

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΗΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ SPE ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Θ. Γκόγκου¹, Α. Μπιμπίλας¹, Γ. Σειραγάκης^{1,*}

¹TÜV AUSTRIA – Food Allergens Labs

(*lab@tuvaustralia.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρουσιάζεται μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού του περιεχομένου κηρών λιπαρών οξέων σε ελαιόλαδο. Η προκατεργασία του δείγματος έγινε με χρήση εκχύλισης στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE), ενώ ακολούθησε αεριοχρωματογραφική ανάλυση με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID). Η μέθοδος βασίζεται στη μέθοδο του κανονισμού EU 61/2011, αντικαθιστώντας την κλασική χρωματογραφία στήλης με φυσίγγια SPE Silica. Η αξιολόγηση της μεθόδου έγινε με χρήση πιστοποιημένου υλικού (CRM) ελαιολάδου του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (COI – International Olive Oil Council). Το CRM αναλύθηκε και με τις δύο μεθόδους (νέα μέθοδος με SPE και μέθοδος EU Regulation 61/2011) και προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του σε κηρούς (C40-C46, C42-C46). Το κάθε δείγμα αναλύθηκε 5 φορές και η σύγκριση αφορά στις αντίστοιχες μέσες τιμές. Η περιεκτικότητα των κηρών για το CRM προσδιορίστηκε 112 mg/kg με την μέθοδο της Ευρωπαϊκής Οδηγίας και 122mg/kg με τη μέθοδο SPE, και οι δύο τιμές αποδεκτές για το CRM και η διαφορά των μέσων τιμών μεταξύ τους είναι μικρότερη από 10%. Η σύγκριση έδειξε τα παρακάτω: α) Τα αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους ήταν εντός των αποδεκτών τιμών για το πιστοποιημένο υλικό, β) δεν προέκυψε σημαντική διαφορά ($p=0.05$) μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων, γ) η αναπτυχθείσα SPE μέθοδος υπερτερεί της μεθόδου του COI σε χρόνο ανάλυσης και κατανάλωση οργανικών διαλυτών.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αέρια Χρωματογραφία, Solid Phase Extraction, Ελαιόλαδο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ελαιολάδων σε κηρούς λιπαρών οξέων. Οι αναλύτες διαχωρίζονται σύμφωνα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα. Η μέθοδος συνιστάται ως μέσο διάκρισης μεταξύ ελαιολάδου και πυρηνελαίου και ως παράμετρος ποιότητας των εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, βάσει της οποίας είναι δυνατόν να εντοπιστεί η παράνομη ανάμιξη εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων με έλαια κατώτερης ποιότητας, ανεξαρτήτως του εάν αυτά είναι παρθένα ελαιόλαδα, μειονεκτικά ελαιόλαδα (λαμπάντε) ή αποσμημένα έλαια.

Οι κηροί είναι εστέρες λιπαρών οξέων. Με την πάροδο του χρόνου αυξάνει η αρχική περιεκτικότητά τους στα υψηλής οξύτητας μειονεκτικά παρθένα ελαιόλαδα. Οι κηροί είναι η αιτία που στο ελαιόλαδο μπορεί να εμφανιστεί θολερότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες ή και να αρχίζει να στερεοποιείται.

Σύμφωνα με το Παράρτημα του Κανονισμού 2568/1991, η περιεκτικότητα:

- των κηρών C42+C44+C46 στα παρθένα και εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα πρέπει να είναι $\leq 150\text{mg/kg}$ (η συνήθης περιεκτικότητα του φρέσκου εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου είναι 40-45mg/kg).
- των κηρών C40+C42+C44+C46 στο μειονεκτικό ελαιόλαδο (λαμπάντε) $\leq 350\text{mg/kg}$, και

- των κηρών C40+C42+C44+C46 στα σύνθετα ελαιόλαδα και στα πυρηνέλαια >350mg/kg.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Αντιδραστήρια

- Εξάνιο, επτάνιο και διαιθυλαιθέρας για χρωματογραφία.
- Φυσίγγια εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) τύπου Silica, Agilent P/N 14256034 BondElut (10g, 60mL, 120μm) ή διοξειδίο του πυριτίου (silica gel) κοκκομετρικού βαθμού 60 έως 200 μm.
- Εσωτερικό πρότυπο: διάλυμα λαυρικού αραχιδεστέρα (lauryl arachidate, εικοσανικού δωδεκυλεστέρα) 0,1% m/V (1000μg/mL) σε επτάνιο.
- Χρωστική Sudan 1 (1-φαινυλ-αζω-2-ναφθόλη).
- Συσκευές : Περιστροφικός εξατμιστήρας, ποτήρια ζέσεως των 250 mL, συσκευή SPE πολλαπλών θέσεων (manifold), Αεριοχρωματογράφος τριχοειδών στηλών με εγχυτή τύπου on column με ανιχνευτή FID, Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός.

