξάνιο.
- Πρότυπο χοληστερόλης (SIGMA CHEMICALS), 0.51 μg/mL .

4.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αέριος χρωματογράφος
- Ομογενοποιητής Ultraturax της IKA (για την εκχύλιση)
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (για την εκτέλεση σαπωνοποίησης)
- Vortex (για την έντονη ανακίνηση των δοκιμαστικών σωλήνων)
- Φυγόκεντρος (για διαχωρισμό στιβάδων)

4.4 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

4.4α ΓΕΝΙΚΑ

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης σε όλα τα δείγματα, είναι η αέρια χρωματογραφία (GC). Πιο συγκεκριμένα, **αέρια χρωματογραφία** (gas chromatography, GC) είναι η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη συσκευή (συγκρότημα οργάνων) "αerioχρωματογράφο" και στην οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιούνται αδρανή αέρια, π.χ. άζωτο ή ήλιο, σε ελεγχόμενες θερμοκρασίες ενώ η στατική φάση, είναι είτε στερεό προσροφητικό (π.χ. πυριτική πηκτή) είτε στερεό προσροφητικό που συνιστά τη στερεή ή φέρουσα φάση (support) με μόνιμη επικάλυψη υγρής φάσης.

Ανάλογα με τα παραπάνω είδη της στατικής φάσης, η μέθοδος GC διακρίνεται αντίστοιχα σε αέρια - στερεή χρωματογραφία (Gas-Solid Chromatography, GCS) και σε αέρια - υγρή χρωματογραφία (Gas-Liquid Chromatography, GLC) (Ανδρικόπουλος, 1998).

Μια συσκευή αέριας χρωματογραφίας, αποτελείται από διάφορα όργανα και εξαρτήματα τα οποία συνδεδεμένα κατάλληλα λειτουργούν ως ενιαίο σύνολο (Σχήμα 4).

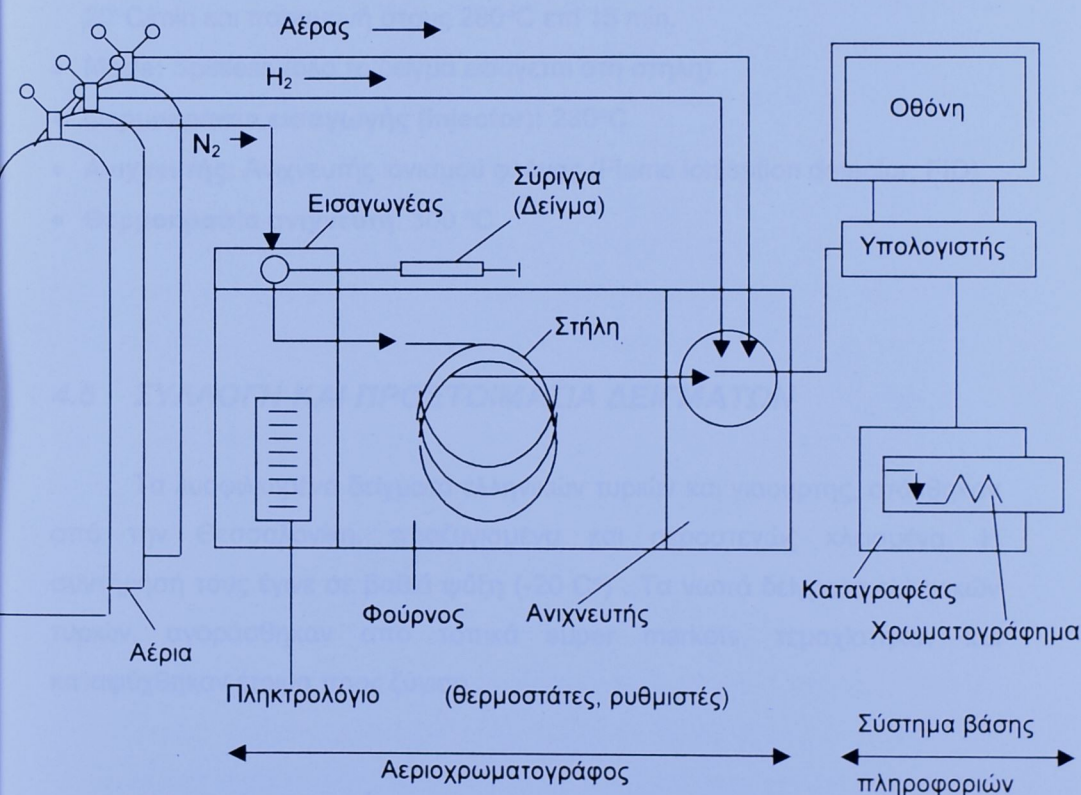
Τα βασικά όργανα και μέρη ενός συγκροτήματος GC είναι:

1. Οι φιάλες (μεταλλικές "οβίδες") των αερίων της κινητής φάσης (carrier gas), N_2 ή He και των αερίων καύσης του δείγματος (ignition gases), H_2 και αέρας.
2. Ο θάλαμος της εισαγωγής του δείγματος ή εγχυτής δείγματος (injector).
3. Η στήλη ανάλυσης (column) μέσα στον θάλαμο θέρμανσης (φούρνο, oven).
4. Ο φούρνος με τους θερμοστάτες για την ρύθμιση της θερμοκρασίας του φούρνου και λοιπά ηλεκτρονικά μέρη για την ρύθμισή τους.

5. Ο ανιχνευτής (detector), ο οποίος ανιχνεύει τα διαχωρισμένα συστατικά του δείγματος με τη σειρά που εξέρχονται (εκλούνται) από τη στήλη.
6. Ο υπολογιστής (computer) ή ολοκληρωτής (integrator) για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
7. Ο καταγραφέας (recorder) με τον οποίο καταγράφεται το αποτέλεσμα του διαχωρισμού, το χρωματογράφημα, επί χαρτιού.

Τα μέρη 2,3,4 και 5 αποτελούν συνήθως ένα ενιαίο όργανο τον "αεριοχρωματογράφο", όπως και τα μέρη 6 και 7 συνιστούν το σύστημα πληροφοριών (Ανδρικόπουλος, 1998).

Σχήμα 4: Σχηματική παράσταση των οργάνων και των μερών συσκευής αέριας χρωματογραφίας (GC).



4.4β ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΜΕ GC

- **Συσκευή:** Αέριος χρωματογράφος Hewlett Packard (HP, Avondale, PA, USA) HP-6890, εφοδιασμένος με αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler).
- **Όγκος δείγματος που ενίεται:** 1μL.
- **Στήλη:** Τριχοειδής στήλη, (SGE, Melbourne, Australia) BPX50 30QC2, μήκους 30m, εσωτερικής διαμέτρου 250 μm, με επικάλυψη 50% PH POLYSILIPHENYLENE SILOXAN πάχους 0,25 μm.
- **Φέρον αέριο:** Ήλιο (He)
- **Ροή φέροντος αερίου:** 1,5 mL/min
- **Πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου:** 180°C έως 280°C με ρυθμό 20°C/min και παραμονή στους 280°C επί 15 min.
- **Mode:** Splitless (όλο το δείγμα εισάγεται στη στήλη).
- **Θερμοκρασία εισαγωγής (injector):** 230°C
- **Ανιχνευτής:** Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (Flame ionisation detector, FID)
- **Θερμοκρασία ανιχνευτή:** 300 °C

4.5 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα λυοφιλιωμένα δείγματα ελληνικών τυριών και γιαούρτης, στάλθηκαν από την Θεσσαλονίκη, προζυγισμένα και αεροστεγώς κλεισμένα. Η συντήρησή τους έγινε σε βαθιά ψύξη (-20 C°) . Τα νωπά δείγματα ελληνικών τυριών, αγοράσθηκαν από τοπικά super markets, τεμαχίστηκαν και καταψύχθηκαν έτοιμα προς ζύγιση.

4.7 ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΗ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η αποδέσμευση των στερολών από τα ολικά λιπίδια πραγματοποιήθηκε με σαπωνοποίηση είτε των αρχικών λυοφιλωμένων δειγμάτων, είτε του εκχυλίσματος των νωπών δειγμάτων, σύμφωνα με τη μέθοδο των Naeemi et al (1992).

A. ΛΥΟΦΙΛΩΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

0,8 - 1g δείγματος, φέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα και προστίθενται 100μL εσωτερικού προτύπου 5α - χολεστανίου σε κυκλοεξάνιο και 5 ml κορεσμένου μεθανολικού δ/τος ΚΟΗ (200g ΚΟΗ σε 1000ml μεθανόλης). Ο σωλήνας πωματίζεται, αναταράσσεται σε vortex και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 80°C επί 30 min. Μόλις ο σωλήνας κρυώσει (< 50°C), προστίθενται 5 ml κυκλοεξανίου. Έπειτα, ο σωλήνας πωματίζεται και αναταράσσεται έντονα επί 1 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές επί 2 min και η διαυγής πάνω φάση (5ml), μεταγγίζεται σε νέο βιδωτό σωλήνα, ο οποίος φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυση.

B. ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα λιπαρά του νωπού δείγματος, διαλύονται σε 2,5 ml ισοπροπανόλη/εξάνιο 1:4 και παραλαμβάνεται 1 ml σε νέο σωλήνα. Οι διαλύτες εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου και ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία, ακριβώς όπως και στα λυοφιλωμένα δείγματα.

4.8 ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της χοληστερόλης των δειγμάτων, τόσο των νωπών, όσο και των λυοφιλωμένων στον αέριο χρωματογράφο, πραγματοποιήθηκε έπειτα από την σαπωνοποίηση τους.

4.8α ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η επιλογή των συνθηκών λειτουργίας του GC, έγινε με γνώμονα:

- α) ταχύτητα ανάλυσης (μικρός χρόνος παραμονής χοληστερόλης στις υψηλές θερμοκρασίες).
- β) λήψη κορυφών απαλλαγμένων από παρεμποδίζουσες κορυφές.

Για τον σκοπό αυτό, έγιναν δοκιμαστικές αναλύσεις με καθαρά πρότυπα χοληστερόλης και 5α-χολεστανίου και μιγμάτων τους, καθώς και τυφλός προσδιορισμός.

Σχετικά με τις δοκιμαστικές αναλύσεις, ξεχωριστά των προτύπων χοληστερόλης και 5α-χολεστανίου, προκύπτουν τα παρακάτω χρωματογραφήματα των σχημάτων 5 και 6 αντιστοίχως. Από τα χρωματογραφήματα αυτά, φαίνεται ότι οι συνθήκες που επιλέχθηκαν, επιτυγχάνουν την έκλουση της χοληστερόλης και του 5α-χολεστανίου σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (12.41min και 7.88 min αντίστοιχα) και σε περιοχές του χρωματογραφήματος που δεν υπάρχουν παρεμποδίσεις.

Επιπλέον, από διαδοχικές μετρήσεις προτύπου χοληστερόλης με GC, που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον έλεγχο του προσδιορισμού της χοληστερόλης βρέθηκε υψηλή επαναληπτικότητα. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι οι χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν είναι κατάλληλες για τον ικανοποιητικό προσδιορισμό της χοληστερόλης.

Ο τυφλός προσδιορισμός, πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο των διαλυτών της μεθόδου (κυκλοεξάνιο, ΚΟΗ, μεθανόλη), για την επιβεβαίωση ότι στην περιοχή της χοληστερόλης και του 5α-χολεστανίου δεν εμφανίζονται παρεμποδίζουσες κορυφές. Πράγματι όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του σχήματος 7, ο έλεγχος των διαλυτών δεν παρουσίασε κανένα πρόβλημα.

Συνεπώς, τόσο οι συνθήκες ανάλυσης, όσο και τα χρησιμοποιούμενα πρότυπα και διαλύτες επιλέχθηκαν ορθά, εφόσον δεν μας δημιουργούν κάποιο πρόβλημα.

4.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η εκχύλιση των νωπών δειγμάτων τυριών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των Folch et al (1957).

ΜΕΘΟΔΟΣ FOLCH:

Ζυγίζεται 1,5 g ($\pm 0,01$ g) θρυμματισμένου δείγματος σε μεγάλο γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος CH_3OH και ομογενοποιούνται σε ομογενοποιητή για 1min. Χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής Ultraturax της IKA. Η ομογενοποίηση συνεχίζεται μετά την προσθήκη 20 ml δ/τος CHCl_3 και το όλον φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό, μεταγγίζεται σε μεγάλο ογκομετρικό κύλινδρο, ενώ στο στερεό υπόλειμμα προστίθενται σταδιακά 30 ml μίγματος CHCl_3 / CH_3OH 2:1 προς ομογενοποίηση. Κατόπιν προστίθενται 200μL πρότυπου δ/τος (stock) 5α - χολεστανίου σε κυκλοεξάνιο (41.2mg/ 100mL κυκλοεξανίου), ως εσωτερικό πρότυπο.

Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 min και μετάγγιση του εκχυλίσματος στον ογκομετρικό κύλινδρο. Εκεί προστίθεται δ/μα KCl 0,9 %, σε όγκο ίσο με το 1/5 του περιεχομένου του ογκομετρικού κυλίνδρου και το όλον αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα επί 1 min. Μετά τον διαχωρισμό των δύο φάσεων (σε ηρεμία), η πάνω στιβάδα απομακρύνεται με αναρρόφηση. Εν συνεχεία, γίνεται η προσθήκη της θεωρητικής πάνω φάσης Folch (CHCl_3 : CH_3OH : KCl(aq) 0,74 % - 3 : 48 : 47), σε όγκο ίσο με το 1/2 του περιεχομένου στον ογκομετρικό σωλήνα και το όλον αναδεύεται για 1 min. Η πάνω στιβάδα, απομακρύνεται με αναρρόφηση, ενώ η κάτω μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και ξηραίνεται με προσθήκη στερεού Na_2SO_4 . Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται σε συσκευή Rotary Evaporator, σε θερμοκρασία $\leq 40^\circ\text{C}$ και στη συνέχεια τα ολικά λιπίδια παραλαμβάνονται με 2*5 ml ισοπροπανόλης / εξάνιο 4:1, και 5 ml εξάνιο. Τέλος, ακολουθεί εξάτμιση των δ/των με ρεύμα αζώτου.

4.7 ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΗ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η αποδέσμευση των στερολών από τα ολικά λιπίδια πραγματοποιήθηκε με σαπωνοποίηση είτε των αρχικών λυοφιλιωμένων δειγμάτων, είτε του εκχυλίσματος των νωπών δειγμάτων, σύμφωνα με τη μέθοδο των Naeemi et al (1992).

A. ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

0,8 - 1g δείγματος, φέρεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα και προστίθενται 100μL εσωτερικού προτύπου 5α - χολεστανίου σε κυκλοεξάνιο και 5 ml κορεσμένου μεθανολικού δ/τος ΚΟΗ (200g ΚΟΗ σε 1000ml μεθανόλης). Ο σωλήνας πωματίζεται, αναταράσσεται σε vortex και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 80°C επί 30 min. Μόλις ο σωλήνας κρυώσει (< 50°C), προστίθενται 5 ml κυκλοεξανίου. Έπειτα, ο σωλήνας πωματίζεται και αναταράσσεται έντονα επί 1 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές επί 2 min και η διαυγής πάνω φάση (5ml), μεταγγίζεται σε νέο βιδωτό σωλήνα, ο οποίος φυλάσσεται στην κατάψυξη μέχρι την ανάλυση.

B. ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα λιπαρά του νωπού δείγματος, διαλύονται σε 2,5 ml ισοπροπανόλη/εξάνιο 1:4 και παραλαμβάνεται 1 ml σε νέο σωλήνα. Οι διαλύτες εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου και ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία, ακριβώς όπως και στα λυοφιλιωμένα δείγματα.

4.8 ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της χοληστερόλης των δειγμάτων, τόσο των νωπών, όσο και των λυοφιλιωμένων στον αέριο χρωματογράφο, πραγματοποιήθηκε έπειτα από την σαπωνοποίηση τους.

4.8α ΕΠΙΛΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η επιλογή των συνθηκών λειτουργίας του GC, έγινε με γνώμονα:

- α) ταχύτητα ανάλυσης (μικρός χρόνος παραμονής χοληστερόλης στις υψηλές θερμοκρασίες).
- β) λήψη κορυφών απαλλαγμένων από παρεμποδίζουσες κορυφές.

Για τον σκοπό αυτό, έγιναν δοκιμαστικές αναλύσεις με καθαρά πρότυπα χοληστερόλης και 5α-χολεστανίου και μιγμάτων τους, καθώς και τυφλός προσδιορισμός.

Σχετικά με τις δοκιμαστικές αναλύσεις, ξεχωριστά των προτύπων χοληστερόλης και 5α-χολεστανίου, προκύπτουν τα παρακάτω χρωματογραφήματα των σχημάτων 5 και 6 αντίστοιχως. Από τα χρωματογραφήματα αυτά, φαίνεται ότι οι συνθήκες που επιλέχθηκαν, επιτυγχάνουν την έκλουση της χοληστερόλης και του 5α-χολεστανίου σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (12.41min και 7.88 min αντίστοιχα) και σε περιοχές του χρωματογραφήματος που δεν υπάρχουν παρεμποδίσεις.

Επιπλέον, από διαδοχικές μετρήσεις προτύπου χοληστερόλης με GC, που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον έλεγχο του προσδιορισμού της χοληστερόλης βρέθηκε υψηλή επαναληπτικότητα. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι οι χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν είναι κατάλληλες για τον ικανοποιητικό προσδιορισμό της χοληστερόλης.

Ο τυφλός προσδιορισμός, πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο των διαλυτών της μεθόδου (κυκλοεξάνιο, ΚΟΗ, μεθανόλη), για την επιβεβαίωση ότι στην περιοχή της χοληστερόλης και του 5α-χολεστανίου δεν εμφανίζονται παρεμποδίζουσες κορυφές. Πράγματι όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα του σχήματος 7, ο έλεγχος των διαλυτών δεν παρουσίασε κανένα πρόβλημα.

Συνεπώς, τόσο οι συνθήκες ανάλυσης, όσο και τα χρησιμοποιούμενα πρότυπα και διαλύτες επιλέχθηκαν ορθά, εφόσον δεν μας δημιουργούν κάποιο πρόβλημα.

4.6 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η εκχύλιση των νωπών δειγμάτων τυριών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των Folch et al (1957).

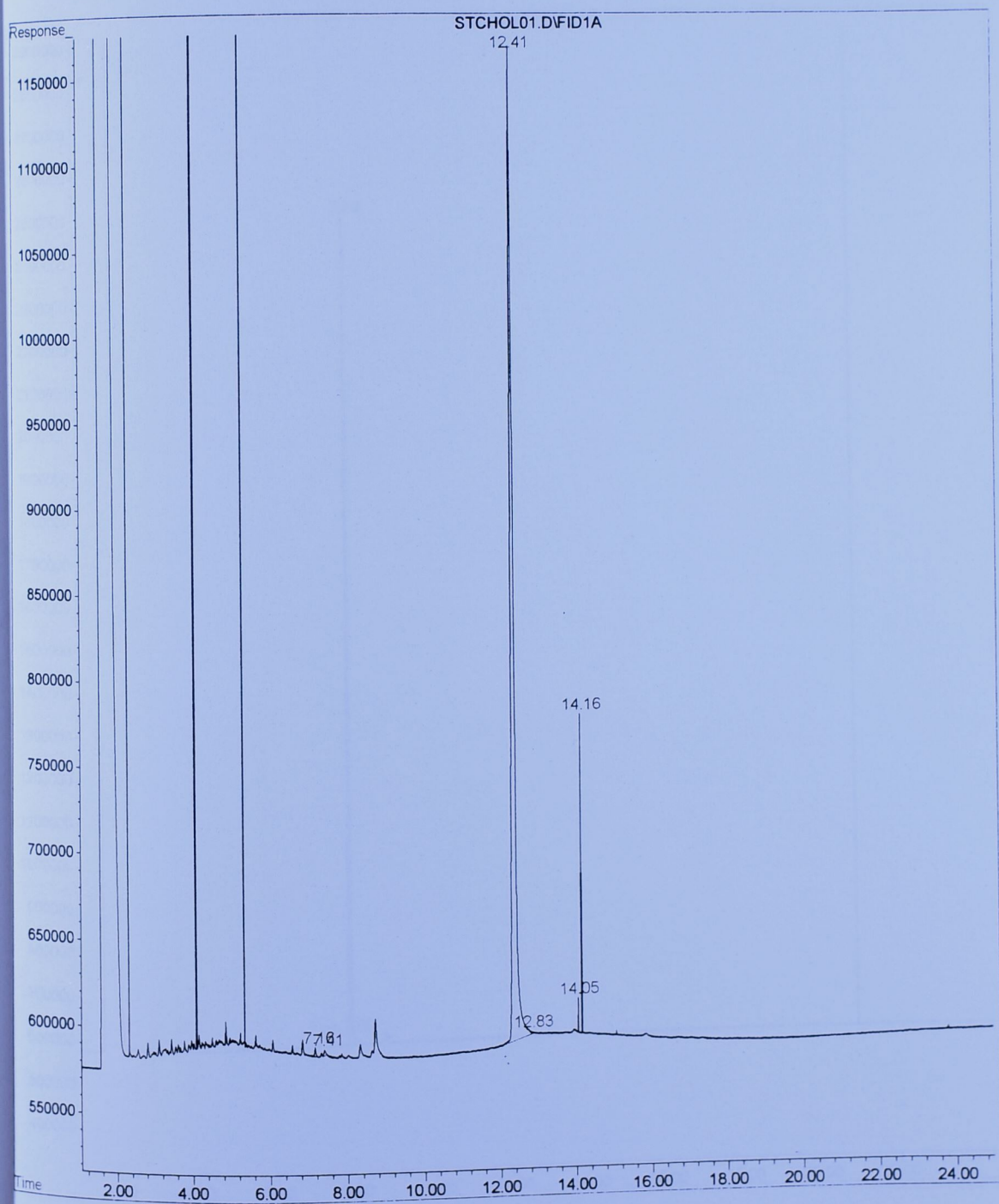
ΜΕΘΟΔΟΣ FOLCH:

Ζυγίζεται 1,5 g ($\pm 0,01$ g) θρυμματισμένου δείγματος σε μεγάλο γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου όπου προστίθενται 10 ml διαλύματος CH_3OH και ομογενοποιούνται σε ομογενοποιητή για 1 min. Χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιητής Ultraturax της IKA. Η ομογενοποίηση συνεχίζεται μετά την προσθήκη 20 ml δ/τος CHCl_3 και το όλον φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό, μεταγγίζεται σε μεγάλο ογκομετρικό κύλινδρο, ενώ στο στερεό υπόλειμμα προστίθενται σταδιακά 30 ml μίγματος CHCl_3 / CH_3OH 2:1 προς ομογενοποίηση. Κατόπιν προστίθενται 200μL πρότυπου δ/τος (stock) 5α - χολεστανίου σε κυκλοεξάνιο (41.2mg/ 100mL κυκλοεξανίου), ως εσωτερικό πρότυπο.

Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 min και μετάγγιση του εκχυλίσματος στον ογκομετρικό κύλινδρο. Εκεί προστίθεται δ/μα KCl 0,9 %, σε όγκο ίσο με το 1/5 του περιεχομένου του ογκομετρικού κυλίνδρου και το όλον αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα επί 1 min. Μετά τον διαχωρισμό των δύο φάσεων (σε ηρεμία), η πάνω στιβάδα απομακρύνεται με αναρρόφηση. Εν συνεχεία, γίνεται η προσθήκη της θεωρητικής πάνω φάσης Folch (CHCl_3 : CH_3OH : KCl(aq) 0,74 % - 3 : 48 : 47), σε όγκο ίσο με το 1/2 του περιεχομένου στον ογκομετρικό σωλήνα και το όλον αναδεύεται για 1 min. Η πάνω στιβάδα, απομακρύνεται με αναρρόφηση, ενώ η κάτω μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και ξηραίνεται με προσθήκη στερεού Na_2SO_4 . Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται σε συσκευή Rotary Evaporator, σε θερμοκρασία $\leq 40^\circ\text{C}$ και στη συνέχεια τα ολικά λιπίδια παραλαμβάνονται με 2*5 ml ισοπροπανόλης / εξάνιο 4:1, και 5 ml εξάνιο. Τέλος, ακολουθεί εξάτμιση των δ/των με ρεύμα αζώτου.

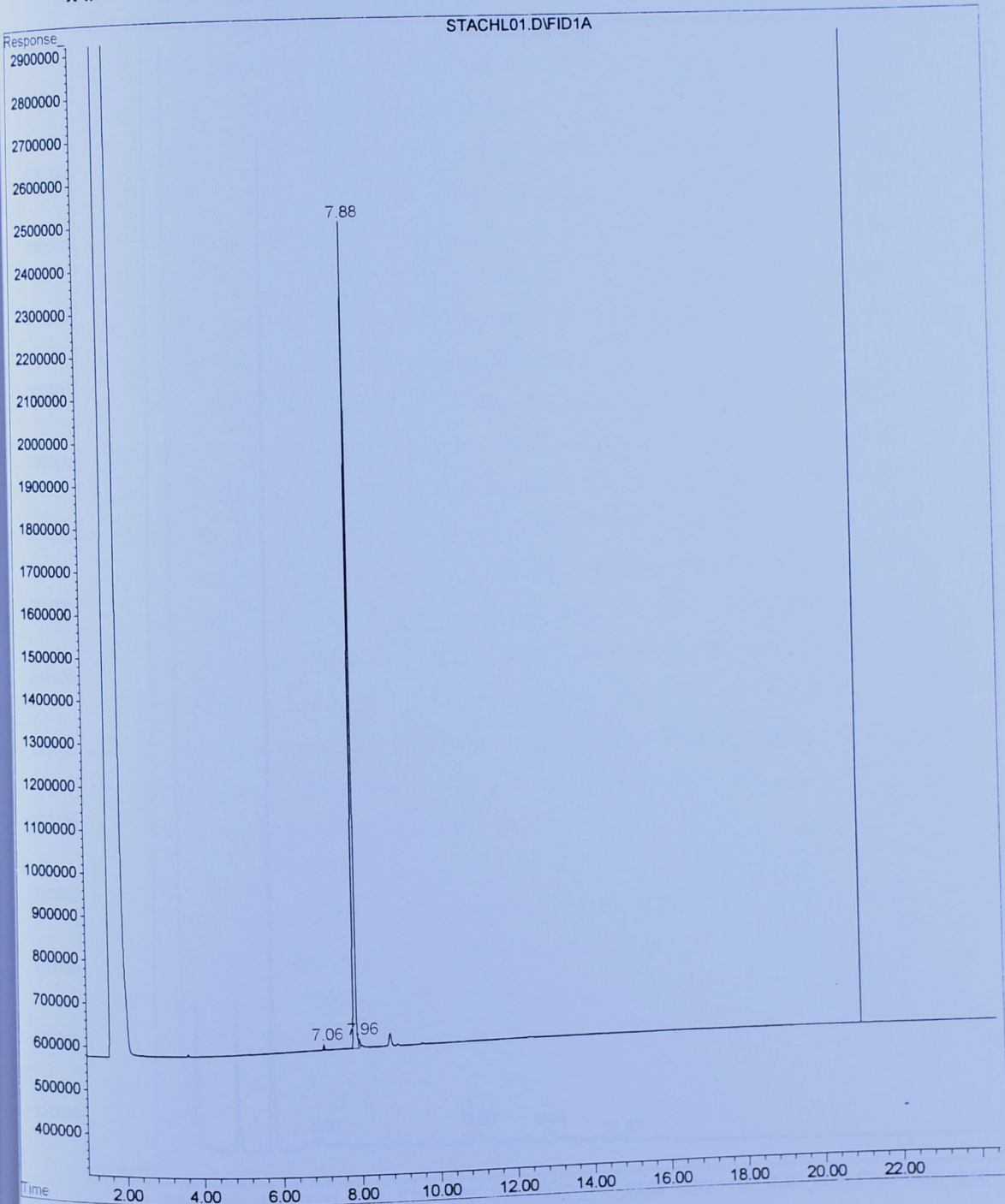
File : C:\HPCHEM\2\DATA\FID\STEROLS\STCHOL01.D
Operator :
Acquired : 5-19-80 11:11:56 using AcqMethod FSTRL01.M
Instrument : HP G1530A
Sample Name: STOCK CHOLESTEROL FID
Misc Info :
Vial Number: 1

Σχήμα 5 : Χρωματογράφημα καθαρού προτύπου χοληστερόλης.



