



**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ (Σ.ΤΕ.Γ)
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ
ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ (ΤΕ.ΓΕ.Π)

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΛΙΠΩΝ

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ
ΝΙΚΟΛΑΟΥ Σ. ΜΠΡΑΤΣΙΩΤΗ**

ΕΠΙΒΛΕΨΗ: ΣΠΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΚΕΙΜ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Σπηλιόπουλο Ιωακείμ για την πολύτιμη καθοδήγησή του. Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω θερμά τις Δρακοπούλου Θεανώ και Κρομούδα Στεφανία για την βοήθεια τους. Τέλος, οφείλω να αφιερώσω αυτήν μου την εργασία στους γονείς μου που μου συμπαραστάθηκαν όλα τα χρόνια της φοίτησής μου στο Α.Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας.

Περίληψη

Η πτυχιακή εργασία αυτή είναι μια μελέτη στην εκχύλιση των λιπιδίων από τα τρόφιμα και άλλα βιολογικά υλικά. Τα λιπίδια είναι αναπόσπαστες συνιστώσες και τα δομικά στοιχεία των βιολογικών υλικών. Για να κατανοήσουμε τα συστατικά στοιχεία, την χημεία και τις βιολογικές λειτουργίες τους, τα λιπίδια θα πρέπει να απομονωθούν και να μελετηθούν. Κατά συνέπεια, μια εκτεταμένη γνώση της εκχύλισης και της ανάλυσης των λιπιδίων είναι απαραίτητη για την διεξαγωγή μελετών σχετικά με τα λιπίδια. Στην εργασία αυτή παρέχεται ολοκληρωμένη πληροφόρηση των διαθέσιμων μεθόδων για την εκχύλιση και την ανάλυση των λιπιδίων από βιολογικά προϊόντα, με παραδείγματα όταν είναι απαραίτητο.

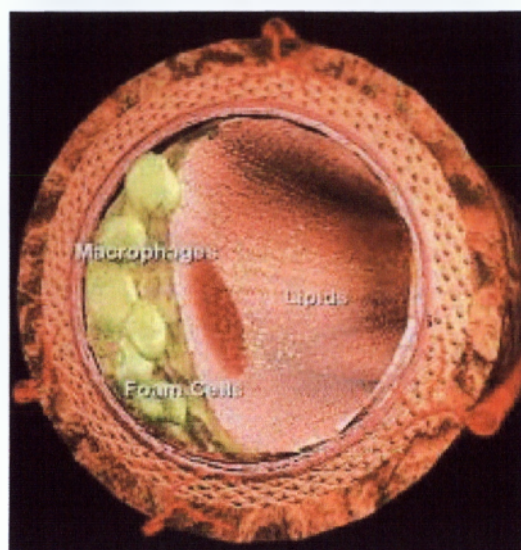
Η εκχύλιση των λιπιδίων από τα τρόφιμα και τα άλλα βιολογικά υλικά, ξεκινάει με σωστή προετοιμασία του δείγματος, δηλαδή απαιτείται σωστή δειγματοληψία και αποθήκευση. Για την ανάλυση του δείγματος χρειάζεται γνώση για την δομή την χημεία και την εμφάνιση των κυριότερων κατηγοριών λιπιδίων και των συστατικών του καθώς και η σωστή εξαγωγή των λιπιδίων από τους ζωντανούς οργανισμούς και η σωστή συντήρηση του δείγματος, υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Στην συνέχεια η προεπεξεργασία του δείγματος είναι απαραίτητη, στην διαδικασία αυτή γίνεται ξήρανση η οποία μειώνει την υγρασία του δείγματος και διευκολύνεται η εκχύλιση των λιπιδίων, επίσης γίνεται μείωση του μεγέθους των σωματιδίων η οποία αυξάνει την επιφάνεια και επιτρέπει πιο στενή επαφή του διαλύτη και τέλος η υδρόλυση των αλκαλίων που είναι απαραίτητη για τη διάσπαση των ομοιοπολικών και ιοντικών δεσμών των λιπιδίων. Η εκχύλιση των λιπιδίων γίνεται με διαλύτες (απλοί οργανικοί διαλύτες, συνδυασμό οργανικών πρωτεϊνών, μη οργανικοί διαλύτες) ή χωρίς διαλύτες με άλλες μεθόδους (υγρή οδός, απορρυπαντικό, φυσική μέθοδος).

Στην συνέχεια απαιτείται καθορισμός των λιπιδίων ο οποίος γίνεται με έμμεσες μεθόδους όπως η μέτρηση πυκνότητας, η διηλεκτρική μέθοδος, η εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία, η χαμηλής ανάλυσης πυρηνική μαγνητική φασματοσκοπία, η μέθοδος υπερήχων, οι θολωσομετρικές/ χρωματομετρικές μέθοδοι και η απορρόφηση ακτινών X. Τέλος γίνεται ανάλυση των λιπιδικών εκχυλίσεων με διαφορές μεθόδους.

Περιεχόμενα

<i>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</i>	- 2 -
<i>Περίληψη</i>	- 3 -
<i>Περιεχόμενα</i>	- 4 -
<i>Εισαγωγή</i>	- 6 -
<i>A. Εκχύλιση των λιπιδίων από τα τρόφιμα και άλλα βιολογικά υλικά ...</i>	- 10 -
1. Προετοιμασία δείγματος	- 11 -
2.1. Ξήρανση	- 12 -
2.2. Μείωση Μεγέθους Σωματιδίων	- 12 -
2.3. Οξέα/ Υδρόλυση αλκαλίων	- 13 -
3. Εκχύλιση Λιπιδίων με Διαλύτες.....	- 13 -
3.1. Ιδιότητες των Διαλυτών και Τρόποι Εξαγωγής.....	- 14 -
3.2. Μέθοδοι Εκχύλισης με Απλό Οργανικό Διαλύτη	- 15 -
3.3. Μέθοδοι που χρησιμοποιούν Συνδυασμό Οργανικών Διαλυτών.....	- 17 -
3.4. Μέθοδοι που χρησιμοποιούν Μη Οργανικούς Διαλύτες.....	- 20 -
4. Εκχύλιση Λιπιδίων χωρίς Διαλύτες	- 22 -
4.1. Μέθοδος πέψης με οξέα	- 22 -
4.2. Μέθοδος με Απορρυπαντικό.....	- 22 -
4.3. Φυσικές Μέθοδοι	- 23 -
5. Αφαίρεση των Μη Λιπιδικών Προσμείξεων από τις Εκχυλίσεις Λιπιδίων και Άλλων Πρακτικών Θεμάτων.....	- 24 -
<i>B. Έμμεσες μέθοδοι για τον Καθορισμό των Λιπιδίων</i>	- 26 -
1. Μέτρηση Πυκνότητας.....	- 26 -
2. Διηλεκτρική Μέθοδος	- 26 -
3. Εγγύς υπέρυθη φασματοσκοπία.....	- 26 -
4. Χαμηλής Διακριτικής Ικανότητας Πυρηνική Μαγνητική Φασματοσκοπία.....	- 27 -
5. Θολωσιμετρικές/Χρωματομετρικές Μέθοδοι	- 28 -
6. Μέθοδος Υπερήχων	- 28 -
7. Απορρόφηση Ακτινών Χ.....	- 29 -
<i>Γ. Ανάλυση των Λιπιδικών Εκχυλίσεων</i>	- 30 -
1. Χαρακτηριστικές ιδιότητες λιπαρών ουσιών.....	- 30 -
1.1. Βαθμός Ακορεστότητας	- 31 -
1.2. Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα	- 31 -
1.3. Δείκτης Διάθλασης.....	- 32 -

1.4. Βαθμός Σαπωνοποίησης.....	- 33 -
2. Χρωματογραφικές Διαδικασίες για τον Χαρακτηρισμό των Λιπιδίων.....	34
2.1. Χρωματογραφία Στήλης.....	- 35 -
2.2. Αέρια χρωματογραφία	- 38 -
2.3. Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία.....	- 40 -
2.4. Υπερκρίσιμη Χρωματογραφία Ρευστού (SFC).....	- 42 -
2.5. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας.....	- 43 -
3. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι Ανάλυσης των Λιπιδίων.....	- 47 -
3.1. Υπεριώδη-Ορατή Φασματοσκοπία	- 47 -
3.2. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Απορρόφησης	- 48 -
3.3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	- 49 -
3.4. Φασματοσκοπία Μάζας (MS).....	- 49 -
4. Ενζυματικές Μέθοδοι	- 51 -
5. Ανοσοχημικές Μέθοδοι	- 52 -
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 53 -



1. Δομή λιπιδίου

Πηγή: <http://www.iator.gr/2011/02/23/lipidia/>

Εισαγωγή

Τα λιπίδια είναι από τα κύρια συστατικά των τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης. Δεν υπάρχει ακριβής ορισμός που διατίθεται για τον όρο *λιπίδια*, ωστόσο, συνήθως περιλαμβάνει μια ευρεία κατηγορία ενώσεων που έχουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά και ομοιότητες σύνθεσης. Τα λιπίδια είναι υλικά μερικώς διαλυτά ή αδιάλυτα στο νερό, αλλά διαλυτά σε επιλεγμένους οργανικούς διαλύτες, όπως το βενζόλιο, χλωροφόρμιο, διαιθυλαιθέρας, εξάνιο και μεθανόλη. Μαζί με τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια αποτελούν τα κύρια συστατικά των ιστών. Ωστόσο, τα κοινά χαρακτηριστικά των λιπιδίων σχετίζονται περισσότερο με τη διαλυτότητα τους και όχι με τα δομικά χαρακτηριστικά τους. [1] Πολλά συστήματα ταξινόμησης έχουν προταθεί για τα λιπίδια. Από την άποψη της διατροφικής τους αξίας, σύμφωνα με την έκθεση της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών σχετικά με την διατροφική επισήμανση, λίπη και έλαια ορίζονται ως τα σύνθετα οργανικά μόρια που σχηματίζονται με τον συνδυασμό τριών μορίων λιπαρών οξέων με ένα μόριο γλυκερίνης. [2] Όπως αναφέρεται και στον πίνακα 1 {3-5}, τα λιπίδια χαρακτηρίζονται γενικά ως απλά και σύνθετα ή αλλιώς, λιπίδια προερχόμενα από την κατάταξη Bloor [3].

Τρόφιμα περιέχουν κάποια ή όλες αυτές τις ενώσεις λιπιδίων. Ωστόσο, τα τριγλυκερίδια (TAGs) και τα φωσφολιπίδια (PLs) είναι τα πιο άφθονα και σημαντικά. Υγρά τριγλυκερίδια, σε θερμοκρασίες δωματίου αναφέρονται ως έλαια, και είναι γενικά φυτικής ή θαλάσσιας προέλευσης (π.χ. φυτικά και θαλάσσια έλαια). Στερεά τριγλυκερίδια σε θερμοκρασία δωματίου ονομάζονται λίπη, τα οποία είναι γενικά ζωικής προελεύσεως (π.χ. το λαρδί και το λίπος).

Η ακριβής και εμπειρισματομένη ανάλυση των λιπιδίων στα τρόφιμα είναι σημαντική για τον προσδιορισμό των στοιχείων που τα αποτελούν, της θρεπτικής τους αξίας, της ταυτότητας και ομοιογένειας, την προετοιμασία των θρεπτικών υλικών, καθώς και την κατανόηση των επιπτώσεων των λιπών και των ελαίων στη λειτουργικότητα των τροφίμων.

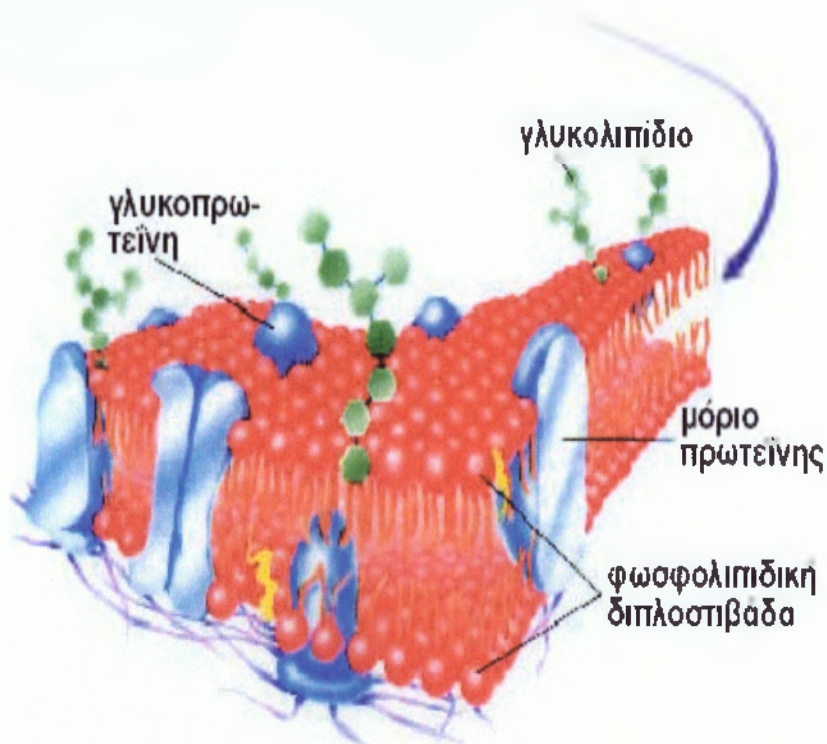
Πίνακας 1 Γενική Κατάταξη των Λιπιδίων

Απλά λιπίδια	Ενώσεις με δύο τύπους δομικών στοιχείων
Γλυκερικοί εστέρες	Εστέρες της γλυκερίνης και των λιπαρών οξέων (π.χ. τριγλυκερίδια, μερικές γλυκερόλες)
Χοληστερικοί εστέρες	Εστέρες της γλυκερόλης και λιπαρά οξέα
Κήροι	Τα πραγματικά κεριά είναι εστέρες μακράς αλυσίδας αλκοολών και λιπαρών οξέων, εστέρες των Βιταμινών Α και D επίσης περιλαμβάνονται
Σεραμίδια (CERAMIDES)	Αμίδια των λιπαρών οξέων με μακρά αλυσίδα δι- ή τριοξύ βάσεων που περιέχουν 12-22 άτομα άνθρακα στην αλειφατική τους αλυσίδα (π.χ. σφιγγοσίνη)
Σύνθετα λιπίδια	Ενώσεις με πάνω από δύο τύπους δομικών στοιχείων
Φωσφολιπίδια	Εστέρες γλυκερόλης των λιπαρών οξέων, φωσφορικό οξύ, και άλλες ομάδες που περιέχουν νιτρικά
Φωσφαταδικό οξύ	Διακυλογλυκερόλη εστεροποιημένη σε φωσφορικό οξύ
Φωσφατιδυλοχολίνη	Φωσφατιδικό οξύ συνδεδεμένο σε χολίνη, λεκιθίνη, Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη,

	Φωσφατιδυλισερίνη, Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
Φωσφατιδυλοακυλογλυκόλη	Περισσότερα από ένα μόριο γλυκερίνης είναι εστεροποιημένα με φωσφορικό οξύ (π.χ., καρδιολίπίνη, διφωσφατιδυλακυλογλυκερόλη)
Γλυκογλυκερολιπίδια	1,2-διακυλογλυκερόλες συνενώνονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς μέσω της sn-3 θέσης σε υδατάνθρακες [π.χ., μονογαλακτόσιλ-διακυλογλυκερόλη, διγαλακτόσιλ-μονοακυλογλυκερόλη, sulfoquinovosyl διακυλογλυκερόλη (μονογλυκοσιλ-διακυλογλυκερόληστη θέση 6 του μορίου δισακχαρίτη που συνδέεται με δεσμό άνθρακα-θείου σε σουλφονικό οξύ)]
Γλυκολιπίδια	Γλυκολιπίδια που είναι δομικά όμοια με ceramide polyhexoside και επίσης περιέχουν 1-3 κατάλοιπα σιαλικού οξέως, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων περιέχει ένα αμινοσάκχαρο, επιπλέον των άλλων σακχάρων
Σφιγγολιπίδια	Παράγωγα των ceramides (ceramide is composed of sphingosine and a fatty acid)
Σφιγγομυελίνη	Κεραμιδική φωσφορυλοχολίνη
Cerebroside	ceramide monohexoside (π.χ., ceramides συνδέονται με έναν μονοσακχαρίτη στην τερματική ομάδα της βάσης)
Σεραμιδικοί Δισακχαρίτες	Συνδέονται με έναν δισακχαρίτη
Σεραμιδικοί Πολυσακχαρίτες	Συνδέονται με τρι- ή ολιγοσακχαρίτη
Παράγωγα λίπη	Ενώσεις που εμφανίζονται ως έχουν ή που εκλύονται από απλά ή σύνθετα λιπίδια λόγω υδρόλυσης (π.χ., λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K, υδρογονανθράκων, στερολών)

Πηγή: Προσαρμοσμένο από την πηγή [3-5].

Ταυτόχρονα, η γνώση σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπιδίων μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη τεχνητών προϊόντων σχεδιασμένα για συγκεκριμένη λειτουργία ή εφαρμογή.



1. Δομή κυττάρου

Πηγή: <http://users.sch.gr/dgspanos/om/om7.htm>



1. Διαχωρισμός λιπιδίων

Πηγή: <http://biosiva.50webs.org/lipids.htm>

A. Εκχύλιση των λιπιδίων από τα τρόφιμα και άλλα βιολογικά υλικά

Τα λιπίδια που συνδέονται με άλλα μόρια μέσω (α) van der Waals αλληλεπίδραση, π.χ., η αλληλεπίδραση των διαφόρων μορίων λιπιδίων με πρωτεΐνες, (β) ηλεκτροστατικών έλξεων και δεσμών υδρογόνου, κυρίως μεταξύ λιπιδίων και πρωτεϊνών και (γ) ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ των λιπιδίων, υδρογονανθράκων και πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, το να διαχωρίσεις και να απομονώσεις τα λιπίδια από μια σύνθετη κυτταρική μήτρα, πρέπει να χορηγούνται διαφορετικές χημικές και φυσικές θεραπείες. Η δυσδιαλυτότητα στο νερό είναι γενικά η ιδιότητα που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των λιπιδίων από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Πλήρης εκχύλιση μπορεί να απαιτήσει μεγαλύτερο διάστημα εκχύλισης ή μια σειρά ή συνδυασμό των διαλυτών, έτσι ώστε τα λιπίδια να μπορούν να απομακρυνθούν από τους ιστούς.

Οι υφιστάμενες διαδικασίες της εκχύλισης λιπιδίων από ζωικούς ή φυτικούς ιστούς συνήθως περιλαμβάνουν αρκετά στάδια: (α) προεπεξεργασία του δείγματος, η οποία περιλαμβάνει ξήρανση, μείωση του μεγέθους, ή υδρόλυση, (β) ομογενοποίηση των ιστών με την παρουσία ενός διαλύτη, (γ) διαχωρισμός υγρών (οργανικών και

υδατικών) και στερεών φάσεων, (δ) αφαίρεση των μη λιπαρών προσμείξεων και (ε) η απομάκρυνση του διαλύτη και η ξήρανση του εκχυλίσματος. Οι πρότυπες μέθοδοι για την εκχύλιση λιπιδίων έχουν καθοριστεί από την International Association of Official Analytical Chemists-IAOAC για τους διαφορετικούς τύπους υλικών/ιστών. Ωστόσο σε κάθε περίπτωση μπορεί να χρειαστεί τροποποίηση της μεθόδου.

