



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Τομέας Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Καθηγητής Α.Λ. Σκαλτσούνης



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

ΘΕΜΑ: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολυφαινολών σε δείγμα ελαιολάδου

ΗΜ/ΝΙΑ: 30/10/2017

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
	Δείγμα ελαιολάδου

ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Εκχύλιση πολυφαινολών
2. HPLC-DAD ανάλυση – ποιοτικό προφίλ
3. Ποσοτικός και ημιποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων φαινολών
4. Ποσοτική ανάλυση του υδρολυμένου εκχυλίσματος ελαιολάδου

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	OLITECN-79102
Όνομα παραγωγού	OLITECN-79102

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την εφαρμογή εξειδικευμένων τεχνικών ανάλυσης (RP-HPLC-DAD) για την ανίχνευση των βιοδραστικών συστατικών του ελαιολάδου, γνωστά και ως βιοφαινόλες, που ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για τις ευεργετικές του ιδιότητες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες της κατηγορίας των φαινυλαλκοολών, όπως η Υδροξυτυροσόλη (Hydroxytyrosol) και η Τυροσόλη (Tyrosol), καθώς και των σεκοϊριδοειδών, όπως η Ολεασείνη (Oleacein) και η Ολεοκανθάλη (Oleocanthal). Τα μόρια αυτά αποτελούν μέρος του πολικού φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, και εμφανίζουν σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ φαίνεται να δρουν προστατευτικά κατά της νόσου Αλτσχάιμερ και της γήρανσης του δέρματος.

Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) αναγνώρισε επίσημα την καρδιοπροστατευτική δράση που ασκεί στον ανθρώπινο οργανισμό το ισχυρό αντιοξειδωτικό του ελαιολάδου Υδροξυτυροσόλη. Σύμφωνα με τον κανονισμό 432/2012 της EFSA, η ημερήσια κατανάλωση 5 mg Υδροξυτυροσόλης και παραγώγων αυτής (όπως για παράδειγμα το σύμπλοκο της Ολευρωπεΐνης και η Τυροσόλη) εμποδίζει την οξείδωση της κακής χοληστερόλης και κατ'επέκταση αποτρέπει το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας στα αιμοφόρα αγγεία, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ο διατροφικός αυτός ισχυρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα ελαιόλαδο εφόσον η προαναφερόμενη ποσότητα Υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της περιέχονται σε 20 γραμμάρια ελαιολάδου.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι τα διαλδεϋδικά σεκοϊριδοειδή Ολεασείνη και Ολεοκανθάλη αποτελούν παράγωγα της Υδροξυτυροσόλης και της Τυροσόλης, αντίστοιχα. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού προσμετρώνται στη συνολική αποτίμηση της ενεργότητας του ελαιολάδου και η ποσοτικοποίησή τους συμβάλλει στην επίτευξη των ποσοτικών κριτηρίων που θέτει η EFSA.

Έτσι, η συγκεκριμένη μελέτη επικεντρώθηκε στην αποτύπωση χαρακτηριστικών αντιπροσώπων των προαναφερόμενων κατηγοριών βιοενεργών συστατικών. Ωστόσο,

μπορεί να επεκταθεί και στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό επιπλέον χημικών βιοδραστικών μορίων, όπως φαινολοξέα, φλαβονοειδή, λιγνάνια, τερπενοειδή.

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί για τον ποιοτικό έλεγχο του ελαιολάδου και σε συνδυασμό με ήδη υπάρχουσες τεχνικές ελέγχου. Το παραγόμενο μεταβολικό προφίλ είναι συγκεκριμένο για κάθε τύπο ελαιολάδου (ποικιλία, εποχή συλλογής, γραμμή παραγωγής κ.ά.) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημικό «αποτύπωμα».