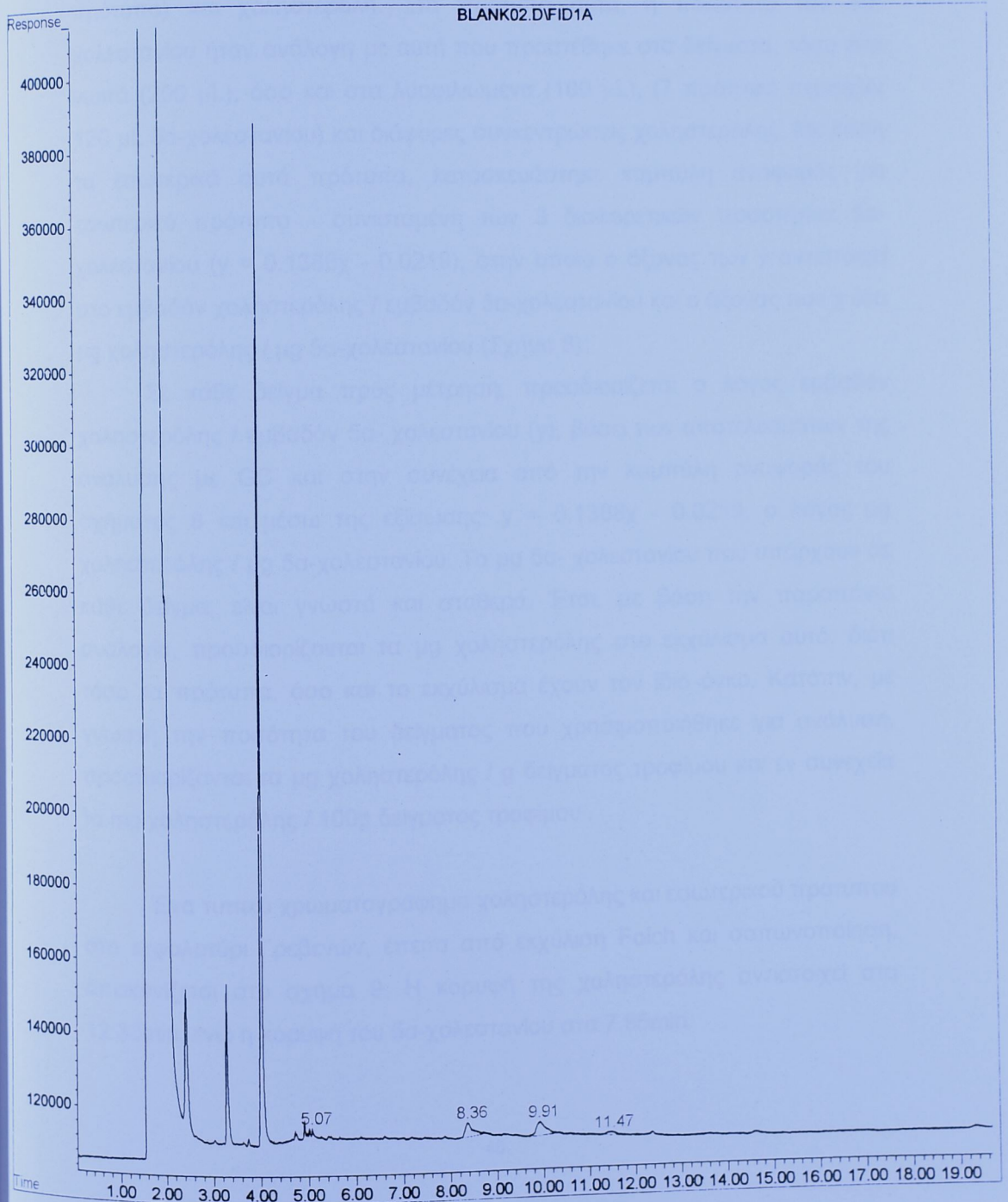
File : C:\HPCHEM\2\DATA\FID\STEROLS\STACHL01.D
Operator :
Acquired : 5-19-80 11:41:03 using AcqMethod FSTR01.M
Instrument : HP G1530A
Sample Name: STOCK A-CHOLESTANE FID
Misc Info :
Vial Number: 2

Σχήμα 6 : Χρωματογράφημα καθαρού προτύπου 5α-χολεστανίου.



File : C:\HPCHEM\2\DATA\FID\STEROLS\BLANK02.D
Operator : NK
Acquired : 6-23-80 13:53:22 using AcqMethod FSTRLO1.M
Instrument : HP G1530A
Sample Name: BLANK OF KUWAIT METHOD
Misc Info :
Vial Number: 19

Σχήμα 7 : Χρωματογράφημα διαλυτών τυφλού προσδιορισμού



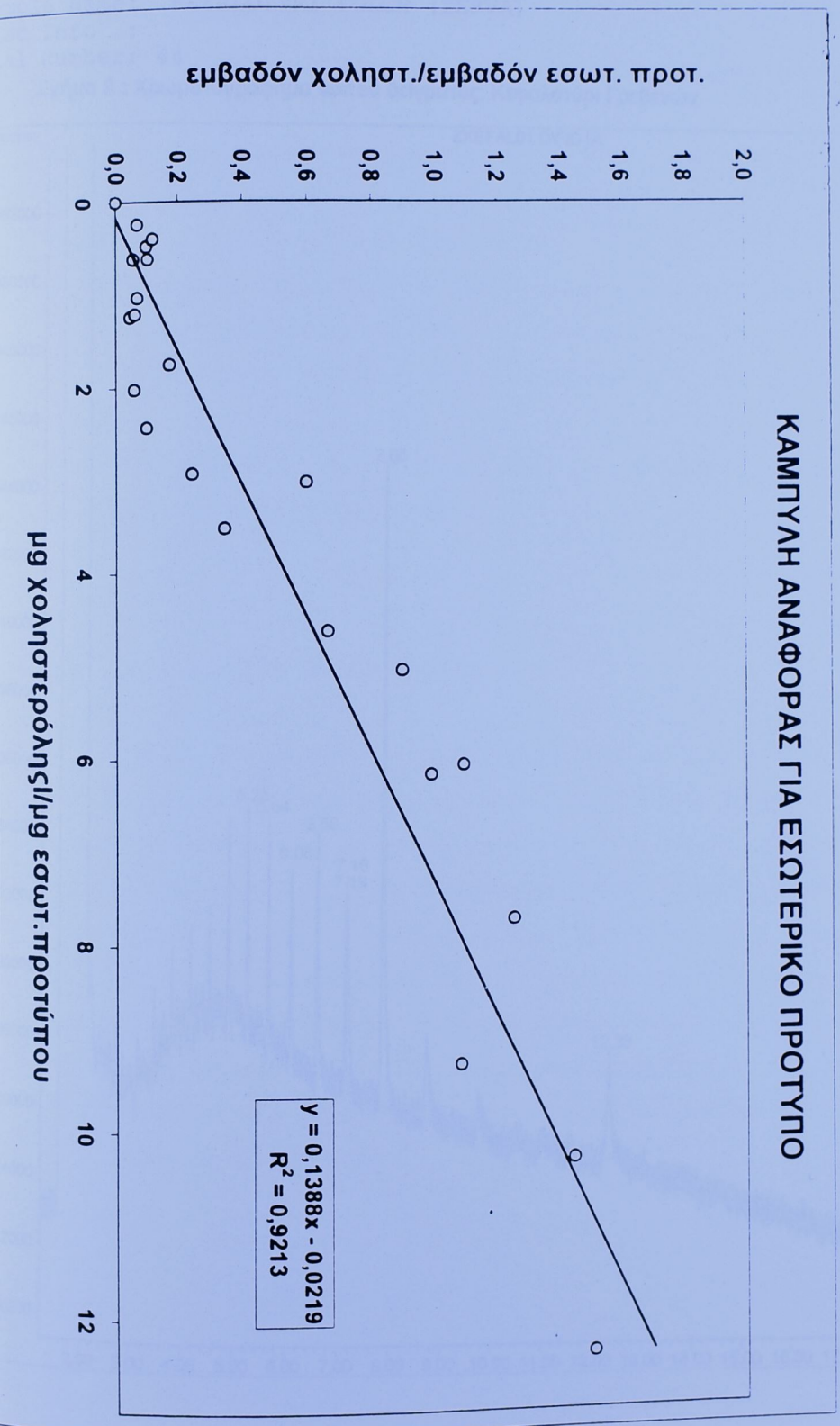
4.8β ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της χοληστερόλης, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας σειράς προτύπων που περιείχαν 5α-χολεστανίο (εσωτερικό πρότυπο) και χοληστερόλη. Στα πρότυπα αυτά, η ποσότητα του 5α-χολεστανίου ήταν ανάλογη με αυτή που προστέθηκε στα δείγματα, τόσο στα νωπά (200 μL), όσο και στα λυοφιλωμένα (100 μL), (7 πρότυπα περιείχαν 120 μL 5α-χολεστανίου) και διάφορες συγκεντρώσεις χοληστερόλης. Με βάση τα εσωτερικά αυτά πρότυπα, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για εσωτερικό πρότυπο - συνισταμένη των 3 διαφορετικών ποσοτήτων 5α-χολεστανίου ($y = 0.1388x - 0.0219$), στην οποία ο άξονας των y αντιστοιχεί στο εμβαδόν χοληστερόλης / εμβαδόν 5α-χολεστανίου και ο άξονας των x στα μg χοληστερόλης / μg 5α-χολεστανίου (Σχήμα 8).

Σε κάθε δείγμα προς μέτρηση, προσδιορίζεται ο λόγος εμβαδόν χοληστερόλης / εμβαδόν 5α- χολεστανίου (y), βάσει των αποτελεσμάτων της ανάλυσης με GC και στην συνέχεια από την καμπύλη αναφοράς του σχήματος 8 και μέσω της εξίσωσης: $y = 0.1388x - 0.0219$, ο λόγος μg χοληστερόλης / μg 5α-χολεστανίου. Τα μg 5α- χολεστανίου που υπάρχουν σε κάθε δείγμα, είναι γνωστά και σταθερά. Έτσι, με βάση την παραπάνω αναλογία, προσδιορίζονται τα μg χοληστερόλης στο εκχύλισμα αυτό, διότι τόσο τα πρότυπα, όσο και το εκχύλισμα έχουν τον ίδιο όγκο. Κατόπιν, με γνωστή την ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση, προσδιορίζονται τα μg χοληστερόλης / g δείγματος τροφίμου και εν συνεχεία τα mg χοληστερόλης / 100g δείγματος τροφίμου .

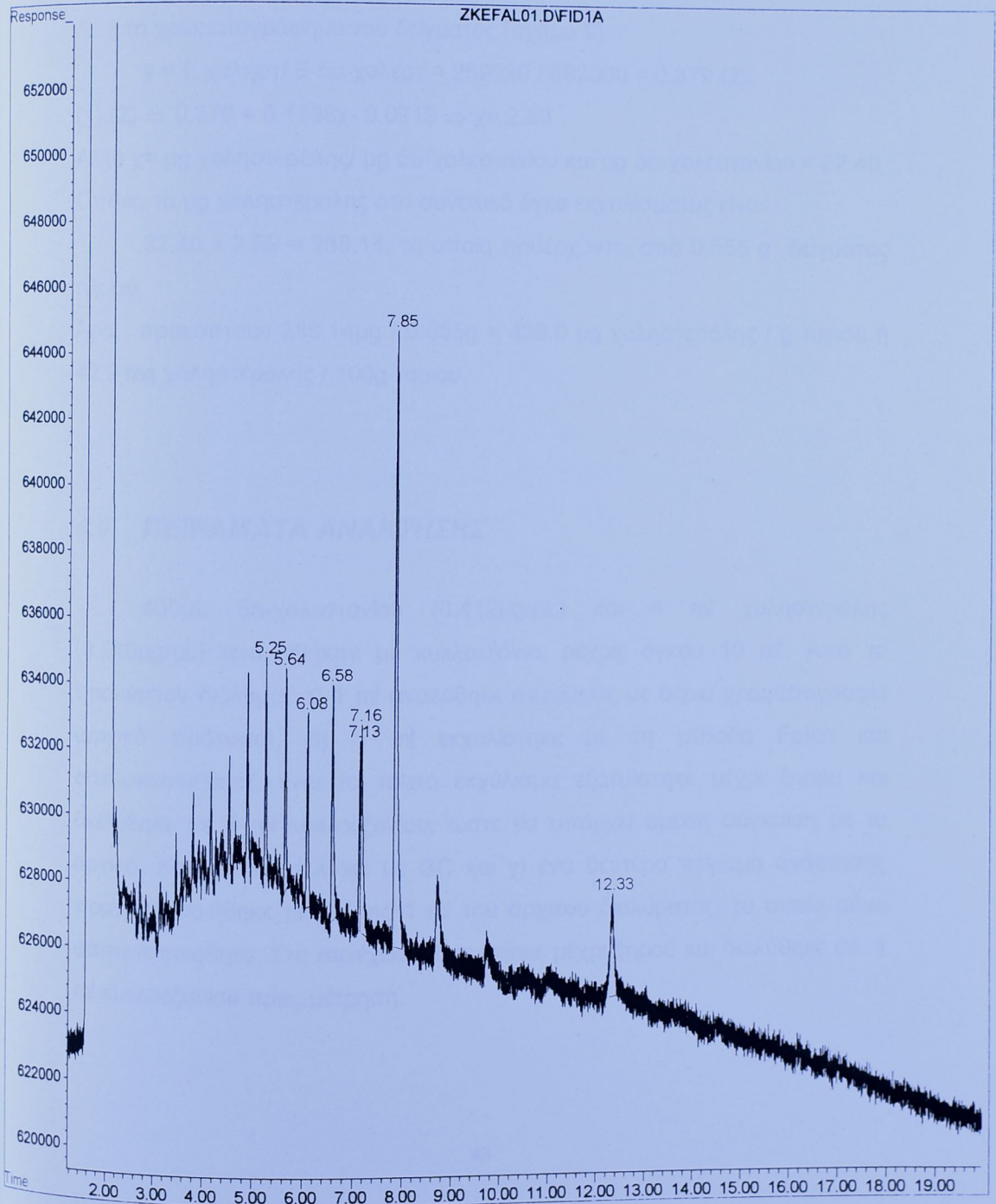
Ένα τυπικό χρωματογράφημα χοληστερόλης και εσωτερικού προτύπου στο κεφαλοτύρι Γρεβενών, έπεται από εκχύλιση Folch και σαπωνοποίηση, απεικονίζεται στο σχήμα 9. Η κορυφή της χοληστερόλης αντιστοιχεί στα 12.33min, ενώ η κορυφή του 5α-χολεστανίου στα 7.85min.

Σχήμα 8 : Καμπύλη αναφοράς για εσωτερικό πρότυπο



File : C:\HPCHEM\2\DATA\FID\STEROLS\ZKEFAL01.D
Operator : nk
Acquired : 5-20-80 11:02:29 using AcqMethod FSTR01.M
Instrument : HP G1530A
Sample Name: KEFALOTYRI FOLCH (ZERVA)
Misc Info :
Vial Number: 44

Σχήμα 9 : Χρωματογράφημα ναπού δείγματος: Κεφαλοτύρι Γρεβενών



Πρακτικό παράδειγμα προσδιορισμού χοληστερόλης

Έστω νωπό δείγμα: Κεφαλοτύρι Γρεβενών

Από την καμπύλη αναφοράς για εσωτερικό πρότυπο (σχήμα 8), ισχύει η σχέση: $y = 0.1388x - 0.0219$ (1).

Από το χρωματογράφημα του δείγματος (σχήμα 9):

$$y = E \text{ χοληστ} / E \text{ 5}\alpha\text{-χολεστ} = 259020 / 683060 = 0.379 \text{ (2)}.$$

$$(1), (2) \Rightarrow 0,379 = 0.1388x - 0.0219 \Rightarrow x = 2.89$$

Αλλά $x = \mu\text{g χοληστερόλης} / \mu\text{g 5}\alpha\text{-χολεστανίου}$ και $\mu\text{g 5}\alpha\text{-χολεστανίου} = 82.40$

Οπότε, τα $\mu\text{g χοληστερόλης}$ στο συνολικό όγκο εκχυλίσματος είναι:

$82.40 * 2.89 = 238.14$, τα οποία προέρχονται από 0.555 g δείγματος τυριού.