1. Προετοιμασία δείγματος

Όπως και με κάθε μορφή της χημικής ανάλυσης, η σωστή δειγματοληψία και αποθήκευση των δειγμάτων είναι απαραίτητες για την επίτευξη έγκυρων αποτελεσμάτων. Το δείγμα πρέπει να είναι ομογενές [5]. Η προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση λιπιδίων εξαρτάται από το είδος των τροφίμων και τη φύση των λιπιδίων του. Αποτελεσματική ανάλυση απαιτεί γνώση της δομής, της χημείας και της εμφάνισης των κυριότερων κατηγοριών των λιπιδίων και των συστατικών τους. Ως εκ τούτου, δεν είναι δυνατή η θέσπιση μιας ενιαίας πρότυπης μεθόδου για την εξαγωγή όλων των ειδών των λιπιδίων από διάφορα τρόφιμα.

Εξαγωγή των λιπιδίων θα πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατό μετά από την αφαίρεση των ιστών από το ζωντανό οργανισμό έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί κάθε μεταγενέστερη μεταβολή. Άμεση εκχύλιση δεν είναι πάντα δυνατή, ωστόσο, τα δείγματα συνήθως αποθηκεύονται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες σε κλειστά δοχεία, σε αδρανή ατμόσφαιρα (άζωτο) ή σε ξηρό πάγο. Ακόμη η ίδια η διαδικασία της ψύξης μπορεί να βλάψει μόνιμα τους ιστούς ως αποτέλεσμα του οσμωτικού σοκ, που μεταβάλλει το αρχικό περιβάλλον των λιπιδίων του ιστού και τα φέρνει σε επαφή με τα ένζυμα από τα οποία κανονικά προστατεύονται. Απόψυξη του δείγματος που ελήφθει από την κατάψυξη πριν από την εκχύλιση μπορεί να ενισχύσει αυτή την επιδείνωση. Ως εκ τούτου, τα δείγματα ιστού πρέπει να ομογενοποιούνται και να εκχυλίζονται με διαλύτες, χωρίς να του επιτραπεί να αποψυχθεί [4]. Τα λιπολυτικά ένζυμα των ζωικών και φυτικών ιστών συνήθως απενεργοποιούνται αμετάκλητα από την ομογενοποίηση με πολικούς διαλύτες. Χρήση υψηλών θερμοκρασιών θα πρέπει να αποφεύγεται. Είναι επίσης σκόπιμο, όταν είναι δυνατόν, να διατηρηθεί σε αδρανή ατμόσφαιρα κατά την προετοιμασία του δείγματος και την εκχύλιση πράγμα που μπορεί να ελαχιστοποιήσει αντιδράσεις οξειδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

2. Προεπεξεργασίες

2.1. Ξήρανση

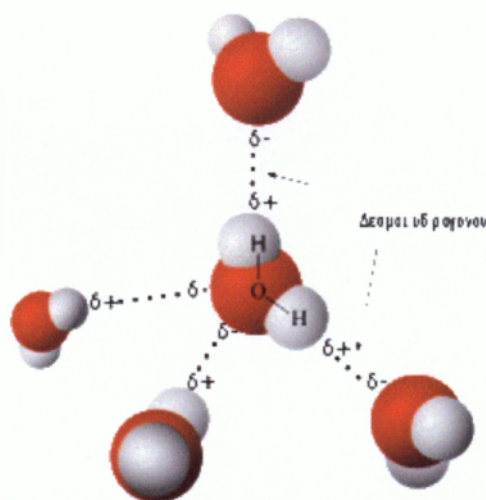
Μερικές φορές μη πολικοί διαλύτες, όπως ο διαιθυλαιθέρας και το εξάνιο, δεν είναι εύκολο να διεισδύσουν στους υγρούς ιστούς (>8% υγρασία) για αυτό και δεν έχουμε αποτελεσματική εκχύλιση. Ο διαιθυλαιθέρας είναι υγροσκοπικός και γίνεται κορεσμένος με το νερό και έτσι ανεπαρκής για την εκχύλιση λιπιδίων. Παρόλα αυτά, μειώνοντας το ποσοστό υγρασίας των δειγμάτων μπορεί διευκολύνει την εκχύλιση των λιπιδίων. Η αποξήρανση σε κλίβανο κενού σε χαμηλές θερμοκρασίες ή λυοφιλοποίηση, συνιστούνται. Προξήρανση διευκολύνει το άλεσμα του δείγματος, ενισχύει την εκχύλιση και βοηθά στην ανεύρεση ελεύθερων λιπιδίων των ιστών. Ξήρανση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες είναι ανεπιθύμητη επειδή τα λιπίδια δημιουργούν δεσμούς με τις πρωτεΐνες και τους υδρογονάνθρακες, και κατά αυτόν τον τρόπο καθιστούν δυσκολότερη την εκχύλισή τους με οργανικούς διαλύτες. [5]

2.2. Μείωση Μεγέθους Σωματιδίων

Η απόδοση της εκχύλισης λιπιδίων από το αποξηραμένο δείγμα εξαρτάται επίσης από το μέγεθος των σωματιδίων. Ως εκ τούτου, μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αυξάνει την επιφάνεια, επιτρέποντας πιο στενή επαφή του διαλύτη και ενισχύει την εκχύλιση των λιπιδίων (λείανση των ελαιούχων σπόρων πριν από την εκχύλιση των λιπιδίων). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ομογενοποίηση του δείγματος διεξάγεται μαζί με το ή σύστημα διαλυτών αντί να εκτελεστούν οι εργασίες αυτές ξεχωριστά.

2.3. Οξεία/ Υδρόλυση αλκαλίων

Για να γίνουν τα λιπίδια περισσότερο προσβάσιμα για τον διαλύτη εκχύλισης, μήτρες τροφίμων συχνά επεξεργάζονται με οξύ ή αλκάλιο (βάση) πριν την εκχύλιση. Οξινή ή αλκαλική υδρόλυση είναι απαραίτητη για τη διάσπαση ομοιοπολικών και ιοντικών δεσμών λιπιδίων σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες καθώς και για να σπάσει γαλακτοποιημένα λίπη. Η πέψη του δείγματος με οξύ (συνήθως 3-6 M HCl) υπό κάθετο ψυκτήρα μετατρέπει τους δεσμούς λιπιδίων σε μια πιο εύκολα εκχυλίσιμη μορφή. Πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένου του βουτύρου, τυριού, γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, απαιτούν κατεργασία με αμμωνία για να σπάσει το γαλακτοποιημένο λίπος, εξουδετερωθεί κάθε οξύ και να διαλυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες πριν από την εκχύλιση με διαλύτες [6]. Τα ένζυμα επίσης χρησιμοποιούνται στην υδρόλυση υδατανθράκων των τροφίμων και των πρωτεϊνών. (π.χ., χρήση Clagage, ένα μείγμα α-αμυλάσης και πρωτεάσης) [2].



2. Δεσμοί υδρογόνου

Πηγή: http://tinanantsou.blogspot.com/2011/05/blog-post_31.html

3. Εκχύλιση Λιπιδίων με Διαλύτες

Η δυσδιαλυτότητα των λιπιδίων στο νερό καθιστά δυνατό το διαχωρισμό τους από τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και το νερό στους ιστούς. Τα λιπίδια έχουν ένα ευρύ φάσμα σχετικής υδροφοβικότητας, ανάλογα με τα μοριακά συστατικά τους. Σε αναλύσεις ρουτίνας τροφίμων, 'λιπαρά' περιεχόμενα (μερικές φορές ονομάζεται το αιθέριο εκχύλισμα, ουδέτερο λίπος, ή ακατέργαστο λίπος) αναφέρεται σε 'ελεύθερα'

συστατικά λιπιδίων που μπορούν να εξαχθούν με λιγότερο πολικούς διαλύτες, όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας ή ο διαιθυλαιθέρας. Τα 'δεσμευμένα' συστατικά των λιπιδίων απαιτούν περισσότερο πολικούς διαλύτες, όπως αλκοόλες, για την εξαγωγή τους. Ως εκ τούτου, συμπεραίνουμε πως δεν είναι δυνατή η χρήση ενός ενιαίου καθολικού διαλύτη για την εξαγωγή των λιπιδίων από τους ιστούς.

Τα ουδέτερα λιπίδια είναι υδροφοβικά δεσμευμένα και μπορούν να εκχυλισθούν από τους ιστούς με μη πολικούς διαλύτες, ενώ πολικά λιπίδια, τα οποία συγκρατούνται κατά κύριο λόγο με ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δεσμούς υδρογόνου, απαιτούν πολικούς. Ωστόσο, λιγότερο πολικά ουδέτερα λιπίδια, όπως τα TAGs και οι εστέρες της χοληστερόλης, μπορούν επίσης να εκχυλισθούν με μη πολικούς διαλύτες, πιθανόν λόγω αδυναμίας πρόσβασης ενός σημαντικού μέρους αυτών των λιπιδίων στους διαλύτες. Τα λιπίδια που είναι συνδεδεμένα με ομοιοπολικούς δεσμούς με πολυπεπτίδια και ομάδες πολυσακχαριτών δε θα εξάγονται καθόλου από τους οργανικούς διαλύτες και θα παραμένουν στα μη λιπιδικά υπολείμματα. Ως εκ τούτου, ένα βήμα υδρόλυσης μπορεί να απαιτηθεί για την αποδέσμευση ομοιοπολικών δεσμών λιπιδίων για να καταστούν εκχυλίσιμα.

3.1. Ιδιότητες των Διαλυτών και Τρόποι Εξαγωγής

Ο τύπος του διαλύτη και η πραγματική μέθοδος εκχύλισης λιπιδίων εξαρτώνται και από την φύση του δείγματος και τον τύπο εκχύλισης των λιπιδίων (π.χ., το σύνολο των λιπιδίων, τα επιφανειακά λιπίδια των φύλλων). Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του ιδανικού διαλύτη για την εκχύλιση των λιπιδίων είναι η υψηλή διαλυτότητα των λιπιδίων σε συνδυασμό με χαμηλή ή καθόλου διαλυτότητα των πρωτεϊνών, τα αμινοξέα και οι υδατάνθρακες. Ο διαλύτης εκχύλισης μπορεί επίσης να αποτρέψει ενζυμική υδρόλυση των λιπιδίων, διασφαλίζοντας έτσι την απουσία παράπλευρων αντιδράσεων. Οι διαλύτες θα πρέπει να διεισδύουν εύκολα στα σωματίδια του δείγματος και θα πρέπει να έχουν σχετικά χαμηλό σημείο βρασμού για να εξατμίζονται εύκολα χωρίς να αφήνουν κατάλοιπα κατά την ανάκτηση των λιπιδίων. Οι διαλύτες που συνήθως χρησιμοποιούνται για την απομόνωση λιπιδίων είναι αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη, ισοπροπανόλη, n-βουτανόλη), ακετόνη, ακετονιτρίλιο, αιθέρες (διαιθυλαιθέρας, ισοπροπυλικός

αιθέρας, διοξλανιο, τετραϋδροφουράνιο), χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο), υδρογονάνθρακες(εξάνιο, βενζόλιο, κυκλοεξάνιο, ισοοκτάνιο), ή μειγμάτων τους. Αν και διαλύτες όπως το βενζόλιο είναι χρήσιμοι για την εκχύλιση λιπιδίων , είναι σκόπιμο να ψάξουμε για εναλλακτικούς διαλύτες λόγω της πιθανής καρκινογένεσης των προϊόντων αυτών. Η ευφλεκτότητα και η τοξικότητα των διαλυτών είναι επίσης σημαντικά ζητήματα για ελαχιστοποίηση των πιθανών κινδύνων καθώς και το κόστος και η μη υγροσκοπικότητα.

Η διαλυτότητα των λιπιδίων σε οργανικούς διαλύτες υπαγορεύεται από το ποσοστό της μη πολικής υδρογονανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων ή άλλων αλειφατικών μορίων και πολικών λειτουργικών ομάδων όπως τα φωσφορικά άλατα ή σάκχαρα, στα μόρια τους. Τα λιπίδια που δεν περιέχουν διακριτές πολικές ομάδες (π.χ., τα TAGs ή οι εστέρες της χοληστερόλης) είναι πολύ διαλυτά σε διαλύτες υδρογονανθράκων όπως το εξάνιο, βενζόλιο ή κυκλοεξάνιο και σε πιο πολικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο ή ο διαιθυλαιθέρας , αλλά παραμένουν αδιάλυτα σε πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη. Η ικανότητα διαλυτότητας αυτών των αλκοολούχων διαλυτών αυξάνεται με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης. Συνεπώς είναι περισσότερο διαλυτά σε αιθανόλη και πλήρως διαλυτά στη n-βουτανόλη. Ομοίως, τα λιπίδια με κοντότερη λιπαρή αλυσίδα έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε πιο πολικούς διαλύτες (π.χ., η τριβουτυρίνη διαλύεται πλήρως σε μεθανόλη ενώ η τριπαλμιτίνη είναι αδιάλυτη). Τα πολικά λιπίδια είναι μόνο ελάχιστα διαλυτά σε διαλύτες υδρογονανθράκων εκτός και αν διαλυτοποιούνται από κοινού με άλλα λιπίδια. Ωστόσο, διαλύονται εύκολα σε πιο πολικούς διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη το χλωροφόρμιο [4].

3.2. Μέθοδοι Εκχύλισης με Απλό Οργανικό Διαλύτη

Διαιθυλαιθέρας και πετρελαϊκός αιθέρας είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι διαλύτες για εκχύλιση λιπιδίων. Επιπλέον , το εξάνιο και πολλές φορές το πεντάνιο προτιμώνται για την απόκτηση των λιπιδίων από ελαιούχους σπόρους. Ο διαιθυλαιθέρας (bp 34,6 ° C) έχει μεγαλύτερη ικανότητα ενυδάτωσης των λιπιδίων σε σύγκριση με τον πετρελαϊκό αιθέρα. Ο πετρελαϊκός αιθέρας είναι το χαμηλότερο σημείου βρασμού κλάσμα (35-38 ° C) του πετρελαίου και περιέχει

κυρίως εξάνια και πεντάνια. Είναι περισσότερο υδροφοβικός από τον διαιθυλαιθέρα και ως εκ τούτου πιο επιλεκτικός για τα περισσότερα υδροφοβικά λιπίδια [5,7]. Το κύριο συστατικό (> 95%) των διαιτητικών λιπιδίων είναι τα TAGs, ενώ τα υπόλοιπα λιπίδια είναι μονο- και διακυλογλυκερόλες, φωσφο- και γλυκολιπίδια και στερόλες. Συνεπώς, οι εκχυλίσεις με μη πολικούς διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εξαγωγή και τον καθορισμό της περιεκτικότητας των λιπιδίων στα τρόφιμα. Όμως, τα λιποδιαλυτά αρώματα, οι βιταμίνες και χρωματικές ενώσεις μπορούν να εξαχθούν και να καθοριστούν ως λιπίδια όταν χρησιμοποιούνται λιγότερο πολικοί διαλύτες.

Κατά τον καθορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια, αρκετές συσκευές και μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί που αξιοποιούν την εκχύλιση με απλό διαλύτη. Ανάμεσα τους οι σταθμικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται πιο συχνά για αναλύσεις ρουτίνας. Στις σταθμικές μεθόδους, τα λιπίδια των δειγμάτων εξάγονται με τον κατάλληλο διαλύτη συνεχώς, ημισυνεχώς και ασυνεχώς. Η περιεκτικότητα του δείγματος ποσοτικοποιείται από την απώλεια βάρους του δείγματος ή από το βάρος του λίπους που αφαιρείται. Η συνεχής εξαγωγή με διαλύτες (π.χ., Goldfish και Foss-Let) δίνει μια συνεχής ροή στον ζέον διαλύτη να ρέει πάνω από το δείγμα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό δίνει μια πιο γρήγορη και πιο αποτελεσματική εκχύλιση από ημισυνεχείς μεθόδους αλλά μπορεί να δώσει ελλιπή εκχύλιση λόγω της διοχέτευσης. Στην ημισυνεχή εκχύλιση με διαλύτες (π.χ., Soxhlet, Soxtec), ο διαλύτης συσσωρεύεται στο θάλαμο εκχύλισης (το δείγμα τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί) για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια με σιφόνια πίσω στη φιάλη θέρμανσης. Αυτή η μέθοδος απαιτεί περισσότερο χρόνο από ότι η συνεχής μέθοδος, παρέχει ένα εμποτισμένο αποτέλεσμα για το δείγμα και δεν οδηγεί στη διοχέτευση. Στη άμεση ή ασυνεχή εκχύλιση με διαλύτες, δεν υπάρχει συνεχής ροή των διαλυτών και το δείγμα εκχυλίζεται με καθορισμένο όγκο διαλύτη. Μετά από μια ορισμένη χρονική περίοδο το στρώμα διαλύτη ανακτάται και το διαλυμένο λίπος είναι απομονωμένο από την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Οι μέθοδοι Rose- Gottlieb, η τροποποιημένη Mojonniér και η Schmid- Boudzynski- Ratzlaff (SBR) είναι παραδείγματα που περιέχουν πάντα οξέα και βάσεις διάλυσης των πρωτεϊνών για την απελευθέρωση των λιπιδίων [6]. Οι διαδικασίες αυτές μερικές φορές χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό εκχύλισης με διαιθυλαιθέρα και πετρελαϊκούς αιθέρες για την απόκτηση των λιπιδίων από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η χρήση αυτών των διαλυτών μπορεί να επιτρέψει

την εκχύλιση μονο-, δι- και τριγλυκεριδίων, τις περισσότερες από τις στερόλες και τα γλυκολιπίδια, αλλά δε μπορούν να αφαιρεθούν φωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα.

3.3. Μέθοδοι που χρησιμοποιούν Συνδυασμό Οργανικών Διαλυτών

Ένας απλός μη πολικός διαλύτης δεν μπορεί να εξάγει τα πολικά λιπίδια από τους ιστούς στις περισσότερες των περιπτώσεων. Για να εξασφαλιστεί μια πλήρης και ποσοτική αξιοποίηση των λιπιδίων του ιστού, ένα σύστημα διαλυτών από πολικά και μη πολικά συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Ένα τέτοιο μίγμα εκχυλισμάτων του συνόλου των λιπιδίων είναι περισσότερο διεξοδικό και το εκχύλισμα είναι κατάλληλο για περαιτέρω χαρακτηρισμό των λιπιδίων. Οι μέθοδοι των Folch [8] και Bligh & Dyer [9] είναι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες για την ολική εκχύλιση των λιπιδίων. Η χρήση ενός πολικού διαλύτη μόνου του μπορεί να αφήσει μη πολικά λιπίδια στο υπόλειμμα. Όταν ελεύθερες λιπιδίων αποπρωτεΐνες πρόκειται να απομονωθούν (ή Όταν λιπίδια χωρίς αποπρωτεΐνες), οι ιστοί απολιπώνονται χωρίς πολικούς διαλύτες μόνο [10]. Είναι, επίσης, αποδεκτό πως το νερό στους ιστούς ή το νερό που χρησιμοποιείται για να εκλούσει τα εκχυλίσματα των λιπιδίων μεταβάλλει αισθητά τις ιδιότητες των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση λιπιδίων.

