



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Αναλυτική Χημεία»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό διγλυκεριδίων και
τριγλυκεριδίων σε δείγματα ελαιολάδου από το Βόρειο
Αιγαίο**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ-ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΝΑΚΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη μεθόδων με σκοπό τον προσδιορισμό διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων σε δείγματα ελαιολάδου από το Βόρειο Αιγαίο

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ-ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΝΑΚΗΣ

A.M.: 11704

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Νικόλαος Θωμαΐδης (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ)
2. Αναστάσιος Οικονόμου (Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ)
3. Χρήστος Κόκκινος (Επικουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 02/07/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των μεθόδων προσδιορισμού της περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση που έχουν περιβαλλοντικοί και γεωγραφικοί παράγοντες, καθώς και παράγοντες επεξεργασίας κατά την παραγωγή του ελαιολάδου. Ο προσδιορισμός των 1,2- και 1,3- διγλυκεριδίων βασίστηκε στο πρότυπο ISO 29822:2012. Έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών της μεθόδου με τη χρήση αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (GC-MS/MS). Η μέτρηση των δειγμάτων και στη συνέχεια επαλήθευση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με αεριοχρωματογράφο με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων, επεξεργάστηκαν στατιστικά ώστε να διαπιστωθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά τις περιεκτικότητες των 1,2- και 1,3-διγλυκεριδίων. Τέλος, υπολογίστηκε ο δείκτης φρεσκότητας των ελαιολάδων. Για τα τριγλυκερίδια έγινε ανασκόπηση των μεθόδων για τον και επιλέχθηκε η χρήση υγροχρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) για τον προσδιορισμό τους. Η ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων έγινε με πρότυπα διαλύματα και υλικό αναφοράς. Τέλος μελετήθηκε η παρουσία του στο ελαιόλαδο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Χημική ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ελαιόλαδο, αεριοχρωματογραφία, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, υγροχρωματογραφία

ABSTRACT

The purpose of this study is to develop methods for the determination of diglycerides and triglycerides in olive oil. The study also contains the influence of environmental, geographic factors as well as processing factors in the concentration of diglycerides in olive oil. The determination of 1,2- and 1,3-diglycerides was based on ISO method 29822:2012. The process conditions were optimized using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The analysis of samples was performed with gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The results obtained from the analysis of the samples were statistically processed to determine the factors that statistically affect the levels of 1,2- and 1,3-diglycerides. Finally, the freshness index of the oils was calculated. For triglycerides, a review of the methods for the triglycerides was carried out and the use of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detector (LC-MS / MS) was chosen to determine the triglycerides. Standard solution and reference material were used for the identification of triglycerides and its presence in olive oil was studied.

SUBJECT AREA: Chemical analysis

KEYWORDS: olive oil, gas chromatography, diglycerides, triglycerides, liquid chromatography

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είναι αφιερωμένη στους γονείς μου για την στήριξη τους στην πορεία μου μέχρι σήμερα και για την προσπάθειά τους ανέκαθεν να μου προσφέρουν το καλύτερο δυνατό.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Θωμαΐδη Νικόλαο για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καλογιούρη Νατάσα και τον Μάριο Κωστάκη για την καθοδήγηση και την στήριξη τους εντός αλλά και εκτός του εργαστηρίου, τις συμφοιτήτριές μου, Κρητικού Ευαγγελία, Λαζάρου Κωνσταντίνα και τον πολύ καλό μου φίλο Μαρτάκο Ιωάννη για τη βοήθεια, τη στήριξη και τις υπέροχες αναμνήσεις που μου χάρισαν. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου περισσότερο από όλους, για την στήριξη, τη βοήθεια και την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	23
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
1.1 Σημασία του Ελαιολάδου	25
1.2 Ορισμός του ελαιολάδου	25
1.3 Κατηγορίες ελαιολάδου.....	25
1.3.1 Παρθένα ελαιόλαδα.....	26
1.3.2 Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο.....	27
1.4 Σύσταση του ελαιολάδου	30
1.4.1 Τριγλυκερίδια	30
1.4.2 Λιπαρά Οξέα	31
1.4.3 Διγλυκερίδια	33
1.4.4 Υδρογονάνθρακες.....	34
1.4.5 Φαινολικές ενώσεις	35
1.4.6 Χρωστικές ουσίες.....	38
1.4.7 Τοκοφερόλες.....	38
1.4.8 Αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες.....	39
1.4.9 Στερόλες	39
1.4.10 Τριτερπενοειδή οξέα	40
1.4.11 Πτητικές και αρωματικές ενώσεις.....	40
1.4.12 Άλλα δευτερεύοντα συστατικά	40
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	40
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	43
2.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό διγλυκεριδίων	43
2.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό τριγλυκεριδίων.....	46
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	49

3.1	Εισαγωγή.....	49
3.2	Τα διγλυκερίδια ως δείκτες ποιότητας.....	50
3.3	Τα τριγλυκερίδια ως δείκτες νοθείας.....	52
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	55
4.1	Εισαγωγή στη χρωματογραφία.....	55
4.2	Αεριοχρωματογραφία	56
4.3	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης	59
4.4	Ανιχνευτές	62
4.4.1	Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID).....	62
4.4.2	Ανιχνευτής συζευγμένης φασματομετρίας μάζων (MS/MS)	63
4.5	Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	64
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	67
5.1	Δείγματα	67
5.2	Πρόγραμμα ανάλυσης των δειγμάτων	67
5.3	Προσδιορισμός διγλυκεριδίων	67
5.3.1	Αντιδραστήρια.....	68
5.3.2	Οργανολογία.....	68
5.3.3	Πειραματική πορεία.....	70
5.3.4	Υπολογισμός αποτελεσμάτων	73
5.3.5	Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού διγλυκεριδίων	74
5.3.6	Επαλήθευση της μεθόδου.....	83
5.4	Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων.....	86
5.4.1	Αντιδραστήρια.....	86
5.4.2	Οργανολογία.....	86
5.4.3	Πειραματική πορεία.....	87
5.4.4	Μεθοδολογία για την ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων.....	88
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	107

6.1	Αποτελέσματα της μέτρησης των διγλυκεριδίων	107
6.1.1	Υψόμετρο.....	107
6.1.2	Μέθοδος φυγοκέντρωσης	108
6.1.3	Είδος καλλιέργειας	109
6.1.4	Στάδιο ωρίμανσης.....	110
6.1.5	Προσθήκη νερού κατά τη μάλαξη.....	112
6.1.6	Χρόνος μάλαξης.....	113
6.1.7	Καλλιεργητική φροντίδα	114
6.1.8	Θερμοκρασία μάλαξης	115
6.1.9	Θερμοκρασία διαχωριστήρα	116
6.1.10	Ημέρες μέχρι την ελαιοποίηση.....	117
6.1.11	Ζώνες στο νησί της Λέσβου.....	118
6.1.12	Νησιά Βορείου Αιγαίου	119
6.1.13	Ποικιλίες.....	120
6.2	Αποτελέσματα της μέτρησης των τριγλυκεριδίων	121
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125
8.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	129
9.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	131
10.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	135

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Μηχανισμός σχηματισμού των ψευδο-διγλυκεριδίων [68]	90
Σχήμα 2: Μηχανισμός σχηματισμού ακυλικών ιόντων των λιπαρών οξέων [68].....	90
Σχήμα 3: Μηχανισμός σχηματισμού κετικών ιόντων [68].....	91
Σχήμα 4: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το υψόμετρο	108
Σχήμα 5: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση την μέθοδο φυγοκέντρωσης	109
Σχήμα 6: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το είδος καλλιέργειας.....	110
Σχήμα 7: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το στάδιο ωρίμανσης του καρπού.....	111
Σχήμα 8: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τη προσθήκη νερού.....	112
Σχήμα 9: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το χρόνο μάλαξης	113
Σχήμα 10: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση την καλλιεργητική φροντίδα	114
Σχήμα 11: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τη θερμοκρασία μάλαξης.....	115
Σχήμα 12: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τη θερμοκρασία του διαχωριστήρα	116
Σχήμα 13: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τις μέρες μέχρι την ελαιοποίηση	117
Σχήμα 14: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τις ζώνες των περιοχών στη Λέσβο.....	118
Σχήμα 15: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τα νησιά του Βορείου Αιγαίου.....	119
Σχήμα 16: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τις ποικιλίες που υπάρχουν στα νησιά του Βορείου Αιγαίου.....	120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή τριγλυκεριδίων.....	30
Εικόνα 2: Λιπαρά οξέα.....	32
Εικόνα 3: Στερεοχημικές δομές διακυλογλυκερολών [10].....	33
Εικόνα 4: Σκουαλένιο [12].....	34
Εικόνα 5: Αναλυτικό διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου [61].....	57
Εικόνα 6: Διατομή στομίου άμεσης έγχυσης δείγματος σε σύστημα ταχέος μικροεξάτμιστή [61].....	58
Εικόνα 7: Διατομή άμεσης έγχυσης δείγματος με σύστημα διαμοιρασμού [62]	59
Εικόνα 8: Διάγραμμα εφαρμογών της υδροχρωματογραφίας [61]	60
Εικόνα 9: Αναλυτικό διάγραμμα ενός υδροχρωματογράφου [63].....	60
Εικόνα 10: Σύστημα έγχυσης με βρόγχους [63].....	61
Εικόνα 11: Διατομή ενός τυπικού ανιχνευτή φλόγας.....	63
Εικόνα 12: Σχηματικό διάγραμμα συζευγμένων ανιχνευτών φασματομετρίας μαζών....	64
Εικόνα 13: Απεικόνιση σταδίων χρωματογραφίας στερεάς εκχύλισης [66].....	66
Εικόνα 14: Αέριοχρωματογράφος (GC) με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS)	69
Εικόνα 15: Αεριοχρωματογράφος(GC) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID)	69
Εικόνα 16: Μέτρηση δειγμάτων (α) χωρίς προκατεργασία με SPE (β) με προκατεργασία με SPE.....	76
Εικόνα 17: Μέτρηση με συνθήκη διαμοιρασμού (α) 1:20 και (β) 1:50.....	77
Εικόνα 18: Μέτρηση με αρχική θερμοκρασία φούρνου του αεριοχρωματογράφου (α) 200 °C και (β) 80 °C.....	78
Εικόνα 19: Μέτρηση με προσθήκη διαφορετικών διαλυτών κατα τη διαδικασία της σιλιανοποίησης. (α) Ακετονιτριλίου και (β) Ακετόνης	79
Εικόνα 20: Μέτρηση με προσθήκη διαφορετικών διαλυτών κατα τη διαδικασία της σιλιανοποίησης. (α) Ακετονιτριλίου (β) Εξανίου και (γ) Τολουολίου.....	80