Άρα, προκύπτουν $238.14 \mu\text{g} / 0.555\text{g} = 429.0 \mu\text{g χοληστερόλης} / \text{g τυριού}$ ή $42.9 \text{ mg χοληστερόλης} / 100\text{g τυριού}$.

4.9 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

400 μL 5 α -χολεστανίου (0,412 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) και 4 ml χοληστερόλης (0,510 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) αναμίχθηκαν με κυκλοεξάνιο, μέχρις όγκου 10 ml. Από το προκύπτον διάλυμα: α) 1 ml αναλύθηκε απευθείας με αέρια χρωματογραφία (αρχικό πρότυπο), β) 1 ml εκχυλίστηκε με τη μέθοδο Folch και σαπωνοποιήθηκε, ενώ το τελικό εκχύλισμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και διαλύθηκε σε 1 ml κυκλοεξανίου, ώστε να υπάρχει άμεση σύγκριση με το αρχικό. Κατόπιν αναλύθηκε με GC και γ) ένα δεύτερο πείραμα ανάκτησης πραγματοποιήθηκε με επίσης 1 ml του αρχικού διαλύματος, το οποίο μόνο σαπωνοποιήθηκε. Στη συνέχεια, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και διαλύθηκε σε 1 ml κυκλοεξανίου προς μέτρηση.

Υπολογισμοί - Αποτελέσματα:

Στο αρχικό πρότυπο, έχουμε:

5α-χολεστανίο: $400\mu\text{L} * 0,412\mu\text{g}/\mu\text{L} = 164,8 \mu\text{g}$ σε 10 ml $\Rightarrow 16,48 \mu\text{g}/\text{ml}$

Χοληστερόλη: $4000 \mu\text{L} * 0,510\mu\text{g}/\mu\text{L} = 2040 \mu\text{g}$ σε 10 ml $\Rightarrow 204,0 \mu\text{g}/\text{ml}$

Δείγμα	Εμβαδόν 5α- χολεστ.	Εμβαδόν χοληστ.	Εχοληστ/Ε 5α- χολεστ.	μg χοληστ /ml	μg IS / ml
Αρχικό 1	2071377	1600582	0,773	94,3	16,48
Αρχικό 2	1976778	2097150	1,061	128,6	16,48
				μ.ο. 111	
Αρχικό μετά 1 ημέρα	1662155	402859	0,242	31,3	16,48
Folch	2320009	2059830	0,888	108,0	16,48
Σαπωνοπ.	3444998	917521	0,266	34,2	16,48

Τα μg χοληστ/ml, προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς για εσωτερικό πρότυπο, με βάση την εξίσωση: $y = 0,1388x - 0,0219$ (βλ. παραγρ.4.8β).

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω πειράματα και αποτελέσματα:

α) Η ανάκτηση της χοληστερόλης για τη μέθοδο Folch είναι:

$$108/111 * 100 \mu\text{g} \text{ χοληστ}/\text{ml} = 97,3\%.$$

β) Η ανάκτηση της χοληστερόλης για μόνο τη σαπωνοποίηση είναι:

$$34,2/111 * 100 \mu\text{g} \text{ χοληστ}/\text{ml} = 30,8\%.$$

Πραγματοποιήθηκε επανάληψη του πειράματος ανάκτησης, σε ότι αφορά την απευθείας σαπωνοποίηση, το οποίο έδειξε ότι η χοληστερόλη ανακτάται σε ποσοστό 69%.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης είναι αβέβαια, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στις ίδιες αιτίες με αυτές των συνολικών προσδιορισμών.

4.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΩΝ ΜΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΗ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΙΜΩΝ

Στα πλαίσια της πτυχιακής μελέτης των Μαχαίρα Παναγιώτη και Αρώνη Ελένης, απομονώθηκε η μη σαπωνοποιήσιμη λιπαρή ύλη (λιποδιαλυτές βιταμίνες -χοληστερόλη) από τα ίδια νωπά δείγματα τυριών, με διαδικασία που περιελάμβανε πρώτα την σαπωνοποίηση των δειγμάτων με αιθανολικό διάλυμα ΚΟΗ και κατόπιν την εκχύλιση των μη σαπωνοποιήσιμων λιπαρών με εξάνιο, χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου. Η κατεργασία των δειγμάτων στην περίπτωση αυτή, έγινε σε ήπιες συνθήκες: όχι υψηλή θερμοκρασία, παρουσία αντιοξειδωτικών (ασκορβικό οξύ και ΒΗΤ βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο) και απουσία έντονου φωτός.

Εν συντομία η μέθοδος έχει ως εξής:

Σαπωνοποίηση: 20g τεμαχισμένου τυριού, τοποθετούνται σε κωνική φιάλη, στην οποία προστίθενται 1g ασκορβικού οξέος και 100ml αιθανολικού δ/τος ΚΟΗ 10%. Η κωνική φιάλη καλύπτεται με πολλές στρώσεις παραφίλμ και διοχετεύεται ρεύμα αζώτου, ενώ εν συνεχεία καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, ώστε να αποφεύγεται η επαφή με το φως. Ακολουθεί, ολονύκτια μαγνητική ανάδευση σε υδατόλουτρο.

Εκχύλιση: Το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης (μέσω δυο εκπλύσεων) μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη, καλυμμένη με αλουμινόχαρτο. Ακολουθούν 4 διαδοχικές εκχυλίσεις με 40ml εξάνιο και μεταφορά σε καθαρή χοάνη κάθε φορά. Η εκχύλιση εφαρμόζεται με ανατάραξη, εκτόνωση, διαχωρισμό των φάσεων και συλλογή της κάτω χρωματιστής στιβάδας. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται έκπλυση του περιεχομένου της τελευταίας χοάνης με 5* 50ml νερό και διαπίστωση της ουδετεροποίησης του ΡΗ με πεχαμετρικό χαρτί.

Εξάτμιση: Το περιεχόμενο της χοάνης μεταφέρεται σε κωνική φιάλη, όπου προστίθενται άνυδρο θειικό νάτριο και 0.02g ΒΗΤ. Αφού το σχηματιζόμενο άλας καθιζήσει, ακολουθεί μεταφορά σε σφαιρική φιάλη και εξάτμιση σε flash

evaporator. Τέλος, πραγματοποιείται έκπλυση με $3 \times 2\text{-}3\text{ml}$ εξάνιο, μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα και επικάλυψη με παραφίλμ και αλουμινόχαρτο, έπειτα από την διοχέτευση ρεύματος αζώτου (Lim et al, 1992).

Τα μη σαπωνοποιήσιμα συστατικά, αναλύθηκαν στη συσκευή GC (με τις λειτουργικές συνθήκες που έχουν προαναφερθεί) και πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός χοληστερόλης με τη βοήθεια εξωτερικού προτύπου χοληστερόλης. Για τον υπολογισμό της χοληστερόλης σε $\mu\text{g}/1\mu\text{L}$ ενέσιμου διαλύματος, χρησιμοποιήθηκε η σχέση: Εμβαδόν χοληστερόλης / Εμβαδόν προτύπου = μg χοληστερόλης / μg προτύπου. Στη συνέχεια με βάση τον εκχυλισμένο όγκο (1ml) και την αρχική ποσότητα δείγματος τυριού (20g), προσδιορίζονται τα μg χοληστερόλης/ g τυριού και κατόπιν τα mg χοληστερόλης/ 100 g δείγματος τυριού.

Ένα τυπικό χρωματογράφημα μη σαπωνοποιήσιμων από το κεφαλοτύρι Γρεβενών, έπειτα από σαπωνοποίηση και εκχύλιση, απεικονίζεται στο σχήμα 10. Η κορυφή της χοληστερόλης αντιστοιχεί στα $12,71\text{min}$.

Πρακτικό παράδειγμα προσδιορισμού χοληστερόλης

Έστω νωπό δείγμα: Κεφαλοτύρι Γρεβενών

Ισχύει η σχέση: $E_{\text{χοληστ}} / E_{\text{προτύπου}} = \mu\text{g χοληστ} / \mu\text{g προτύπου}$ (1).

Από το χρωματογράφημα του δείγματος (σχήμα 10): $E_{\text{χοληστ}} / E_{\text{προτύπου}} = 407918209 / 11591879 = 35.19$ (2).

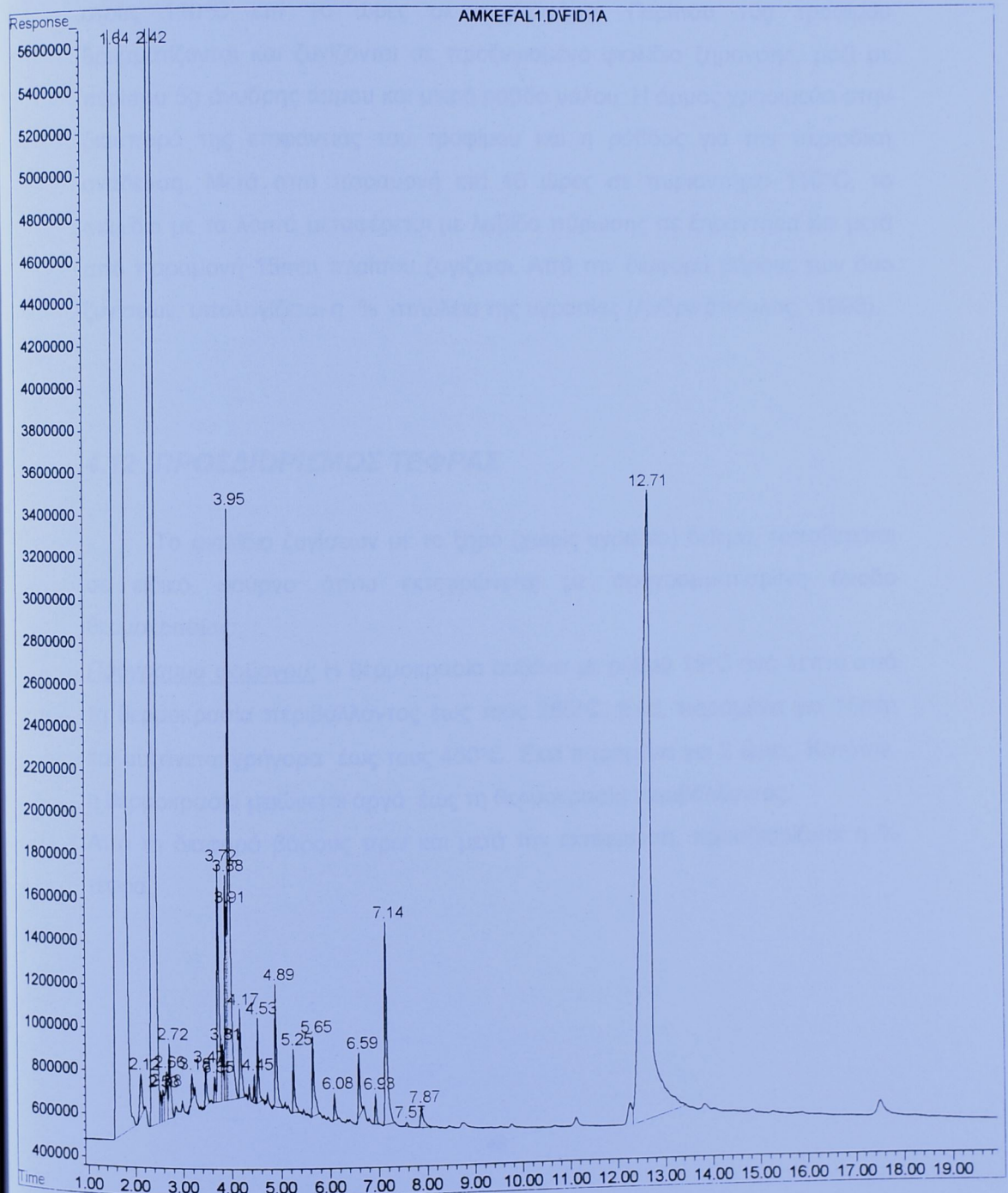
Η ποσότητα του προτύπου είναι γνωστή: $0.51\text{ }\mu\text{g}$ (3).

(1),(2),(3) $\Rightarrow \mu\text{g χοληστερόλης στο } 1\mu\text{L ενέσιμου διαλύματος: } 35.19 * 0.51 = 17.946$.

Στο 1ml εκχυλισμένου όγκου, είναι: $17.946 * 1000 = 17946\text{ }\mu\text{g χοληστερόλης}$, τα οποία προέρχονται από 20g αρχικού δείγματος τυριού. Άρα, $17946\mu\text{g} / 20\text{g} = 897.3\text{ }\mu\text{g χοληστερόλης/g τυριού ή } 89.7\text{ mg χοληστερόλης}/100\text{ g τυριού}$.

File : C:\HPCHEM\2\DATA\FID\STEROLS\AMKEFAL1.D
Operator : nk
Acquired : 5-24-80 14:11:14 using AcqMethod FSTR01.M
Instrument : HP G1530A
Sample Name: Kefalotyri (3)
Misc Info :
Vial Number: 3

Σχήμα 10 : Χρωματογράφημα ωπτού δείγματος: Κεφαλοτύρι Γρεβενών



4.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ο προσδιορισμός της υγρασίας, πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό της διαφοράς του βάρους του δείγματος πριν και μετά από την θέρμανσή του στους 110°C επί 16 ώρες σε πυριαντήριο. Περίπου 10g τροφίμου θρυμματίζονται και ζυγίζονται σε προζυγισμένο φιαλίδιο ξήρανσης, μαζί με περίπου 5g άνυδρης άμμου και μικρή ράβδο υάλου. Η άμμος χρησιμεύει στην διασπορά της επιφάνειας του τροφίμου και η ράβδος για την περιοδική ανάδευση. Μετά από παραμονή επί 16 ώρες σε πυριαντήριο 110°C, το φιαλίδιο με τα λοιπά μεταφέρεται με λαβίδα πύρωσης σε ξηραντήρα και μετά από παραμονή 15min περίπου ζυγίζεται. Από την διαφορά βάρους των δυο ζυγίσεων, υπολογίζεται η % απώλεια της υγρασίας (Ανδρικόπουλος, 1998).