2. Προκατεργασία δείγματος ελαιολάδου

Μετά από προσθήκη στο έλαιο εσωτερικού προτύπου, ακολουθεί: Α] Στη μέθοδο του κανονισμού EU Regulation 61/2011 προτύπου, κλασμάτωση με χρωματογραφία σε ενυδατωμένη στήλη πυριτίου και ανάκτηση του κλάσματος που εκλύεται υπό τις συνθήκες δοκιμής (με χαμηλότερη πολικότητα από τα τριγλυκερίδια). Β] Στη μέθοδο SPE ακολουθείται η κάτωθι διαδικασία εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) με φυσίγγια πυριτίου:

Σε φιαλίδιο των 8mL ζυγίζονται 500 ± 5 mg δείγματος και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Διαβιβάζονται στο φυσίγγιο 20mL εξάνιο για ενεργοποίηση του και ακολούθως διαβιβάζεται το δείγμα στο φυσίγγιο απορρίπτοντας το έκλουσμα μέσα σε ποτήρι ζέσης των 250mL. Στη συνέχεια διαβιβάζονται στο φυσίγγιο 70mL εξανίου για να απομακρυνθούν τα φυσιολογικά ενυπάρχοντα αλκάνια στο ποτήρι απόρριψης εκλούσματος. Αποσύρεται μέσα από τη συσκευή το ποτήρι απόρριψης εκλούσματος και τοποθετείται στη θέση του νέο ποτήρι ζέσης των 250mL (ποτήρι συλλογής εκλούσματος). Διαβιβάζονται 220mL φρεσκοπαρασκευασμένου μίγματος [εξανίου:διαιθυλαιθέρα] = [99:1] με ροή ~ 10 mL/min και συλλέγεται το έκλουσμα. Για έλεγχο της έκλουσης των κηρών, μπορεί να προστεθούν στο μίγμα έκλουσης των κηρών 100 μl διαλύματος Sudan 1%. Επειδή το Sudan εκλύεται μεταξύ των κηρών και των τριγλυκεριδίων, όταν το χρώμα φθάσει στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης, η έκλουση διακόπτεται, καθώς έχουν διέλθει οι κηροί. Το έκλουσμα του δείγματος μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 250mL και ξηραίνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι όγκου 1 ως 2mL. Συνεχίζεται η εξάτμιση με ήπιο ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Στο ξηρό υπόλειμμα προστίθεται 1mL επτανίου.

Προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθεί το φυσίγγιο σε νέο δείγμα, διαβιβάζονται από αυτό 80mL μίγματος [εξανίου:διαιθυλαιθέρα] = [80:20]. Στεγνώνει το φυσίγγιο με διαβίβαση αέρα με τη βοήθεια αντλίας κενού επί 2min. Διαβιβάζονται βαρυτικά 40mL εξάνιο και στεγνώνει ξανά με τον ίδιο τρόπο. Επαναχρησιμοποιείται μόνο μετά από δείγμα ελαιολάδου και μόνο για μία φορά.

3. Αεριοχρωματογραφία

Εγχυτής: Cool on-column, Όγκος έγχυσης: 1 μL, Προστήλη: precolumn 5cm x 0.53mm, Στήλη RtxR-Mineral Oil, P/N 17208 της Restek, διαστάσεων 15m x 0.32mm x 0.10μm (max. temp. 400°C), He: 3mL/min, H₂: 35mL/min, Air: 400mL/min, Makeup gas (N₂): 15mL/min, Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 80°C (1 min), 20°C/min στους 240°C (0 min), 5°C/min στους 325°C (6 min), 20°C/min στους 340°C (10 min), Ανιχνευτής: FID 350°C.

4. Υπολογισμοί

Υπολογίζονται τα εμβαδά των κορυφών που αντιστοιχούν στο εσωτερικό πρότυπο και με 40, 42, 44, 46 άτομα άνθρακα για τους κηρούς.

Υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε κάθε εστέρα με ένα δεκαδικό ψηφίο από τη σχέση:

$$[A_x \times m_i \times 1000] / [A_s \times m] \quad (\text{mg/kg}) \quad (1)$$

Όπου:

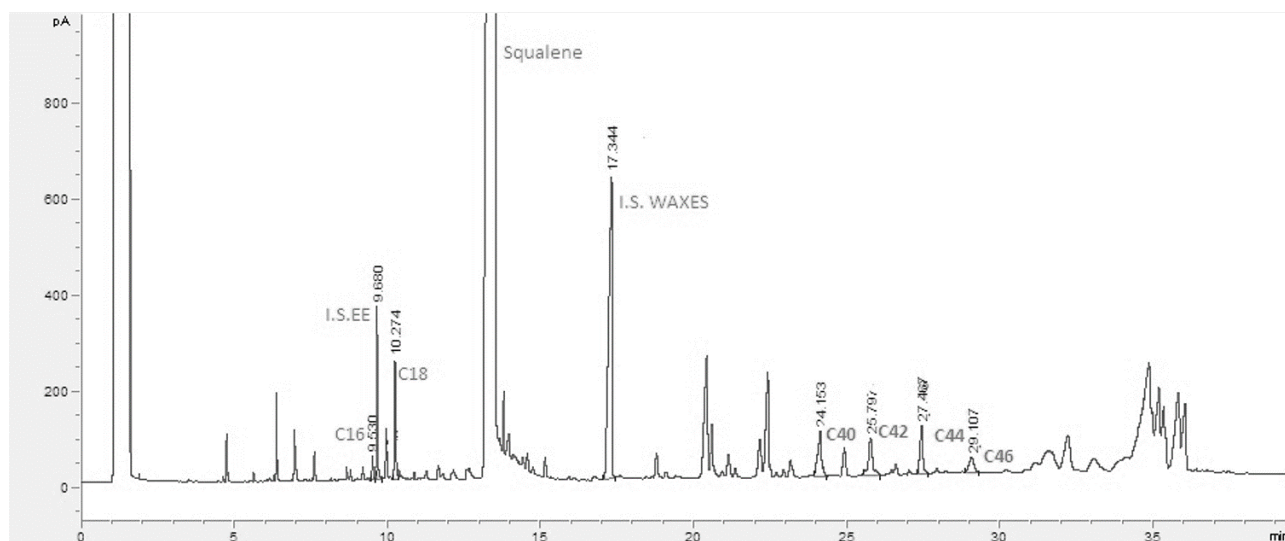
A_x = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί σε κάθε εστέρα.

A_s = το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο.

m_i = η προστιθέμενη μάζα εσωτερικού προτύπου, σε χιλιοστόγραμμα (mg), που είναι συνήθως 0,2mg.

m = η μάζα του δείγματος, σε γραμμάρια (g), που είναι συνήθως 0,5.

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου για τους κηρούς είναι 10 mg/kg.



Σχήμα 1. Χρωματογραφική ανάλυση κηρών και αιθυλεστέρων δείγματος ελαιολάδου. Ταυτοποίηση των κορυφών: αιθυλεστέρες (C16, C18), κηροί (C40, C42, C44, C46). Τα εσωτερικά πρότυπα είναι δεκαεπτανικό μεθύλιο για αιθυλεστέρες και λαυρικός αραχιδεστέρας για κηρούς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την σύγκριση των δύο μεθόδων προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους ήταν εντός των αποδεκτών τιμών για το πιστοποιημένο υλικό, ενώ δεν προέκυψε σημαντική διαφορά ($p=0.05$) μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων. Η αναπτυχθείσα SPE μέθοδος υπερτερεί της μεθόδου του COI σε χρόνο ανάλυσης (2h έναντι 4h) και σε κατανάλωση οργανικών διαλυτών (240mL/δείγμα έναντι 370mL/δείγμα). Λόγω των παραπάνω, η δυναμική του εργαστηρίου μπορεί να αυξηθεί από 2 δείγματα σε 8 δείγματα ανά ημέρα.

Πίνακας 1. Σύγκριση των δύο μεθόδων ανάλυσης κηρών (Μέθοδος SPE και μέθοδος EU Regulation 61/2011)

Παράμετρος	Νέα μέθοδος με SPE	Μέθοδος COI
Χρόνος ανάλυσης	2h	4h
Δείγματα/ημέρα	8	2
Οργανικοί διαλύτες/δείγμα	240mL	370mL
Αξιοπιστία σε διεργαστηριακό	z score = 0.8	z score = 0.9

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] International Olive Oil Council. (2017). T.20, Doc. No 28, Rev.2
[2] Commission Regulation (EU). (2011). Official Journal of the European Union, 61.