Εικόνα 21: Χρωματογραφήματα με προσθήκη (α) 50 μL BSTFA και 150 μL ACN (β) 150 μL αντιδραστηρίου και 50 μL διαλύτη και (γ) 100 μL αντιδραστηρίου σιλανοποίησης και 100 μL ACN.....	81
Εικόνα 22: Μέτρηση (α) χωρίς θέρμανση και (β) με θέρμανση στους 60 $^{\circ}\text{C}$, κατά τη σιλανοποίηση	82
Εικόνα 23: (α) Χρωματογράφημα από τον GC-FIDκατά τη μέτρηση του προτύπου, (β) μεγέθυνση της περιοχής με τα προσδιοριζόμενα διγλυκερίδια	84
Εικόνα 24: Υγροχρωματογράφος(LC) με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) [67]	87
Εικόνα 25: Χρωματογραφήματα με διάλυση του ελαιολάδου α) σε ακετονιτρίλιο και β) σε εξάνιο.....	94
Εικόνα 26: Χρωματογράφημα πιστοποιημένου υλικού αναφοράς IRMM-801, βούτυρο από κακάο	96
Εικόνα 27: Φάσμα της κορυφής στα 94,96 λεπτά η οποία ανήκει στο SOO	97
Εικόνα 28: Φάσμα της κορυφής στα 88,52 λεπτά η οποία ανήκει στο SOS	98
Εικόνα 29:Φάσμα της κορυφής στα 87,30 λεπτά η οποία ανήκει στο PPS.....	99
Εικόνα 30: Φάσμα της κορυφής στα 58,15 λεπτά η οποία ανήκει στα POO και SLS	99
Εικόνα 31: Φάσμα της κορυφής στα 56,32 λεπτά η οποία ανήκει στο OOO	100
Εικόνα 32: Φάσμα της κορυφής στα 54,10 λεπτά η οποία ανήκει στο POP	101
Εικόνα 33: Φάσμα της κορυφής στα 52,60 λεπτά η οποία ανήκει στο PPP.....	102
Εικόνα 34: Φάσμα της κορυφής στα 39,06 λεπτά η οποία ανήκει στο PLO.....	102
Εικόνα 35: Φάσμα της κορυφής στα 37,02 λεπτά η οποία ανήκει στο OLO	103
Εικόνα 36: Φάσμα της κορυφής στα 35,69 λεπτά η οποία ανήκει στο PLP	104
Εικόνα 37: Φάσμα της κορυφής στα 24,61 λεπτά η οποία ανήκει στο PLL	104
Εικόνα 38: Φάσμα της κορυφής η οποία ανήκει στο LLLn.....	105
Εικόνα 39: Φάσμα της κορυφής η οποία ανήκει σταLLLκαι LnOL	105
Εικόνα 40: Φάσμα της κορυφής η οποία ανήκει στο OLnO	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιτρεπόμενα όρια των χαρακτηριστικών του ελαιολάδου βάση του Κανονισμού (ΕΟΚ) 2568/91 [3].....	28
Πίνακας 2: Χαρακτηρίστηκες ενώσεις για της κατηγορίες των φαινολών.....	36
Πίνακας 3: Μοριακές απεικονίσεις φαινολών.....	37
Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων.....	43
Πίνακας 5: Συνοπτική παρουσίαση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων.....	46
Πίνακας 6: Συνθήκες αεριοχρωματογράφου και ανιχνευτών για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου και τη μέτρηση των δειγμάτων.....	72
Πίνακας 7: Συνθήκες GC-FID.....	75
Πίνακας 8: Σύγκριση εμβαδών κορυφών.....	80
Πίνακας 9: Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την μέτρηση του διεργαστηριακού δείγματος.....	85
Πίνακας 10: Παρουσίαση αποτελεσμάτων του διεργαστηριακού ελέγχου.....	86
Πίνακας 11: Συνθήκες LC/MS/MS κατά τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων.....	88
Πίνακας 12: Παρουσίαση m/z των ακυλικών ιόντων των λιπαρών οξέων.....	92
Πίνακας 13: Παρουσίαση m/z των κετενικών ιόντων των λιπαρών οξέων.....	93
Πίνακας 14: Παρουσίαση m/z των ψευδοδιγλυκεριδίων.....	93
Πίνακας 15: Παρουσίαση των τριγλυκεριδίων που βρίσκονται στο πρότυπο.....	95
Πίνακας 16: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση υψομέτρου.....	108
Πίνακας 17: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση της μεθόδου φυγοκέντρησης.....	109
Πίνακας 18: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση του είδους καλλιέργειας.....	110

Πίνακας 19: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση του σταδίου ωρίμανσης του καρπού.....	111
Πίνακας 20: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση της προσθήκης νερού.....	112
Πίνακας 21: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση του χρόνου μάλαξης	113
Πίνακας 22: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση της καλλιεργητικής φροντίδας.....	114
Πίνακας 23: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση της θερμοκρασίας μάλαξης.....	115
Πίνακας 24: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση της θερμοκρασίας του διαχωριστήρα.....	116
Πίνακας 25: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση των ημερών μέχρι την ελαιοποίηση	117
Πίνακας 26: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση των περιοχών των ζωνών στη Λέσβο.....	118
Πίνακας 27: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση των νησιών του Βορείου Αιγαίου	120
Πίνακας 28: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση τις ποικιλίες που υπάρχουν στα νησιά του Βορείου Αιγαίου	121
Πίνακας 29: Περιεκτικότητες τριγλυκεριδίων	122
Πίνακας 30: Σχετικοί τυπικοί χρόνοι προτύπου και δειγμάτων	123
Πίνακας 31: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	129

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019 στα πλαίσια του προγράμματος «Εξειδικευμένη έρευνα προώθησης ελαιολάδου και προϊόντων ελιάς Βορείου Αιγαίου μέσω ανάδειξης του βιοδραστικού περιεχομένου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας», με επιβλέποντα καθηγητή τον κύριο Νικόλαο Θωμαΐδη. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά την ελαιοκομική περίοδο 2017 – 2018 και αποθηκεύτηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 4 °C και απουσία φωτός. Η αποθήκευση, η επεξεργασία και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σημασία του Ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής διατροφής από τα παλαιότερα χρόνια λόγω των ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης του δέντρου της ελιάς και αποτελεί πηγή ευζωίας και ευημερίας για όλους τους λαούς της Μεσογείου[1]. Στις σύγχρονες μέρες είναι ευρέως γνωστό ότι εκτός από τη βελτίωση του επιπέδου της γεύσης που επιφέρει στη διατροφή, περιέχει υψηλά επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων αλλά και βιοδραστικών συστατικών, για τα οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία. Πιο συγκεκριμένα τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα βοηθούν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων και τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και χημειοπροστατευτικές ιδιότητες. Τέλος είναι άξιο να αναφερθεί ότι εκτός από τα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, το ελαιόλαδο προσφέρει και ένα τεράστιο οικονομικό πλεονέκτημα των λαών της Μεσογείου λόγω του εμπορίου εξαγωγής του στις υπόλοιπες χώρες παγκοσμίως [2].

1.2 Ορισμός του ελαιολάδου

Ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται αποκλειστικά με μηχανικές ή φυσικές μεθόδους, από τον καρπό της Ευρωπαϊκής ελιάς (*Olea Europaea*), σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες οι οποίες δεν προκαλούν αλλοίωση των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου [3].

1.3 Κατηγορίες ελαιολάδου

Σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες ελαιολάδου, τα παρθένα ελαιόλαδα τα οποία έχουν τέσσερις υποκατηγορίες, το εξευγενισμένο, και το ελαιόλαδο. Οι κατηγορίες αυτές παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω [3].

1.3.1 Παρθένα ελαιόλαδα

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες ιδίως θερμικές, οι οποίες δεν συνεπάγονται αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της καθίζησης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης, εξαιρουμένων των ελαίων που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και κάθε μίγματος με έλαια άλλης φύσης [3].

Τα έλαια τα οποία ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία χωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες ανάλογα με το βαθμό οργανοληπτικής τους αξιολόγησης και την ελεύθερη οξύτητα εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ.

α) Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο

Το παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 6,5, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 1g ανά 100g ελαιολάδου, και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [3].

β) Παρθένο ελαιόλαδο

Το παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 5,5, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 2g ανά 100g ελαιολάδου, και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. Στο στάδιο της παραγωγής και του χονδρικού εμπορίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο χαρακτηρισμός «Εκλεκτό» [3].

γ) Κοινό παρθένο ελαιόλαδο

Το παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 3,5, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 3,3g ανά 100g ελαιολάδου, και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [3].

δ)Μειονεκτικό (LAMPANTE) παρθένο ελαιόλαδο

Το παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 3,5, ή/και του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 3,3 g ανά 100 γρ ελαιολάδου, και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [3].

1.3.2 Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ελαιόλαδα τα οποία λαμβάνονται από εξευγενισμό παρθένου ελαιόλαδου, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,5g στα 100g ελαιολάδου, και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [3].

1.3.3 Ελαιόλαδο

Ελαιόλαδα τα οποία προέρχονται από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένου ελαιόλαδου, εξαιρουμένου του μειονεκτικού, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 1,5g ανά 100g ελαιόλαδου, και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [3].

1.3.4 Βιομηχανικό ελαιόλαδο

Η ονομασία αυτή δίνεται σε ελαιόλαδα και σε εξευγενισμένα ελαιόλαδα (ραφινέ), με δυσάρεστους οργανοληπτικούς χαρακτήρες ή/και οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα καθοριζόμενα όρια της κάθε κατηγορίας. Τα ελαιόλαδα της συγκεκριμένης κατηγορίας δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παρασκευή προϊόντων διατροφής. Χαρακτηριστικά, σε αυτή την κατηγορία υπάγονται τα ελαιόλαδα τα οποία έχουν παλμιτικό οξύ σε θέση 2 των τριγλυκεριδίων ανώτερο του 2,2%, το οποίο σημαίνει πως έχουν υποστεί αλλοίωση της μοριακής τους σύστασης, έχουν χωματέλαια, μουργέλαια και άλλα δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα ελαιόλαδα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ως πρώτη ύλη για την Παρασκευή άλλων βιομηχανικών προϊόντων (σαπούνια, γλυκερίνη) [2].

Πίνακας 1: Επιτρεπόμενα όρια των χαρακτηριστικών του ελαιολάδου βάση του Κανονισμού (ΕΟΚ) 2568/91 [3]

Κατηγορία	Εξαιρετικά Παρθένο ελαιόλαδο	Παρθένο ελαιόλαδο	Κοινό Παρθένο ελαιόλαδο	Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο
Οξύτητα (%)	≤ 1,0	≤ 2,0	≤ 3,3	>3,3	≤ 0,5	≤ 1,5
K270	≤ 0,20	≤ 0,25	≤ 0,25	>0,25	≤ 1,20	≤ 1,00
K270 υπεράνω αλουμίνας	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,11	-	-
ΔΚ	≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01	-	≤ 0,16	≤ 0,13
K232	≤ 2,50	≤ 2,60	≤ 2,60	≤ 3,70	≤ 3,40	≤ 3,30
Δείκτης υπεροξειδίων(meqO₂/kg)	≤ 20	≤ 20	≤ 20	>20	≤ 5	≤ 15
Οργανοληπτική αξιολόγηση	≥ 6,5	≥ 5,5	≥ 3,5	< 3,5	-	-
Αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες (mg/kg)	≤ 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20	>0,20	≤ 0,20	≤ 0,20
Μυριστικό οξύ %	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05
Λινολενικό οξύ %	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9
Αραχιδικό οξύ %	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6
Εικοσενοϊκό οξύ %	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4
Βεχενικό οξύ %	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2
Λιγνοκηρικό οξύ %	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2
Σύνολο trans ισομερών του ελαϊκού οξέος %	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,20	≤ 0,20
Σύνολο trans ισομερών του λινελαϊκού + του λινολενικού οξέος %	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,30	≤ 0,30
Κεκορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 των τριγλυκεριδίων %	≤ 1,3	≤ 1,3	≤ 1,3	≤ 1,3	≤ 1,5	≤ 1,5
Στιγμασταδιένιαmg/kg	≤ 0,15	≤ 0,15	≤ 0,15	≤ 0,50	-	-
Κήροι (mg/kg)	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 350	≤ 350	≤ 350