Συνήθως το σύστημα διαλυτών χλωροφορμίου- μεθανόλης (2:1, v/v) [8] αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέσο για την πλήρη εξαγωγή των λιπιδίων από ζωικούς, φυτικούς ή βακτηριακούς ιστούς. Το αρχικό σύστημα διαλυτών είναι δυαδικό. Κατά την διαδικασία εκχύλισης γίνεται ένα τριαδικό σύστημα που αποτελείται από χλωροφόρμιο, μεθανόλη και νερό σε διάφορες αναλογίες, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε υγρασία του δείγματος [9]. Η μέθοδος Bligh & Dyer αναγνωρίζει ρητά τη σημασία του νερού στην εκχύλιση των λιπιδίων από τους περισσότερους ιστούς και επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθαρισμό του προκύπτον εξαγόμενου λιπιδίου. Μια τυπική Folch διαδικασία χρησιμοποιεί έναν διαλύτη προς δείγμα αναλογία 2:1 (v/w) με ένα μίγμα χλωροφορμίου και μεθανόλης (2:1, v/v) σε εκχύλιση δύο σταδίων. Το δείγμα είναι ομογενοποιημένο με τον διαλύτη και το μείγμα που προκύπτει φιλτράρεται για να ανακτήσει το μίγμα λιπιδίων

από το υπόλειμμα. Οι διαδοχικές εκχυλίσεις διεξάγονται συνήθως με φρέσκα μείγματα διαλυτών μιας παρόμοιας σύνθεσης. Είναι συνήθως αποδεκτό ότι περίπου το 95% των λιπιδίων των ιστών εξάγονται κατά το πρώτο βήμα. Σε αυτή την μέθοδο, εάν το αρχικό δείγμα περιέχει σημαντική ποσότητα νερού, μπορεί να είναι απαραίτητο να εκτελεστεί προκαταρκτική εκχύλιση με αναλογία 1:2 (v/v) χλωροφορμίου-μεθανόλης , προκειμένου να επιτευχθεί διάλυμα μιας φάσης. Το εκχύλισμα στην συνέχεια αραιώνεται με νερό ή με διάλυμα άλατος (0,08% KCl) μέχρι διαχωρισμού των φάσεων και η τελευταία φάση να περιέχει τα λιπίδια που συλλέγονται. Η Bligh & Dyer [9] χρησιμοποιεί 1:1 (v/v) χλωροφόρμιο-μεθανόλη για το πρώτο βήμα της εκχύλισης και η αναλογία είναι προσαρμοσμένη στο 2:1 (v/v) στο επόμενο στάδιο της εκχύλισης και του πλυσίματος. Η αρχική διαδικασία της Folch ή της Bligh & Dyer χρησιμοποιεί μεγάλες ποσότητες δείγματος (40-100 gr) και διαλυτών. Ως εκ τούτου, τα ποσά μπορούν να μειωθούν όταν μια μικρή ποσότητα του δείγματος είναι παρών ή για τακτικές αναλύσεις στο εργαστήριο. Εξού και ο Lee και οι συνεργάτες του[11] έχουν περιγράψει μια μέθοδο που χρησιμοποιεί τον ίδιο συνδυασμό διαλυτών , αλλά σε διαφορετικές αναλογίες, με βάση την αναμενόμενη περιεκτικότητα του δείγματος σε λιπίδια. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο , συνιστώνται οι αναλογίες χλωροφορμίου-μεθανόλης, 2:1 (v/v) για τους λιπαρούς ιστούς (>10% λιπίδια) και 1:2 (v/v) για τους άπαχους (<2%) ιστούς. Η εκχύλιση Folch ανακτά τα ουδέτερα λιπίδια, διακυλογλυκεροφωσφολιπίδια και τα περισσότερα από τα σφιγγολιπίδια. Τα λυσοφωσφολιπίδια ανακτώνται εν μέρει και τα περισσότερα πολικά όξινα φωσφολιπίδια χάνονται κατά το πλύσιμο με νερό. Όμως και οι δύο διαδικασίες μαζί, Folch και Bligh-Dyer, μπορεί να αποτύχουν να μεταφέρουν όλα τα λιπίδια στην οργανική φάση. Τα λυσοφωσφολιπίδια , τα φωσφοϊνοσιτιδία και άλλα υψηλής πολικότητας λιπίδια, είναι ουσίες που επιλεκτικά χάνονται. Σύμφωνα με την Christie [5], οι ιστοί που είναι πλούσιοι σε φωσφοϊνοσιτιδία θα πρέπει να αποθηκεύονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η ενζυμική υποβάθμισή τους και η εκχύλιση με διαλύτες θα πρέπει να γίνεται αρχικά με την παρουσία CaCl₂. Όταν οι λυσοφωσφατίδες είναι η το κύριο συστατικό της εκχύλισης των ιστών, συνίσταται τα οξέα ή τα ανόργανα άλατα να προστίθενται κατά την διάρκεια της εκχύλισης με χλωροφόρμιο-μεθανόλη ή n-βουτανόλη κορεσμένη με νερό. Επομένως, συγκεκριμένες εφαρμογές και τροποποιήσεις της μεθόδου απαιτούνται για να διασφαλιστεί η πλήρης αποκατάσταση των λιπιδίων του ιστού.

Λόγω των πιθανών κινδύνων του χλωροφορμίου για την υγεία, μίγματα διαλυτών που περιέχουν μείγματα αλκανίων-αλκοολών-νερού όπως επίσης εξάνιο και ισοπροπανόλη, με ή χωρίς νερό, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εκχύλιση των ιστών [12,13] και των λιπιδίων ιχθυάλευρων [14]. Εξάνιο-ισοπροπανόλη (3:2, v/v) [12,14,15], επτάνιο-αιθανόλη-νερό- νιτρικό δωδεκυλοθειικό άλας (1:1:1, v/v/v) [16], μεθυλενοχλωρίδιο-μεθανόλη (2:1, v/v) και εξάνιο-ακετόνη (1:1, v/v) [19], οι εν λόγω συνδυασμοί διαλυτών χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση των λιπιδίων από βιολογικά υλικά. Τα αζεοτροπικά μίγματα της ισοπροπανόλης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση των λιπιδίων από ελαιούχους σπόρους ως υποκατάστατα εξάνιου [20-22]. Η κορεσμένη από νερό n-βουτανόλη [23] είναι πιο αποτελεσματική όσον αφορά την εκχύλιση των λιπιδίων από τα σιτηρά που είναι πλούσια σε άμυλο. Αυτό το μίγμα διαλυτών χρησιμοποιείται εκτενώς για την για την εκχύλιση λιπιδίων από τα αμυλούχα τρόφιμα. Ωστόσο , η υδρόλυση με χρήση οξέος ενδέχεται να απαιτείται για την αποδέσμευση λιπιδίων ή ενσωματωμένων συμπλόκων πριν από την εκχύλιση τους.

Η τεχνική Ταχείας Εκχύλισης με Διαλύτες (ASE-Accelerated Solvent Extraction) έχει πρόσφατα εισαχθεί. Αυτή χρησιμοποιεί κλασικά συστήματα διαλυτών για την εκχύλιση των λιπιδίων, αλλά κάτω από ποικίλες παραμέτρους εκχύλισης, όπως θερμοκρασία, πίεση και όγκος. Η ASE είναι επίσης αυτοματοποιημένη [24,25]. Η τεχνική ASE καταναλώνει πολύ χαμηλότερο όγκο διαλύτη και χρόνο καθώς τα λιπίδια εκχυλίζονται σε θερμοκρασίες πολύ πάνω από το σημείο βρασμού του διαλύτη λόγω υψηλών πιέσεων που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία. Αυτό ενισχύει την διαλυτοποίηση και την διάχυση των λιπιδίων από τα δείγματα στο διαλύτη, μειώνει σημαντικά τον χρόνο εκχύλισης και την κατανάλωση του διαλύτη. Το λίπος θα μπορούσε να εξαχθεί με μη εκροή του διαλύτη (στατική κατάσταση λειτουργίας) ή επιτρέποντας υγρό διαλύτη να ρέει συνεχώς μέσω του δείγματος (δυναμική κατάσταση λειτουργίας) κατά την εκχύλιση. Υπό αυξημένες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, διαλυμένα λιπίδια διαχέονται από τον πυρήνα προς την επιφάνεια των σωματιδίων του δείγματος και στην συνέχεια μεταφέρονται στον διαλύτη εκχύλισης. Συμπιεσμένο αέριο τότε διαχωρίζει το διαλυτοποιημένο λίπος σε ένα δοχείο συλλογής και μπορεί τότε να ποσοτικοποιηθεί σταθμικά [7]. Σύμφωνα με τον Schafer [25], η περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων των εκχυλισμένων λιπιδίων από τις μυϊκούς ιστούς χρησιμοποιώντας ASE (Σύστημα

Dionex 30 ή 300 , σύστημα χλωροφορμίου-μεθανόλης) ήταν ίδια ή παρόμοια σε σύγκριση με την συμβατική εκχύλιση του Folch. Οι αυτοματοποιημένοι εκχυλιστές με διαλύτες περιέχουν αναλυτή υγρασίας μικροκυμάτων για να ξηράνουν το δείγμα πριν την εκχύλιση, να το ξανά αποξηράνουν για να απομακρυνθεί ο διαλύτης και η υγρασία και να προσδιοριστεί το ποσοστό του λίπους καθώς χάνεται βάρος από την διαδικασία της εκχύλισης [2].

3.4. Μέθοδοι που χρησιμοποιούν Μη Οργανικούς Διαλύτες

Λόγω των περιβαλλοντικών ανησυχιών και των δυνητικών κινδύνων για την υγεία από τους οργανικούς διαλύτες, μη οργανικοί διαλύτες έχουν γίνει δημοφιλείς. Η χρήση του φούρνου μικροκυμάτων χώνεψης για απομόνωση λιπιδίων, έχει πρόσφατα αναφερθεί [26]. Υποστηρίζεται πως η ενέργεια των μικροκυμάτων, αυξάνοντας την περιστροφική δύναμη των δεσμών που συνδέουν διπολικά μόρια με παρακείμενα μόρια, μειώνει την ενέργεια που απαιτείται για να διαταράξει τις υδροφοβικές ενώσεις. Δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές δυνάμεις , συνεπώς βοηθούν να διαλυθούν όλα τα είδη λιπιδίων [26]. Η τεχνολογία των μικροκυμάτων επέτρεψε την ανάπτυξη της γρήγορης, ασφαλούς και οικονομικής μεθόδου για την εκχύλιση των λιπιδίων και δεν απαιτεί τα δείγματα να είναι άνευ νερού [27]. Η απόδοση της εκχύλισης λιπιδίων με μικροκύματα ήταν ποιοτικά (όλων των κατηγοριών των λιπιδίων) και ποσοτικά συγκρίσιμη με εκείνη της συμβατικής μεθόδου του Folch για ποικίλα βιολογικά δείγματα [26].

Υπερκρίσιμη ρευστή εκχύλιση (SFE). Όταν το διοξείδιο του άνθρακα είναι συμπιεσμένο σε θερμοκρασία (31,1 °C) και πίεση (72.9 atm) πάνω από το κρίσιμο σημείο, δεν ρευστοποιείται αλλά επιτυγχάνει μια πυκνή αέρια κατάσταση που συμπεριφέρεται όπως ένας διαλύτης. Έτσι ονομάζεται υπερκρίσιμο CO₂ (SC-CO₂). Η χρήση του SC-CO₂ για την εκχύλιση λιπιδίων μειώνει σημαντικά τη χρήση οργανικών διαλυτών, αποφεύγει τα προβλήματα διάθεσης των αποβλήτων, καταργεί τη χρήση δυνητικά τοξικών και εύφλεκτων διαλυτών και μειώνει τον χρόνο εκχύλισης. Έτσι τα λιπίδια που εξάγονται δεν εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες κατά την διαδικασία εκχύλισης.

Η εκχύλιση με SC-CO₂ αποδίδει μια καλή ανάκτηση των μη πολικών λιπιδίων συμπεριλαμβανομένων εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, ακυλογλυκερόλων και ασαπωνοποίητων υλών. Τα πολύπλοκα πολικά λιπίδια είναι ελάχιστα διαλυτά στο SC-CO₂. Η πολικότητα του SC-CO₂ μπορεί να ποικίλλει με την χρήση ενός πρόσθετου όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη ή ακόμη και το νερό για να βελτωθεί η εκχύλιση των πολικών λιπιδίων [28-31]. Αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση λιπιδίων από διάφορους φορείς, συμπεριλαμβανομένων των αφυδατωμένων τροφίμων [32,33], κρεάτων [34-36] και τηγανισμένων τροφίμων [37]. Το μέγεθος των σωματιδίων επίσης επιδρά στην ανάκτηση των λιπιδίων επειδή αυτό επηρεάζει την -επιφάνειας που είναι εκτεθειμένη στο SC-CO₂. Η περιεκτικότητα υψηλής υγρασίας μειώνει την επαφή μεταξύ του δείγματος και του SC-CO₂ καθώς και διάχυσης των λιπιδίων εκτός του δείγματος [38]. Τα εκχυλισμένα λιπίδια που προέρχονται από κρέας ή τα υδρολυτικά προϊόντα από την υδρόλυση των με οξέα μπορούν να απορροφηθούν σε μία μήτρα στερεής φάσης της εκχύλισης (SPE) και το SC-CO₂ μπορεί να χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των προσροφημένων λιπιδίων [35]. Αύξηση της ανάκτησης των λιπιδίων με μειωμένη περιεκτικότητα σε υγρασία έχει αποδειχθεί σε υγρά δείγματα, όπως το κρέας [34,39-42]. Ως εκ τούτου, η λυοφιλοποίηση προτείνεται για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης λιπιδίων από τα δείγματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία. Η εκχύλιση με SC-CO₂ είναι σε θέση να ανακτήσει το 97-100% των λιπιδίων σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης με διαλύτη [43-44]. Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των λιπαρών οξέων που παρατηρήθηκαν. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι η υπερκρίσιμη ρευστή εκχύλιση (SFE) θα μπορούσε να αντικαταστήσει μεθόδους εκχύλισης με διαλύτες σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων. Στην πραγματικότητα η SFE έχει πρόσφατα συμπεριληφθεί στις συνιστώμενες μεθόδους του AOAC για την εκχύλιση λιπιδίων από ελαιούχους σπόρους [45]. Το κύριο μειονέκτημα της SC-CO₂ είναι το κόστος εξοπλισμού και η εκχύλιση των μη λιπαρών υλικών, όπως το νερό [46].

4. Εκχύλιση Λιπιδίων χωρίς Διαλύτες

Οι μέθοδοι εκχύλισης λιπιδίων χωρίς διαλύτες είναι κυρίως υγρές διαδικασίες εκχύλισης που δε χρησιμοποιούν διαλύτες και τα παράγωγα των λιπιδίων ποσοτικοποιούνται ογκομετρικά. Τέτοιες διαδικασίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του παραγών των λιπιδίων στα γαλακτοκομικά τρόφιμα, κυρίως το γάλα και απαιτούν την χρήση ειδικά σχεδιασμένων υαλικών ειδών και εξοπλισμού.

4.1. Μέθοδος πέψης με οξέα

Οι μέθοδοι Babcock και Gerber είναι κλασικά παραδείγματα μεθόδων με οξέα. Η βασική αρχή των μεθόδων αυτών είναι η αποσταθεροποίηση και η απελευθέρωση του λίπους από το γαλάκτωμα με ένα ισχυρό οξύ (π.χ., θεικό). Το λιγότερο πυκνό λίπος ανεβαίνει στον βαθμονομημένο λαϊμό του μπουκαλιού Babcock και το στάδιο της φυγοκέντρισης βοηθά το διαχωρισμό. Το προστιθέμενο θειικό οξύ χωνεύει τις πρωτεΐνες, παράγει θερμότητα και απελευθερώνει λίπος. Η περιεκτικότητα λίπους μετριέται ογκομετρικά και εκφράζεται σε ποσοστό του βάρους. Η τροποποιημένη μέθοδος του Babcock χρησιμοποιεί ένα μίγμα οξικού-υπερχλωρικού οξέως αντί του θεικού οξέως και χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει το αιθέριο έλαιο σε εκχυλίσματα αρωματικών ουσιών και προϊόντων που περιέχουν ζάχαρη και σοκολάτα. Η μέθοδος Gerber χρησιμοποιεί μια αρχή παρόμοια με εκείνη της Babcock αλλά αξιοποιεί το θειικό οξύ και πεντανόλη. Η πεντανόλη εμποδίζει την απανθράκωση της ζάχαρης, η οποία μπορεί να συμβεί με την μέθοδο Babcock. Για αυτό, η μέθοδος Gerber θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων με βάση το γάλα [2,6].

4.2. Μέθοδος με Απορρυπαντικό

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα απορρυπαντικό για να σχηματιστεί ένα σύμπλεγμα πρωτεΐνης –απορρυπαντικού για να διαλύσει το γαλάκτωμα και να απελευθερώσει το λίπος. Για το γάλα, το ανιονικό απορρυπαντικό, διόκτυλο

φωσφορικό νάτριο, προστίθεται για να διασπάσει την στοιβάδα της πρωτεΐνης που σταθεροποιεί και απελευθερώνει το λίπος. Στη συνέχεια ένα δυνατό υδροφιλικό μη ιονικό polyoxyethylene απορρυπαντικό , η sorbitan monolaurate προστίθεται για να διαχωρίσει το λίπος από τα άλλα συστατικά των τροφίμων [5].

4.3. Φυσικές Μέθοδοι

Εξωτερικές δυνάμεις συμπίεσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να απελευθερωθούν τα συστατικά του ιστού και τα εκχυλίσματα των λιπιδίων, ειδικά από την ξηρά ουσία. Ελαιούχοι σπόροι (υγρασία <5%, έλαιο >30%) γενικά υπόκεινται σε πίεση έκθλιψης για να αποκτηθούν τα λιπίδια χωρίς διαλύτες.