A. ΕΚΧΥΛΙΣΗ / ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Με σκοπό την απομόνωση των πολικών φαινολικών συστατικών του δείγματος ελαιολάδου **OLITECN-79102**, εφαρμόστηκε η μέθοδος της υγρής-υγρής εκχύλισης με χρήση φυγοκέντρου (*πειραματικές συνθήκες: διαθέσιμες εφόσον ζητηθούν*). Το πολυφαινολικό εκχύλισμα που προκύπτει – από εδώ και στο εξής **OLITECN-79102**– εξατμίζεται υπό κενό στους 40°C μέχρι ξηρού, ζυγίζεται και οδηγείται προς ανάλυση.

Επιπλέον, μέρος του πολυφαινολικού κλάσματος που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία εκχύλισης υδρολύθηκε υπό όξινες συνθήκες [Mastrallexi et al., 2014. Addressing analytical requirements to support health claims on "olive oil polyphenols" (EC Regulation 432/2012), *J Agric Food Chem*, 26;62(12):2459-61] με σκοπό την ποσοτικοποίηση των φαινολών του αναλυόμενου δείγματος εκφρασμένων ως Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη & παραγώγων τους και την τεκμηρίωση του διατροφικού ισχυρισμού υγείας της EFSA.

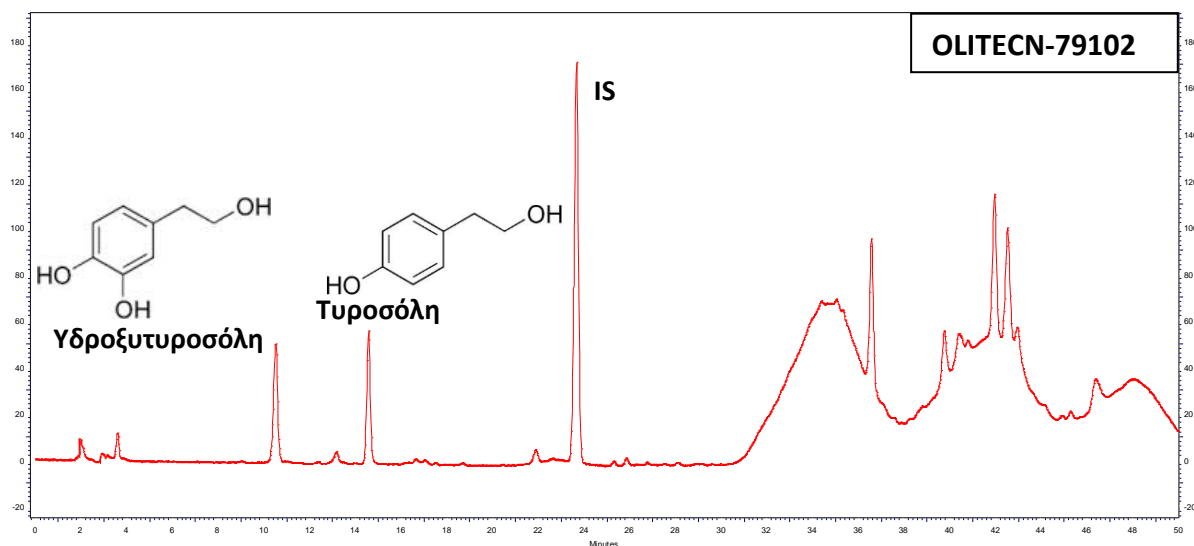
B. ΑΝΑΛΥΣΗ HPLC-DAD

Με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-DAD) πραγματοποιήθηκε: α) ποιοτική ανάλυση των βιοφαινολών του δείγματος ελαιολάδου **OLITECN-79102**, β) ποσοτικός προσδιορισμός των φαινυλαλκοολών Υδροξυτυροσόλη (**HT**) και Τυροσόλη (**T**), τόσο στο αρχικό όσο και στο υδρολυμένο πολυφαινολικό εκχύλισμα του υπό μελέτη δείγματος ελαιολάδου, και γ) ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των διαλδεϋδικών σεκοϊριδοειδών Ολεασεΐνη και Ολεοκανθάλη (*πειραματικές συνθήκες: διαθέσιμες εφόσον ζητηθούν*). Τα αποτελέσματα της ποσοτικής