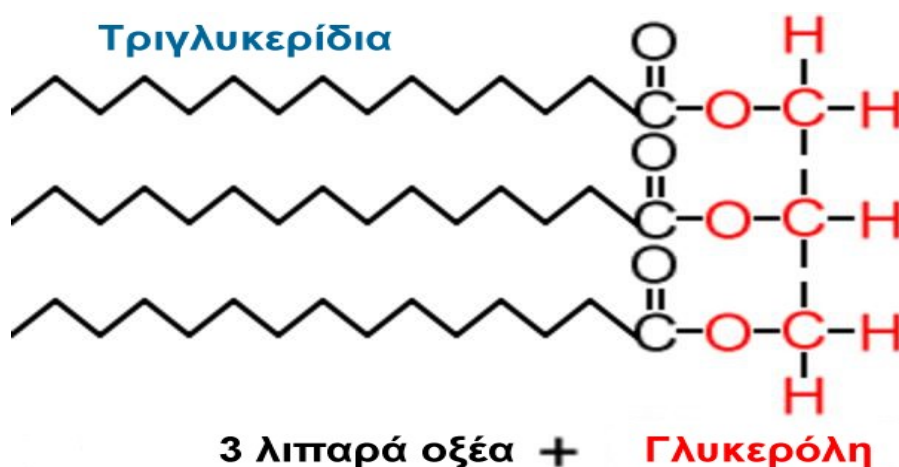
Κατηγορία	Εξαιρετικά Παρθένο ελαιόλαδο	Παρθένο ελαιόλαδο	Κοινό Παρθένο ελαιόλαδο	Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο
Σύνολο Στερολών (mg/kg)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Χοληστερόλη %	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Βρασσικαστερόλη %	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1
Καμπεστερόλη %	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0
Στιγμαστερόλη %	<Καμπε-στερόλη	<Καμπε-στερόλη	<Καμπε-στερόλη	<Καμπε-στερόλη	<Καμπε-στερόλη	<Καμπεστερόλη
β-Σιτοστερόλη %	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0
Δ7-Στιγμαστενόλη %	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Ερυθροδιόλη + Ουβαόλη %	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
Υγρασία και πτητικές ουσίες %	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,1	≤ 0,1
Αδιάλυτες ύλες στον πετρελαϊκό αιθέρα %	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05
Διαφορά ECN 42 – HPLC και ECN 42 θεωρητικός υπολογισμός	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3

1.4 Σύσταση του ελαιολάδου

Η σύσταση του ελαίου το οποίο προέρχεται από τον καρπό της ελιάς (*Olea Europea*), χωρίζεται σε δύο κλάσματα. Στο πρώτο κλάσμα, το οποίο είναι σαπωνοποιήσιμο, περιέχονται κυρίως λιπαρά οξέα, μόνο-, δι- και τριγλυκερίδια, τα οποία απαρτίζουν το 98,5-99,5 % της σύστασης του ελαιολάδου. Στο δεύτερο μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα, περιέχονται τα υπόλοιπα συστατικά του ελαιολάδου τα οποία είναι οι υδρογονάνθρακες, σκουαλένιο, καροτενοειδή (λουτεΐνη, β-καροτένιο), τριτερπενοειδή οξέα, φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες, χρωστικές ουσίες, αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες, πτητικές και αρωματικές ενώσεις, καθώς και αλλά δευτερεύοντα συστατικά [3].

1.4.1 Τριγλυκερίδια

Τα τριγλυκερίδια (ή αλλιώς οι τριακυλογλυκερόλες) αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των συστατικών του ελαιολάδου, με την ποσοστιαία περιεκτικότητά τους σε αυτό να κυμαίνεται στα 95-98 % [4]. Τα τριγλυκερίδια είναι εστέρες της τριϋδρικής αλκοόλης της γλυκερόλης, στις οποίες οι τρεις υδροξυλομάδες εστεροποιούνται με λιπαρά οξέα όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [5].



Εικόνα 1: Δομή τριγλυκεριδίων

Τα τριγλυκερίδια τα οποία συναντώνται σε μεγαλύτερη αφθονία στο ελαιόλαδο είναι τα OOO (40-59 %), POO (12-20 %), OOL (12,5-20 %), POL (5-5,7 %) και SOO (3-7 %). Σε μικρότερα ποσοστά συναντώνται POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO και LLL (οι αναλυτικές ονομασίες των τριγλυκεριδίων που αναγράφονται βρίσκονται στον πίνακα Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια στο τέλος της εργασίας).

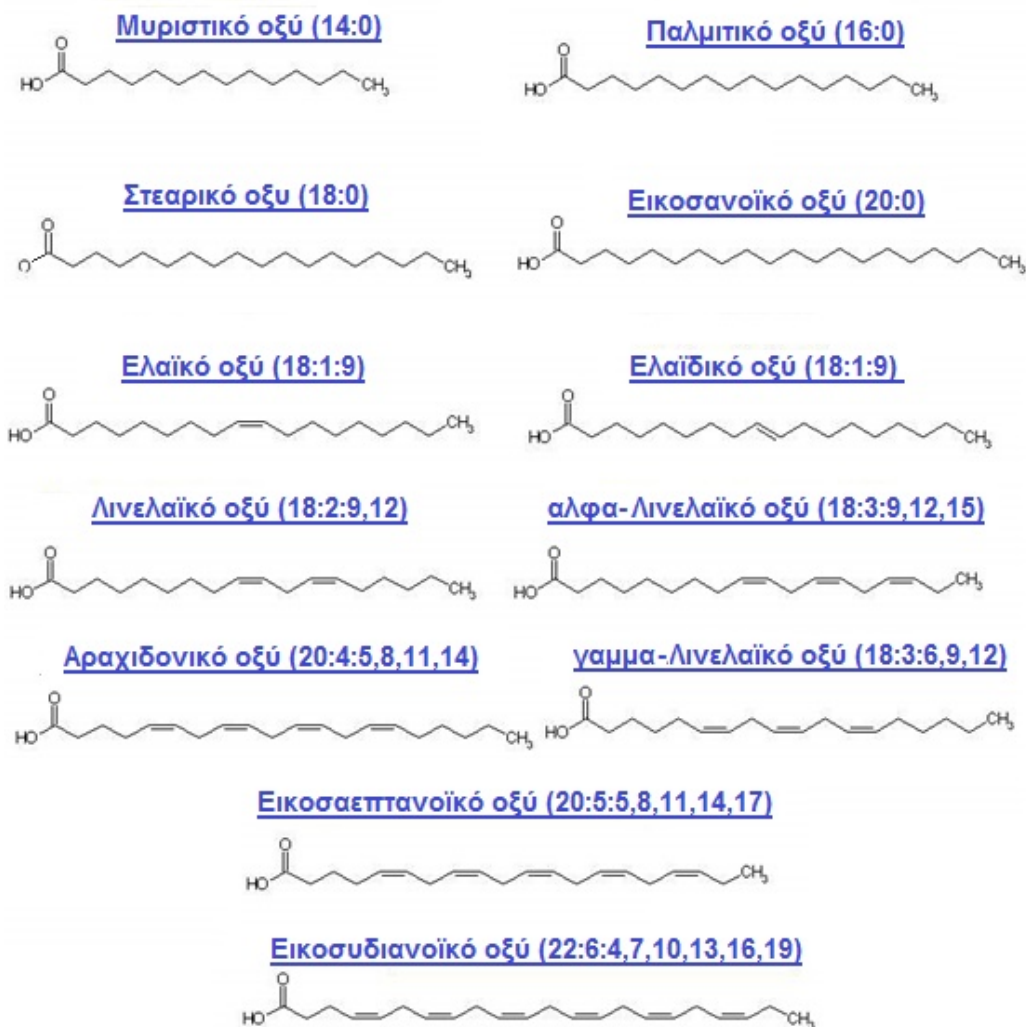
Το ελαιόλαδο όπως και τα υπόλοιπα φυτικά έλαια, έχει υψηλές συγκεντρώσεις μορίων τριγλυκεριδίων τα οποία έχουν στη θέση 2-ολεϊκό οξύ και μικρότερες συγκεντρώσεις μορίων με παλμιτικό και στεατικό οξύ στη θέση 2-. Συνήθως το παλμιτικό και στεατικό οξύ δεν εντοπίζονται στη θέση 2- σε μόρια τα οποία είναι ακόρεστα ή έχουν περισσότερους από πέντε διπλούς δεσμούς στο μόριο τους. Η τριλινολεϊνή ή αλλιώς η τριακυλογλυκερόλη η οποία έχει ισοδύναμο αριθμό αλυσίδας (Equivalent Chain Number, ECN) 42, χρησιμοποιείται σαν δείκτης αυθεντικότητας του ελαιολάδου από την Ευρωπαϊκή Ένωση, και προσδιορίζεται από τον υπολογισμό του αθροίσματος των ποσοτήτων των LLL, PoPoPo, SLnLn, PoPoL, PPoln, OLLn, PLLn και PoOLn τα οποία περιλαμβάνουν και τα πιθανά ισομερή μόρια της τριολεϊνης. Σε μεθόδους υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC), τα μόρια εκλούνται βάση του ECN [2].

1.4.2 Λιπαρά Οξέα

Λιπαρά οξέα ονομάζονται τα οξέα που περιέχουν μια μεγάλη ανθρακική αλυσίδα, με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα, και μια καρβοξυλομάδα (-COOH) στην μια τους πλευρά. Τα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται στο ελαιόλαδο είναι κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητάς τους ορίζει το είδος του ελαιολάδου, καθώς μέσω αυτής βρίσκουμε την ελεύθερη οξύτητα του που εκφράζεται ως προς ελαϊκό οξύ, αλλά και την καταλληλότητά του ως βρώσιμο προϊόν(trans-λιπαρά οξέα)[6].

Ορισμένα από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο είναι το Λαυρικό οξύ (C12:0), Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Στεατικό οξύ (C18:0), Αραχιδικό οξύ (C20:0), Επταδεκανοϊκό οξύ (C17:0), Βεχενικό οξύ (C22:0), και Λιγνοκηρικό οξύ (C24:0) [2].

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο είναι το Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Επταδεκενοϊκό οξύ (C17:1), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινολεϊκό οξύ (C18:2), Λινολενικό οξύ (C18:3), Εικοσεναϊκό οξύ (C20:1), και Ερουκικό οξύ (C22:1). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζονται τα βασικότερα λιπαρά οξέα που εντοπίζονται σε φυτικά έλαια [7].



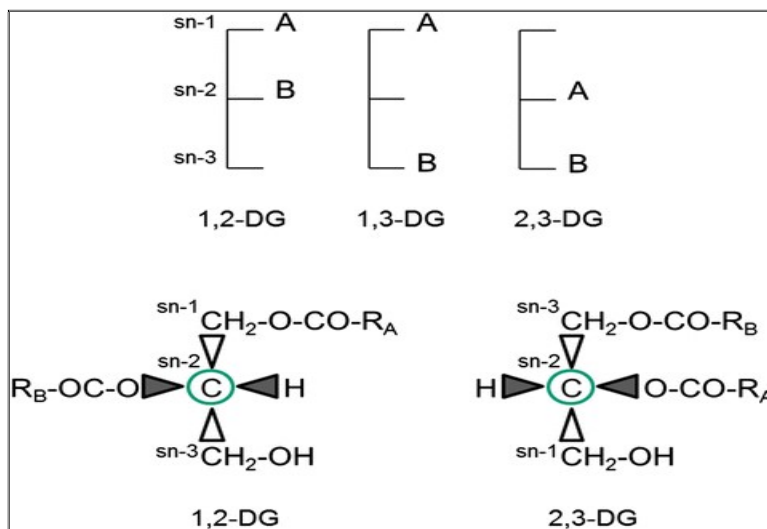
Εικόνα 2: Λιπαρά οξέα

Η σύσταση των λιπαρών οξέων διαφέρει από δείγμα σε δείγμα ελαιολάδου. Οι διαφορές αυτές στην περιεκτικότητα τους εξαρτώνται από την γεωγραφική θέση του δέντρου της ελιάς, το υψόμετρο, το κλίμα, την ποικιλία της ελιάς,

αλλά και το στάδιο ωριμότητας του καρπού πριν την κατεργασία του προς την παραγωγή του ελαιολάδου [2,8]. Τα κύρια λιπαρά οξέα, που βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα είναι το ελαϊκό οξύ, το παλμιτικό και το λινελαϊκό οξύ. Κατά τον προσδιορισμό των περιεκτικότητων αυτών των λιπαρών οξέων, τα ελαιόλαδα κατατάσσονται σε 2 κατηγορίες, στα ελαιόλαδα με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και χαμηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό και λινελαϊκό, και στα ελαιόλαδα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και υψηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό και λινολεϊκό.