5. Αφαίρεση των Μη Λιπιδικών Προσμείξεων από τις Εκχυλίσσεις Λιπιδίων και Άλλων Πρακτικών Θεμάτων

Η απομάκρυνση των λιπιδικών ρύπων από το εκχύλισμα των λιπιδίων είναι απαραίτητη δεδομένου ότι οι περισσότεροι διαλύτες αναλώνονται επίσης με την διάλυση σημαντικών ποσοτήτων λιποδιαλυτών αρωματικών ουσιών, των χρωστικών ουσιών, των σακχάρων, των αμινοξέων, μικρής αλυσίδας πεπτιδίων, των ανόργανων αλάτων και της ουρίας. Τα μη λιπίδια πρέπει να αφαιρούνται πριν από το σταθμικό προσδιορισμό των ολικών λιπιδίων, ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση κατά την διάρκεια της επακόλουθης κλασμάτωσης των εκχυλισμάτων. Στο εκχύλισμα χλωροφορμίου-μεθανόλης, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αφαίρεση μη λιπιδικών προσμείξεων, περιλαμβάνεται το πλύσιμο με νερό ή με ένα διάλυμα KCl (0,88% w/v). Η χρήση του διαλύματος άλατος έχει το πλεονέκτημα της πρόληψης ή ελαχιστοποίησης του σχηματισμού μιας ενδιάμεσης φάσης. Όταν το μίγμα χλωροφόρμιου-μεθανόλης (2:1, v/v) χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του δείγματος, η προσθήκη νερού ή αραιωμένου διαλύματος άλατος συντελεί στη διαμόρφωση ενός συστήματος δύο φάσεων, π.χ., μια κατώτερη φάση αποτελούμενη από μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού (86:14:1 v/v/v) και μιας ανώτερης φάσης που αποτελείται από το ίδιο μίγμα, αλλά με αναλογία 3:48:47, v/v/v. Η κατώτερη φάση καταλαμβάνει περίπου τα δύο τρίτα του συνολικού όγκου και περιέχει τα συστατικά των λιπιδίων, αλλά η ανώτερη φάση διατηρεί τις μη λιπιδικές προσμείξεις. Ωστόσο, περισσότερο πολικά λιπίδια, όπως ορισμένα φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια και gangliosides, μπορούν να παραμείνουν στην ανώτερη φάση [4,47]. Οι μη λιπιδικές προσμείξεις μπορούν επίσης να αφαιρεθούν μερικώς ή ολικώς σε κενό ή σε ατμόσφαιρα αζώτου και στη συνέχεια ξαναεκχυλίζονται με μη πολικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο.

Στη μέθοδο Bligh & Dyer [9] το δείγμα ομογενοποιείται με χλωροφόρμιο και μεθανόλη σε τέτοιες αναλογίες που αναμίξιμο σύστημα σχηματίζεται με το νερό του δείγματος. Αραίωση του ομογενοποιημένου δείγματος με χλωροφόρμιο και νερό το διαχωρίζει σε δύο στοιβάδες. Η χλωροφορμική στοιβάδα περιέχει όλα τα λιπίδια και το στρώμα μεθανόλης-νερού περιέχει όλη τη μη λιπιδική ύλη. Ένα καθαρό εκχύλισμα λιπιδίων θα μπορούσε να επιτευχθεί με την απομόνωση της χλωροφορμικής

στοιβάδας. Ίχνη υγρασίας μπορούν να αφαιρεθούν κατά την διέλευση του εκχυλίσματος χλωροφορμίου μέσα από το στρώμα του άνυδρου θεικού νατρίου.

Η απομάκρυνση των μη λιπιδικών προσμειξεων με υγρή-υγρή χρωματογραφία κατανομής σε ένα πήκτωμα δεξτράνης εισήχθη από τους Wells και Dittmer[48]. Αυτό γίνεται με το πέρασμα του ακατέργαστου λιπιδικού εκχυλίσματος μέσα από μια στήλη Sephadex G-25. Τα λιπίδια που δεν έχουν προσμειξεις θα πρέπει να εκλύονται γρήγορα από την στήλη. Τα Gangliosides και τα μη λιπίδια παραμένουν στη στήλη και μπορούν να ανακτηθούν [49]. Η χρήση προαποσταγμένων διαλυτών για την εκχύλιση λιπιδίων είναι σκόπιμη, δεδομένου ότι όλοι οι διαλύτες περιέχουν μικρές ποσότητες λιπιδικών προσμειξεων. Η χρήση των πλαστικών εμπορευματοκιβωτίων και των μη Teflon σκευών πρέπει επίσης να αποφεύγεται γιατί μπορεί να περάσουν στο εκχύλισμα των λιπιδίων. Για να αποφευχθεί η αυτοοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι σκόπιμο να προστεθεί ένα αντιοξειδωτικό (π.χ., BHP) στο διαλύτη (στο επίπεδο των 50-100mg/L). Επιπλέον, η εκχύλιση πρέπει να γίνεται σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου αζώτου και για τα εκχυλίσματα ιστών και για τους ιστούς, πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -20°C σε ατμόσφαιρα αζώτου, αν είναι δυνατόν. Οι περισσότερες από τις παραπάνω μεθόδους είναι κατάλληλες για την ποσοτικοποίηση του συνόλου των περιεχομένων των λιπιδίων του δείγματος. Όταν υψηλές θερμοκρασίες εμπλέκονται στην εκχύλιση, το αποτέλεσμα της εκχύλισης των λιπιδίων δεν είναι κατάλληλο για περαιτέρω ανάλυση περιεκτικότητας. Η μέθοδος εκχύλισης Folch είναι συνήθως η προτιμώμενη διαδικασία, περαιτέρω ανάλυση του σύνολο των λιπιδίων. Τα λιπίδια ανακτώνται από την χλωροφορμική στοιβάδα από την απομάκρυνση του διαλύτη σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό κενό. Η υδρόλυση οξέως έχει επίσης αποτελέσματα στην αποσύνθεση των φωσφολιπιδίων και πιθανώς τα TAGs σε κάποιο βαθμό [6].

Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπιδίων από τις εκχυλίσεις πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από την διαφορά της ποσότητας μετά την απομάκρυνση του διαλύτη. Η απομάκρυνση του διαλύτη από τα εκχυλίσματα των λιπιδίων πρέπει να διεξάγονται υπό κενό σε ή κοντά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα λιπίδια θα πρέπει να αποθηκεύονται άμεσα σε έναν αδρανές, μη αλκοολικό διαλύτη, όπως το χλωροφόρμιο, αντί να τους επιτραπεί να παραμείνουν στη ξηρά κατάσταση για πολύ ώρα [4].

B. Έμμεσες μέθοδοι για τον Καθορισμό των Λιπιδίων

Διάφορες τεχνικές και μέσα έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί στον έμμεσο και γρήγορο καθορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια των δειγμάτων. Αυτές οι μέθοδοι δεν είναι πραγματικές μέθοδοι εκχύλισης λιπιδίων, αλλά κερδίζουν έδαφος επειδή είναι γρήγορες και σε μεγάλο βαθμό μη καταστροφικές. Οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους στηρίζονται σε διαδικασία με πρότυπο αναφοράς.

1. Μέτρηση Πυκνότητας

Έχει αναφερθεί ότι η πυκνότητα του λιναρόσπορου έχει υψηλό βαθμό συσχέτισης με την περιεκτικότητα σε λάδι [50]. Έτσι, η μέτρηση της πυκνότητας των σπόρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο ελέγχου γενετικών γραμμών για την υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι.

2. Διηλεκτρική Μέθοδος

Η διηλεκτρική σταθερά ενός διαλύτη αλλάζει όταν το λίπος διαλύεται σε αυτό. Αφού ένα ελαιούχο δείγμα έχει εκχυλιστεί με ένα διαλύτη και η διηλεκτρική σταθερά του μείγματος έχει μετρηθεί, η περιεκτικότητα σε λιπίδια προσδιορίζεται από το πρότυπο διάγραμμα που δείχνει διακύμανση της διηλεκτρικής σταθεράς ως προς το ποσόν των λιπιδίων στον ίδιο διαλύτη [5]. Σύμφωνα με τον Hunt [51], η ποσότητα του επαγωγικού ρεύματος και ο προσδιορισμός του περιεχόμενου λαδιού από τον διαλύτη της εκχύλισης της σόγιας, είναι γραμμικά ($r = 0,98$).

3. Εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία

Η NIR φασματομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των περιεχομένων του ελαίου, των πρωτεϊνών και της υγρασίας και λειτουργεί ως ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την καθημερινή ανάλυση των ελαιούχων σπόρων.

Οι Rodrigez-Otero [52] χρησιμοποίησαν την NIR φασματοσκοπία για την μέτρηση του λίπους, των πρωτεϊνών και των ολικών λιπιδίων του τυριού. Ο Lee [53]

έχει χρησιμοποιήσει μικρού μήκους κύματος (700-1100 nm) NIR για την εκτίμηση του ακατέργαστου περιεχομένου των λιπιδίων στο μυ μιας ολόκληρης ιριδίζουσας πέστροφας. Μια πολύ καλή συσχέτιση παρατηρήθηκε στην χημική ανάλυση της περιεκτικότητας των λιπαρών ουσιών και τις τιμές της NIR φασματοσκοπίας που λαμβάνονται για τον εκτρεφόμενο σολομό του Ατλαντικού [54]. Η χρήση της mid-IR φασματοσκοπίας για τον προσδιορισμό του περιεχομένου των λιπιδίων του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων έχει περιγραφεί από τον Biggs [55]. Τα λιπίδια απορροφούν υπέρυθρη ενέργεια στο μήκος κύματος των 5730 nm και η απορροφημένη ενέργεια εξαρτάται από την περιεκτικότητα των λιπιδίων του δείγματος. Ποσοτική εκτίμηση γίνεται από την πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης [56]. Λεπτομέρειες σχετικά με τη χρήση υπέρυθρης φασματοσκοπίας για ανάλυση λιπιδίων παρέχεται σε επόμενο τμήμα του παρόντος κεφαλαίου.

4. Χαμηλής Διακριτικής Ικανότητας Πυρηνική Μαγνητική Φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία πυρηνικής μαγνητικής συντονισμού (NMR) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπίδια των τροφίμων. Τα σήματα από τους πυρήνες υδρογόνου (πρωτόνια ή ^1H) των διαφόρων συστατικών των τροφίμων διακρίνονται μεταξύ τους. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη με τον αριθμό πρωτονίων και, ως εκ τούτου, των περιεχομένων του υδρογόνου. Έτσι, η ένταση του σήματος της NMR μπορεί να μετατραπεί στην περιεκτικότητα του ελαίου του δείγματος χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης ή πίνακες [57-60]. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον καθορισμό των συστατικών του νερού και του λαδιού. Η NMR έχει χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί η περιεκτικότητα σε λίπος των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων του βουτύρου, της μαργαρίνης, της σοκολάτας, των ελαιούχων σπόρων, του κρέατος, του γάλακτος και γάλακτος σε σκόνη και του τυριού [61-63].

Η μορφή του φάσματος NMR του λαδιού αντανακλά τον βαθμό ακορεστότητας και άλλων χημικών ιδιοτήτων [56,61].

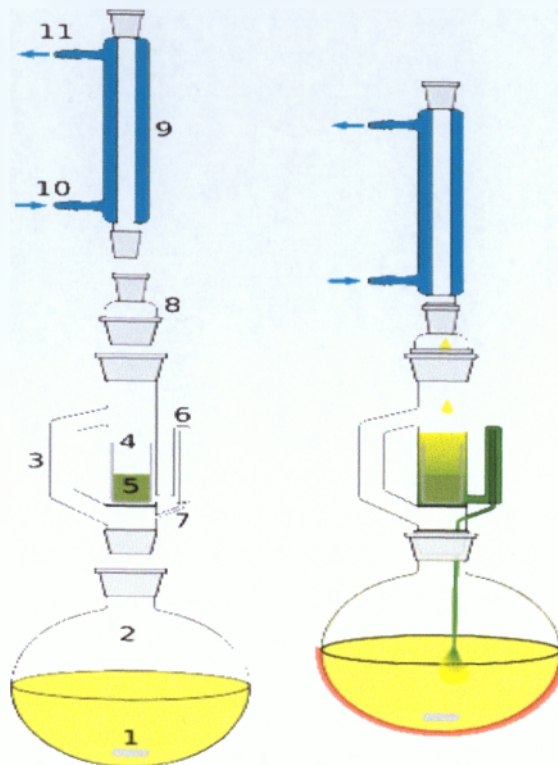
5. Θολωσιμετρικές/Χρωματομετρικές Μέθοδοι

Οι Haugaard & Pettinati [64] περιέγραψαν μια θολωσιμετρική μέθοδο για γρήγορο προσδιορισμό των λιπιδίων στο γάλα. Το λίπος στο γάλα ομογενοποιείται για να αποκτήσει ομοιόμορφα σφαιρίδια και οι πρωτεΐνες του γάλακτος διατηρούνται με χημικούς παράγοντες όπως το EDTA. Η διαπερατότητα του δείγματος μετράται και στη συνέχεια συσχετίζεται με την περιεκτικότητα σε λιπίδια με την χρήση ενός διαγράμματος μετατροπής.

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια του γάλακτος μπορεί επίσης να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας μια χρωματομετρική μέθοδο [65]. Τα λιπίδια του γάλακτος αφήνονται να αντιδράσουν με ένα αλκαλικό διάλυμα υδροξαμικού οξέως για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Μετά την αύξηση της οξύτητας και την προσθήκη τριχλωριούχου σιδήρου, μια σχετικά σταθερή χρωμοφόρος, διαμορφώνεται με μέγιστη απορρόφηση στα 540 nm [66].

6. Μέθοδος Υπερήχων

Ο Fitzgerald [67] έχει περιγράψει μια μέθοδο υπερήχων για να καθορίσει το ποσό των λιπιδικών και των μη λιπιδικών στερεών του υγρού γάλακτος. Η ταχύτητα του ήχου αυξάνει ή μειώνει άμεσα με την περιεκτικότητα των λιπιδίων πάνω ή κάτω από μια ορισμένη κρίσιμη θερμοκρασία. Αυτή η μέθοδος προσδιορισμού του λίπους βασίζεται στην ταχύτητα του ήχου που διέρχεται από το γάλα σε διάφορες θερμοκρασίες.



3. Εκχύλιση με την μέθοδο Soxhlet

Πηγή: <http://www.chemist.gr/2011/01/4606/>

7. Απορρόφηση Ακτινών Χ

Είναι γνωστό ότι το άπαχο κρέας απορροφά περισσότερες ακτίνες Χ από το υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά κρέας [68]. Το γεγονός αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπίδια στο κρέας και τα προϊόντα κρέατος χρησιμοποιούν μια τυποποιημένη καμπύλη της σχέσης μεταξύ της απορρόφησης των ακτινών Χ και του καθορισμού της περιεκτικότητας των λιπιδίων με τις συνήθεις μεθόδους εκχύλισης [5].

Γ. Ανάλυση των Λιπιδικών Εκχυλίσεων

Η ανάλυση λιπιδίων απαιτείται συνήθως για να καθοριστεί η σύνθεση και η δομή των λιπιδίων που προέρχονται από το δείγμα. Τα τρόφιμα πρέπει να αναλυθούν για να καθοριστεί το περιεχόμενο και το είδος των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και η περιεκτικότητα τους σε χοληστερόλη. Ο εν λόγω χαρακτηρισμός παρέχει πληροφορίες σχετικά με την θερμιδική αξία, καθώς και άλλων ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της διατροφικής ποιότητας και ασφάλειας των λιπιδίων σε σχέση με την χοληστερόλη και τα συστατικά των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών όπως ο βαθμός ακορεστότητας, η βαθμός σαπωνοποίησης, ο δείκτης διάθλασης, το περιεχόμενο σε λιπαρά οξέα και ο δείκτης στερεάς λιπαρής φάσης απαιτούνται για τον προσδιορισμό της αξίας της αγοράς και την δυνατότητα εφαρμογής των λιπών και ελαίων.

1. Χαρακτηριστικές ιδιότητες λιπαρών ουσιών

Η ανάλυση των ιδιοτήτων των λιπιδίων είναι κυρίως σημαντικές για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών των ελαίων και των λιπών. Ως εκ τούτου, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των φυτικών ελαίων, των λιπών ζαχαροπλαστικής (π.χ., βούτυρο κακάο) καθώς και των επιτραπέζιων ελαίων (π.χ., βούτυρο, μαργαρίνη) είναι:

1.1. Βαθμός Ακορεστότητας

Ο αριθμός του ιωδίου (IV) μετρά το βαθμό ακορεστότητας των λιπιδίων και ορίζεται ως η ποσότητα σε γραμμάρια του ιωδίου που απορροφάται από 100 γραμμάρια λιπιδίων. Η πηγή του ιωδίου (ή άλλων αλογόνων, όπως το Br₂ και Cl₂) για την αντίδραση είναι ή Wijs ή Hanus αντιδραστήριο. Η αντίδραση που εμπλέκεται είναι ουσιαστικά μια ογκομετρική μέθοδος.

Ο προσδιορισμός του IV παρέχει της ακορεστότητας των λιπιδίων εάν οι διπλοί δεσμοί δεν είναι συζευγμένοι μεταξύ τους ή με καρβονυλικό οξυγόνο. Επιπλέον, ο προσδιορισμός θα πρέπει να διεξάγεται απουσία του φωτός για μια συγκεκριμένη περίοδο και με περίσσια αντιδραστήριου αλογόνου που χρησιμοποιείται.

Η υδρογόνωση χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του βαθμού ακορεστότητας των ακετυλενικών ή συζευγμένων διπλών δεσμών. Τέτοια λιπίδια δεν απορροφούν εύκολα αλογόνο. Όμως, η προσθήκη υδρογόνου σε αυτά θεωρείται πως είναι αποδοτική. Αυτή η μέθοδος είναι ουσιαστικά μια καταλυτική αντίδραση των θερμαινόμενων λιπιδίων. Το ποσό του υδρογόνου που απορροφάται, προσδιορίζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

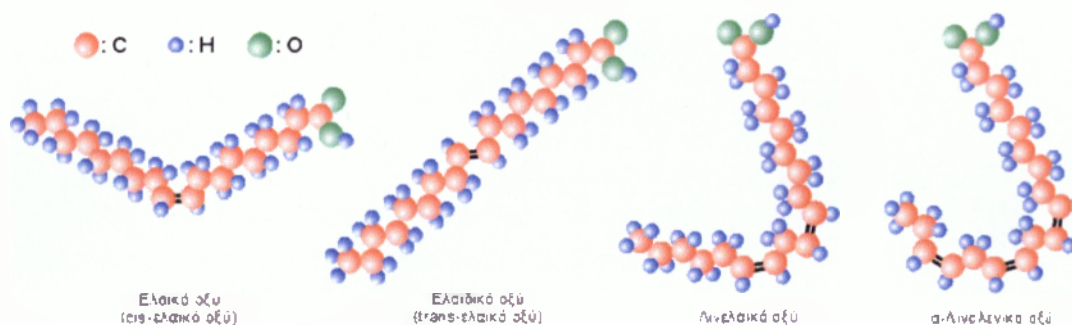
Στην φασματοσκοπία IR, στην περιοχή συχνοτήτων 1500-900cm⁻¹, μια ζώνη απορρόφησης οφείλεται στους trans διπλούς δεσμούς CH=CH. Επίσης παρατηρείται και απορρόφηση των cis διπλών δεσμών CH=CH. Ο συνδυασμός των cis και trans απορροφήσεων παρέχουν μια μέτρηση της συνολικής ακορεστότητας ή της τιμής του ιωδίου [69-71].

1.2. Ελεύθερα Λιπαρά Οξέα

Η παρουσία των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA's) σε ένα έλαιο αποτελεί ένδειξη της ανεπαρκούς διαδικασίας, της δραστηριότητας της λιπάσης, ή άλλων υδρολυτικών εργασιών. Η τιμή του οξέος, η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των milligrams KOH που απαιτούνται για την εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε 1 gr δείγματος, είναι μια μέτρηση της περιεκτικότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA's). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα των ελαίων μπορούν να

προσδιορίζονται χρωματομετρικά με την διάλυση του ελαίου σε χλωροφόρμιο (ή βενζόλιο), επιτρέποντας στην συνέχεια στα ελεύθερα λιπαρά οξέα να αντιδρούν με διάλυμα οξικού χαλκού. Ο οργανικός διαλύτης μετατρέπεται σε ένα μπλε χρώμα λόγω του συμπλόκου ελεύθερων λιπαρών οξέων-ιόντων χαλκού, το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση μεταξύ 640 και 690 nm [73].