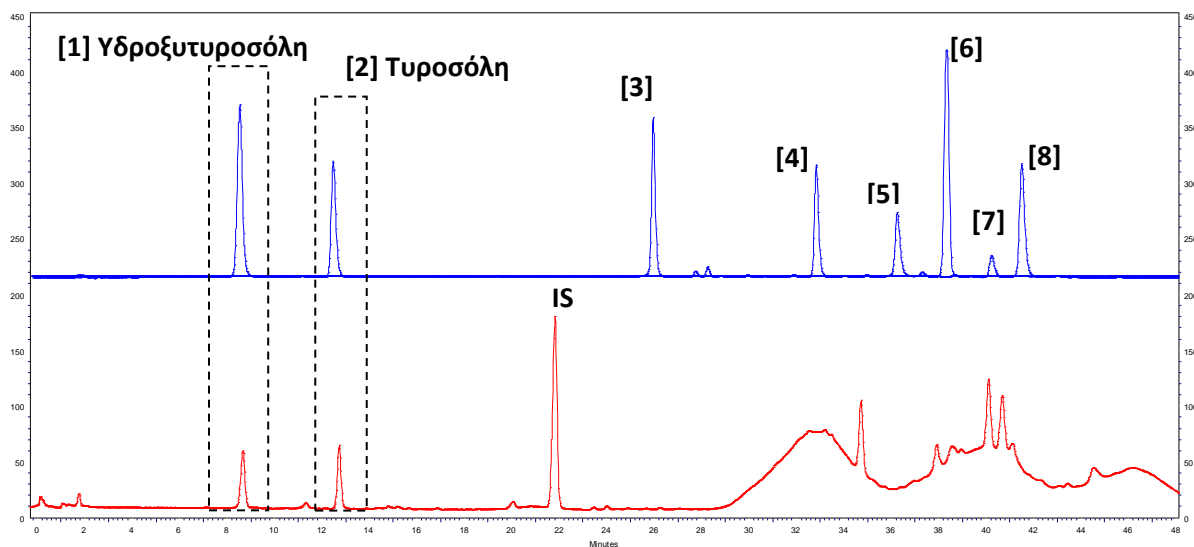
και ημι-ποσοτικής ανάλυσης εκφράστηκαν σε mg ουσίας ανά κιλό ελαιολάδου, καθώς και σε mg ουσίας ανά 20 g ελαιολάδου (Πίνακας 2 και 3).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

B1) Προσδιορισμός Υδροξυτυροσόλης και Τυροσόλης



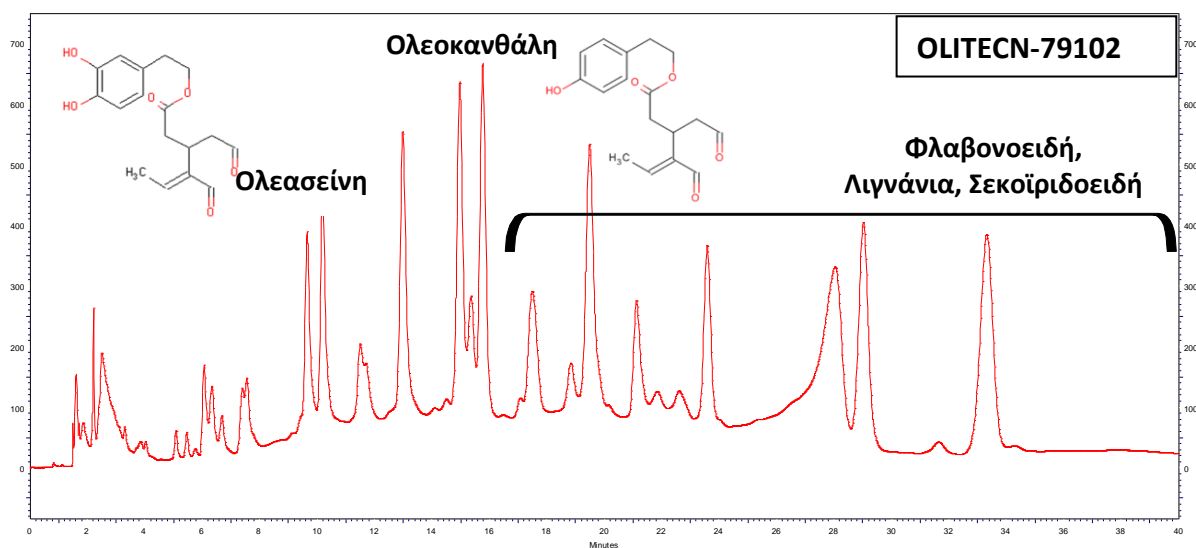
Εικόνα 1: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (280 nm) του αναλυόμενου δείγματος **OLITECN-79102**, όπου επισημαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στην Υδροξυτυροσόλη και την Τυροσόλη.