4.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΕΦΡΑΣ

Το φιαλίδιο ζυγίσεων με το ξηρό (χωρίς υγρασία) δείγμα, τοποθετείται σε ειδικό φούρνο όπου εκτεφρώνεται με προγραμματισμένη άνοδο θερμοκρασίας:

Πρόγραμμα φούρνου: Η θερμοκρασία αυξάνει με ρυθμό 15°C ανά λεπτό από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος έως τους 265°C. Εκεί, παραμένει για 15min και αυξάνεται γρήγορα έως τους 450°C. Εκεί παραμένει για 2 ώρες. Κατόπιν, η θερμοκρασία μειώνεται αργά έως τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Από τη διαφορά βάρους πριν και μετά την εκτέφρωση, προσδιορίζεται η % τέφρα.

4.13 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΑΤΟΣ

Το περιεχόμενο άλας, προσδιορίζεται ογκομετρικά με τη μέθοδο Mohr (αργυρομετρία). Πιο συγκεκριμένα, η τέφρα αναμιγνύεται με απιονισμένο νερό μέχρις όγκου 100ml. 50ml, μεταφέρονται σε κωνική φιάλη προς τιτλοδότηση με δ/μα AgNO_3 0,0282M, ύστερα από την προσθήκη 5 σταγόνων δείκτη K_2CrO_4 2 % W / V. Από την κατανάλωση του AgNO_3 , υπολογίζεται το % αλάτι επί ξηρού, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\% \text{ αλάτι (επί ξηρού) } = (V_1 - V_2) * V_4 / V_3 * N / W * 58,41 * 100$$

V_1 = ml AgNO_3 τιτλοδότηση δείγματος

V_2 = ml AgNO_3 αποτέλεσμα τυφλού προσδιορισμού

V_3 = όγκος προς τιτλοδότηση (50 ml)

V_4 = συνολικός όγκος δ/τος τέφρας (100ml)

N = συγκέντρωση AgNO_3 (0,0282 N)

W = βάρος αρχικού δείγματος τυριού σε mg

58,41 = MB NaCl

4.14 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Kjeldahl τόσο στα νωπά όσο και στα λυοφιλιωμένα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκε συσκευή Buchi, η οποία αποτελείται από τρία μέρη, τη συσκευή πέψης, τη συσκευή δέσμευσης ατμών της πέψης και την συσκευή απόσταξης με υδρατμούς.

Ζυγίζεται ~1g δείγματος και μεταφέρεται σε ειδικό σωλήνα της συσκευής πέψης Kjeldahl, όπου προστίθεται ένα δισκίο εμπορίου μίγματος 10g K_2SO_4 (για έλεγχο της ανόδου του σημείου ζέσεως) και 1g CuSO_4 (για την

κατάλυση της αντίδρασης καύσης των πρωτεϊνών). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη με διανομέα υγρού 25ml π. H_2SO_4 προς καύση των πρωτεϊνών στη συσκευή πέψης, ενώ το πρωτεϊνικό N μετατρέπεται με τον τρόπο αυτό σε αμμωνιακά άλατα. Τα ιόντα NH_4^+ , των αλάτων μετατρέπονται σε NH_3 με επίδραση δ/τος αλκάλειος NaOH 32% και η πτητική NH_3 αποστάζεται με υδρατμούς στην συσκευή απόσταξης Kjeldahl και το σύνολό της εξουδετερώνεται με γνωστή περίσσεια δ/τος οξέος, HCl 0,5N. Η περίσσεια του οξέος, υπολογίζεται με ογκομέτρηση με δ/μα βάσης NaOH 0,5N με δείκτη ερυθρό του μεθυλίου και από την κατανάλωση, υπολογίζεται η αποσταχθείσα NH_3 και το άζωτο της αμμωνίας, δηλ. το άζωτο των πρωτεϊνών και τελικά η ποσότητα των πρωτεϊνών του δείγματος, βάσει της σχέσης:

% Πρωτεΐνη = % N * 6.38 (για τα γαλακτοκομικά) (Ανδρικόπουλος, 1998).

4.15 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΥΣ

ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η εκχύλιση των νωπών δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο Folch, οδηγεί στην παραλαβή των ολικών λιπαρών, από τη ζύγιση των οποίων προκύπτει η % περιεκτικότητα λίπους επί νωπού δείγματος. Με γνωστή την % υγρασία κάθε δείγματος, υπολογίζεται η % περιεκτικότητα λίπους επί ξηρού δείγματος.

4.16 ΕΜΜΕΣΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΟΥΣ

ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ - ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Με γνωστές τις τιμές της % υγρασίας, της % τέφρας και της % πρωτεΐνης, προσδιορίζεται έμμεσα το ποσοστό λίπους των δειγμάτων τυριών, δεδομένου ότι το ποσοστό των περιεχομένων σ' αυτά υδατανθράκων θεωρείται αμελητέο. Στα δείγματα γιαούρτης, υπάρχουν συνήθως υδατάνθρακες.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΥΓΡΑΣΙΑ – ΛΙΠΟΣ – ΠΡΩΤΕΪΝΗ – ΤΕΦΡΑ – ΑΛΑΤΙ

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δειγμάτων γαλακτοκομικών συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4: Αποτελέσματα προσδιορισμών επί νωπού (%) δείγματος.

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΥΓΡΑΣΙΑ (%)	ΠΡΩΤΕΪΝΗ (%)	ΛΙΠΟΣ** (%)	ΤΕΦΡΑ (%)	ΑΛΑΤΙ (%)
Φέτα Μακεδονίας	52.30	16.32	27.74	3.64	1.99
Φέτα Ηπείρου	53.30	16.22	26.78	3.70	2.06
Φέτα Θεσσαλίας	50.70	16.55	29.56	3.20	1.63
Φέτα Πελοποννήσου	52.10	17.75	26.44	3.69	1.87
Φέτα Δωδώνης*	54.40	16.12	25.27	4.21	2.77
Καλαθάκι Λήμνου	58.10	15.65	21.94	4.30	2.91
Φέτα Λήμνου*	55.07	16.04	25.72	3.17	3.21
Τελεμές Μακεδονίας	60.50	14.43	21.84	3.21	2.10
Τελεμές Θεσσαλίας	54.70	15.53	26.15	3.62	2.30
Τελεμές Τρικάλων*	55.64	14.31	26.88	3.16	2.97
Μανούρι Μακεδονίας	44.30	6.95	47.34	1.41	0.93
Μανούρι Θεσσαλίας	35.60	7.73	54.34	2.32	1.88
Ανθότυρο Μακεδονίας	72.50	9.96	16.01	1.53	0.75
Μυζήθρα Μακεδονίας	64.10	13.72	19.70	2.48	1.65
Μυζήθρα Κρήτης	66.70	11.26	20.54	1.50	0.59
Κοπανιστή*	59.81	13.54	23.86	2.79	2.95
Κασέρι Μακεδονίας	40.90	24.49	30.35	4.26	1.40
Κασέρι Νήσων Αιγαίου	46.00	23.90	26.18	3.93	1.30
Κασέρι*	40.95	25.30	30.73	3.02	1.42
Κεφαλοτύρι Μακεδονίας	36.00	24.20	33.61	6.19	3.40
Κεφαλοτύρι Κρήτης	37.80	28.19	29.53	4.48	3.37
Κεφαλοτύρι Γρεβενών*	36.18	21.41	36.51	5.90	5.61
Γραβιέρα Κρήτης	33.60	23.65	38.35	4.41	1.39
Γραβιέρα Νάξου	31.60	27.70	36.43	4.28	1.28
Γραβιέρα Κρήτης*	33.34	25.33	38.22	3.01	1.40
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	33.80	24.38	36.83	4.98	1.97
Λαδοτύρι Μυτιλήνης*	40.87	21.94	33.69	3.50	1.97
Μετσοβόνε*	43.81	21.90	30.83	3.46	2.11
Φορμαέλλα*	40.00	21.87	33.50	4.63	2.33
Αγνό Βικτώρια	33.10	25.36	37.00	4.53	1.70
Γιαούρτι στραγγιστό	75.00	7.02	-	0.73	0.05
Γιαούρτι αγελάδος Ευρ.	81.10	4.81	-	1.07	0.20
Γιαούρτι αγελάδος παρ.	79.80	5.70	-	1.16	0.21
Γιαούρτι πρόβειο παρ.	74.90	7.24	-	1.30	0.17

Πίνακας 5: Αποτελέσματα προσδιορισμών επί ξηρού (%) δείγματος.

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΡΩΤΕΪΝΗ (%)	ΛΙΠΟΣ** (%)	ΤΕΦΡΑ (%)	ΑΛΑΤΙ (%)
Φέτα Μακεδονίας	34.22	58.15	7.63	4.18
Φέτα Ηπείρου	34.73	57.35	7.92	4.41
Φέτα Θεσσαλίας	33.56	59.95	6.49	3.31
Φέτα Πελοποννήσου	37.07	55.21	7.72	3.92
Φέτα Δωδώνης*	35.34	55.43	9.23	6.07
Καλαθάκι Λήμνου	37.36	52.37	10.27	6.94
Φέτα Λήμνου*	35.70	57.24	7.06	7.14
Τελεμές Μακεδονίας	36.55	55.31	8.14	5.33
Τελεμές Θεσσαλίας	34.29	57.72	7.99	5.07
Τελεμές Τρικάλων*	32.27	60.60	7.13	6.71
Μανούρι Μακεδονίας	12.48	84.99	2.53	1.67
Μανούρι Θεσσαλίας	12.01	84.39	3.60	2.92
Ανθότυρο Μακεδονίας	36.22	58.21	5.57	2.74
Μυζήθρα Μακεδονίας	38.22	54.87	6.91	4.60
Μυζήθρα Κρήτης	33.82	61.69	4.49	1.77
Κοπανιστή*	33.69	59.38	6.93	7.33
Κασέρι Μακεδονίας	41.43	51.36	7.21	2.37
Κασέρι Νήσων Αιγαίου	44.25	48.48	7.27	2.40
Κασέρι*	42.84	52.04	5.12	2.41
Κεφαλοτύρι Μακεδονίας	37.82	52.51	9.67	5.31
Κεφαλοτύρι Κρήτης	45.32	47.47	7.21	5.42
Κεφαλοτύρι Γρεβενών*	33.55	57.21	9.24	8.79
Γραβιέρα Κρήτης	35.61	57.75	6.64	2.10
Γραβιέρα Νάξου	40.49	53.26	6.25	1.87
Γραβιέρα Κρήτης*	38.05	57.43	4.52	2.10
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	36.83	55.64	7.53	2.97
Λαδοτύρι Μυτιλήνης*	37.10	56.98	5.92	3.34
Μετσοβόνη*	38.98	54.87	6.15	3.75
Φορμαέλλα*	36.45	55.83	7.72	3.89
Αγνό Βικτώρια	37.92	55.31	6.77	2.54
Γιαούρτι στραγγιστό	28.09	-	2.90	0.21
Γιαούρτι αγελάδος Ευρ.	25.46	-	5.67	1.08
Γιαούρτι αγελάδος παρ.	28.24	-	5.73	1.03
Γιαούρτι πρόβειο παρ.	28.87	-	5.19	0.67

* Νωπά δείγματα τυριών.

** Ο προσδιορισμός του λίπους τόσο επί νωπού όσο και επί ξηρού δείγματος έχουν γίνει **έμμεσα** βάσει των τιμών των υπολοίπων δεδομένων.

Σημείωση: Ο έμμεσος προσδιορισμός λίπους επί νωπού (%) και επί ξηρού (%) δείγματος στα γιαούρτια ήταν αδύνατος, εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε υδατάνθρακες σε ποσοστό που δεν θεωρείται αμελητέο.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν οι εξής παρατηρήσεις για την υγρασία, πρωτεΐνη, λίπος, τέφρα και αλάτι με βάση το διαχωρισμό των τυριών σε επιμέρους κατηγορίες (Ανδρικόπουλος, 1998):

ΥΓΡΑΣΙΑ:

Μεταξύ των μαλακών τυριών (Φέτες, Τελεμέδες, Κοπανιστή) η υψηλότερη υγρασία παρατηρήθηκε στον Τελεμέ Μακεδονίας με τιμή 60.5% και η μικρότερη στη Φέτα Θεσσαλίας με τιμή 50.7%.

Στα μαλακά τυριά τυρογάλατος - τύπου μυζήθρας (Ανθότυρα, Μυζήθρες, Μανούρια) οι τιμές για την υγρασία κυμαίνονται από 35.6% στο Μανούρι Θεσσαλίας έως 72.5% στο Ανθότυρο Μακεδονίας.

Η ανώτερη τιμή υγρασίας στα σκληρά τυριά (Κασέρια, Γραβιέρες) βρέθηκε στο Κασέρι Νήσων Αιγαίου σε ποσοστό 46%, ενώ η κατώτερη τιμή ήταν 31.6% και αντιστοιχεί στη Γραβιέρα Νάξου.

Στη κατηγορία των πολύ σκληρών τυριών (Κεφαλοτύρια, Λαδοτύρια) η υψηλότερη υγρασία εμφανίστηκε στο νωπό δείγμα Λαδοτύρι Μυτιλήνης με τιμή 40.87% και η χαμηλότερη στο ίδιο λυοφιλωμένο δείγμα με τιμή 33.8%.

Τέλος, από τα δείγματα γιαουρτιών, τη μεγαλύτερη τιμή υγρασίας 81.1% έχει το γιαούρτι αγελάδος Ευρωπαϊκού τύπου και τη μικρότερη 74.9% το πρόβειο παραδοσιακό γιαούρτι.

ΠΡΩΤΕΪΝΗ επί νωπού(%)

Από την κατηγορία των μαλακών τυριών, το δείγμα με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη αποτελεί η Φέτα Πελοποννήσου με ποσοστό 17.75%, ενώ το μικρότερο ποσοστό 13.54% εμφανίζεται στη Κοπανιστή.

Ανάμεσα στα μαλακά τυριά τυρογάλατος (τύπου μυζήθρας) το υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης (13.72%) παρατηρείται στη Μυζήθρα Μακεδονίας, ενώ το χαμηλότερο 6.95% στο Μανούρι Μακεδονίας.

Στα σκληρά τυριά, η μεγαλύτερη τιμή περιεχόμενης πρωτεΐνης εμφανίστηκε στη Γραβιέρα Νάξου σε ποσοστό 27.7% και η χαμηλότερη στο λυοφιλιωμένο δείγμα Γραβιέρα Κρήτης σε ποσοστό 23.65%.

Το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης στα πολύ σκληρά τυριά παρατηρήθηκε στο Κεφαλοτύρι Κρήτης με τιμή 28.19%, ενώ το μικρότερο ποσοστό 21.41% αντιστοιχεί στο Κεφαλοτύρι Γρεβενών.

Τέλος, η υψηλότερη τιμή πρωτεΐνης στα γιαούρτια βρέθηκε 7.24% στο πρόβειο παραδοσιακό, ενώ η χαμηλότερη 4.81% στο γιαούρτι αγελάδος Ευρωπαϊκού τύπου.

ΛΙΠΟΣ επί νωπού(%)

Στη κατηγορία των μαλακών τυριών, η Φέτα Θεσσαλίας εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους (29.56%) και η Κοπανιστή το μικρότερο ποσοστό με τιμή 13.54%.