Δεδομένου ότι υπάρχει μια ζώνη απορρόφησης που αποδίδεται στην καρβοξυλική ομάδα (COOH) στην περιοχή $3200-2500\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος (IR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ελεύθερα λιπαρά οξέα [74,75].



4. Λιπάρα οξέα

Πηγή: http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_omegaFA.htm

1.3. Δείκτης Διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης (RI) ενός ελαίου ορίζεται ως ο λόγος της ταχύτητας του φωτός στο κενό (πρακτικά στον αέρα) με την ταχύτητα του φωτός στο έλαιο σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Ο λόγος αυτός παρέχει επίσης μια μέτρηση της καθαρότητας των ελαίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για τον προσδιορισμό της. Η RI μετράται με διαθλασίμετρο, συνήθως στους $20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα

έλαια και στους 40 °C για τα στερεά λίπη, τα οποία γενικά ρευστοποιούνται στους 40°C. Η RI μειώνεται γραμμικά με την μείωση της IV. Επομένως, χρησιμοποιείται ως δείκτης για την αναφορά του βαθμού υδρογόνωσης του ελαίου [5].

1.4. Βαθμός Σαπωνοποίησης

Η Βαθμός σαπωνοποίησης παρέχει μια ένδειξη του μέσου μοριακού βάρους των λιπιδίων. Ορίζεται ως η ποσότητα του KOH, σε milligrams, που απαιτούνται για την σαπωνοποίηση 1 gr λίπους, για παράδειγμα, να εξουδετερώσει την υφιστάμενη FFA's και αυτές που απελευθερώθηκαν από την TAG [5].

1.5. Δείκτης Στερεού Λίπους

Ο δείκτης στερεού λίπους (SFI), μια εμπειρική έκφραση της αναλογίας των υγρών στο λίπος σε μια δεδομένη θερμοκρασία, υπολογίζεται ως η μεταβολή του ειδικού όγκου σε σχέση με την θερμοκρασία. Το στερεό λίπος λιώνει, ο όγκος του δείγματος αυξάνεται και η μεταβολή αυτή μετράται με την διαστολομετρία. Ανίχνευση της ανάλυσης του μετασχηματισμού φάσης του λίπους μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί, επειδή τα λιπίδια διευρύνουν την τήξη και συμβάλλουν με την πολυμορφική αλλαγή σε ένα πιο σταθερό λίπος [5]. Για τον προσδιορισμό περιεχόμενων στερεών λιπών έχει χρησιμοποιηθεί NMR και IR [76-80].

2. Χρωματογραφικές Διαδικασίες για τον Χαρακτηρισμό των Λιπιδίων

Τα εκχυλίσματα λιπιδίων είναι σύνθετα μείγματα των επιμέρους κατηγοριών των ενώσεων και απαιτούν περαιτέρω διαχωρισμό στα επιμέρους συστατικά. Η ανάλυση των χημικών συστατικών των λιπιδίων (π.χ., κατηγορίες λιπιδίων, λιπαρά οξέα, trans λιπαρά οξέα, στερόλες, τοκοφερόλες, χρωστικές ουσίες, κτλ.) προϋποθέτει κυρίως χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους. Συνήθως ένας συνδυασμός τεχνικών διαχωρισμού χρησιμοποιείται για την επίτευξη υψηλού βαθμού καθαρότητας των αντίστοιχων συστατικών των λιπιδίων. Το πρώτο βήμα για την ανάλυση περιλαμβάνει διαχωρισμό των λιπιδίων ανάλογα την πολικότητά τους. Μπορεί απλά να διαχωρίσει το λίπος σε πολικά ή μη πολικά κλάσματα ή μπορεί να συνεπάγεται την ανάλυση των TAG, FFA's, στερόλων, στερυλεστέρων, γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων. Παραδοσιακά, η εκχύλιση υγρού-υγρού, λεπτής στοιβάδας χρωματογραφίας (TLC) ή υγρού-στερεού χρωματογραφία στήλης έχουν χρησιμοποιηθεί για κλασμάτωση, καθαρισμό και συγκέντρωση των εκχυλισμάτων των λιπιδίων. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές τεχνικές για την ανάλυση των λιπιδίων περιλαμβάνουν χρωματογραφία στήλης, αέριοχρωματογραφία (GC), υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), υπερκρίσιμου ρευστού χρωματογραφία (SFC) και η TLC.

2.1. Χρωματογραφία Στήλης

Τα εκχυλίσματα των λιπιδίων είναι συνήθως διαχωρισμένα από την στήλη χρωματογραφίας σε μια προπαρασκευασμένη κλίμακα πριν από την υποβολή τους σε λεπτομερή ανάλυση. Η στερεού-υγρού (χρωματογραφία προσρόφησης), η υγρού-υγρού (χρωματογραφία κατανομής) και η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι μεταξύ των ευρέως χρησιμοποιούμενων μεθόδων κλασμάτωσης των λιπιδίων. Στην στερεά-υγρή χρωματογραφία, η έκπλυση της επιθυμητής τάξης των λιπιδίων επιτυγχάνεται με την μεταβολή της πολικότητας και την δύναμη της κινητής φάσης. Κοινές στατικές φάσεις (προσροφητικά υλικά) για την χρωματογραφία στήλης είναι το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), του αργιλίου (alumina) και ρητίνες ανταλλαγής ιόντων, ενώ τα προτιμώμενα υλικά στήλης για την ανάλυση των λιπιδίων είναι πυριτικό οξύ καθώς και Florisil (πυριτικό μαγνήσιο).

Οι κυριότερες παράμετροι που υπεισέρχονται στην στήλη χρωματογραφίας περιλαμβάνουν το βάρος του προσροφητικού υλικού, την κατάσταση του προσροφημένου (περιεχόμενη υγρασία) και το μέγεθος της στήλης. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μακριές στενές στήλες δίνουν την καλύτερη ανάλυση, αλλά οι μεγάλης διαμέτρου στήλες αυξάνουν την χωρητικότητα του δείγματος. Για λόγους ευκολίας, οι διάμετροι πάνω από 5 εκατοστά και ύψη πάνω από 45 εκατοστά δε συνιστώνται για τυπική εργαστηριακή χρήση [4,81].

Στην χρωματογραφία προσρόφησης, ενώσεις δεσμεύονται στο στερεό προσροφητικό από πολικές, ιοντικές και, σε μικρότερο βαθμό, μη πολικές van der Waals δυνάμεις. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των συστατικών των λιπιδίων γίνεται σύμφωνα με τις σχετικές πολικότητες των επιμέρους συστατικών, τα οποία καθορίζονται από τον αριθμό και το είδος των μη πολικών υδροφοβικών ομάδων. Σε γενικές γραμμές, έκλυση της στήλης με διαλύτες με αυξανόμενη πολικότητα διαχωρίζει το μίγμα λιπιδίων, σύμφωνα με την αύξηση της πολικότητας των συστατικών του με την ακόλουθη σειρά : κορεσμένοι υδρογονάνθρακες, ακόρεστοι υδρογονάνθρακες, εστέρες κεριού, στερολών, μακράς αλυσίδας αλδευδών, τριγλυκερίδια, μακράς αλυσίδας αλκοολών, FFA's, κινόνες, στερόλες, διγλυκερίδια, μονοακυλογλυκερίδια, cerebrosides, γλυκοζυλικά διγλυκερίδια, θειολιπίδια, όξινα γλυκεροφωσφατίδια, φωσφατοδουλαιθανολαμίνη, λυσοφωσφατοδουλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, σφιγγομυελίνη και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη [82]. Η διαδικασία

που ισχύει για τα περισσότερα μίγματα των λιπιδίων είναι έκλυση σε στήλη πυριτικού οξέως με την αλληλουχία διαλυτών χλωροφορμίου, ακετόνης και μεθανόλης να διαχωριστεί σε ουδέτερα λιπίδια, γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια, αντίστοιχα [4, 82].

Οι στήλες ιοντοανταλλαγής φέρουν ιοντικές ομάδες δεσμευμένες στο αντίθετο φορτίο από τις ιοντικές ομάδες των λιπιδίων. Έτσι, ρητίνη με κατιόντα θα δεσμεύει ανιονικά λιπίδια από το μείγμα, υπό την προϋπόθεση ότι το pH του μίγματος των διαλυτών επιτρέπει τον ιονισμό των ανιονικών ομάδων. Μερικά από τα υλικά ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανάλυση των λιπιδίων δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Υλικά Χρωματογραφίας Ιοντοανταλλαγής που Χρησιμοποιούνται στην Ανάλυση των Λιπιδίων

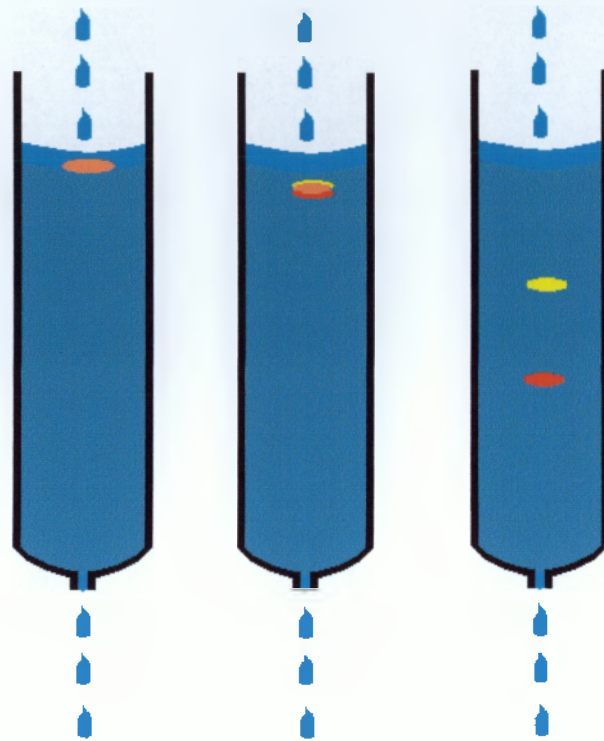
Ιονίζουσα ομάδα	Εμπορική Ταξινόμηση	Αναλυτική χρήση
$-(CH_2)_2N^+H(C_2H_5)_2$ (διαιθυλοαμινοαιθύλιο)	DEAE (ανιονικός ανταλλάκτης)	Ανιονικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, σουλφολιπίδια, σιαλογλυκολιπίδια, λιπαρά οξέα)
$-(CH_2)_2N^+(C_2H_5)_3$ (τριαιθυλοαμινοαιθύλιο)	TEAE (ανιονικός ανταλλάκτης)	Ανιονικά λιπίδια
$-CH_2COO-$ (καρβοξυμεθύλιο)	CM (κατιονικός ανταλλάκτης)	Μείγμα φωσφολιπιδίων

Πηγή: Προσαρμοσμένο από την παραπομπή 83

Διαιθυλαμινοαιθυλική (DEAE) κυτταρίνη χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των κατηγοριών των λιπιδίων και η τριαιθυλαμινοαιθυλική (TEAE) κυτταρίνη είναι χρήσιμη για διαχωρισμό των λιπιδίων που έχουν μονάχα ιοντικές καρβοξυλικές ομάδες (π.χ., λιπαρά οξέα, χολικά οξέα, gangliosides) ή φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ceramide polyhexosides [82]. Στην ανάλυση λιπιδίων, η DEAE κυτταρίνη σε οξική μορφή είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υλικό ανταλλαγής ανιόντων. Είναι πιο αποτελεσματική στην περιοχή pH 3-6 και συχνά διαχωρισμός των πολικών

λιπιδίων επιτυγχάνεται με σταδιακή έκλυση με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου σε νερό-αιθανόλη. Ο ανταλλάκτης κατιόντων καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) ως νιτρικό άλας έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς στην ίδια περιοχή pH για τον διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων [83].

Συμπλέκοντας το απορροφητικό υλικό με νιτρικό άργυρο δίνεται η δυνατότητα διαχωρισμού των μειγμάτων των λιπιδίων ανάλογα με το αριθμό, την θέση και τις *cis* και *trans* ισομέρειες των διπλών δεσμών στα ακόρεστα λιπαρά οξέα και στα παράγωγα τους. Η χρήση της επεξεργασίας με βορικό των υλικών της στήλης συμπλέκει τις ενώσεις που περιέχουν ομάδες υδροξυλίου σε διαδοχικά άτομα άνθρακα και βοηθά το διαχωρισμό των γλυκολιπιδίων [83]. Σήμερα οι εμπορικές στήλες είναι προπαρασκευασμένες με μια ποικιλία των στερεών στατικών φάσεων, οι οποίες είναι διαθέσιμες για το διαχωρισμό των κατηγοριών των λιπιδίων και μπορεί να αναφέρονται ως στήλες εκχύλισης στερεής φάσης (SPE). Η SPE καταναλώνει λιγότερο χρόνο, διαλύτη και υλικό συσκευασίας από ότι η κλασική χρωματογραφία στήλης [84]. Η SPE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση, την συγκέντρωση, τον καθαρισμό και την κλασμάτωση των αναλυόμενων ουσιών από τα σύνθετα μείγματα [85,86]. Αμινοπροπυλο-συνδεδεμένη φάση έχει χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό των ολικών λιπιδίων στις τάξεις των λιπιδίων που προέρχονται από διάφορες πηγές [87-90]. Ανοσοσυγγενική (Immunoaffinity) στήλη χρωματογραφίας έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση και τον καθαρισμό των απολιποπρωτεϊνών. .



5. Στήλη χρωματογραφίας

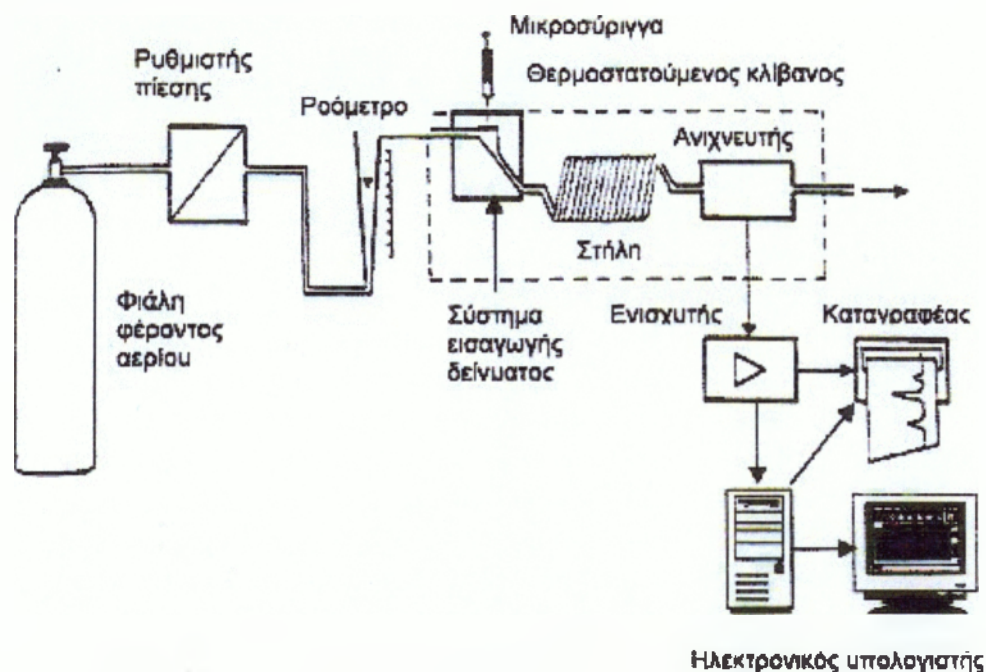
Πηγή:<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CF%81%CF%89%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%B3%CF%81%CE%B1%CF%86%CE%AF%CE%B1>

2.2. Αέρια χρωματογραφία

Η GC (ή GLC) ανάλυση των λιπιδίων έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει διαχωρισμό των συστατικών του μείγματος των λιπιδίων στην κατάσταση αέρια μεταξύ μιας κινητής αέριας κατάστασης και μιας στατικής αμετάβλητης υγρής φάσης διασκορπισμένα σε μια αδρανή υποστήριξη.

Η ανάλυση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων από την GC συνήθως απαιτεί σχηματισμό παραγώγων των λιπαρών οξέων με σκοπό να αυξηθεί η πτητικότητα τους. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAME) μπορούν να παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές διαμεθυλίωσης και στη συνέχεια διαχωρίζονται στις GC στήλες και εντοπίζονται από την ανίχνευση ιονισμού φλόγας (FID). Η αέρια φάση για την GC είναι συνήθως άζωτο ή ήλιο για τις συμβατικές στήλες και ήλιο ή υδρογόνο για τις τριχοειδείς στήλες. Η ταυτοποίηση των χρωματογραφικών κορυφών βασίζεται στη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης τους με εκείνες των προτύπων

δειγμάτων. Η GC ανάλυση των TAG των λιπιδίων των τροφίμων μπορεί επίσης να παράσχει πληροφορίες σχετικά με την κατανομή της θέσης των λιπαρών οξέων στα μόρια. Τα φυσικά TAGs που καθαρίζονται από την TLC μπορούν στην συνέχεια να επιλυθούν χωρίς σχηματισμό παραγώγων, βάσει του αριθμού άνθρακα τους ή του μοριακού βάρους τους με την βοήθεια τριχοειδούς GC με στήλες 8 έως 15 μ μακρίες επικαλυμμένες με μεθυλφαινύλ-, μεθύλ- ή διμεθυλοσιλικόνη (μη πολικά τριχοειδή). Χρήση υδρογόνου και ήλιου ως φέρον αέριο για τον διαχωρισμό των TAG στις στήλες του είδους αυτού απαιτεί υψηλότερες θερμοκρασίες από εκείνες που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των μεθυλεστέρων. Μονό- και διγλυκερόλες πρέπει να μετατραπούν σε τριμεθυλπυριτικούς (TMS) ή τερτ-βουτυλδιμεθυλπυριτικούς αιθέρες (TBDMS) για πλήρη ανάλυση [91,92]. Ένας συνδυασμός των τεχνικών GC και φασματομετρίας μάζας έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό μοριακών ειδών στους γλυκερικούς εστέρες. Τα TMS και t-BDMS παράγωγα των εστέρων της γλυκερόλης που διαχωρίζονται στην GC μπορούν να υποβληθούν σε ανάλυση με φασματομετρία μάζας, προκειμένου να συλλεχθούν πληροφορίες για την μοριακή δομή τους [93].



6. Αέρια χρωματογραφία

Πηγή: <http://chimikoergastirio.blogspot.com/2009/11/s.html>

2.3. Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία

Η HPLC είναι μια πολύ αποτελεσματική μορφή LC. Το προσροφητικό είναι στενά συσκευασμένο μέσα σε στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα (10-30 εκατ. μήκος, 2-4 εκατ. διάμετρο) και απαιτεί μια υψηλής πίεσης αντλία να αποκτήσει επαρκή και σταθερή ροή του διαλύτη μέσα από την στήλη. Έκκλουση της στήλης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε ισοκρατικά με ένα μείγμα διαλυτών σταθερής σύνθεσης ή με βαθμιαία έκκλουση στην οποία η σύνθεση του διαλύτη μπορεί να μεταβάλλεται γραμμικά ή σε μια σταδιακή μόδα με τόσο διμερή όσο και τριμερή συστήματα διαλύτη. Η έκκλουση της στήλης παρακολουθείται συνεχώς μέσω ενός συνεχούς ροής ανιχνευτή, που θα πρέπει να είναι ευαίσθητος στη ροή του διαλύτη, τη θερμοκρασία και την σύνθεση [82].