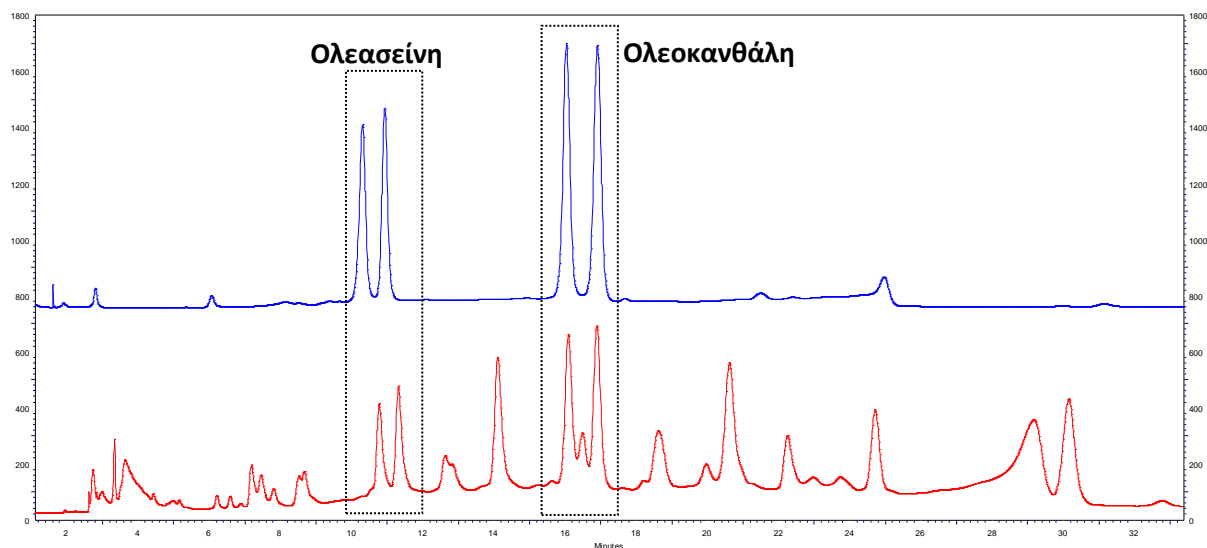
Εικόνα 2: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD του αναλυόμενου δείγματος **OLITECN-79102** στα 280 nm (κόκκινη γραμμή). Αντιπαραβάλλεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα (μπλε γραμμή) διαλύματος πρότυπων ουσιών (βλ. Πίνακα 1), συμπεριλαμβανομένων της Υδροξυτυροσόλης [1] και της Τυροσόλης [2].

Πίνακας 1: Πρότυπες φαινολικές ενώσεις.

[1] Υδροxyτυροσόλη (Hydroxytyrosol)
[2] Τυροσόλη (Tyrosol)
[3] Βερμπασκοσίδης (Verbascoside)
[4] Ολευρωπεΐνη (Oleuropein)
[5] Λουτεολίνη (Luteolin)
[6] Πινορεσινόλη (Pinoresinol)
[7] Ακετοxyπινορεσινόλη (Acetoxypinoresinol)
[8] Απιγενίνη (Apigenin)

B2) Προσδιορισμός Ολεασείνης και Ολεοκανθάλης

Εικόνα 3: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD (235 nm) του αναλυόμενου δείγματος **OLITECN-79102**, όπου επισημαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στην Ολεασείνη και την Ολεοκανθάλη. Επίσης, επισημαίνεται η περιοχή έκλυσης άλλων σημαντικών βιοδραστικών μορίων, όπως φλαβονοειδών, λιγνάνων και άλλων σεκοΐριδοειδών.