Μεταξύ των μαλακών τυριών τύπου τυρογάλατος, αλλά και μεταξύ όλων των αναλυμένων δειγμάτων, το τυρί με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος 47.34% αποτελεί το Μανούρι Μακεδονίας, ενώ τη μικρότερη περιεκτικότητα σε λίπος 16.01% κατέχει το Ανθότυρο Μακεδονίας.

Το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους στα σκληρά τυριά παρατηρείται στο λυοφιλιωμένο δείγμα Γραβιέρα Κρήτης με τιμή 38.35% ενώ το μικρότερο ποσοστό λίπους στο Κασέρι Νήσων Αιγαίου με τιμή 26.18%.

Τέλος, στα πολύ σκληρά τυριά το ποσοστό λίπους κυμαίνεται από 29.53% στο Κεφαλοτύρι Κρήτης έως 36.83% στο λυοφιλωμένο δείγμα Λαδοτύρι Μυτιλήνης.

ΤΕΦΡΑ επί νωπού(%):

Το υψηλότερο ποσοστό τέφρας στα μαλακά τυριά παρατηρήθηκε στο Καλαθάκι Λήμνου (4.30%) και οφείλεται στο περιεχόμενο αλάτι, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό στη Κοπανιστή με τιμή 2.79%.

Ανάμεσα στα μαλακά τυριά τύπου τυρογάλατος, η υψηλότερη τιμή τέφρας 2.48% εμφανίζεται στη Μυζήθρα Μακεδονίας και η χαμηλότερη τιμή 1.41% στο Μανούρι Μακεδονίας.

Από τα σκληρά τυριά, το λυοφιλωμένο δείγμα Γραβιέρα Κρήτης έχει την μεγαλύτερη τιμή τέφρας σε ποσοστό 4.41% και το αντίστοιχο νωπό δείγμα τη μικρότερη τιμή 3.01%.

Το υψηλότερο ποσοστό τέφρας στα πολύ σκληρά τυριά, βρέθηκε στο Κεφαλοτύρι Μακεδονίας με τιμή 6.19%, ενώ το μικρότερο 3.50% στο νωπό δείγμα Λαδοτύρι Μυτιλήνης.

Τέλος, στα δείγματα γιαουρτιών η μεγαλύτερη τιμή τέφρας 1.3% παρατηρήθηκε στο πρόβειο παραδοσιακό και η μικρότερη τιμή 0.73% στο στραγγιστό γιαούρτι.

ΑΛΑΤΙ επί νωπού(%):

Σχετικά με την περιεκτικότητα των μαλακών τυριών σε αλάτι, στη Φέτα Λήμνου βρέθηκε η ανώτερη τιμή 3.21%, ενώ στη Φέτα Θεσσαλίας η μικρότερη 1.63%.

Στη κατηγορία των μαλακών τυριών τύπου τυρογάλατος, το Μανούρι Θεσσαλίας βρέθηκε να έχει το μεγαλύτερο ποσοστό άλατος 1.88% και η Μυζήθρα Κρήτης το μικρότερο 0.59%.

Μεταξύ των σκληρών τυριών, η μεγαλύτερη τιμή άλατος εμφανίζεται στο Κασέρι (1.42%), ενώ η μικρότερη στη Γραβιέρα Νάξου (1.28%).

Στα πολύ σκληρά τυριά το ποσοστό άλατος κυμαίνεται από 1.97% στο Λαδοτύρι Μυτιλήνης (νωπό – λυοφιλιωμένο) έως 5.61% στο Κεφαλοτύρι Γρεβενών.

Τέλος, σε ότι αφορά τα δείγματα γιαουρτιών, το παραδοσιακό γιαούρτι αγελάδος εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή άλατος 0.21% και το στραγγιστό γιαούρτι τη μικρότερη 0.05%.

5.2 ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ΣΕ mg/100g ΤΡΟΦΙΜΟΥ

Η προσδιοριζόμενη χοληστερόλη σε mg/100g νωπού και ξηρού δείγματος στα αναλυμένα τρόφιμα, δίνεται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 6: Χοληστερόλη σε mg/100g νωπού και ξηρού τροφίμου προσδιοριζόμενη στα λυοφιλιωμένα δείγματα τυριών (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ').

ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ' mg/100g νωπού	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ' mg/100g ξηρού
Φέτα Μακεδονίας	60.8	127.51
Φέτα Ηπείρου	15.7	33.64
Φέτα Θεσσαλίας	46.8	94.94
Φέτα Πελοποννήσου	71.7	149.84
Φέτα Στερεάς Ελλάδας	2.7	5.29
Τελεμές Μακεδονίας	26.4	66.87
Τελεμές Θεσσαλίας	34.6	76.52
Τελεμές Θράκης	6.4	13.61
Μανούρι Μακεδονίας	37.9	68.14
Μανούρι Θεσσαλίας	26.0	40.40
Ανθότυρο Μακεδονίας	8.47	30.88
Ανθότυρο Ηπείρου	8.30	27.19
Μυζήθρα Μακεδονίας	12.6	35.14
Μυζήθρα Κρήτης	22.0	66.05
Καλαθάκι Λήμνου	38.7	92.38
Κασέρι Μακεδονίας	41.5	70.32
Κασέρι Νήσων Αιγαίου	28.0	51.98
Κεφαλοτύρι Μακεδονίας	8.6	13.41
Κεφαλοτύρι Κρήτης	15.5	25.01
Κεφαλοτύρι Ηπείρου	7.1	10.98
Κεφαλογραβιέρα Στ. Ελλάδας	13.2	20.70
Γραβιέρα Κρήτης	18.9	28.56
Γραβιέρα Νάξου	19.8	29.00
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	33.1	50.01
Αγνό Βικτώρια	34.8	52.04
Μετσοβόνη	15.1	23.89
Γιαούρτι στραγγιστό	18.4	73.71
Γιαούρτι αγελάδος Ευρωπαϊκό	12.6	66.58
Γιαούρτι αγελάδος παραδοσιακό	19.4	96.04
Γιαούρτι πρόβειο παραδοσιακό	17.6	70.06

Πίνακας 7: Χοληστερόλη σε mg/100g νωπού και ξηρού τροφίμου προσδιοριζόμενη στα νωπά δείγματα τυριών (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ²).

ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ² mg/100g νωπού	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ² mg/100g ξηρού
Κασέρι	62.40	105.6
Φέτα Δωδώνης	81.67	179.15
Γραβιέρα Κρήτης	33.70	50.55
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	6.43	10.87
Μετσοβόνη	22.41	39.88
Φέτα Λήμνου	27.33	60.83
Κοπανιστή Τήνου	104.8	260.76
Φορμαέλλα	23.33	38.72
Τελεμές Τρικάλων	46.90	105.73
Κεφαλοτύρι Γρεβενών	42.90	67.22

Από τις αρχικές μετρήσεις της χοληστερόλης (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ¹ και ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ²) λυοφιλιωμένων και νωπών δειγμάτων αντίστοιχα σε **mg/100g νωπού τροφίμου** προκύπτουν οι εξής παρατηρήσεις για τις διάφορες κατηγορίες τυριών:

ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ:

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται όλα τα είδη τυριών Φέτα, Τελεμές και Κοπανιστή, από τα οποία η Κοπανιστή Τήνου εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή χοληστερόλης: 104.8mg/100g νωπού τροφίμου ενώ η Φέτα Στερεάς Ελλάδας τη μικρότερη τιμή: 2.7mg/100g νωπού τροφίμου. Οι τιμές όμως χοληστερόλης στα περισσότερα δείγματα είναι στατιστικά μικρότερες από το μέσο όρο χοληστερόλης 89mg/100g νωπού τροφίμου όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (USDA) για τα μαλακά τυριά (φέτα).

ΜΑΛΑΚΑ ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΤΟΣ:

Σ' αυτή την κατηγορία υπάγονται όλα τα είδη από τα τυριά Μανούρι, Ανθότυρο και Μυζήθρα. Οι τιμές για τη χοληστερόλη στα μαλακά τυριά τυρογάλατος κυμαίνονται από 8.3mg/100g νωπού τροφίμου στο Ανθότυρο Ηπείρου έως 37.9mg/100g νωπού τροφίμου στο Μανούρι Μακεδονίας. Η βιβλιογραφία για αντίστοιχα τυριά Ευρωπαϊκού τύπου αναφέρει για την κατηγορία αυτή, ποσότητα χοληστερόλης 51mg/100g νωπού τροφίμου στο Ricotta (Mahan et al, 1994), ποσότητα μεγαλύτερη από τις παραπάνω αντίστοιχες τιμές.

ΣΚΛΗΡΑ ΤΥΡΙΑ:

Στα σκληρά τυριά αναφέρονται τα είδη: Κασέρι, Γραβιέρα καθώς και η Κεφαλογραβιέρα (Στ.Ελλάδας). Στην κατηγορία αυτή, η υψηλότερη τιμή χοληστερόλης βρέθηκε 62.40mg/100g νωπού τροφίμου στο νωπό δείγμα Κασέρι, ενώ η χαμηλότερη 13.2mg/100g νωπού τροφίμου στη Κεφαλογραβιέρα Στερεάς Ελλάδας. Οι τιμές αυτές της χοληστερόλης είναι χαρακτηριστικά μικρότερες από αυτές που ισχύουν για αντίστοιχα Ευρωπαϊκά τυριά π.χ Cheddar με τιμή 105mg/100g νωπού τροφίμου (Mahan et al, 1994).

ΠΟΛΥ ΣΚΛΗΡΑ ΤΥΡΙΑ:

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν όλα τα Κεφαλοτύρια και Λαδοτύρια, από τα οποία το νωπό δείγμα Κεφαλοτύρι Γρεβενών παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης: 42.9mg/100g νωπού τροφίμου και το νωπό δείγμα Λαδοτύρι Μυτιλήνης τη μικρότερη: 6.43mg/100g νωπού τροφίμου. Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα για Ευρωπαϊκά τυριά της ίδιας κατηγορίας (Παρμεζάνα) με μέσο όρο χοληστερόλης 67.7mg/100g νωπού τροφίμου (USDA), παρατηρούμε ότι και στην περίπτωση αυτή οι τιμές μας είναι στατιστικά μικρότερες.

ΓΙΑΟΥΡΤΙΑ:

Ανάμεσα στα τέσσερα εξεταζόμενα δείγματα: στραγγιστό γιαούρτι, γιαούρτι αγελάδος παραδοσιακό και Ευρωπαϊκού τύπου, καθώς και πρόβειο παραδοσιακό γιαούρτι, η μεγαλύτερη τιμή χοληστερόλης 19.4mg/100g νωπού τροφίμου βρέθηκε στο παραδοσιακό γιαούρτι αγελάδος και η μικρότερη 12.6 mg/100g στο αντίστοιχο γιαούρτι Ευρωπαϊκού τύπου. Χαρακτηριστικό είναι ότι όλες οι προσδιοριζόμενες τιμές χοληστερόλης, είναι υψηλότερες από εκείνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Τριχοπούλου, 1992), δεδομένου ότι ο μέσος όρος τους δεν ξεπερνά τα 12 mg/100g νωπού τροφίμου.

5.2.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΝΩΠΩΝ ΚΑΙ ΛΥΟΦΙΛΙΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΤΗΣ.

Συγκρίνοντας τα δεδομένα του Πίνακα 5 με εκείνα του Πίνακα 6 σε ότι αφορά τη ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ¹ και ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ² σε mg/100g νωπού τροφίμου, είναι δυνατόν να γίνουν οι εξής παρατηρήσεις:

Με βάση το γεγονός ότι η απευθείας σαπωνοποίηση των δειγμάτων απουσία νερού – όπως πραγματοποιήθηκε στα λυοφιλιωμένα δείγματα – οδηγεί σε πλήρη ανάκτηση της χοληστερόλης (Naeemi et al, 1995), αναμένεται η χοληστερόλη των λυοφιλιωμένων δειγμάτων να είναι μεγαλύτερη από αυτή των νωπών για τα **αντίστοιχα** δείγματα τυριών. Αυτό συμβαίνει διότι τα νωπά δείγματα έχουν υποστεί εκχύλιση και μετέπειτα σαπωνοποίηση· έχουν δηλαδή υποστεί παρατεταμένη κατεργασία, γεγονός που επηρεάζει την τελική παραλαβή της χοληστερόλης. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από τις αντίστοιχες τιμές στο Λαδοτύρι Μυτιλήνης (νωπό – λυοφιλιωμένο) και στη Φέτα Λήμνου (νωπό – λυοφιλιωμένο) εφόσον πρόκειται για συγκρίσιμα δείγματα (ίδιας προελεύσεως). Παρολαυτά όμως, δεν παρατηρείται το ίδιο στα δείγματα Γραβιέρα Κρήτης και Μετσοβόνη, γεγονός που κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται σε άλλους παράγοντες όπως π.χ. περιεχόμενο ποσό τριγλυκεριδίων.

5.2.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΝΩΠΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ - ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΤΗΣ.

Συγκρίνοντας την προσδιοριζόμενη χοληστερόλη (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ²) στα νωπά δείγματα, με την προσδιοριζόμενη χοληστερόλη στα ίδια νωπά δείγματα μέσω διαφορετικής μεθοδολογίας-συνθήκες παραλαβής της (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ³), παρατηρούνται διαφοροποιήσεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 8: Χοληστερόλη (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ²) και χοληστερόλη μέσω διαφορετικής μεθοδολογίας-συνθήκες παραλαβής της (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ³), των νωπών δειγμάτων σε **mg/100g νωπού τροφίμου**.

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ² mg/100g νωπού	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ³ mg/100g νωπού
Κασέρι	62.40	72.22
Φέτα Δωδώνης	81.67	65.38
Γραβιέρα Κρήτης	33.70	67.78
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	6.43	52.33
Μετσοβόνη	22.41	58.31
Φέτα Λήμνου	27.33	64.80
Κοπανιστή Τήνου	104.8	55.16
Φορμαέλλα	23.33	72.15
Τελεμές Τρικάλων	46.90	37.68
Κεφαλοτύρι Γρεβενών	42.90	89.73

Οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των παραπάνω τιμών, είναι δυνατόν να οφείλονται:

- Στην διαφορετική ποσότητα αρχικού δείγματος. Η τιμή της ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ² προέρχεται από 1,5g αρχικού δείγματος, ενώ η τιμή της ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ³ από 20g αρχικού δείγματος.
- Στις διαφορετικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, αφού για τον προσδιορισμό της ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ³ εφαρμόζονταν συνθήκες μη οξειδωτικές, σκοτάδι και όχι ιδιαίτερως υψηλή θερμοκρασία.

- iii. Στην διαφορετική μεθοδολογία παραλαβής της.
- iv. Στη διαφορετική μέθοδο υπολογισμού (εσωτερικό – εξωτερικό πρότυπο).