Παραγωγοποίηση του δείγματος χρησιμοποιείται για να διευκολύνει το διαχωρισμό και/ή να ενισχύσει το όριο ανίχνευσης για την ανάλυση HPLC. Υδρόλυση ή σαπωνοποίηση γίνεται για να διασπαστούν δεσμοί εστέρα και να δημιουργηθούν FFAs για την περαιτέρω ανάλυση τους. Αν και τα λιπίδια δε διαθέτουν ειδικές κορυφές απορρόφησης UV, θα μπορούσαν να εντοπιστούν στην περιοχή των 203-210 nm, λόγω της παρουσίας των διπλών δεσμών ή τις λειτουργικές όπως τα καρβονύλια, τα καρβοξύλια, τα φωσφορικά, τα αμινοξέα ή οι ομάδες αμμωνίου. Ωστόσο, αυτό το μικρού μήκους κύματος UV περιορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιλογή του διαλύτη και καλό είναι να αποφεύγονται τα μείγματα χλωροφορμίου-μεθανόλης, επειδή εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση κάτω από τα 245 nm. Συχνά, οι διγλυκερόλες απαιτούν προετοιμασία από τα παράγωγα της υπεριώδους απορρόφησης (π.χ., βενζοικούς, δινιτροβενζοικούς, πενταφθοριτοβενζοικούς και TBDMS εστέρες) για την ανίχνευση. Τα λιπαρά οξέα μπορούν να αναλυθούν με τη δημιουργία 9-anthryl-diazomethane (ADAM) παραγώγων και χρησιμοποιούν έναν ανιχνευτή φθορισμού. Τα λιπαρά οξέα αυξάνουν την υδροφοβικότητα τους όταν το ADAM είναι συνδεδεμένο με την καρβοξυλική ομάδα. Έτσι τα παράγωγα διατηρούνται περισσότερο σε μια στήλη ανάστροφης φάσης από τα λιπαρά οξέα και επιτυγχάνεται καλός διαχωρισμός [94]. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι συγκεκριμένοι για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των τοκοφερολών και των παραγώγων φθορισμού των λιπαρών οξέων. Η εξατμιστική ανίχνευση σκέδασης φωτός (ELSD) και η FID χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση όλων των τύπων των λιπιδίων στα οποία στη συνέχεια γίνεται HPLC διαχωρισμός [91, 95]. Η αρχή της ELSD

περιλαμβάνει εξάτμιση της κινητής φάσης των διαχωρισμένων κλασμάτων των λιπιδίων από έναν νεφελοποιητή (ψεκασμός της ροής του εκλούσματος με μεγάλο όγκο αζώτου ή αέρα) για την απόκτηση σταγονιδίων της διαλυτής ουσίας (λιπίδια). Αυτά τα σταγονίδια διαλυτής ουσίας προσανατολίζονται απο μια φωτεινή πηγή (μπορεί να είναι μια πηγή φωτός λέιζερ). Ο βαθμός σκέδασης του φωτός είναι ανάλογος προς τη μάζα της διαλυμένης ουσίας [96]. Η ανίχνευση RI μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των λιπιδίων [97].

Η κανονικής φάσης HPLC επιτρέπει επίσης το διαχωρισμό της κανονικής αλυσίδας και των υδροξύ λιπαρών οξέων- που περιέχουν TAG. Η κανονική HPLC με στήλες ανιοντοανταλλαγής με ιόντα αργύρου, χρησιμοποιείται σήμερα για την επίλυση των TAG με βάση τον βαθμό ακορεστότητας τους [91]. Η HPLC αντίστροφης φάσης (με στήλες C18) επίσης εφαρμόζεται ευρέως για τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των τρι-, δι-, και μονογλυκεριδίων.

Ο διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων είναι πολύ επίπονος όταν χρησιμοποιείται η TLC. Ωστόσο η HPLC παρέχει ένα καλύτερο μέσο διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης. Προς το παρόν, η χρήση της βαθμιαίας έκλουσης σε στήλες διοξειδίου του πυριτίου χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό των διαφόρων κατηγοριών των φωσφολιπιδίων. Πολλά πολικά συστήματα διαλύτη που είναι κατάλληλα για τέτοιου είδους διαχωρισμούς είναι διαθέσιμα [98-100]. Ανίχνευση υπεριωδών, FID, ή ELSD είναι κατάλληλα για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωσφολιπιδίων. Διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας μια στήλη πυριτίου με μια δυαδική βαθμίδα έκλουση (εξάνιο-IPA-2.8 mM οξικό αμμώνιο) [101] ή με στήλες αντίστροφης φάσης C18 (ODS) [96].

Η ισοκρατική, ο κανονικός διαχωρισμός των φάσεων των εστέρων της χοληστερόλης, τα FFAs και οι ελεύθερες στερόλες χρησιμοποιούνται ευρέως. Ταυτόχρονη ανάλυση των μη πολικών και πολικών λιπιδίων με HPLC στήλη διοξειδίου του πυριτίου έχει επίσης αναφερθεί.

2.4. Υπερκρίσιμη Χρωματογραφία Ρευστού (SFC)

Η χρήση της SFC για την εκχύλιση λιπιδίων συζητήθηκε σε προηγούμενη ενότητα. Όταν το CO₂ συμπιέζεται σε θερμοκρασία και πίεση άνω του κρίσιμου σημείου του, αυτό δεν υγροποιείται αλλά αποτελεί ένα πυκνό αέριο, επομένως, ως μια κινητή SFC φάση είναι αέρια και διαλυτική. Ένα τέτοιο πυκνό αέριο έχει μια σειρά από ιδιότητες (π.χ., σχετικά υψηλή πυκνότητα και συντελεστές διάχυσης) που το καθιστούν ελκυστικό για χρήση ως κινητή φάση για την LC. Η SFC με ανοιχτή στήλη λειτουργεί ως υποκατάστατο για την GC, αλλά με την θερμοκρασία ανάλυσης πολύ μικρότερη από αυτή που απασχολείται στην GC.

Η θερμοκρασία και η πίεση για τον SC-CO₂ είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη για την HPLC. Καθώς το CO₂ είναι μη πολικό το SFC του μπορεί να διαλύσει λιγότερο πολικές ενώσεις και είναι κατάλληλο για την ανάλυση των λιγότερο πολικών ειδών. Για να αναλυθούν πολικά συστατικά, πολικοί διαλύτες όπως η μεθανόλη ή αιθανόλη μπορούν να προστεθούν στην SFC για να καλύψουν τα ενεργά κέντρα (-Si-OH) στην επιφάνεια της ακίνητης φάσης και να αυξήσουν την διαλυτική δύναμη της κινητής φάσης., πληρωμένες και τριχοειδείς στήλες χρησιμοποιούνται για την SFC. Τα υλικά πλήρωσης που δημιουργούνται και χρησιμοποιούνται για HPLC είναι κατάλληλα για τις SFC συσκευασμένες στήλες [102]. Ομοίως-στήλες πυριτίου που χρησιμοποιούνται για την GC, είναι κατάλληλοι για την SFC και οι στατικές φάσεις μπορούν να απασχολούν διμεθυλοπολυσιλοεξάνιο, μεθυλοφαινυλοπολυσιλοεξάνιο, διφαινυλοπολυσιλοεξάνιο και κυανοπροπυλοπολυσιλοεξάνιο [103].

Τριχοειδείς SFC έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των TAG, των FFAs και των παραγώγων τους [104-106]. Ανιχνευτές για ELSD, FID, UV, φασματομετρία μάζας (MS) και FTIR που αναπτύχθηκαν για την GC και την HPLC ισχύουν για την SFC. Ο συνδυασμός της SFC με την υπερκρίσιμη εκχύλιση ρευστού (SFE) έχει επιτυχία για την ανάλυση των λιπιδίων από διάφορα δείγματα τροφίμων. Η SFE μπορεί να αντικαταστήσει οποιαδήποτε συμβατική μέθοδο εκχύλισης καθώς και η ποσοτικοποίηση των εξαγόμενων λιπιδίων (έναντι της σταθμικής ανάλυσης) μπορεί να εκτελεσθεί με έναν ανιχνευτή (ELSD) που έχει άμεση σχέση με το κύτταρο εκχύλισης. Οι SFE-SFC έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει τα πρότυπα TAG των σπορελαίων [102,107]. Η SFC είναι μια βιώσιμη εναλλακτική

λύση για την μείωση κάθε χρήσης διαλυτών στην εκχύλιση και ανάλυση των λιπιδίων και έχει μεγάλες δυνατότητες για περαιτέρω ανάπτυξη.

2.5. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας

Η TLC είναι ένα από τα κύρια εργαλεία ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των λιπιδίων. Η TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλασμάτωση των σύνθετων μειγμάτων των λιπιδίων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της καθαρότητας, την ταυτοποίηση, για πληροφορίες σχετικά με τη δομή καθώς και για την παρακολούθηση της εκχύλισης και του διαχωρισμού των συστατικών μέσω προπαρασκευαστικών στηλών χρωματογραφίας για συνήθεις και πειραματικούς σκοπούς. Οι αρχές και η θεωρία της TLC είναι βασισμένες στη διαφορά στη συγγένεια ενός συστατικού προς μια στατική και κινητή φάση. Τα σημαντικά στοιχεία της TLC είναι η στατική φάση, η κινητή φάση, η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση [5]. Το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιείται γενικά στην TLC για την ανάλυση λιπιδίων είναι διοξείδιο του πυριτίου και μπορεί να περιέχει θειικό ασβέστιο ως συνδετικό υλικό για να διασφαλιστεί η επικόλληση στην πλάκα [4]. Η αλουμίνα και το kieselguhr επίσης χρησιμοποιούνται στις στατικές φάσεις. Αυτά τα απορροφητικά υλικά μπορούν επίσης να τροποποιηθούν με εμποτισμό με άλλες ουσίες έτσι ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητοί διαχωρισμοί. Οι πιο δημοφιλείς εμποτισμοί είναι με βορικό οξύ ή νιτρικό άργυρο. Το νιτρικό άργυρο-εμποτισμένο TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαχωριστούν τα TAGs ή τα λιπαρά οξέα των μεθυλικών εστέρων ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών αλλά και λόγω της γεωμετρίας (π.χ., cis και trans) και την θέση των διπλών δεσμών της αλυσίδας των αλκυλίων. Το αργυρό ιόν σχηματίζει ένα σύμπλοκο με τα π ηλεκτρόνια των διπλών δεσμών των ακόρεστων λιπαρών οξέων, μειώνοντας έτσι την κινητικότητα τους [108]. Τα δομικά ισομερή των TAGs (λόγω των συστατικών των λιπαρών οξέων) μπορούν επίσης να διαχωριστούν σε αυτό το είδος της πλάκας TLC [95]. Ο εμποτισμός των TLC πλακών με βορικό οξύ (3%, w/v) αποτρέπει τον ισομερισμό των μόνο- και διγλυκερολών κατά τον διαχωρισμό των ουδέτερων λιπιδίων [82]. Το βορικό οξύ συμπλέκει με γειτονικές ομάδες υδροξυλίου και τις οδηγεί σε πιο αργές μεταβάσεις αυτών των ενώσεων [108].

Τα δείγματα των εκχυλισμάτων των λιπιδίων που εφαρμόζονται ως διακριτές κηλίδες ή ως στενές ραβδώσεις, 1,5 έως 2 εκατοστά από το κάτω μέρος της πλάκας. Η πλάκα στη συνέχεια αναπτύσσεται σε ένα θάλαμο που περιέχει το διαλύτη ανάπτυξης ή μίγμα διαλυτών. Ο διαλύτης κινείται πάνω στη πλάκα από την τριχοειδή δράση, λαμβάνοντας τα διάφορα συστατικά με διαφορετικούς ρυθμούς, ανάλογα με την πολικότητα τους και πόσο σφιχτά θα μπορούσαν να κρατηθούν από το απορροφητικό υλικό. Η πλάκα απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης όταν ο διαλύτης προσεγγίζει την κορυφή της και στη συνέχεια στεγνώνει στον αέρα ή κάτω από ρεύμα αζώτου. Οι διαλύτες με χαμηλό σημείο βρασμού, ιξώδες και τοξικότητα είναι κατάλληλοι για εφαρμογή στη TLC. Το χαμηλό σημείο ζέσης βοηθά στην γρήγορη εξάτμιση του διαλύτη από το επιφανειακό στρώμα και το χαμηλό ιξώδες διευκολύνει την ταχύτερη κίνηση του διαλύτη κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι πολύ σημαντική για τον καλό διαχωρισμό των κατηγοριών των λιπιδίων. Αρκετά συστήματα διαλυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίλυση επιμέρους κατηγοριών των λιπιδίων, όπως καταδεικνύεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 Διαλυτικά Συστήματα που μπορούν να Χρησιμοποιηθούν για τον Διαχωρισμό των Λιπιδίων από την TLC

Συστατικό Λιπιδίου	TLC απορρόφηση	Διαλυτικό σύστημα	Παρ.
Σύνθετα λιπίδια (ζωικοί ιστοί)	Silica gel G	Χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό, 25:10:1, v/v/v	120
	Silica gel H	Χλωροφόρμιο-μεθανόλη οξικό οξύ-νερό, 25:15:4:2, v/v/v/v	120
	Silica gel H	Πρώτο σύστημα ανάπτυξης, πυριδίνη-εξάνιο, 3:1, v/v και το δεύτερο σύστημα ανάπτυξης, χλωροφόρμιο-μεθανόλη-πυριδίνη-2M αμμωνία, 35:12:65:1, v/v/v/v	120
Σύνθετα λιπίδια (φυτικοί ιστοί)	Silica gel G	Ακετόνη-ασετικό οξύ- νερό, 100:2:1, v/v/v	121
		Δισοβουτυλοκετόνη -ασετικό οξύ, 40:25:3.7, v/v/v	4
Απλά λιπίδια	Silica gel G	Εξάνιο-διαιθυλαιθέρας- φορμικό οξύ, 80:20:2, v/v/v	4,122
	Silica gel G	Βενζιο-διαιθυλαιθέρας- οξικός αιθυλεστερας-ακετικό οξύ, 80:10:10:0.2, v/v/v/v	4,122

Μερική ακυλογλυκε ρόλη	Silica gel G περιέχοντας 5% (w/v) βορικό οξύ	Χλωροφόρμιο-ακετόνη, 96:4, v/v	4
Ουδέτερα πλασμαλογ ονίδια	Silica gel G	Εξάνιο-διαιθυλαιθέρας, 95:5, v/v, στην πρώτη κατεύθυνση, εξάνιο-διαιθυλαιθέρας, 80:20, v/v, στην δεύτερη κατεύθυνση	4

Ανίχνευση κηλίδων μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήριο κατευθείαν στην πλάκα. Το αντιδραστήριο αυτό θα μπορούσε να είναι ειδικά για ορισμένες λειτουργικές ομάδες των μορίων των λιπιδίων ή μπορεί να είναι ένα μη ειδικό αντιδραστήριο που καθιστά όλα τα λιπίδια ορατά. Υπάρχουν μη καταστροφικά χημικά αντιδραστήρια, όπως η 2',7'-διχλωροφθοριτοεσκίνη σε 95% μεθανόλη (1%, w/v), το ιώδιο, η ροδαμίνη 6G, και το νερό, το οποίο επιτρέπει την ανάκτηση των λιπιδίων μετά την ανίχνευση. Τα λιπίδια παρουσιάζουν ένα κίτρινο χρώμα και στην παρουσία της 6G ροδαμίνης (0,01%, w/v) παράγουν ροζ κηλίδες στο υπεριώδες φως. Αυτές οι χημικές ουσίες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ένα μη καταστροφικό σπρέι για προπαρασκευαστική TLC. Όταν το νερό χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό λιπιδίων μπορεί να εμφανίζονται ως λευκές κηλίδες σε ένα διαφανές υπόβαθρο και μπορούν εύκολα να διακριθούν. Οι αναπτυγμένες πλάκες μπορούν επίσης να υπόκεινται σε κορεσμένο ατμό ιωδίου σε ένα θάλαμο και αυτό μπορεί να παράγει καφέ κηλίδες που οφείλονται στην αντίδραση του ιωδίου με τα ακόρεστα ομόλογα των μορίων των λιπιδίων. Ωστόσο, τα ακόρεστα λιπίδια μπορούν να σχηματίσουν κάθε κηλίδα με το ιώδιο, αν διατίθεται επαρκής χρόνος ώστε να γίνει αυτό. Οι καταστροφικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τον ψεκασμό μεθειικό οξύ (50%, v/v) και ξήρανση στους 180° C για 1 ώρα για να γίνουν τα λιπίδια ορατά ως μαύρα απανθρακώματα [4]. Διχρωμικό κάλιο (5%, w/v) σε 40% (v/v)θειικό οξύ, λειτουργεί επίσης με παρόμοιο τρόπο με το σπρέιθειικού οξέος. Μολυβδοφωσφορικό οξύ (5%, w/v) σε αιθανόλη μετατρέπει τα λιπίδια σε μπλε, μετά σε μαύρα όταν ζεσταθεί στους 120° C για μια ώρα. Χρώση με coomassie blue (0,03% σε 20% μεθανόλη) μετατρέπει τα λιπίδια σε μπλε κηλίδες πάνω σε λευκό φόντο. Παραδείγματα ειδικών αντιδραστηρίων που αντιδρούν επιλεκτικά με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες

που περιλαμβάνουν FeCl_3 για την ανίχνευση της χοληστερόλης και των εστέρων της χοληστερόλης, νινυδρίνη για την χολίνη που περιέχει φωσφολιπίδια και ορκινόλη ή ναφθόλη/ H_2SO_4 για τα γλυκολιπίδια [109]. Κάποια λιπίδια περιέχουν χρωμοφόρα και μπορεί να απεικονιστούν άμεσα στο υπεριώδες ή το ορατό φώς χωρίς χρώση.

Λιπίδια ανιχνεύονται με μη καταστροφικές μεθόδους μπορούν να ανακτηθούν με απόξεση των ζωνών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον και διαλύοντας τα στον κατάλληλο διαλύτη. Τα σύμπλοκα μείγματα λιπιδίων δεν μπορούν πάντα να διαχωρίζονται από μια μονοδιάστατη TLC, ωστόσο, η δύο-διαστάσεων TLC μπορεί να επιλύσει αυτά τα μείγματα.