Εικόνα 4: Χρωματογράφημα RP-HPLC-DAD του αναλυόμενου δείγματος **OLITECN-79102** στα 235 nm (κόκκινη γραμμή). Αντιπαραβάλλεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα (μπλε γραμμή) των πρότυπων ουσιών Ολεασείνη και Ολεοκανθάλη.

Πίνακας 2: Ποσοτική και ημι-ποσοτική ανάλυση του υπό μελέτη δείγματος.

Κωδικός δείγματος	Ελεύθερη HT (mg/Kg)	Ελεύθερη T (mg/Kg)	OLEA (mg/Kg)	OLEO (mg/Kg)
OLITECN-79102 (n=3)	5,71	9,05	180	266

Πίνακας 3: Χημική ανάλυση υδρολυμένου εκχυλίσματος ελαιολάδου.

Κωδικός δείγματος	Συνολική ποσότητα HT και T/Kg ελαιολάδου	Συνολική ποσότητα HT, T και παραγώγων τους/ Kg ελαιολάδου ^[1]
OLITECN-79102 (n=3)	655	1535

[1] Mastralexi et al., 2014. Addressing analytical requirements to support health claims on "olive oil polyphenols" (EC Regulation 432/2012), *J Agric Food Chem*, 26;62(12):2459-61.

ΣΧΟΛΙΑ – ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Παρατηρώντας το χρωματογράφημα της **Εικόνας 1**, μετά την ποσοτικοποίηση που πραγματοποιήθηκε στο **OLITECN-79102** προκύπτει ότι η περιεκτικότητά του σε Υδροξυτυροσώλη είναι **5,71 mg/Kg ελαιολάδου**, ενώ σε Τυροσώλη είναι **9,05**

- mg/Kg ελαιολάδου.** Τα χαμηλά επίπεδα της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης είναι χαρακτηριστικό των φρέσκων ελαιολάδων.
2. Όσον αφορά τα 235 nm (**Εικόνες 3 και 4**), όπου πραγματοποιείται ανίχνευση και προσδιορισμός των διαλδεϋδικών σεκοϊριδοειδών, παρατηρούμε ότι η Ολεασίνη και το δομικά συγγενές της μόριο Ολεοκανθάλη εμφανίζονται σε επίπεδα περίπου **180 και 266 mg/Kg ελαιολάδου**, αντίστοιχα. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ημι-ποσοτικής ανάλυσης τα επίπεδα της ολεασίνης και της ολεοκανθάλης στο συγκεκριμένο δείγμα ελαιολάδου φαίνεται ότι είναι πολύ υψηλότερα συγκρινόμενα με το μέσο όρο των δειγμάτων που έχουν αναλυθεί στο εργαστήριό μας.
 3. Από την όξινη υδρόλυση που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι το υπό μελέτη δείγμα ελαιολάδου περιέχει **1535 mg Υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της/Kg ελαιολάδου**. Επομένως, το δείγμα **OLITECN-79102** φαίνεται να πληροί τις προϋποθέσεις του διατροφικού ισχυρισμού υγείας της EFSA (<http://www.gcsf.gr/media/trofima/reg-432-2012.pdf>), καθώς περιέχει **> 5 mg Υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της ανά 20 g ελαιολάδου**.
 4. Τέλος, στο πολυφαινολικό κλάσμα του εξεταζόμενου δείγματος ελαιολάδου παρατηρούνται, εκτός των προαναφερόμενων, και άλλες κατηγορίες δραστικών φυσικών μορίων, όπως φλαβονοειδή (π.χ. απιγενίνη), λιγνάνια (π.χ. πινορεσινόλη, ακετοξυπινορεσινόλη) και άλλα σεκοϊριδοειδή (**Εικόνες 2 και 4**).