1.4.3 Διγλυκερίδια

Τα διγλυκερίδια (ή αλλιώς διάκυλογλυκερόλες) βρίσκονται σε ποσοστό 1-2,8 % στο ελαιόλαδο. Είναι προϊόντα ατελούς βιοσύνθεσης ή υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων [6]. Τα διγλυκερίδια είναι εστέρες της τριϋδρικής αλκοόλης της γλυκερόλης, στις οποίες οι δύο υδροξυλομάδες εστεροποιούνται με λιπαρά οξέα, σχηματίζοντας πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς διακυλογλυκερολών [9]. Οι δομές στις οποίες μπορούν να υπάρχουν παρουσιάζονται στην Εικόνα 3:



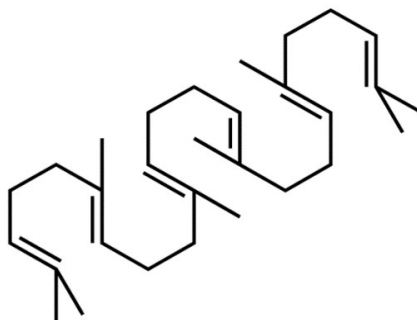
Εικόνα 3: Στεreoχημικές δομές διακυλογλυκερολών [10]

Τα διγλυκερίδια στο ελαιόλαδο παράγονται μέσω της γλυκερόλυσης και της αλκοόλυσης των τριγλυκεριδίων. Το μίγμα που προκύπτει μετά από τις συγκεκριμένες χημικές διεργασίες περιέχει μόνο- δι- και τριγλυκερίδια. Τα

διγλυκερίδια τα οποία συνήθως προκύπτουν είναι τα 1,2- και 1,3-διγλυκερίδια. Κατά τη σύνθεση των διγλυκεριδίων η αλυσίδα που υπάρχει στον sn-2 άνθρακα των 1,2- και 2,3-διγλυκεριδίων υπόκειται σε μία αυθόρμητη μετατόπιση προς τον sn-3 άνθρακα του μορίου σχηματίζοντας έτσι ένα νέο μόριο 1,3-διγλυκεριδίου.

1.4.4 Υδρογονάνθρακες

Οι υδρογονάνθρακες εντοπίζονται στο μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα του ελαιολάδου. Το σκουαλένιο και το β-καροτένιο είναι οι υδρογονάνθρακες οι οποίοι εντοπίζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο ελαιολάδο, ενώ σε μικρότερες ποσότητες εντοπίζονται διτερπένια, τριτερπένια, πολυφαινόλες, n-παραφίνες και ισοπρενοειδή [11]. Το β-καροτένιο αποτελεί μία από τις πιο γνωστές χρωστικές ουσίες οι οποίες ανιχνεύονται στο ελαιολάδο [2]. Το σκουαλένιο αποτελεί περίπου το 90 % του υδρογονανθρακικού κλάσματος και είναι ο τελευταίος μεταβολίτης που προηγείται του σχηματισμού της στερόλης. Η συγκέντρωσή του κυμαίνεται μεταξύ 200-7500 mg/kg, ενώ έχουν υπάρξει αναφορές ακόμα και για 12.000 mg/kg. Το μεγάλο αυτό εύρος τιμών έχει σχέση με την εξάρτηση της ποσότητας του σκουαλενίου από τον τρόπο ελαιοποίησης και την ποικιλία του ελαιόδεντρου. Στα ραφιναρισμένα ελαιολάδα, η συγκέντρωση του σκουαλενίου είναι χαμηλότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες ελαιολάδου, δεδομένο το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο νοθείας του ελαιολάδου με άλλα φυτικά έλαια κατώτερης ποιότητας [11]. Τέλος, το σκουαλένιο συμβάλει σημαντικά στο ρόλο του ελαιολάδου στην χημειοπρόληψη εναντίων πολλών μορφών καρκίνου [2].



Εικόνα 4: Σκουαλένιο [12]

1.4.5 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν πολικά συστατικά τα οποία βρίσκονται στο ελαιόλαδο και εκχυλίζονται με τη μίξη του ελαιολάδου με διάλυμα μεθανόλης-νερού [13]. Η περιεκτικότητά τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται από την γεωγραφική θέση του δέντρου της ελιάς, το υψόμετρο, το κλίμα, την ποικιλία της ελιάς, αλλά και το στάδιο ωριμότητας του καρπού πριν την κατεργασία του προς την παραγωγή του ελαιολάδου [14].

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν τη δομική λίθο στη συσχέτιση της διατροφής με την υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις συμβάλουν ευεργετικά για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης παθήσεων όπως καρδιαγγειακής νόσου και καρκίνου, έχουν αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, αντιδιαβητική δράση, αντικαρκινική δράση, αντιμικροβιακή δράση, αντιπικρή δράση, προστασία δέρματος και αντιγηραντική δράση [15-17]. Για αυτό το λόγο γίνονται προσπάθειες εμπλουτισμού της καθημερινής διατροφής με τροφές οι οποίες είναι πλούσιες σε φαινολικές ενώσεις όπως είναι το ελαιόλαδο. Από αυτή την μεγάλη οικογένεια ενώσεων οι πολυφαινόλες έχουν συσχετιστεί με τη σταθερότητα και τη βιολογική σύσταση του ελαιολάδου λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Οργανοληπτικά, οι φαινολικές ενώσεις προσδίδουν πικρή και στυφή γεύση στο ελαιόλαδο, και ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε αυτό προσδίδουν μία έντονη οσμή.

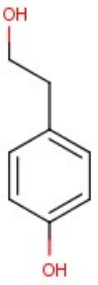
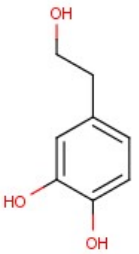
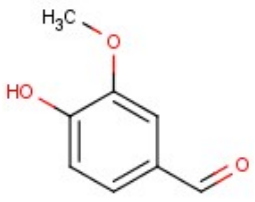
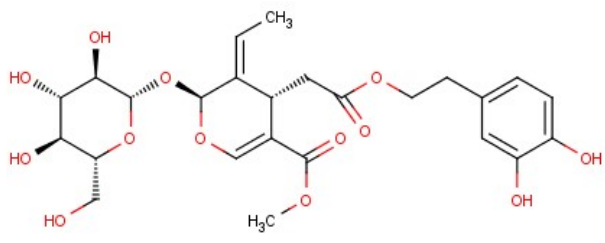
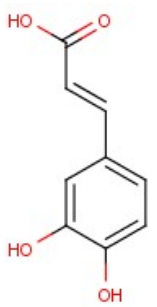
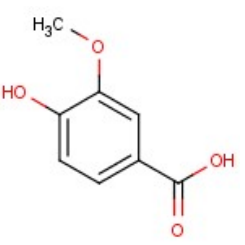
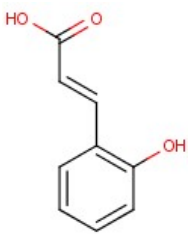
Οι φαινολικές ενώσεις χωρίζονται σε 6 κύριες κατηγορίες [2, 18-21]:

- 1) Απλές φαινόλες
- 2) Φαινολικά οξέα
- 3) Φλαβονοειδή
- 4) Σεκοροϊριδοειδή
- 5) Λιγνάνες
- 6) Υδρόξυ-ισοχρωμάνες

Πίνακας 2: Χαρακτηρίστηκες ενώσεις για της κατηγορίες των φαινολών

Κατηγορία	Χαρακτηριστικές Ενώσεις
Φαινολικά οξέα	Βανιλλικό οξύ, γαλλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, o-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, συριγγικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, συναπτικό οξύ, ομοβανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, 4-υδροξυφαινυλο-αιθανικό οξύ, ελενολικό οξύ
Απλές φαινόλες	Υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βανιλίνη
Φλαβονοειδή	Λουτεολίνη, απιγενίνη, ρουτίνη, 7-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, κερκετίνη
Σεκοϊροειδοειδή	Ελαιοευρωπαΐνη, άγλυκη ελαιοευρωπαΐνη, λινγκσροσίνη, άγλυκη λινγκστροσίνη, ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη
Λιγνάνες	Πινορεζινόλη, 1-ακετοξυ-πινορεζινόλη
Υδροξυ-ισοχρωμάνες	1-φαίνυλο-6,7-διυδροξυ ισοχρωμάνη, 1-(3- μεθόξυ-4-υδρόξυ)φαινυλο-6,7-διυδροξυ ισοχρωμάνη

Πίνακας 3: Μοριακές απεικονίσεις φαινολών

<u>Απλές φαινόλες</u>		
		
Τυροσόλη	Υδροxyτυροσόλη	Βανιλίνη
<u>Σεκοϊροϊδοειδή</u>		
Ελαιευρωπαΐνη		
		
<u>Φαινολικά οξέα</u>		
		
Καφεϊκό οξύ	Βανιλλικό οξύ	ο-κουμαρικό οξύ

1.4.6 Χρωστικές ουσίες

Το χρώμα του ελαιολάδου οφείλεται στις χρωστικές ουσίες οι οποίες το απαρτίζουν. Συνήθως είναι μεταξύ πράσινων και κίτρινων αποχρώσεων, οι οποίες εξαρτώνται από το στάδιο ωρίμανσης, την ποικιλία του καρπού, τη μέθοδο εκχύλισης, την ζώνη παραγωγής της ελιάς και τις συνθήκες φύλαξης του παραγόμενου ελαιολάδου. Οι χρώσεις του ελαιολάδου οφείλονται στην περιεκτικότητα του σε χλωροφύλλες και καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες είναι οι χρωστικές οι οποίες προσδίδουν το πράσινο χρώμα στο ελαιόλαδο και εντοπίζονται κυρίως ως φαιοφυτίνες, με την α-φαιοφυτίνη να είναι σε μεγαλύτερη σε περιεκτικότητα. Σε συνθήκες μακροχρόνιας φύλαξης του ελαιολάδου ή σε συνθήκες έκθεσης του στον ατμοσφαιρικό αέρα για μεγάλο διάστημα έχει παρατηρηθεί η παραγωγή προϊόντων αποικοδόμησης των φαιοφυτινών όπως είναι διάφορα επιμερή, πυρο-μορφές και αλλομερή, με αποτέλεσμα οι πράσινες χρωστικές ουσίες του ελαιολάδου να χάνονται και να παρατηρείται αποχρωματισμός του ελαιολάδου. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί η ηλικία και η σωστή φύλαξη των ελαιολάδων εμπειρικά, καθώς τα φρέσκα ελαιόλαδα είναι πλούσια σε χλωροφύλλες.