Η ικανότητα διαχωρισμού των πλακών της TLC επηρεάζεται από τον βαθμό της ενυδάτωσης του προσροφητικού υλικού. Ως εκ τούτου, η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού, η οποία εξαρτάται τόσο από τον χρόνο και την θερμοκρασία καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσης των πλακών και την σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας, πρέπει να προσεχτεί. Χρήση των αυθεντικών προτύπων των λιπιδίων θα επιτρέπει την άμεση σύγκριση των διαλυμένων λιπιδίων στο άγνωστο μείγμα. Οι υψηλής-απόδοσης πλάκες της TLC (HP-TLC) έχουν μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και ταχύτητα διαχωρισμού. Είναι διαθέσιμες στο εμπόριο ως προεπιστρωμένες πλάκες με λεπτότητα (5- μm) και ομοιόμορφο μέγεθος των σωματιδίων του διοξειδίου του πυριτίου (silica gel). Ωστόσο, το ποσό του δείγματος που μπορεί να εφαρμόζεται σε τέτοιου είδους πλάκες (HP-TLC) είναι πολύ μικρό. Η TLC είναι η προτιμώμενη μέθοδος καθαρισμού και διαχωρισμού των κατηγοριών των λιπιδίων πριν την υποβολή τους σε περαιτέρω διαχωρισμό των μεμονωμένων συστατικών. Για την ποσοτικοποίηση των χωρισμένων λιπιδίων της TLC, παραδοσιακά η απόξεση ακολουθείται από ποσοτικοποίηση. Οι διαχωρισμένες κατηγορίες λιπιδίων πάνω στο πλακίδιο διοξείδιο του πυριτίου μπορούν να αποξένονται, να εξάγονται μέσω των κατάλληλων διαλυτών και να ποσοτικοποιούνται σταθμικά, φασματομετρικά ή με την GC. Ο προσδιορισμός του περιεχομένου του φωσφόρου των εκλούμενων λιπιδίων είναι ένα κλασικό παράδειγμα για τον φασματοφωτομετρικό ποσοτικό προσδιορισμό. Η GC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των διαχωρισμένων ουδέτερων λιπιδίων και φωσφολιπίδια αφού προηγουμένως τα λιπαρά οξέα που περιέχουν τα ουδέτρα λιπίδια και τα φωσφολιπίδια μετατραπούν στους αντίστοιχους μεθυλ-εστέρες. Πυκνομετρικές μέθοδοι παρέχουν έναν επί τόπου ποσοτικό προσδιορισμό για τα λιπίδια. Τα λιπίδια επεξεργάζονται με κατάλληλα αντιδραστήρια

και η απορρόφηση ή ο φθορισμός τους μπορεί να μετρηθεί υπό υπεριώδες ή ορατό φως με πυκνομετρία.

Οι κηλίδες που εντοπίζονται με απανθράκωση μπορούν να μετρηθούν με σάρωση φωτοπυκνομέτρου των κηλίδων, οι οποίες είναι ανάλογες του ποσού των παρόντων πρωτότυπων λιπιδίων, που έχουν καταγραφεί. Η σπινθηρογραφία είναι επίσης δυνατή μετά την εισαγωγή ενός κατάλληλου σπινθηριστή [π.χ., μείγμα της 2,5-διφαινυλοξαζόλης και του 1,4-δι-2-(5-φαινυλοξαζούλη)βενζόλιο, του PPO και του POPOP σε τολουόλιο] μέσα στα λιπίδια.

Η TLC θα μπορούσε να συνδυαστεί με άλλες μεθόδους για να διευκολυνθεί η ανίχνευση, ο ποσοτικός προσδιορισμός ή η ποσοτικοποίηση των χωρισμένων λιπιδίων. Αυτά περιλαμβάνουν σύζευξη με HPLC (HPLC/TLC), μετασχηματισμό Fourier υπέρυθρων (TLC/FTIR), πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (TLC/NMR) και φασματοσκοπία Raman (TLC/RS) [108].

3. Φασματοσκοπικές Μέθοδοι Ανάλυσης των Λιπιδίων

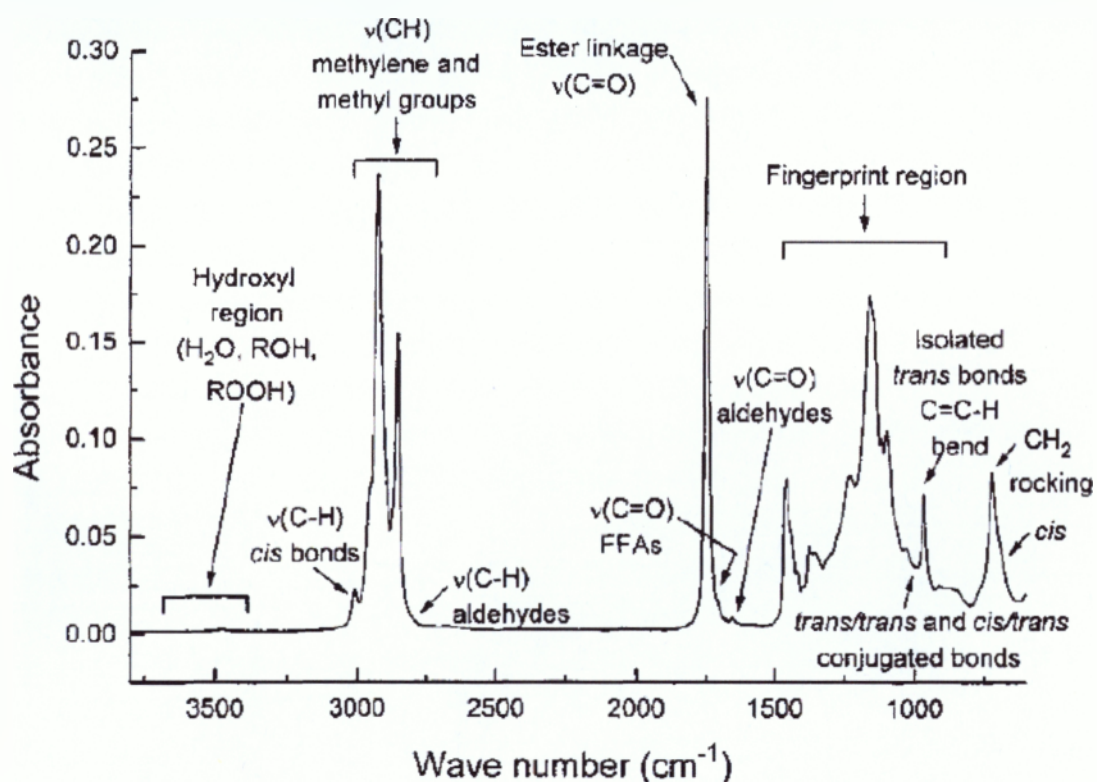
Η υπεριώδης-ορατή φασματοσκοπία χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά, αλλά έχει συγκεκριμένες εφαρμογές για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των λιπιδίων. Η IR φασματοσκοπία ήταν η πρώτη φασματοσκοπική μέθοδος που εφαρμόστηκε για την ανάλυση των λιπιδίων. Οι NMR και MS έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δομής των λιπιδίων. Οι IR, UV και NMR είναι μη καταστροφικές φασματοσκοπικές μεθοδολογίες.

3.1. Υπεριώδη-Ορατή Φασματοσκοπία

Το υπεριώδες-ορατό φάσμα των οργανικών ενώσεων είναι υπεύθυνο για ηλεκτρονικές διεγέρσεις ή μεταβάσεις. Οι λειτουργικές ομάδες με υψηλή πυκνότητα ηλεκτρονίων, όπως καρβονύλιο και νιτροομάδες με διπλούς, τριπλούς ή συζευγμένους διπλούς δεσμούς, απορροφούν έντονα στο υπεριώδες ή ορατό φάσμα σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος ($\lambda_{\text{μέγιστο}}$) και μοριακούς συντελεστές αποσβέσεως ($\epsilon_{\text{μέγιστο}}$) [82,83].

3.2. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία Απορρόφησης

Το φάσμα IR ενός ελαίου παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την δομή και τις λειτουργικές ομάδες των λιπιδίων αλλά και σχετικά με τις ακαθαρσίες που συνδέονται με αυτό. Αυτές οι πληροφορίες παρουσιάζονται ως κορυφές του φάσματος, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.



Το σήμα της IR απορρόφησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και την λήψη πληροφοριών σχετικά με τις λειτουργικές ομάδες των λιπιδίων. Καταρχήν, οι IR εντάσεις έχουν γραμμική σχέση με την συγκέντρωση της μοριακής απορρόφησης, παίρνουμε ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τα λιπίδια [110]. Η IR φασματοσκοπία έχει εφαρμοστεί σε στερεά λίπη για να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τον πολυμορφισμό, την κρυσταλλική δομή, τη διαμόρφωση και το μήκος της αλυσίδας. Στα έλαια, η IR φασματοσκοπία χρησιμοποιείται συνήθως για να καθορίσει την παρουσία και την περιεκτικότητα της *trans* ακορεστότητας. Απομονωμένοι *trans* διπλοί δεσμοί δείχνουν μια χαρακτηριστική συχνότητα στα 968

cm^{-1} , και η συχνότητα δεν αλλάζει για επιπλέον διπλούς δεσμούς εκτός και αν αυτοί είναι συζευγμένοι. Δεν υπάρχει παρόμοια διαγνωστική συχνότητα απορρόφησης IR για την cis ακορεστότητα. Ωστόσο, το φάσμα Raman δείχνει ισχυρή απορρόφηση στα $1665 \pm \text{cm}^{-1}$ (cis-ολεφίνες), $1670 \pm \text{cm}^{-1}$ (trans-ολεφίνες) και 2230 ± 1 και $2291 \pm 2 \text{cm}^{-1}$ (ακετυλένιο) [92]. Ο Kates [82] έδωσε τις χαρακτηριστικές συχνότητες της IR απορρόφησης που έχουν διαγνωστικές αξίες για την ταυτοποίηση των κυριότερων κατηγοριών των λιπιδίων. Επίσης έχει αναφέρει πως η ιοντική μορφή των φωσφολιπιδίων επηρεάζει τις συχνότητες απορρόφησης που συνδέονται με τις φωσφορικές ομάδες που επηρεάζουν την ερμηνεία των φασμάτων [82]. Η IR φασματοσκοπία βρίσκει χρήση κατά την μέτρηση ιωδίου, την αξία σαπωνοποίησης και τα FFAs [111]. Η οξειδωτική σταθερότητα των λιπιδίων, όπως αντικατοπτρίζεται στον σχηματισμό των υπεροξειδίων και των δευτερογενών προϊόντων οξειδωσης μπορούν επίσης να καθοριστούν από την IR [110,112].

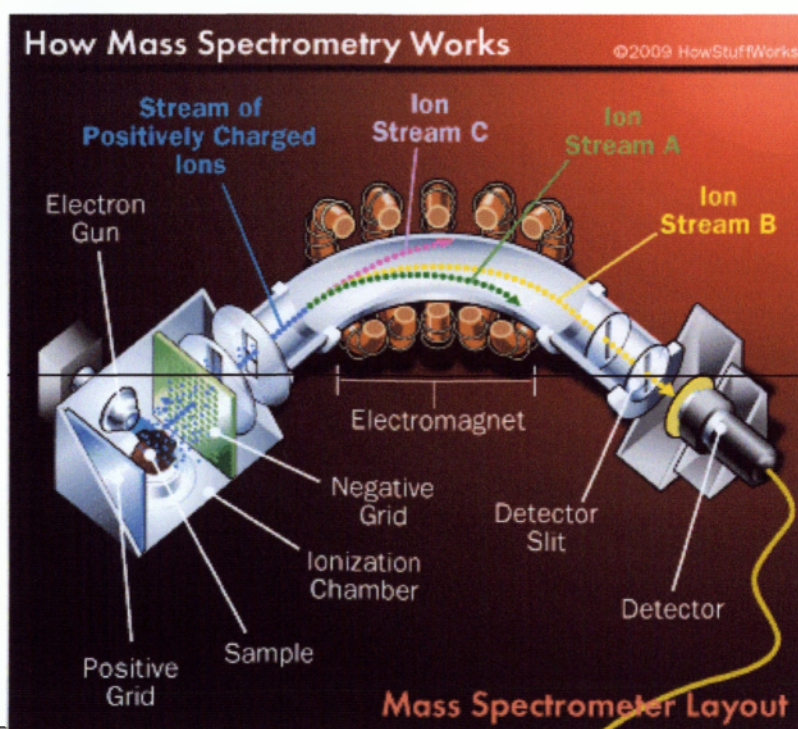
3.3. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η ^1H NMR φασματοσκοπία χρησιμοποιείται για τον καθορισμό στερεών λιπαρών υλών των λιπιδίων καθώς και την περιεκτικότητα σε έλαια των σπόρων, Η NMR που εφαρμόζεται στα φυτικά έλαια δίνει καθορισμένες χημικές μετατοπίσεις (κορυφές), σταθερά σύζευξης, μοτίβο διάσπασης των κορυφών (splitting pattern) εμβαδόν κορυφής. Αυτή η πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση των δομικών και ποσοτικών πληροφοριών σχετικά με τα λιπίδια.

3.4. Φασματοσκοπία Μάζας (MS)

Στην συμβατική MS, οι ενώσεις στην αέρια κατάστασή τους είναι ιονισμένες από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια (σύγκρουση ηλεκτρονίων) σε ένα θάλαμο ιονισμού. Το φάσμα μάζας που προκύπτει αποτελείται από ένα χαρακτηριστικό σχέδιο των κορυφών που αντιπροσωπεύουν τα μοριακά θραύσματα με διαφορετική αναλογία μάζα φορτίου (m/z). Μερικές από αυτές τις κορυφές ή τα μοτίβα των κορυφών είναι διαγνωστικές: τα λιπίδια που περιέχουν πολικές ομάδες, όπως τα φωσφολιπίδια, με

χαμηλή θερμική σταθερότητα και αστάθεια και υψηλό μοριακό βάρος, δεν μπορούν να αναλυθούν από την συμβατική φασματομετρία ηλεκτρονιακής σύγκρουσης (EI) μάζας. Ως εκ τούτου, ο γρήγορος ατομικός βομβαρδισμός (FAB), ο χημικός ιονισμός (CI), το πεδίο εκρόφησης (FD), ή η φασματοσκοπία μάζας δευτερογενών ιόντων απαιτούνται για μια τέτοια ανάλυση των λιπιδίων [93]. Η MS είναι πολύ χρήσιμη για τον προσδιορισμό των δομικών μεταβολών της αλυσίδας, όπως η διακλάδωση ή η παρουσία των δακτυλίων για τα κορεσμένα είδη. Από αυτή την άποψη, η μέτρηση του φάσματος της μάζας MALDITOF-MS έχει πολλά πλεονεκτήματα. Δεν απαιτεί προηγούμενος σχηματισμός παραγώγων του δείγματος για την ενίσχυση της πιητικότητας των λιπιδίων. Η έκταση του κατακερματισμού της MALDI-TOF-MS είναι χαμηλή, έτσι η ανίχνευση των μοριακών ιόντων είναι δυνατή στις περισσότερες περιπτώσεις. Η MS σε συνδυασμό με τις GC και HPLC είναι επίσης χρήσιμη στον τομέα του δομικού καθορισμού των μεμονωμένων μορίων των λιπιδίων.



7. Φασματοσκοπία μάζας

Πηγή: <http://www.chemist.gr/2009/05/1109/>

4. Ενζυματικές Μέθοδοι

Ο Higgins [113] έχει περιγράψει μια ενζυματική μέθοδο για τον προσδιορισμό του περιεχομένου των TAG των δειγμάτων. Αυτή περιλαμβάνει την αντίδραση των TAG με την λιπάση προκειμένου να λάβει γλυκερόλη και FFAs. Η γλυκερίνη που παράγεται έτσι, μετατρέπεται στη συνέχεια σε γλυκεροφωσφορικό χρησιμοποιώντας κινάση γλυκερίνης. Η γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να ανάγει το-NAD σε NADH. Το προκύπτων NADH μετρείται με μια χρωματομετρική αντίδραση.

Η οξειδάση της χοληστερόλης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) με *cis*-μεθυλαινομάδες ανάμεσα στους διπλούς δεσμούς τους (π.χ., λινελαϊκά, λινολενικά και αραχιδονικά οξέα) μπορούν να μετρηθούν ποσοτικά από την UV απορρόφησης των υδροϋπεροξειδίων συζευγμένων διενίων που παράγονται μέσω της λιποξυγενάσης (λιποξιδάση) -που καταλύει την οξείδωση. Οι εστέρες των λιπαρών οξέων πρέπει να σαπωνοποιηθούν πριν από την ανάλυση. Η περιεχόμενη φωσφατιδυλοχολίνη ή λεκιθίνη των τροφίμων(π.χ., ως ένα μέτρο για το περιεχόμενο των αυγών των τροφίμων) μπορεί να φτιαχτεί με την καταλυτική μετατροπής της λεκιθίνης σε φωσφαταδικό οξύ και της χολίνης από την λεκιθινάση (φωσφολιπάση D) [5].

Η μέθοδος της στερεοειδικής ανάλυσης των TAG που περιγράφεται από τον Brockerhoff και τον Yorkowski [114] χρησιμοποιεί παγκρεατική λιπάση που αφαιρεί τελικά τα λιπαρά οξέα από τις sn-1 και sn-3 θέσεις των TAG. Αυτή η διαδικασία έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό των υφιστάμενων δομικών διαφορών των ιχθυελαίων και του ελαίου της φώκιας [115]. Η φωσφολιπάση A₂ χρησιμοποιείται για να απελευθερώσει τα λιπαρά οξέα στη θέση sn-2 των σύνθετων φωσφατιδίων κατά την διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας.

5. Ανοσοχημικές Μέθοδοι

Τα λιπίδια δεν είναι γενικά πολύ ανοσογόνα. Ωστόσο, τα περισσότερα γλυκολιπίδια (εκτός από την καθαρή τους μορφή) έχουν αντισώματα υψηλής δραστηριότητας και εξειδίκευσης. Συνεπώς, τα γλυκολιπίδια που πρέπει να χορηγούνται στο ζώο είναι συζευγμένα με ομοιοπολική σύνδεση σε μια ξένη πρωτεΐνη ή χρησιμοποιούμε αυτά σαν ένα μέρος της διπλοστοιβάδας ενός λιποσώματος για να ευνοηθεί παραγωγή των ειδικών αντισωμάτων [55,57]. Οι ανοσοχημικές μέθοδοι έχουν επίσης αναπτυχθεί για την ανάλυση των φωσφολιπιδίων και των TAGs [55]. Οι στεροειδείς ορμόνες όταν ενώνονται με λευκοματίνη ορού είναι επαρκώς ανοσοποιητικές για την τόνωση της παραγωγής αντισωμάτων με υψηλή δραστηριότητα και αυτό επιτρέπει την ανίχνευση τους.

Η ανοσολογική χρώση των TLC πλακών για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γλυκοπρωτεϊνών γίνεται ευρέως. Για να ξεπεραστεί η χαμηλή ευαισθησία της ανοσοραδιοσημασμένης ανίχνευσης των γλυκολιπιδίων, αναπτύχθηκε η ένζυμο-απορροφητική (ELISA) [83].