Όπως παρατηρείται, οι τιμές της προσδιοριζόμενης ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ³, είναι στην πλειοψηφία τους αυξημένες σε σύγκριση με τις τιμές της ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ² (βλ. Παράρτημα), κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Hargis et al, 1991). Με βάση τα δεδομένα αυτά από έρευνα προσδιορισμού χοληστερόλης κρόκων αυγών, η απευθείας σαπωνοποίηση και εν συνεχεία εκχύλιση των δειγμάτων δίνει υψηλότερα και ακριβέστερα ποσά χοληστερόλης απ' ότι η αντίστροφη διαδικασία. Σε κάθε όμως περίπτωση, οι τιμές όλων των αναλύσεων (ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ^{1,2,3}) είναι μειωμένες σε σχέση με τις αναμενόμενες βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων. Άρα υπάρχουν άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάλυση.

Ένας σημαντικός παράγοντας, είναι η επίδραση των τριγλυκεριδίων στην ανάκτηση της χοληστερόλης. Πιο συγκεκριμένα κατά τον προσδιορισμό της χοληστερόλης σε κρόκους αυγών, βρέθηκε ότι το ποσό των τριγλυκεριδίων του δείγματος παρεμποδίζει την πλήρη ανάκτηση της χοληστερόλης (Fenton et al, 1991). Τα τυριά είναι πλούσια σε λίπος που αποτελείται κατά 99% από τριγλυκερίδια (Pena et al, 1997). Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τις μειωμένες τιμές της χοληστερόλης των δειγμάτων.

Η επίδραση των τριγλυκεριδίων στην ανάκτηση της χοληστερόλης επιβεβαιώνεται με:

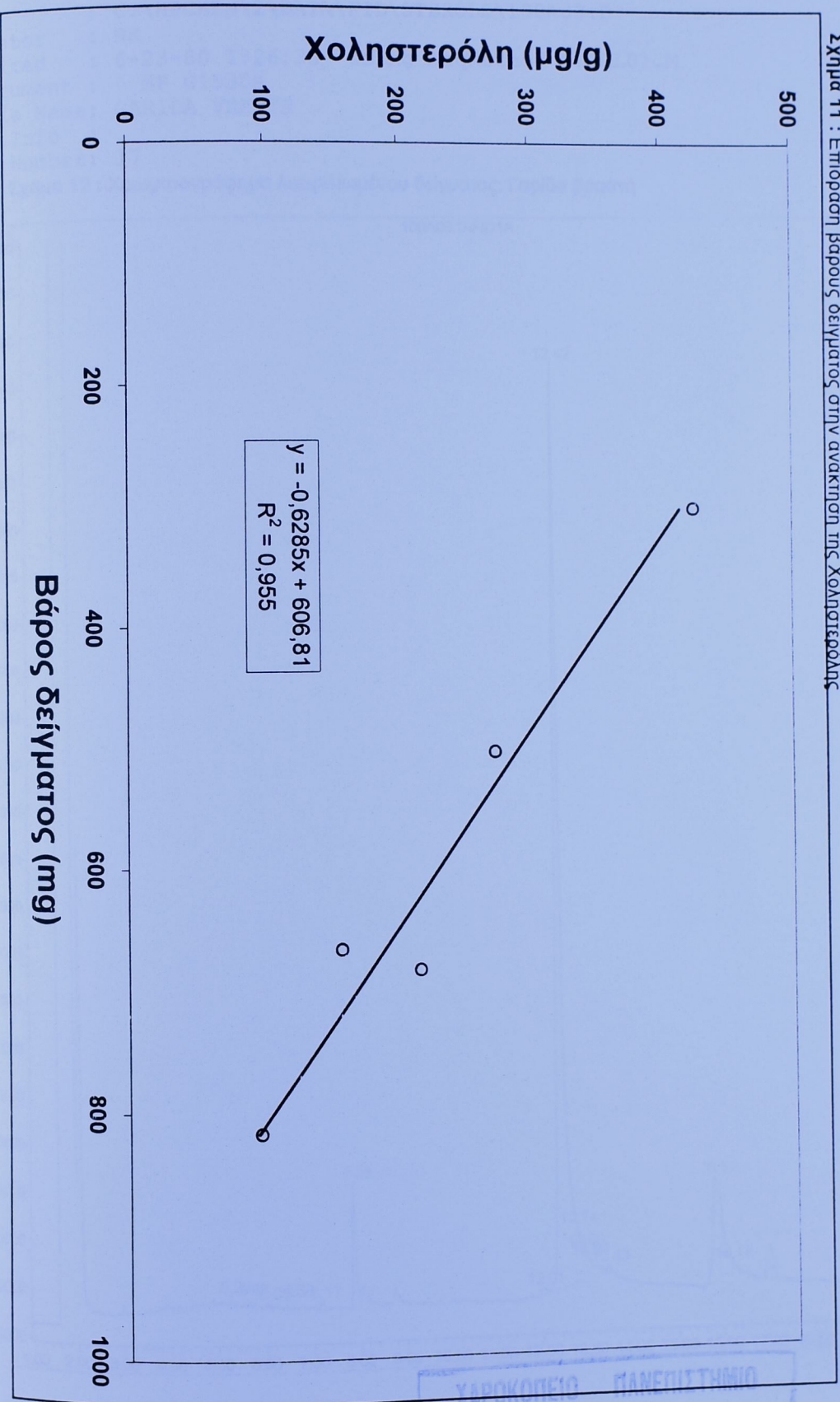
- i. Πείραμα ανάλυσης λυοφιλιωμένων δειγμάτων από τα ίδια τυριά με διαφορετικά βάρη και
- ii. Εφαρμογή μεθόδου απευθείας σαπωνοποίησης εν θερμώ σε άλλα είδη λυοφιλιωμένων τροφίμων.

Στην πρώτη περίπτωση, το σχήμα 11 δείχνει τις διαφορετικές τιμές της προσδιοριζόμενης χοληστερόλης ($\mu\text{g} / \text{g}$ τυριού) για διαφορετικά βάρη αναλυμένου δείγματος (Ανθότυρο Ηπείρου). Από τη γραφική αυτή παράσταση φαίνεται ότι όσο αυξάνεται το βάρος του δείγματος τόσο μειώνεται η τιμή της

προσδιοριζόμενης χοληστερόλης, γεγονός που οφείλεται στην αύξηση του περιεχόμενου λίπους και άρα και τριγλυκεριδίων του δείγματος.

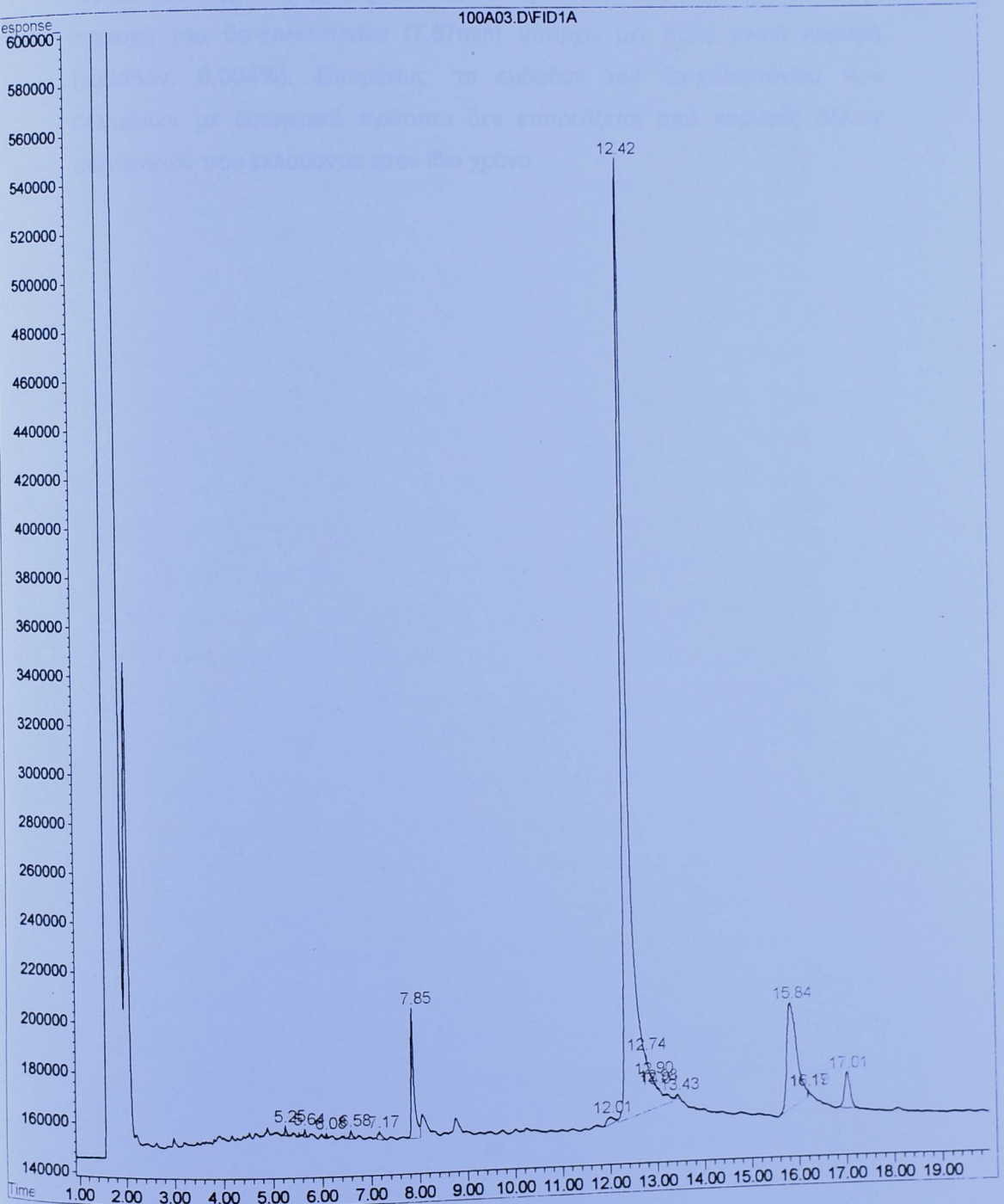
Η εφαρμογή της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε για τα λυοφιλωμένα δείγματα, εφαρμόστηκε και σε άλλα τρόφιμα (θαλασσινά και ψάρια) που περιέχουν λιγότερα λιπαρά, η ανάλυση των οποίων έδειξε ότι έγινε ποσοτική παραλαβή της χοληστερόλης, οι συγκεντρώσεις της οποίας βρέθηκαν συγκρίσιμες με αυτές της βιβλιογραφίας. Στο σχήμα 12 απεικονίζεται το χρωματογράφημα χοληστερόλης και εσωτερικού προτύπου σε δείγμα βραστής γαρίδας έπειτα από απευθείας σαπωνοποίηση. Η κορυφή της χοληστερόλης αντιστοιχεί στα 12.42min ενώ του 5α-χολεστανίου στα 7.85min. Συνεπώς, η μειωμένη περιεκτικότητα του δείγματος σε λιπαρά και άρα σε τριγλυκερίδια οδήγησε σε καλύτερη ποσοτική ανάκτηση της χοληστερόλης.

Σχήμα 11 : Επίδραση βάρους δείγματος στην ανάκτηση της Χοληστερόλης



File : C:\HPCHEM\2\DATA\FID\STEROLS\100A03.D
Operator : NK
Acquired : 6-23-80 1:26:33 using AcqMethod FSTR01.M
Instrument : HP G1530A
Sample Name: GARIDA VRASTH
Disc Info :
Vial Number: 17

Σχήμα 12 : Χρωματογράφημα λυοφιλωμένου δείγματος: Γαρίδα βραστή



Η σύγκριση, τέλος, των 2 διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού της χοληστερόλης, έδειξε την καταλληλότητα της χρήσης του 5α-χολεστανίου ως εσωτερικού προτύπου. Πιο συγκεκριμένα, μελετώντας το χρωματογράφημα από το Κεφαλοτύρι Γρεβενών (βλ. σχήμα 10) έπειτα από σαπωνοποίηση 20g τυριού και εκχύλιση (χωρίς εσωτερικό πρότυπο), παρατηρούμε ότι στην περιοχή του 5α-χολεστανίου (7.87min) υπάρχει μια πολύ μικρή κορυφή (εμβαδόν: 0.004%). Επομένως, το εμβαδόν του 5α-χολεστανίου των δειγμάτων με εσωτερικό πρότυπο δεν επηρεάζεται από κορυφές άλλων συστατικών που εκλούονται στον ίδιο χρόνο.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συνολική πορεία μελέτης και προσδιορισμού της χοληστερόλης κατά την ανάλυση των προαναφερθέντων δειγμάτων τροφίμων, έδειξε ότι η χοληστερόλη αποτελεί ένα ιδιαίτερο συστατικό το οποίο δικαιολογημένα έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές. Εξάλλου, δεν είναι τυχαία η έλλειψη δοκιμασμένων και εφαρμοσμένων μεθόδων, η οποία οδηγεί σε ευρεία διακύμανση και σε αδυναμία συσχέτισης των ήδη προσδιορισμένων τιμών χοληστερόλης σε διάφορα είδη τροφίμων (Fenton et al, 1991).

Σε ότι αφορά το είδος των προς ανάλυση τροφίμων για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης, συνήθη τρόφιμα προσδιορισμού αποτελούν, το κρέας, τα αυγά και το γάλα. Η ανάλυση τυριών για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης, που αποτέλεσε το κύριο αντικείμενο της έρευνάς μας, έχει πραγματοποιηθεί κυρίως σε Ευρωπαϊκά τυριά, γι' αυτό και τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τα Ελληνικά τυριά είναι περιορισμένα στους διάφορους πίνακες σύνθεσης Ελληνικών τροφίμων. Για το λόγο αυτό, η συσχέτιση με τα πειραματικά μας δεδομένα δεν ήταν απόλυτα εφικτή.

Ως προς τις τρεις διαφορετικές μεθόδους που δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στα δείγματα τυριών, καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν κατά σειρά:

- i. Απευθείας σαπωνοποίηση και εν συνεχεία εκχύλιση νωπών δειγμάτων με ήπιες συνθήκες.
- ii. Απευθείας σαπωνοποίηση λυοφιλιωμένων δειγμάτων εν θερμώ.
- iii. Εκχύλιση λιπαρών από νωπό τρόφιμο και εν συνεχεία σαπωνοποίηση.

Εντούτοις όμως, οι παραπάνω μέθοδοι δεν κρίνονται κατάλληλες για προσδιορισμό χοληστερόλης στα τυριά, εφόσον σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πειραματικής μας μελέτης και με βάση το μέτρο σύγκρισης που μπορούμε να έχουμε με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι προσδιορισμένες τιμές χοληστερόλης στα δείγματά μας εμφανίζονται μειωμένες. Το γεγονός αυτό είναι πολύ πιθανόν να σχετίζεται με την ιδιαιτερότητα των τυριών ως

δείγματα προσδιορισμού χοληστερόλης, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας τους σε λίπος δεδομένου ότι τα τριγλυκερίδια είναι δυνατόν να εμποδίζουν την ανάκτηση της χοληστερόλης (Fenton et al, 1991).