Τα καροτενοειδή είναι κίτρινες χρωστικές ουσίες οι οποίες ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο. Τα κυριότερα καροτενοειδή στο ελαιόλαδο είναι η λουτεΐνη και το β-καροτένιο. Η συγκέντρωσή τους επηρεάζεται από τους ίδιους παράγοντες που προαναφέρθηκαν για τις πράσινες χρωστικές ουσίες και ο αντιοξειδωτικός τους ρόλος συνδέεται με αυτόν των τοκοφερολών [22]. Άξιο να αναφερθεί είναι ότι, στα καροτενοειδή του ελαιολάδου εντοπίζονται και πολλές ξανθοφύλλες όπως είναι η βιολαξανθίνη, η νεοξανθίνη, η λουτεοξανθίνη, η ανθεραξανθίνη, η μουτατοξανθίνη και η β-κρυπτοξανθίνη. Ο λόγος μεταξύ των μεγάλων αυτών οικογενειών των καροτενοειδών ενώσεων εξαρτάται από την ποικιλία του ελαιοκαρπού [2].

1.4.7 Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι ουσίες οι οποίες έχουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα από τις 8 τοκοφερόλες που απαρτίζουν την οικογένεια της «Βιταμίνης-E», Μόνο τέσσερις συναντώνται στο ελαιόλαδο, με την α-τοκοφερόλη να καταλαμβάνει το 90% της ολικής συγκέντρωσης των τοκοφερολών. Η συγκέντρωση της α-

τοκοφερόλης συνήθως είναι πάνω από 100mg/kg και μπορεί να βρεθεί και μέχρι 300mg/kg, η γ-τοκοφερόλη περίπου 20mg/kg και η β- και δ-τοκοφερόλη κοντά στα 10mg/kg[2,23]. Η συγκέντρωση των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο επηρεάζεται από το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς καθώς και από τη μέθοδο ελαιοποίησης του καρπού. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι κατά τις διαδικασίες υδρογόνωσης και εξευγενισμού, η συγκέντρωση των τοκοφερολών μειώνεται.

1.4.8 Αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες

Οι αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες στο ελαιόλαδο συναντώνται σε ελεύθερη ή εστεροποιημένη μορφή. Οι κυριότερες είναι οι λιπαρές αλκοόλες και οι διτερπενοειδής αλκοόλες. Στο πτητικό κλάσμα του ελαιολάδου εντοπίζονται αλκοόλες και αλκενόλες (δηλαδή αλκοόλες με έναν διπλό δεσμό), με λιγότερα από δέκα άτομα άνθρακα στην ανθρακική τους αλυσίδα [2].

Οι λιπαρές αλκοόλες είναι ευθύγραμμες κορεσμένες αλκοόλες με περισσότερα από 16 άτομα άνθρακα. Οι κυριότερες που έχουν ταυτοποιηθεί στο ελαιόλαδο είναι η εικασιδουανόλη, η εικοσιτετρανόλη, η εικοσιεξανόλη και η εικοσιεξανόλη. Μέσω του προσδιορισμού της περιεκτικότητας των εστεροποιημένων λιπαρών αλκοολών με λιπαρά οξέα γίνεται η διαφοροποίηση των ελαιολάδων στις διάφορες κατηγορίες του [2].

Οι κυριότερες διτερπενοειδείς αλκοόλες στο ελαιόλαδο είναι η φυτόλη και τογεραυλογερανόλιο. Τα προσδιοριζόμενα επίπεδά τους χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του αλκοολικού δείκτη, η οποία είναι μια χρήσιμη παράμετρος για την ταυτοποίηση ελαιολάδων τα οποία έχουν επεξεργασθεί με χημικούς διαλύτες κατά την παραγωγή τους [2].

1.4.9 Στερόλες

Οι στερόλες οι οποίες εντοπίζονται στο ελαιόλαδο χωρίζονται σε 4 κατηγορίες, τις κοινές στερόλες, τις 4α-μεθυλοστερόλες, τις τριτερπενοειδείς αλκοόλες και τις τριτερπενοειδείς διαλκοόλες. Η περιεκτικότητά τους στο ελαιόλαδο εξαρτάται από την ποικιλία του ελαιοκαρπού αλλά και από το τρόπο επεξεργασίας του καρπού για την εκχύλιση του ελαιόλαδου. Ο προσδιορισμός

της συγκέντρωσή τους στα δείγματα του ελαιολάδου αποτελεί δείκτη για τον έλεγχο γνησιότητας του ελαιολάδου [2].

1.4.10 Τριτερπενοειδή οξέα

Τα υδροξυπεντακυκλικά τριτερπενοειδή οξέα αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις στο ελαιόλαδο οι οποίες έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία. Βρίσκονται σε μικρές ποσότητες συνήθως στο ελαιόλαδο και τα κυριότερα τερπενοειδή οξέα τα οποία ανιχνεύονται είναι το ολεανολικό και το μασλινικό οξύ. Η περιεκτικότητά τους επηρεάζεται σε περιπτώσεις επεξεργασίας ραφινάρισματος [2].

1.4.11 Πτητικές και αρωματικές ενώσεις

Στις πτητικές ενώσεις, οι οποίες έχουν προσδιορισθεί στο ελαιόλαδο, ανήκουν ενώσεις υδρογονανθράκων, αλδεϋδών, κετονών, αλκοολών, οξέων, εστέρων, αιθέρων, πυραζονών, θειολών, πυραζανών και παράγωγες ενώσεις φουρανίου και θειοφαινίου. Συνολικά έχουν αναγνωρισθεί διακόσιες ογδόντα πτητικές ενώσεις στο ελαιόλαδο, εκ των οποίων οι 67 μόνο συμβάλουν στο άρωμά. Αυτό συμβαίνει λόγω των υψηλών περιεκτικότητων τους στο ελαιόλαδο σε σχέση με τις υπόλοιπες οι οποίες βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες [2].

1.4.12 Άλλα δευτερεύοντα συστατικά

Τα υπόλοιπα συστατικά τα οποία συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι τα φωσφολιπίδια και οι πρωτεΐνες. Αυτές οι δύο ομάδες ενώσεων βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο ελαιόλαδο καθώς το μεγαλύτερο μέρος αυτών, απομακρύνεται κατά τις διεργασίες φιλτραρίσματος και ραφινάρισματος του ελαιολάδου [2].

1.5 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο προσδιορισμός των διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων σε δείγματα ελαιολάδου. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων έγινε μελέτη της πρότυπης μεθόδου ISO 29822:2009 με αεριοχρωματογραφία, σε ανιχνευτές συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (GC-MS/MS) και ιοντισμού φλόγας (GC-FID). Για τα

τριγλυκερίδια, έγινε ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού σε σύστημα υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών. Και οι δύο οικογένειες ενώσεων στο ελαιόλαδο έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια. Ο προσδιορισμός τους συνδέεται με την ποιότητα του ελαιολάδου και τη διατροφική του αξία άμεσα, καθώς μέσω του προσδιορισμού τους μπορεί να γίνει διαπίστωση νοθείας του ελαιολάδου, της φρεσκότητας του αλλά και της καταλληλότητας του για βρώση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό διγλυκεριδίων

Για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση με σκοπό την εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου προσδιορισμού. Τα δεδομένα τα οποία ανακτήθηκαν από την ανασκόπηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων

<i>Ενώσεις - Μήτρα</i>	<i>Προκατεργασία δείγματος</i>	<i>Τεχνική</i>	<i>Βιβλιογραφία</i>
1,2-διγλυκερίδια, 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	0,1 g δείγματος και 1 mL τολουόλιο. Εκχύλιση: SPE, Silica 60, διαλύτης έκλουσης 2,5 mL διαίθυλαιθέρα Ξήρανση υπό άζωτο Αντιδραστήριο σιλανοποίησης: HDMS+TMCS+Πυριδίνη Τελική σύσταση διαλύματος: 1 mL ακετόνη	GC-FID Στήλη: Restek RTX5, 60 m, εσωτερική διάμετρος 0,25 mm, πάχος στιβάδας 0,1 μm Φέρον αέριο: Υδρογόνο	[10]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Σύμφωνα με το ISO 29822:2009 0,1 g δείγματος και 1 mL τολουόλιου Εκχύλιση: SPE, Silica 60, διαλύτης έκλουσης 7 mL διεθυλαιθέρα Ξήρανση υπό άζωτο Προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου σιλανοποίησης 3:1:9-Sylon™ HPT Τελική σύσταση διαλύματος 1 mL ακετόνη	GC-FID Στήλη: SGE BP5 30 m, εσωτερική διάμετρος 0.25 mm, 0.25 μm πάχος στοιβάδας	[24]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	100 mg δείγματος με 500 μL διλαουρίνης 2 rrb ως εσωτερικό πρότυπο Προσθήκη 0,2 mL 3:1:9 HPT ως αντιδραστήριο σιλανοποίησης Ξήρανση υπό άζωτο Τελική σύσταση διαλύματος 200 μL n-εξάνιο Φυγοκέντρηση στα 2000 rpm για ένα λεπτό.	GC-FID Στήλη: RTX65-TG, 30 m, εσωτερική διάμετρος 0,25 mm, 0,1 μm πάχος στιβάδας 35 % διμεθυλ-65 % διφενυλ- πολυσιλοξάνιο Φέρον αέριο: Ήλιο	[25]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	1mg δείγματος με 100 μL 3:1:9 HPT Χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η τριπενταδεκανοΐνη	HEGC-FID Στήλη: SE25 , 25 m, εσωτερική διάμετρος 0,32 mm, 0,15 μm πάχος Φέρον αέριο: Υδρογόνο	[26]
Χαρτογράφηση ελαιόλαδου	40 μL δείγματος σε 20 μL δευτεριομένου χλωροφορμίου	NMR ¹ H Καταγραφή φάσματος με παλμό 6,7 ms, με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 7 s, 32 σαρώσεις, φασματικό πλάτος 7100 Hz και χωρίς περιστροφή του δείγματος. Τα φάσματα μελετήθηκαν στην περιοχή 0 ppm με 10 ppm	[27]