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. H. D. Belitz and W. Grosch. *Food Chemistry*. Springer-Verlag, New York, 1987.
2. D. E. Carpenter, J. N. Ngvainti, and S. Lee. Lipid analysis. In: *Methods of Analysis for Nutrition Labeling* (D. M. Sullivan and D. E. Carpenter, eds.). AOAC Press, Arlington, VA, 1993, pp. 85–104.
3. W. R. Bloor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 17: 138–140 (1920).
4. W. W. Christie. *Lipid Analysis*. Pergamon Press, Oxford, 1982.
5. Y. Pomeranz and C. L. Meloan. *Food Analysis; Theory and Practice*, 4th ed. AVI, Westport, CT, 1994.
6. R. S. Kirk and R. Sawyer. *Pearson's Composition and Analysis of Foods*, 9th ed. Longman, London, 1992, pp. 22–26.
7. D. B. Min and D. F. Steenson. Crude fat analysis. In: *Food Analysis* (S.S. Neilson, ed.). Aspen, Gaithersburg, MD, pp. 201–215.
8. J. Folch, M. Lees, and G. H. S. Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–509 (1957).
9. E. G. Bligh and W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911–917 (1959).
10. G. J. Nelson. Isolation and purification of lipids from biological matrices. In: *Analysis of Fats, Oils and Lipoproteins* (E. G. Perkins, ed.). AOCS Press, Champaign, IL, 1991, pp. 20–59.
11. C. N. Lee, B. Trevino, and M. Chaiyawat. A simple and rapid solvent extraction method for determining total lipids in fish tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 79:487–492 (1996).
12. A. Hara and N. S. Radin. Lipid extraction of tissues with low toxicity solvent. *Anal. Chem.* 90:420–426 (1978).
13. N. S. Radin. Extraction of tissue lipids with solvent of low toxicity. In: *Methods of Enzymology, Vol. 72* (J. Lowenstein, ed.). Academic Press, New York, 1981, pp. 5–7.
14. H. Gunnlaugsdottir and R. G. Ackman. Three extraction methods for determination of lipids in fish meal; alternative to chloroform-based methods. *J. Sci. Food Agric.* 61: 235–240 (1993).

15. I. Undeland, N. Harrod, and H. Lingnert. Comparison between methods using lowtoxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry* 61:355–365 (1998).
16. G. W. Burton, A. Webb, and K. U. Ingold. A mild rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*. 20:29–39 (1985).
17. H. Swaczyna and A. Montag. Estimation of cholesterol fatty acid esters in biological materials. *Fette Seifen Anstrimmittel*. 86:436–446.
18. M. G. C. B. Soares, K. M. O. da Silva, and L. S. Guedes. Lipid extraction; A proposal of substitution of chloroform by dichloromethane in the method of Folch Lees and Solane. *Aquat. Biol. Technol.* 35:655–658 (1992).
19. M. E. Honeycutt, V. A. McFarland, and D. D. Masant. Comparison of three lipid extraction methods for fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55:469–472 (1995).
20. L. A. Johnson and E. W. Lusas. Comparison of alternative solvents for oil extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60:181A–194A (1983).
21. E. W. Lusas, L. R. Watkins, and K. C. Rhee. Separation of fats and oils by solvent extraction; nontraditional methods. In: *Edible fats and oil processing; Basic principles and modern practices* (D. R. Erikson, ed.). AOCS Press, Champaign, IL, 1990, pp. 56–58.
22. E. W. Lusas, L. R. Watkins, and S. S. Koseoglu. Isopropyl alcohol to be tested as solvent. *Inform* 2:970–976 (1991).
23. W. R. Morrison and A. M. Coventry. Solvent extraction of fatty acids from amylase inclusion complexes. *Starch* 41:24–27 (1989).
24. B. E. Ritcher, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, N. Avdalarie, and C. Pohl. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68: 1033–1039 (1996).
25. K. C. Shafer. Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. *Anal. Chim. Acta* 358:69–77 (1998).
26. C. Leary, T. Gracie, G. Guthier, and M. Bnouham. Microwave oven extraction procedure for lipid analysis in biological samples. *Analysis* 23:65–67 (1995).
27. J. R. J. Pare, G. Matni, J. M. R. Belanger, K. Li, C. Rule, and B. Thibert. Use of the microwave assisted process in extraction of fat from meat, dairy and egg products under atmospheric pressure condition. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 80:928–933 (1997).

28. F. Temelli. Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. Food Sci.* 57:440–442 (1992).
29. M. J. Cocero and L. Calvo. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂–ethanol mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1573–1578 (1996).
30. L. Montarini, J. W. King, G. R. List, and K. A. Rennick. Selective extraction of phospholipid mixture by supercritical CO₂ solvent. *J. Food Sci.* 61:1230–1233 (1996).
31. F. Diorisi, B. Aeschlimann Hug, J. M. Aeschimann, and A. Houlemar. Supercritical CO₂ extraction for total fat analysis of food products. *J. Food Sci.* 64:612–615 (1999).
32. P. Lembke and H. Engelhardt. Development of a new supercritical fluid extraction method for rapid determination of total fat content of food. *Chromatographia* 35:509–516 (1993).
33. M. Fattori, N. R. Bulley, and A. Meisen. Fatty acid and phosphorus contents of canola seed extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 35:739–743 (1987).
34. J. W. King, J. H. Johnson, and J. P. Friedrich. Extraction of fat tissue from meat products with supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.* 37:951–954 (1989).
34. J. W. King, F. J. Eller, J. N. Snyder, J. H. Johnson, F. K. McKeith, and C. R. Stites. Extraction of fat from ground beef for nutrient analysis using analytical supercritical fluid extraction. *J. Agric. Food Chem.* 44:2700–2704 (1996).
35. J. W. Hampson, K. C. Jones, T. A. Foglia, and K. M. Kohout. Supercritical fluid extraction of meat lipids: An alternative approach to the identification of irradiated meats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:717–721 (1996).
37. N. Devineni, P. Mallikarjunan, M. S. Chinnan, and R. D. Phillips. Supercritical fluid extraction of lipids from deep fat fried food products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:1517–1523 (1997).
38. N. T. Durnford and F. Temelli. Extraction condition and moisture content of canola flakes related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts. *J. Food Sci.* 62:155–159 (1997).

39. N. T. Durnford, F. Temelli, and E. Leblanc. Supercritical CO₂ extraction of oil and residual protein from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) as affected by moisture content. *J. Food Sci.* 62:289–294 (1997).
40. M. Snyder, J. P. Friedrich, and D. D. Christianson. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:1851–1856 (1984).
41. D. D. Christianson, J. P. Friedrich, G. R. List, K. Warner, E. B. Bagley, A. C. Stringfellow, and G. E. Inglett. Supercritical fluid extraction of dry milled corn germ with CO₂. *J. Food Sci.* 49:229–232, 272 (1984).
42. Y. Ikushima, N. Saito, K. Hatakeda, S. Ito, T. Asano, and T. Goto. A supercritical CO₂ extraction from mackerel (*Scomber japonicas*) powder: Experiment and modelling. *Bull Chem. Soc. Jpn.* 59:3709–3713 (1986).
43. S. L. Taylor, J. W. King, and G. R. List. Development of oil content in oilseeds by analytical supercritical fluid extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:437–439 (1993).
44. A. I. Hopia and V.-M. Ollilainen. Comparison of the evaporative light scattering detector (ELSD) and refractive index detector (RID) in lipid analysis. *J. Liq. Chromatogr.* 16:2469–2482 (1993).
45. *Association of Official Analytical Chemists' Official Methods of Analysis*. AOAC Press, Arlington, VA, 2000, pp. 66–68.
46. A. I. Carrapiso and C. Garcia. Development in lipid analysis; some new extraction techniques and *in situ* transesterification. *Lipids* 35:1167–1177 (2000).
47. L. D. Bergelson. *Lipid Biochemical Preparations*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1990, pp. 1–36.
48. M. A. Wells and J. C. Dittmer. The use of Sephadex for the removal of non-lipid contaminants from lipid extracts. *Biochemistry* 2:1259–1263 (1963).
49. R. E. Wuthier. Purification of lipids from non-lipid contaminants on Sephadex bead columns. *J. Lipid Res.* 7:558–565 (1966).
50. D. C. Zimmerman. The relationship between seed density and oil content in flax. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39:77–78 (1962).
51. W. H. Hunt, M. H. Neustadt, J. R. Hardt, and L. Zeleny. A rapid dielectric method for determining the oil content of soybean. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 29:258–261 (1952).

52. J. L. Rodrigueuz-Otero-, M. Hermida, and A. Cepeda. Determination of fat protein and total solids in cheese by near IR reflectance spectroscopy. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 78:802–807 (1995).
53. M. H. Lee, A. G. Carinato, D. M. Mayod, and B. A. Rasco. Noninvasive short wavelength near IR spectroscopic method to exhibit the crude lipid content in the muscle of intact rainbow trout. *J. Agric. Food Chem.* 40:2176–2179 (1992).
54. J. P. Wold, T. Jokebsen, and L. Krane. Atlantic salmon average fat content estimated by near IR transmittance spectroscopy. *J. Food Sci.* 61:74–78 (1996).
55. D. A. Biggs. Milk analysis with the infrared milk analyzer. *J. Dairy Sci.* 50:799–803 (1967).
56. T. M. Eads and W. R. Croasmun. NMR application to fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65:78–83 (1988).
57. T. F. Cornway and F. R. Earle. Nuclear magnetic resonance for determining oil content of seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 40:265–268 (1963).
58. D. E. Alexander, L. Silvela, I. Collins, and R. C. Rodgers. Analysis of oil content of maize by wide-line NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44:555–558 (1967).
59. I. Collins, D. E. Alexander, R. C. Rodgers, and L. Silvela. Analysis of oil content of soybean by wide-line NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44:708–710 (1967).
60. J. A. Robertson and W. R. Windham. Comparative study of methods of determining oil content of sunflower seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58:993–996 (1981).
61. D. B. Min. Crude fat analysis. In: *Introduction to the Chemical Analysis of Foods* (S. S. Neilson, ed.). Jones and Bartlett, London, 1994, pp. 81–192.
62. C. Beauvallet and J.-P. Renou. Application of NMR spectroscopy in meat research. *Trends Food Sci. Technol.* 3:197–199 (1992).
63. M. J. Gidley. High-resolution solid state NMR of food materials. *Trends Food Sci. Technol.* 3:231–236 (1992).
64. G. Haugaard and J. D. Pettinati. Photometric milk fat determination. *J. Dairy Sci.* 42: 1255–1275 (1959).
65. I. Katz, M. Keeney, and R. Bassette. Caloric determination of fat in milk and saponification number of a fat by the hydroxamic acid reaction. *J. Dairy Sci.* 42:903–906 (1959).
66. I. Stern and B. Shapiro. A rapid and simple determination of esterified fatty acids and for total fatty acids in blood. *J. Clin. Pathol.* 6:158–160 (1953).

67. J. W. Fitzgerald, G. R. Rings, and W. C. Winder. Ultrasonic method for measurement of fluid non-fat and milk fat in fluid milk. *J. Dairy Sci.* 44:1165 (1961).
68. D. H. Kropf. New rapid methods for moisture and fat analysis: A review. *J. Food Qual.* 6:199–210 (1984).
69. R. R. Allen. Determination of unsaturation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 32:671–674 (1955).
70. F. R. van de Voort, J. Sedman, G. Emo, and A. A. Ismail. Rapid and direct iodine value and saponification number determination of fats and oils by attenuated total reflectance/Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69:1118–1123 (1992).
71. Y. B. Che Man, G. Setiowatry, and F. R. van de Voort. Determination of iodine value of palm oil by Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:693–699 (1999a).
72. H. Li, F. R. van de Voort, A. A. Ismail, J. Sedman, R. Cox, C. Simard, and H. Burjs. Discrimination of edible oil products and quantitative determination of their iodine value by Fourier transform–near infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77:29–36 (2000).
73. R. R. Lowery and L. J. Tinsley. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53:470–472 (1975).
74. Y. B. Che Man, N. H. Moh, and F. R. van de Voort. Determination of free fatty acids in crude palm oil and refined bleached deodorized palm olein using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:485–490 (1999b).
75. A. A. Ismail, F. R. van de Voort, and J. Sedman. Rapid quantitation determination of free fatty acids in fats and oils by FTIR spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:335–341 (1993).
76. K. van Putte and J. C. van den Enden. Pulse NMR as quick method for the determination of the solid fat content in partially crystallized fats. *J. Phys. Eng. Sci. Instr.* 6: 910–912 (1973).
77. J. C. van den Enden, A. J. Haighton, K. van Putte, L. F. Vermaas, and D. Waddington. A method for the determination of the solid phase content of fats using pulse nuclear magnetic resonance. *Fette Seifen Anstrichmittel* 80:180–186 (1978).

78. J. C. van den Enden, J. B. Rossel, L. F. Vermaas, and D. Waddington. Determination of the solid fat content of hard confectionary butters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59:433–439 (1982).
79. V. K. S. Shukla. Studies on the crystallization behaviour of the cocoa butter equivalents by pulsed nuclear magnetic resonance. Part I. *Fette Seifen Anstrichmittel* 85:467–471 (1983).
80. F. R. van de Voort, P. Memon, J. Sedman, and A. A. Ismail. Determination of solid fat index by FTIR spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:411–416 (1996).
81. M. P. Purdon. Application of HPLC to lipid separation and analysis: Sample preparation. In: *Analysis of Fats, Oils, and Lipoproteins* (E. G. Perkins, ed.). AOCS Press, Champaign, IL, 1991, pp. 166–192.
82. M. Kates. *Techniques of Lipidology*, 2nd ed. Elsevier, New York, 1986.
83. F. W. Hemming and J. N. Hawthorne. *Lipid Analysis*. BIOS Scientific, Oxford, 1996.
84. J. L. Sebedio, C. Septier, and A. Grandgirard. Fractionation of commercial frying oil samples using Sep-Pak cartridges. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63:1541–1543 (1986).
85. G. D. Wachob. Solid phase-extraction of lipids. In: *Analysis of Fats and Lipoproteins* (E. G. Perkins, ed.). Champaign, IL, 1991, pp. 122–137.
86. S. E. Ebeler and J. D. Ebeler. Solid phase extraction methodologies for separation of lipids. *Inform* 7:1094 (1996).
87. M. A. Kaluzny, L. A. Duncan, M. V. Merritt, and D. E. Epps. Rapid separation of lipid classes in high field and purity using bonded phase column. *J. Lipid Res.* 26:135 (1985).
88. J. A. Prieto, A. Ebri, and C. Collar. Optimized separation of non-polar and polar lipid classes from wheat flour by solid phase extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69:387–391 (1992).
89. M. N. Vaghela and A. Kilara. A rapid method for extraction of total lipids from whey protein concentrates and separation of lipid classes with solid phase extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:1117–1120 (1995).
90. H. G. Bateman and T. C. Perkins. Method for extraction and separation by solid phase extraction of neutral lipids free fatty acids and polar lipid from minced microbial cultures. *J. Agric. Food Chem.* 45:132-134 (1997).

91. A. Kuksis. GLC and HPLC of neutral glycerolipids. In: *Lipid Chromatographic Analysis* (T. Shibamoto, ed.). Dekker, New York, 1994, pp. 177–222.
92. F. D. Gunstone. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Blackie, London, UK, 1996.
93. A. Kuksis, L. Marai, J. J. Myher, Y. Habashi, and S. Pind. Application of GC/MS, LC/MS, and FAB/MS to determination of molecular species of glycerolipids. In: *Analysis of Fats, Oils, and Lipoproteins* (E. G. Perkins, ed.). AOCS Press, Champaign, IL, 1991, pp. 464–495.
94. M. Hayakawa, S. Sugiyama, and T. Osawa. HPLC analysis of lipids; Analysis of fatty acids and their derivatives by a microcolumn HPLC system. In: *Lipid Chromatographic Analysis* (T. Shibamoto, ed.). Dekker, New York, 1994, pp. 270–273.
95. E. W. Hammond. *Chromatography for the Analysis of Lipids*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.
96. R. A. Moreau. Quantitative analysis of lipids by HPLC with a FID or an evaporative light-scattering detector. In: *Lipid Chromatographic Analysis* (T. Shibamoto, ed.). Dekker, New York, 1994, pp. 251–273.
98. M. D. Grieser and J. N. Gesker. High performance liquid chromatography of phospholipids with flame ionization detection. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66:1484–1487 (1989).
99. J. Becart, C. Chevalier, and J. P. Biesse. Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light scattering evaporating detector: Application to raw materials for cosmetic use. *J. High Resolut. Chromatogr.* 13:126–129 (1990).
100. W. S. Letter. A rapid method for phospholipid class separation by HPLC using an evaporative light scattering detector. *J. Liq. Chromatogr.* 15:253–266 (1992).
101. W. W. Christie and W. R. Morrison. Separation of complex lipids of cereals by highperformance liquid chromatography with mass detection. *J. Chromatogr.* 436:510–513 (1988).
102. L. G. Blomberg, M. Demirbaker, and M. Anderson. Characterization of lipids by supercritical fluid chromatography and supercritical fluid extraction. In: *Lipid Analysis in Oils and Fats* (R. J. Hamilton, ed.). Blackie Academics & Professional, London, 1998, pp. 34–58.

103. K. Matsumoto and M. Taguchi. Supercritical fluid chromatographic analysis of lipids. In: *Lipid Chromatographic Analysis* (T. Shibamoto, ed.). Dekker, New York, 1994, pp. 365–396.
104. R. Huopalahti, P. Laakso, J. Saaristo, R. Linko, and H. Kallio. Preliminary studies on triacylglycerols of fats and oils by capillary SFC. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 11:899–902 (1988).
105. F. O. Geiser, S. G. Yocklovich, S. M. Lurcott, J. W. Guthrie, and E. J. Levy. Water as a stationary phase modified in packed-column supercritical fluid chromatography I. Separation of free fatty acids. *J. Chromatogr.* 459:173–181 (1988).
106. A. Nomura, J. Yamada, K. Tsunoda, K. Sakaki, and T. Yokochi. Supercritical fluid chromatographic determination of fatty acids and their esters on an ODS-silica gel column. *Anal. Chem.* 61:2076–2078 (1989).
107. T. Greibrokk. Application of supercritical fluid extraction in multidimensional system. *J. Chromatogr. A.* 703:523–536 (1995).
108. N. C. Shantha and G. E. Napolitano. Lipid analysis using thin layer chromatography and Iatroscan. In: *Lipid Analysis in Oils and Fats* (R. J. Hamiton, ed.). Blackie Academics & Professional, London, 1998, pp. 1-33.
109. B. Fried. Lipids. In: *Handbook of Thin Layer Chromatography* (C. J. Sharma and B. Fried, eds.). Dekker, New York, 1996, pp. 704–705.
110. F. R. van de Voort and J. Sedman. FTIR spectroscopy: The next generation of oil analysis methodologies? *Inform* 11:614–620 (2000).
111. F. R. van de Voort. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. Int.* 25:397–403 (1992).
112. J. Sedman, A. A. Ismail, A. Nicodemo, S. Kubow, and F. van de Voort. Application of FTIR/ATR differential spectroscopy for monitoring oil oxidation and antioxidant efficiency. In: *Natural Antioxidants: Chemistry, Health, and Applications* (F. Shahidi, ed.). AOCS Press, Champaign, IL, 1996, pp. 358–378.
113. T. Higgins. Evaluation of a colorimetric triglyceride method on the KDA analyzer. *J. Clin. Lab. Autom.* 4:162–165 (1984).
114. H. Brockerhoff and M. Yurkowski. Stereospecific analysis of several vegetable fats. *J. Lipid Res.* 7:62–64 (1966).
115. U. N. Wanasundara and F. Shahidi. Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols of seal blubber oil. *J. Food Lipids* 4:51–64 (1997).