Επιπλέον, πιθανή θα μπορούσε να θεωρηθεί και η επίδραση άλλων μη ελεγχόμενων παραμέτρων – ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με την αυξημένη λιποπεριεκτικότητα των δειγμάτων – στα αποτελέσματα της εργασίας μας.

Συμπερασματικά λοιπόν, με τις τρεις μεθόδους που δοκιμάστηκαν στο Εργαστήριο, είναι δυνατό να αναλυθούν τρόφιμα χωρίς πολύ λίπος, με αυθημερόν ανάλυση στο χρωματογράφο. Τέλος, ως επικρατέστερη – προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού της χοληστερόλης σε τυριά, θα μπορούσε να θεωρηθεί η προαναφερθείσα επίσημη μέθοδος, όπως περιγράφεται από τους Aizetmueller et al (1998), (German Fat Research Association).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aizetmueller K, Bruehl L, Fiebig HJ. (1998) Sterols - isolation and GC analysis. *Fett/Lipid* 100 (9), 422-428.

Alonso L, Fontecha J, Lozada L and Juarez M. (1997) Determinations of mixtures in vegetable oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography. *JAOCs* 74 (2), 131-134.

Ανδρικόπουλος Ν.Κ. (1998) Χημεία και τεχνολογία τροφίμων, τόμος II, εργαστηριακές ασκήσεις.

Ανδρικόπουλος Ν.Κ. (1998) Χημεία και τεχνολογία τροφίμων, τόμος I, κεφάλαια θεωρίας.

Angulo A.J, Romera J.M, Ramirez M and Gil A. (1997) Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effects of storage conditions. *Journal of agriculture and food chemistry* 45 (11), 4318-323.

Appelqvist L.A, Dutta C.P. (1996) Sterols and sterol oxides in the potato products and sterols in the vegetable oils used for industrial frying operations. *Grasas-y-Aceites* 47 (1/2), 38-47.

Appelqvist L.A, Dutta C.P. (1997) Studies on phytosterol oxides I. Effect of storage on the content in potato chips prepared in different vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74 (6), 644-657.

Arneth W and Al-Ahmad H. (1995) Cholesterol: Its determination in muscle and adipose tissue and in offal using HPLC. *Fleischwirtsch* 75 (8), 1001-1005.

Asfahany Al, Raiia A and Farag R.S. (1992) Influence of microwave and conventional cooking on beef liver lipids. *Grasas-y-Aceites* 43 (6), 336-340.

Careri M, Mangia A, Musci M and Parolari G. (1998) Development of gas chromatographic method for determination of cholesterol oxides in meat products. *Chromatographia* 47 (1/2), 42-48.

Child P. (1987) The absorption of cholesterol and plant sterols by the intestine. *Fat absorption* 2, 1-47.

De Blas O.J and Del Valle Gonzalez A. (1996) Determination of sterols by capillary column gas chromatography. Differentiation among different types of olive oil: Virgin, Refined and solvent-extracted. *JAOCs* 73 (12) 1685-1688.

Dey P.M and Harbborne J.B.(1997) *Plant biochemistry*, p. 425-427.

Esteve E, Maraschiello C and Regueiro JAG. (1998) Cholesterol oxidation in meat from chickens fed alpha-tocopherol and beta-carotene supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids* 33 (7), 705-713.

Fenton M and SIM J.S. (1991) Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *Journal of chromatography* 540, 323-329.

Finocchiaro E.T and Richardson T. (1983) Sterol oxides in food stuffs. *Journal of food protection* 46 (10), 917-925.

Groff J.L, Gropper S.S and Hunt S.M. (1995) Advanced Nutrition and Human Metabolism, Second Edition.

Gunstone F.D, Harwood J.L and Padley F.B. (1994) The lipid handbook, Second Edition.

Guyton A. (1990) Φυσιολογία του ανθρώπου, 3η έκδοση.

Hadziyev D and Pun W.H. (1978) Lipids in raw and granulated potatoes. Canadian Institute of Food Science and Technology. Journal 11 (3), 134-141.

Hamill T.W and Soliman H.A. (1994) Determination of cholesterol by p-Nitrobenzoate. Derivatization and liquid chromatography. Journal of AOAC International 77 (5), 1190-1196.

Hargis P.S, Schake L.S, Van-Elswyk M.E. (1991) Research note: Evaluation of two extraction methods for the determination of egg yolk cholesterol. Poultry Sci. Champaign, Ill: Poultry Science Association 70 (4), 1015-1019.

[Http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/list_nut.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/list_nut.pl)

Jones P.J.H and Ling W.H. (1995) Dietary Phytosterols: a review metabolism, benefits and side effects. Life Sciences 57, 196-206.

Jones P.J.H. (1997) Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. Can J Physiol Pharmacol 75, 217-227.

Καφάτος Α.Γ και Λαμπαδάριος Δ.Ν. (1990) Τελευταίες εξελίξεις στην κλινική διατροφή και επιδημιολογία των νοσημάτων διατροφής.

Lim C.L, Tee E.S. (1992) Re-analysis of vitamin A values of selected Malaysian foods of animal origin by the AOAC and HPLC methods. Food-Chem. Essex: Elsevier Applied Science Publishers 45 (4), 289-296.

Mahan L.K and Stump E.S. (1994) Krause's Food Nutrition and Diet Therapy, 9th edition.

Manzi P, Panfili G and Pizzoferrato L. (1996) Normal and reversed phase HPLC for more complete evaluation of tocopherols, retinols, carotenes and sterols in dairy products. Chromatographia 43 (1/2), 89-93.

Metzler D.E. (1997) BIOCHEMISTRY: The chemical reactions of living cells, International Edition.

Naeemi E.D, Ahmad N, Al-Sharrah T.K and Behbahani M. (1995) Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. Journal of AOAC International 78 (6), 1522-1525.

Oles P, Gates G, Kensinger S, Patchell J, Schumacher D, Showers T and Silcox A. (1990) Optimization of the determination of cholesterol in various food matrixes. J. Assoc. Of Anal. Chem. 73 (5), 724-728.

Pena A, Nevarez L, Labastida C, Capella S. (1997) Triglyceride Characterization of Different Mexican Cheeses by High Temperature Capillary Gas Chromatography (HT-CGC). J High Resol. Chromatogr. 20, 572-574.

Schmarr H.G, Gross H.B and Shibamoto T. (1996) Analysis of polar cholesterol oxidation products: Evaluation of a new method involving transesterification, solid

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΜΕΘΟΔΟΝ 2 & 3 ΣΕ ΝΟΤΑ ΔΕΥΤΕΡΙΑ

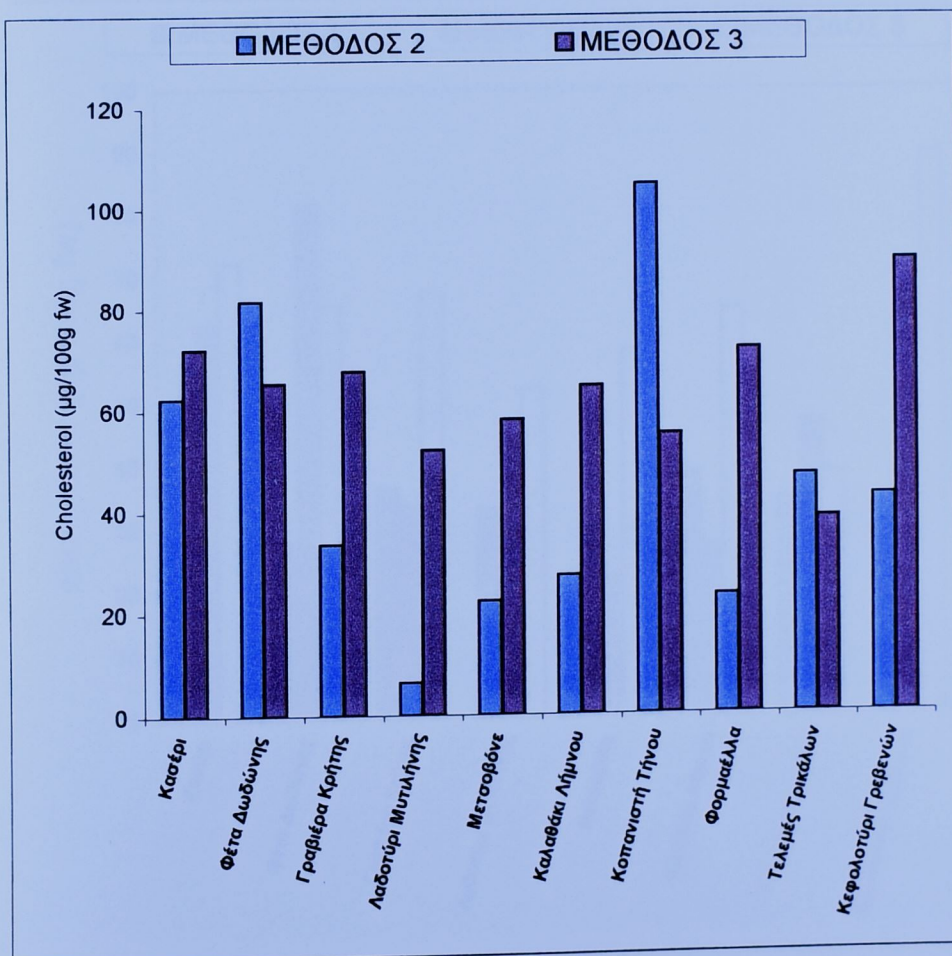
ΕΙΔΟΣ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ (mg/100g FW)	
	ΜΕΘΟΔΟΣ 2	ΜΕΘΟΔΟΣ 3
Συνολικά	82.4	72.5
Αντιβιοτικά	81.7	85.4
Αντιμυκη	32.7	37.8
Αντιμικροβιακά	8.4	32.3
Αντιβιοτικά	22.4	58.9
Αντιμυκη	27.3	84.8
Αντιμικροβιακά	104.8	58.7
Αντιβιοτικά	23.3	72.1
Αντιμυκη	48.9	32.5
Αντιμικροβιακά	42.9	88.7

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ 2 & 3 ΣΕ ΝΩΠΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

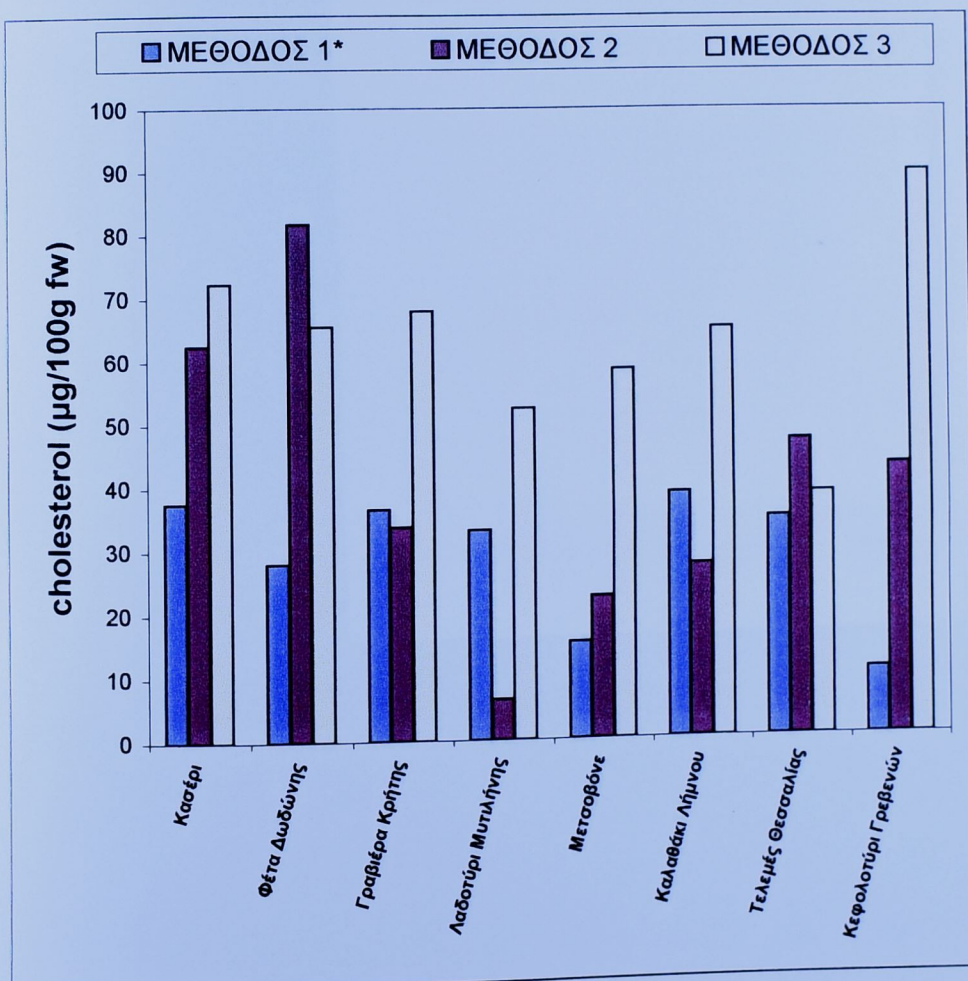
ΔΕΙΓΜΑ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ (mg/100g FW)	
	ΜΕΘΟΔΟΣ 2	ΜΕΘΟΔΟΣ 3
Κασέρι	62,4	72,2
Φέτα Δωδώνης	81,7	65,4
Γραβιέρα Κρήτης	33,7	67,8
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	6,4	52,3
Μετσοβόνη	22,4	58,3
Καλαθάκι Λήμνου	27,3	64,8
Κοπανιστή Τήνου	104,8	55,2
Φορμαέλλα	23,3	72,1
Τελεμές Τρικάλων	46,9	38,5
Κεφολοτύρι Γρεβενών	42,9	89,7



ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ 1, 2 & 3

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ (mg/100g FW)		
	ΜΕΘΟΔΟΣ 1*	ΜΕΘΟΔΟΣ 2	ΜΕΘΟΔΟΣ 3
	Λυοφιλωμένα	Νωπά	Νωπά
Κασέρι	37,6	62,4	72,2
Φέτα Δωδώνης	28	81,7	65,4
Γραβιέρα Κρήτης	36,5	33,7	67,8
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	33,1	6,4	52,3
Μετσοβόνη	15,2	22,4	58,3
Καλαθάκι Λήμνου	38,7	27,3	64,8
Τελεμές Θεσσαλίας	34,7	46,9	38,5
Κεφολοτύρι Γρεβενών	10,4	42,9	89,7

* μέσος όρος ίδιου τύπου δειγμάτων



**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Υπερ.Βιβ/κης Χαροκόπειου Παν/μίου.954916

* 4 9 7 8 *



HJ