Ενώσεις - Μήτρα	Προκατεργασία δείγματος	Τεχνική	Βιβλιογραφία
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Διαφορετικές ποσότητες από κάθε πρότυπο διαλύθηκαν σε 400 μ L δευτεριωμένου χλωροφορμίου με τετραμεθυλοσιλάνιο ως εσωτερικό πρότυπο.	NMR ¹ H Συχνότητα: 400 MHz Καταγραφή φάσματος: με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 3 s, 64 σαρώσεις, φασματικό πλάτος 6410 Hz και εύρος παλμού 90°.	[28]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	100 mL με πυριδίνη και CDCl ₃ με αναλογία δείγματος 1:15 περιέχοντας περίπου 0,1 mL εξαφθοροβενζόλιο. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το 4-tert-βουτυλοφαινόλη (Α διάλυμα) 400 mg δείγματος αναμίχθηκαν με 2 mL από το παραπάνω διάλυμα (Β διάλυμα) Σε ένα σωλήνα του NMR τοποθετήθηκαν 0,4 mL του Α διαλύματος και 30 μ L του Β	NMR ¹⁹ F Συχνότητα: 470 MHz για το φθόριο-19 Καταγραφή φάσματος με εύρος παλμού 90° για 19,3 μ s , με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 1 s, 16 σαρώσεις και εύρος φάσματος 212 ppm. Έγινε ρύθμιση μηδενικής βάσης 0,3 Hz συντελεστή διεύρυνσης γραμμής πριν τον μετασχηματισμό Fourier	[29]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	100 mg δείγματος 1 μίτολουολίου Εκχύλιση: SPE, Silica 60, διαλύτης έκλουσης 7 mL 3,5 μλιδιαιθυλαίθρα Εξάτμιση σε περιστρεφόμενο αποστακτήρα και στη συνέχεια μέχρι ξηρού υπό άζωτο Προσθήκη 200 μ l αντιδραστηρίου σιλανιποίησης Τελική σύσταση διαλύματος 1 ml ακετόνης.	GC-FID Στήλη: Restek RTX5, 60 m, εσωτερική διάμετρος 0,25 mm, πάχος στιβάδας 0,1 μ m Φέρον αέριο: Υδρογόνο Αέριο για το FID: Υδρογόνο	[30]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	20 μ L δείγματος σε 20 μ L DMSO και 700 μ L δευτεριωμένου CDCl ₃	NMR ¹ H Συχνότητα: 600,13 MHz Καταγραφή φάσματος με εύρος παλμού 90° για 8 μ s , με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 3,5 s, 1024 σαρώσεις και εύρος φάσματος 18.5 ppm.	[31]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Το δείγμα διαλύθηκε σε ακετόνη ώστε να προκύψει διάλυμα με περιεκτικότητα 5 % v/v	HPLC-RI Στήλη: RP Hypersil ODS 250 mm, εσωτερική διάμετρος 4,6 mm, πάχος στιβάδας 5 μ m Διαλύτες: Ακετονιτρίλιο-Ακετόνη 55/45 v/v ισοκρατική έκλυση με ροή 2 mL/min	[32]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Τα δείγματα ελαιολάδου διαλύθηκαν σε διάφορες αναλογίες διαλυτών n-εξανίου και ισοπροπυλικής αλκοόλης	HPLC-RI Στήλη: Zorbax C-18 250 mm, εσωτερική διάμετρος 4,6 mm, πάχος στιβάδας 5 μ m Διαλύτες: n-εξάνιο:ισοπροπυλική αλκοόλη 4:5 v/v με ροή 1 mL/min	[33]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Σε 10 mL διαλύματος πυριδίνης και CDCl ₃ σε αναλογία 1,6:1 προστίθενται 0,6 mg ακετυλακετονιομένου χρωμίου, Cr(acac) ₃ , και 13,5 mg κυκλοεξανόλης (13,47 mM) 150 mg δείγματος διαλύονται σε 0,4 mL του προηγούμενου διαλύματος και 15 μ L 2-χλωρο-4,4,5,5-τετραμεθυλδιοξαφσφολάνη	NMR ³¹ P Συχνότητα: 202,6 MHz Καταγραφή φάσματος με εύρος παλμού 90° για 12,5 μ s , με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 30 s, σαρώσεις με συχνότητα 10 kHz.	[34]

Ενώσεις - Μήτρα	Προκατεργασία δείγματος	Τεχνική	Βιβλιογραφία
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Σε 10 mL διαλύματος πυριδίνης και CDCl_3 σε αναλογία 1,6:1 προστίθενται 0,6 mg ακετυλακετονιομένου χρωμίου, $\text{Cr}(\text{acac})_3$, και 13,5 mg κυκλοεξανόλης (13,47 mM) 150 mg δείγματος διαλύονται σε 0,4 mL του προηγούμενου διαλύματος και 15 μL 2-χλωρο-4,4,5,5-τετραμυθυλδιοξαφσφολάνη	NMR ^{31}P Συχνότητα: 202,6 MHz Καταγραφή φάσματος με εύρος παλμού 90° για 12,5 μs , με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 30 s, 10 kHz. NMR ^1H Συχνότητα: 500 MHz και 400 MHz αντίστοιχα Καταγραφή φάσματος με εύρος παλμού 90° για 10 μs και 9,3 μs αντίστοιχα, με συνολικό χρόνο χαλάρωσης 2 s, 64 σαρώσεις και εύρος σάρωσης 12 ppm.	[35]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	0,1 g δείγματος και 1 mL τολουολίου Εκχύλιση: SPE, Silica 60, διαλύτης έκλουσης 7 mL διεθλαιθέρα Εξάτμιση υπό άζωτο Προσθήκη 100 μL διαλύματος σιλανοποίησης (1-methylimidazole: MSHFBA, 1:20 Προσθήκη 900 μL ακετόνης	GC-MS Στήλη: DB-5HT, 30 m, εσωτερική διάμετρος 0,25 mm, πάχος στιβάδας 0,1 μm Φέρον αέριο: Ήλιο	[36]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Τα δείγματα διαλύθηκαν σε μεθανόλη με τελική περιεκτικότητα 0,01 %	HPLC-MS Στήλη: Purospher Star RP-18, εσωτερικός όγκος 55 mm x 2 mm, μέγεθος σωματιδίων 3 μm Κινητή φάση: 90:10 (% v/v) μεθανόλη νερό με 0,2 % οξικό και μεθανόλη/η-εξανίου 90:10 (% v/v) με 0,2 % οξικό οξύ.	[37]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	100 μL τρικαπρίνης, 70 μL διαλύματος βουτανετριόλης σαν εσωτερικά πρότυπα, 100,0-110,0 mg δείγματος και προσθήκη 100 μL MSTFA Τελικά αραιώνεται με προσθήκη 9 mL n-επτανίου	GC-FID Προ στήλη: Μη επικαλυμμένη, απενεργοποιημένη σίλικα 2 m με εσωτερική διάμετρο 0,53 mm Στήλη: J&W Scientific DB-5, 10 m, εσωτερική διάμετρος 0,32 mm, πάχος στιβάδας 0,1 μm Φέρον αέριο: Υδρογόνο	[38]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Δάκρια κουνελιών	Δείγματα: Το λιπαρό τμήμα από τα δάκρια κουνελιών πάρθηκαν με μία απλή μέθοδο προκατεργασίας με χλωροφόρμιο και στη συνέχεια έγινε επανασύσταση με διάλυμα μεθανόλης:χλωροφορμίου 9:1 %v/v το οποίο περιείχε 2 mM LiCl	ESI-MS/MS. Άζωτο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο νεφελοποιητή και εξάτμισης. Αέριο συγκρούσεων: αργό	[39]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Φοινικόλαδο	5 g δείγματος σαπυνοποιείται Το τελικό σαπυνοποίηση τμήμα τοποθετήθηκε πάνω σε πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας Στη συνέχεια εκχυλίστηκε από το στερεό λεπτό στρώμα με n-εξάνιο, το κάθε συστατικό ξεχωριστά Στη συνέχεια 0,02 g του δείγματος προστέθηκε 1,2 mL διχλωριμεθανίου και 0,3 mL BSTFA	GC-FID Στήλη: BX-5, 15 m, εσωτερική διάμετρος 0,32 mm, πάχος στιβάδας 0,25 μm Φέρον αέριο: Ήλιο	[40]
1,2-διγλυκερίδια 1,3-διγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Τα δείγματα επεξεργάζονται ώστε να παραχθούν TMS-παράγωγα.	GC-FID Στήλη: MET-Biodiesel, μήκος 14 m, εσωτερική διάμετρος 0,53 mm με πάχος στρώσης 0,16 μm Προ στήλη: μήκος 2 m με εσωτερική διάμετρος 0,53 mm	[41]

Από τον πίνακα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης φαίνεται ότι η πιο συχνή μέθοδος προσδιορισμού η οποία χρησιμοποιείται είναι η αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας [10, 24-26, 30, 36, 38, 40, 41]. Εκτός από αυτή τη μέθοδο προσδιορισμού υπάρχουν και μέθοδοι που γίνεται χρήση NMR [27-29, 31, 34, 35], HPLC-RI [32, 33], HPLC-MS [37] ESI-MS/MS [39]. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται GC-FID, σαν προκατεργασία χρησιμοποιείται η παραγωγοποίηση των διγλυκεριδίων με κάποιο αντιδραστήριο σιλιανοποίησης. Τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις για να απομονωθεί το άπολο κλάσμα των διγλυκεριδίων χωρίς τη μήτρα του ελαίου, χρησιμοποιείται εκχύλιση στερεάς φάσης [10, 24, 30, 36]. Συνοψίζοντας τα στοιχεία από την βιβλιογραφική ανασκόπηση, για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων έγινε χρήση αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας, και ως τεχνική προκατεργασίας των δειγμάτων εκχύλιση στερεάς φάσης και παραγωγοποίηση με αντιδραστήριο σιλιανοποίησης.

2.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση για τον προσδιορισμό τριγλυκεριδίων

Για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων έγινε βιβλιογραφική ανασκόπηση με σκοπό την εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου προσδιορισμού. Τα δεδομένα τα οποία ανακτήθηκαν από την ανασκόπηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Συνοπτική παρουσίαση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων

Ενώσεις - Μήτρα	Προκατεργασία δείγματος	Τεχνική	Βιβλιογραφία
Τριγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Τα δείγματα ζυγίζονται από 8-12 mg και διαλύονται σε εξάνιο μέχρι τα 25 mL. Στη συνέχεια μετρήθηκαν σε όργανο HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS Στήλη: Reverse Phase Li Chrospherocetadecyl (ODS) με μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 3 mm και μέγεθος πόρων 5 μm. Κινητές φάσεις: Ακετονιτρίλιο και ισοπροπανόλη	[42]
Τριγλυκερίδια Φυτικά έλαια	Για κάθε φυτικό έλαιο παρασκευάστηκαν πέντε μίγματα με περιεκτικότητες 1,2,3,4 και 5 % σε διαλύτη ακετονιτρίλιου	HPLC-RI Στήλη: Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C-18, μήκος 250 mm και εσωτερική διάμετρο 4,6 mm Κινητή φάση: 50:50 v/v ακετόνη:ακετονιτρίλιο	[43]

Ενώσεις - Μήτρα	Προκατεργασία δείγματος	Τεχνική	Βιβλιογραφία
Τριγλυκερίδια Σπόροι παπάγιας	Οι σπόροι παπάγια συλέχθηκαν και κονιοροτοποιήθηκαν Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση του ελαίου με πετρελαϊκό αιθέρα Τελική σύσταση δειγμάτων 6 % ελαίου σε χλωροφόρμιο	HPLC-RI Λογισμικό: Shimadzu CR4AX-inegrator Στήλη: RP-18 της Merck με μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 4 mm και μέγεθος πόρων 5 μm. Κινητή φάση: 63,5/36,5 v/v ακετόνη:ακετονιτρίλιο	[44]
Τριγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πλούσια σε λινελαϊκό οξύ και αναμίχθηκαν με δείγματα παρθένου ελαιολάδου ώστε να δημιουργηθούν νοθευμένα δείγματα.	HPLC-RI Στήλη: Δύο στήλες Supelcosil-LC 8 με μήκος 150 mm και εσωτερική διάμετρο 4,5 mm Κινητή φάση: 70:30 v/v ακετόνη:ακετονιτρίλιο	[45]
Τριγλυκερίδια Φυτικά έλαια	10-15 g των σπόρων των επιλεγμένων φυτών κονιοροτοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε 15 mLεξανίου και αναδεύονταν για 15 λεπτά. Το μίγμα πέρασε αποφίλτρο και ο διαλύτηςξερατιστηκευτικό άζωτο Δείγματα ελαιολάδου νοθευμένο με ηλιέλαιο ετοιμάστηκαν με περιεκτικότητες 1,2,5 και 10 % Επίσης ετοιμάστηκαν δείγματα φυτικών ελαίων σε συγκεντρώσεις 10 g/L με διαλύτη 1:1:1 v/vακετονιτρίλιο/2-προπανόλη/εξάνιο	HPLC/APCI/MS Στήλη: δύο στήλες Nova-Pak C18, η μία με 300 mm μήκος, 3,9 mm εσωτερική διάμετρο και 4 μm μέγεθος σωματιδίων και η άλλη με 150 mm μήκος, 3,9 mm εσωτερική διάμετρο και 4 μm μέγεθος πόρων Κινητές φάσεις: ακετονιτρίλιο και 2-προπανόλη Ανιχνευτής UV: μήκος κύματος 205 nm	[46]
Τριγλυκερίδια Σπόροι αμάρανθου	Η εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα Τα δείγματα παρασκευάστηκαν με τελική συγκέντρωση 5 % ελαίου σε ακετόνη.	RP-HPLC-RI Στήλη: δύο στήλες σε σειρά Econosil C-18 με μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και μέγεθος πόρων 5 μm. Κινητή φάση: 60:40 v/v ακετόνη:/ακετονιτρίλιο	[47]
Τριγλυκερίδια Ελαιόλαδο	Τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 5 % σε ακετόνη για την περίπτωση της υδροχρωματογραφίας και 0,2 % σε εξάνιο για την περίπτωση της αεριοχρωματογραφίας	RP-HPLC-RI Στήλη: Novarack C-18 με μήκος 30 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και μέγεθος πόρων 5 μm Κινητή φάση: 50:50 v/v ακετόνη:ακετονιτρίλιο CGC-FID Στήλη: WCOT με μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο 0,25 mm και πάχος πληρωτικού υλικού 0,1 μm Φέρον αέριο: ήλιο	[48]
Τριγλυκερίδια Ελαιόλαδο και φουντουκέλαιο	Τα δείγματα αφού πέρασαν από φίλτρο, παρασκευάστηκαν με τελική συγκέντρωση 5 % v/v σε χλωροφόρμιο και στη συνέχεια αναμίχθηκαν ώστε να παρασκευαστούν νοθευμένα δείγματα	HPLC/APCI/MS Στήλη: Spherisorb ODS-2 με μήκος 0,25 m, εσωτερική διάμετρο 0,46 cm και μέγεθος πόρων 5 μm. Κινητή φάση: 64:36 v/v ακετόνη:ακετονιτρίλιο	[49]
Τριγλυκερίδια Φυτικά έλαια	Τα δείγματα διαλύθηκαν σε ακετονιτρίλιο με τελική συγκέντρωση 5 % v/v.	HPLC/APCI/MS Μοντέλο: Finnigan MAT TSQ700 Στήλη: SupelcosilL C-18 με μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 μm και μέγεθος πόρων 5 μm. Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο	[50]

Ενώσεις - Μήτρα	Προκατεργασία δείγματος	Τεχνική	Βιβλιογραφία
Τριγλυκερίδια Φυτικά έλαια	Τα δείγματα παρασκευάστηκαν ζυγίζοντας 0,25 g ελαίου τα οποία διαλύθηκαν σε 5 mL ακετόνης ώστε να έχουμε 5 % v/v τελική συγκέντρωση	HPLC-RI Στήλη: Spherisorb ODS-2 με μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων 3 μm	[51]
Τριγλυκερίδια Έλαιο παπάγιας	Ξήρανση των καρπών στους 45 °C Κορριοποίηση και στη συνέχεια εκχύλιση σε 10 g από κάθε καρπό με εξάνιο Η εκχύλιση έγινε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και για διαφορετικά χρονικά διαστήματα Μετά από την εκχύλιση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων ώστε να υποβοηθηθεί η διαδικασία	HPLC/APCI/MS Στήλη: Supelco με μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 μm και μέγεθος πόρων 5 μm. Κινητές φάσεις: 2-προπανόλη/εξάνιο 5:4 v/v και Ακετονιτρίλιο	[52]
Τριγλυκερίδια Φυτικά έλαια	10 μL από κάθε δείγμα ελαίου απλώθηκαν πάνω σε γυάλινη επιφάνεια ώστε να μετρηθούν σε όργανο DESI-MS	DESI-MS/MS Γωνία ψεκασμού διαλύτη: 60° Τάση: 5 kV	[53]
Τριγλυκερίδια Φυτικά έλαια	Τα δείγματα διαλύθηκαν σε διαλύτη 50:50 v/v ακετόνης:χλωροφορμίου.	HPLC-RI Στήλη: Lichrosphere 100 RP-18 με μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4 mm και μέγεθος σωματιδίων 5μm Κινητή φάση: 60:40 v/vακετόνη ακετονιτρίλιο	[54]
Τριγλυκερίδια Ελαιόλαδο	3 g δείγματος με 0,1 g τριλαουρίνης το ποθετούνται σε ένα δοχείο στους 100 °C Στη συνέχεια 50mg από το δείγμα τοποθετείται στήλη SPE Παραλαμβάνονται με 10 mL εξανίου:διεθυλαιθέρα (87:13 v/v) Τελική σύσταση διαλύματος 1 mL ακετόνης.	HPLC-RI Στήλη: RP-18 Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο	[55]

Από τον πίνακα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης φαίνεται ότι η πιο συχνή μέθοδος προσδιορισμού η οποία χρησιμοποιείται είναι η υγροχρωματογραφία [42-52, 54, 55]. Από τις δημοσιεύσεις φάνηκε ότι η βέλτιστη ανίχνευση γίνεται με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών καθώς βασίζεται στα θραύσματα που λαμβάνονται από τα τριγλυκερίδια [42, 46, 49, 50, 52, 53]. Σε όλες τις περιπτώσεις γίνεται αραιώση των δειγμάτων σε όγκους από 5 % v/v [43, 47-51] μέχρι και 10 % v/v [42, 44, 46]. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίστηκε η χρήση υγροχρωματογραφίας ως μέθοδος προσδιορισμού με συζευγμένη φασματομετρία μαζών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Τα λιπαρά παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη διατροφή καθώς αποτελούν μεγάλη πηγή ενέργειας. Συναντώνται συνήθως σε έλαια και ζωικά λίπη, και χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές στα τρόφιμα, σε καλλυντικά και σε φαρμακευτικά προϊόντα. Αποτελούν επίκεντρο μελέτης λόγω της σύνδεσής τους με την σύσταση του ελαιολάδου, την γεύση αλλά και την διάρκεια ζωής του. Στη σημερινή εποχή είναι αναγκαία η βαθύτερη γνώση για τον μηχανισμό της πέψης των λιπαρών ώστε να γίνεται άρτια σχεδίαση υγιεινότερων τροφών και ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού σημαντικών θρεπτικών συστατικών, όπως είναι τα λιπαρά [28].

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1, οι συνθήκες φύλαξης αλλά και οι συνθήκες στις οποίες γίνεται η εκχύλιση του ελαιολάδου, παίζουν κρίσιμο ρόλο για τη διάρκεια ζωής αλλά και τη σύσταση του ελαιολάδου. Οι παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν τη σύσταση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου είναι το φως, η ελεύθερη οξύτητα, το οξυγόνο και η θερμότητα [56]. Για το λόγο αυτό ο παραγωγός θα πρέπει να συμπεριλάβει όλους τους κρίσιμους παράγοντες, ώστε να μπορέσει να προβλέψει μέχρι πότε θα είναι ασφαλές να καταναλωθεί το παραγόμενο ελαιόλαδο. Η επέκταση του χρόνου ζωής του παραγόμενου ελαιολάδου αποτελεί μεγάλο όφελος για τον καταναλωτή αλλά για τους παραγωγούς, και θα πρέπει η σύσταση του ελαιολάδου να παραμένει σταθερή μέχρι να φτάσει στα χέρια του καταναλωτή.

Υπάρχουν πολλές αναφορές για νοθείες σε προϊόντα ελαιολάδου τα οποία έχουν αναμειχθεί με φθηνότερα έλαια όπως ηλιέλαιο, σογιέλαιο και ραφινρισμένο λάδι. Ο έλεγχος για την αυθεντικότητα του ελαιολάδου γίνεται μέσω της μέτρησης συγκεκριμένων συστατικών ώστε να υπολογισθούν συγκεκριμένοι δείκτες ποιότητας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τέτοιοι προσδιορισμοί αφορούν το προφίλ των ελεύθερων λιπαρών οξέων, το φαινολικό περιεχόμενο, το προφίλ των χλωροφυλλών, των τοκοφερολών, της πυροφαιοφυτίνης των διγλυκεριδίων και των τριγλυκεριδίων. Πιο

συγκεκριμένα ο προσδιορισμός των διγλυκεριδίων και των τριγλυκεριδίων αφορά την ηλικία του ελαιολάδου, τη φρεσκότητά του και τον έλεγχο πιθανής νοθείας [10].

Οι κανονισμοί και οι έλεγχοι στα προϊόντα του ελαιολάδου είναι απαραίτητοι για την ασφάλεια του καταναλωτή. Ανά καιρούς έχουν παρουσιαστεί αρκετά κρούσματα τα οποία αφορούν αρρώστιες ή ακόμα και θανάτους λόγω έλλειψης ελέγχων σε τρόφιμα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για το ελαιόλαδο έγινε το 1981, όπου λόγω νοθευμένων προϊόντων ελαιολάδου 20,000 άνθρωποι αρρώστησαν και 400 πέθαναν στην Ισπανία. Το συγκεκριμένο περιστατικό είναι γνωστό ως το «Σύνδρομο του τοξικού ελαιολάδου της Ισπανίας» [57]. Σε πιο πρόσφατη περίοδο, το 2012 βρέθηκαν 770 ύποπτα προϊόντα στην Ευρώπη εκ των οποίων το 23 % δεν ήταν συμμορφούμενα με τους κανονισμούς για το ελαιόλαδο. Στις παραβιάσεις που καταγράφηκαν το 47,5 % είχαν σχέση με την ποιότητα και την καθαρότητα, το 32,7 % με την επισήμανση και 4 % με την ιχνηλασιμότητα [58].

Ως προς την πρόληψη περιστατικών όπως το προαναφερθέν του 2012, ανά τον κόσμο έχουν θεσπιστεί πρότυπα τα οποία αφορούν τον έλεγχο ποιότητας του ελαιολάδου. Ο κανονισμός που υπάρχει στην Ευρώπη για το έλεγχο των χαρακτηριστικών ποιότητας των ελαιολάδων, είναι ο ΕΚ 2568/91. Σύμφωνα με αυτό τον κανονισμό έχουν θεσπιστεί ποιοτικές και ποσοτικές αναλυτικές μέθοδοι με τις οποίες ανιχνεύονται οι νοθείες και προσδιορίζονται τα χαρακτηριστικά ποιότητας και η κατάταξη των παραγόμενων ελαιολάδων [59].

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες με σκοπό την ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης της νοθείας σε παραγόμενα ελαιόλαδα [28].

3.2 Τα διγλυκερίδια ως δείκτες ποιότητας

Η βασική παράμετρος που παίζει ρόλο στην ποιότητα του παραγόμενου ελαιολάδου είναι η οξύτητα. Η οξύτητα μετριέται σε ποσότητα ελαϊκού οξέος ανά 100 g λιπαρής ύλης και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την λιπολυτική δράση της λιπάσης στα τριγλυκερίδια, μέσα στον καρπό πριν την μηχανική κατεργασία. Η λιπάση είναι ένζυμο το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί στη ζύμη της ελιά μετά την μηχανική επεξεργασία [26]. Η λειτουργία της έχει ως

αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκερόλης, διγλυκεριδίων και λιπαρών οξέων λόγω της λιπόλυσης των τριγλυκεριδίων, τα οποία αυξάνουν την οξύτητα του προϊόντος. Η αυξημένη οξύτητα δρα καταλυτικά για την αυθόρμητη μετατόπιση της ανθρακικής αλυσίδας από τον δεύτερο άνθρακα των διγλυκεριδίων στον πρώτο ή στον τρίτο. Με αυτό τον τρόπο τα 1,2- και 2,3-διγλυκερίδια με την πάροδο του χρόνου μετατρέπονται στα ισομερή τους 1,3-διγλυκερίδια. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι οι υψηλές θερμοκρασίες, η παρουσία όξινων ακαθαρσιών καθώς και η επαφή του ελαιολάδου με πολικούς διαλύτες ενισχύουν τη δράση της λιπάσης και κατ' επέκταση οδηγούν στην αύξηση της οξύτητας και της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Επομένως, οι συγκεκριμένες συνθήκες δεν είναι επιθυμητές καθώς μειώνουν την ποιότητα του ελαιολάδου και δεν μπορεί να διατηρηθεί βρώσιμο για μεγάλο χρονικό διάστημα. [57].

Μέσω της μελέτης των ποσοτήτων των διγλυκεριδίων σε ένα ελαιολάδο μπορούν να προσδιοριστούν στοιχεία για την ποιότητά του, ηλικία του, πιθανές νοθείες καθώς και για τις συνθήκες φύλαξης του στα πρώιμα στάδια μετά την παραγωγή του [24]. Η προσέγγιση όμως αυτή είναι ποιοτική καθώς υπάρχει αβεβαιότητα ακόμα για το μηχανισμό με τον οποίο δρουν οι συνθήκες φύλαξης του ελαιολάδου, στην ποσότητα των 1,2- και 1,3-διγλυκεριδίων. Για τη συσχέτιση αυτή είναι αναγκαία η κινητική μελέτη της αυθόρμητης αυτής μετατόπισης υπό ελεγχόμενες συνθήκες [34].

Υπάρχουν τρεις οργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την καθιέρωση των προδιαγραφών ποιότητας και εμπορίας του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου: το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC), το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (USDA) και ο οργανισμός πιστοποίησης «Πρότυπα της Αυστραλίας». Σύμφωνα με αυτούς, υπάρχουν συγκεκριμένοι δείκτες, οι οποίοι βασίζονται στην ποσότητα των διαφόρων συστατικών στο ελαιολάδο και χρησιμοποιούνται ως δείκτες ποιότητας. Τέτοιος δείκτης είναι ο λόγος της ποσότητας των 1,2-διγλυκεριδίων προς την ποσότητα των 1,3-διγλυκεριδίων ο οποίος χρησιμοποιείται για να εξακριβωθεί εάν το ελαιολάδο έχει παραποιηθεί από την προσθήκη διαφορετικής ποιότητας ελαίου, με σκοπό τη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του [60]. Ο λόγος αυτός θα πρέπει να είναι όσο γίνεται υψηλότερος δηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ένα φρέσκο και υψηλής ποιότητας ελαιολάδο. Αυτό συμβαίνει καθώς ένα

εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο μετά το πέρας της παραγωγής του έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε 1,2-διγλυκερίδια, ενώ τα 1,3-διγλυκερίδια σχηματίζονται κατά τη διάρκεια φύλαξης του ελαιολάδου. Τα 1,3-διγλυκερίδια βρίσκονται εξ αρχής σε υψηλά ποσοστά σε χαμηλής ποιότητας καρπούς ελιάς και σε καρπούς οι οποίοι έχουν μολυνθεί με κάποιο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξη του καρπού. Σύμφωνα με το πρότυπο ISO 29822 τα 1,2-διγλυκερίδια μπορούν να προσδιορισθούν με αέρια χρωματογραφία στήλης (GC) και στη συνέχεια να γίνει ανίχνευση των θραυσμάτων τους με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) [32].

3.3 Τα τριγλυκερίδια ως δείκτες νοθείας

Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του ελαιολάδου και είναι η μεγαλύτερη πηγή διγλυκεριδίων, τα οποία όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.2, προκύπτουν μετά από την λιπόλυσή τους. Λόγω της αυξημένης ζήτησης του ελαιολάδου για διατροφικούς λόγους, της υψηλής του τιμής αλλά και της χαμηλής παραγωγής του σε παγκόσμιο επίπεδο, η ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού τριγλυκεριδίων με σκοπό την ανίχνευση νοθειών του ελαιολάδου έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Η ανίχνευση της νοθείας στο ελαιόλαδο μέσω του προσδιορισμού των τριγλυκεριδίων, βασίζεται στο διαφορετικό προφίλ τριγλυκεριδίων που παρουσιάζουν τα διάφορα φυτικά έλαια μεταξύ τους. Αυτό σημαίνει ότι, σε περίπτωση νοθείας, ανάλογα με το είδος του φυτικού ελαίου το οποίο προστέθηκε στο ελαιόλαδο, θα παρουσιαστεί αύξηση συγκεντρώσεων τριγλυκεριδίων τα οποία φυσιολογικά θα προσδιορίζονταν σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων, σε ένα ανόθευτο ελαιόλαδο [56]

Ένα άλλο είδος νοθείας το οποίο γίνεται συχνά από τους ελαιοπαραγωγούς, είναι η χημική εστεροποίηση των αλκοολικών άκρων της γλυκερόλης με ελεύθερα λιπαρά οξέα. Δεδομένου ότι η τοπικοεκλεκτικότητα του ενζυματικού μεταβολικού μονοπατιού είναι πολύ συγκεκριμένη και δεν είναι τυχαία, όπως και η χημική οδός, γίνεται προσδιορισμός των λιπαρών οξέων στη θέση sn-2 της γλυκερόλης των τριγλυκεριδίων. Μέσω αυτού του προσδιορισμού, είναι δυνατή η διαπίστωση του συγκεκριμένου είδους νοθείας [51].

Η πιο διαδεδομένη διεργασία η οποία γίνεται για την μελέτη αυθεντικότητας του ελαιολάδου, είναι η παρακολούθηση της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Η πιο γνωστή τεχνική που υπάρχει για τον προσδιορισμό του βαθμού της υδρόλυσής τους κατά τη διάρκεια της πέψης, είναι η ογκομέτρηση με καυστικό νάτριο (NaOH), με σκοπό τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων τα οποία απελευθερώνονται από τα τριγλυκερίδια κατά τη διάρκεια της πέψης. Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι εξαρτάται από το βαθμό ιοντισμού των λιπαρών οξέων που απελευθερώνονται, το μέγεθος της ανθρακικής τους αλυσίδας, το pH του μέσου και του χολικού άλατος και τη συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη. Συγκεκριμένα αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται ως προσομοίωση του εντερικού σταδίου, όπου χρησιμοποιούνται απλοί διαλύτες, για να αποφευχθούν παρεμποδίσεις από πιο σύνθετα μέσα [28].

Σύμφωνα με το IOC, για τον έλεγχο νοθειών με τεχνικές χρωματογραφίας, οι κορυφές οι οποίες λαμβάνονταν υπόψη, είναι αυτή του τριγλυκεριδίου της τριλινολεΐνης (LLL), και των τριγλυκεριδίων με ισοδύναμο αριθμό ανθρακικής αλυσίδας (ECN) 42. Η επιλογή αυτή, δίνει το πλεονέκτημα στο ότι μπορεί να εξεταστεί το δείγμα ελαιολάδου, ως προς τη νοθεία με έλαια τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα προφίλ με αυτό. Ένα τέτοιο παράδειγμα ελαίου είναι το φουντουκέλαιο, το οποίο έχει παρόμοιο προφίλ με το ελαιόλαδο, όμως έχει υψηλές συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων με ECN42 [55]. Η δεδομένη τεχνική, λόγω πολλαπλών αναφορών για μεγάλες διαφορές από το επιτρεπόμενο όριο της τυπικής απόκλισης σε ελαιόλαδα κατά τον προσδιορισμό του LLL, έχει ανανεωθεί, και πλέον γίνεται προσδιορισμός των κορυφών οι οποίες έχουν $\Delta ECN42$, το οποίο υπολογίζεται από την διαφορά μεταξύ θεωρητικού και πειραματικού ισοδύναμου αριθμού ανθρακικής αλυσίδας [43].

Το πρόβλημα και ο παράγοντας ο οποίος αυξάνει την περιπλοκότητα της διεργασίας κατά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων, είναι η ύπαρξη ισομερών τριγλυκεριδίων τα οποία είναι δύσκολο να διαχωριστούν χρωματογραφικά αλλά και να ταυτοποιηθούν [1]. Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνικές οι οποίες έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων, αφορούν προσδιορισμούς με LC-MS/MS. Με αυτές τις τεχνικές επιτυγχάνεται

αποτελεσματικός διαχωρισμός των τριγλυκεριδίων που περιέχονται σε έλαια και λίπη με τη χρήση στηλών οι οποίες έχουν ως πληρωτικό υλικό χημικά συνδεδεμένες φάσεις δεκαοκτυλίου (ODS). Ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση του αριθμού ανθράκων των αλυσιδών των λιπαρών οξέων που είναι συνδεδεμένα στη γλυκερόλη αλλά και βάση του συνολικού αριθμού διπλών δεσμών που υπάρχουν στο μόριο του τριγλυκεριδίου. Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών, δίνουν τα πλεονεκτήματα της πληροφόρησης ως προς το μοριακό βάρος, τη σύσταση των λιπαρών οξέων του κάθε τριγλυκεριδίου, αλλά και την ταυτοποίηση ισομερών ή/και συνεκλουόμενων τριγλυκεριδίων [50].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Για τη μελέτη και τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Αεριοχρωματογράφος με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, GC-MS/MS)
- Αεριοχρωματογράφος με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Gas Chromatography–Flame Ionization Detector, GC-FID)

Για τη μελέτη και τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω όργανο

- Υγροχρωματογράφος με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)

Στη συνέχεια αυτού του κεφαλαίου θα παρουσιαστούν οι βασικές αρχές και η οργανολογία των αναλυτικών οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με την παραπάνω σειρά.

4.1 Εισαγωγή στη χρωματογραφία

Η χρωματογραφία αποτελεί μία μεγάλη οικογένεια μεθόδων, μέσω των οποίων οι επιστήμονες μπορούν να διαχωρίσουν αποτελεσματικά τις ουσίες ενός πολύπλοκου δείγματος οι οποίες έχουν παραπλήσιες χημικές ιδιότητες. Η μέθοδος της χρωματογραφίας αποτελεί ένα πανίσχυρο εργαλείο για όλα τα αναλυτικά εργαστήρια, καθώς πολλοί διαχωρισμοί χημικών ουσιών δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν με κάποια άλλη αναλυτική μέθοδο. Η μεθοδολογία η οποία ακολουθείται στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, βασίζεται στην κίνηση του δείγματος σε μία κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι σε υγρή ή αέρια κατάσταση ή να είναι ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Η κινητή αυτή φάση στη συνέχεια διέρχεται μέσα από μία στερεά φάση, η οποία βρίσκεται στερεωμένη πάνω σε μία επιφάνεια ή εντός μίας στήλης. Η χημική σύσταση της στατικής και της κινητής φάσης επιλέγεται έτσι ώστε η κατανομή

των συστατικών του δείγματος που αναλύονται να γίνεται σε διαφορετικό βαθμό. Σύμφωνα με τη χημική συγγένεια που έχουν τα συστατικά του δείγματος με την στατική φάση, κάποια κατακρατούνται ισχυρότερα σε σχέση με άλλα τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα. Το αποτέλεσμα αυτών των διαφοροποιήσεων της κατακράτησης κάθε ουσίας, είναι τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται κατά το πέρασ τους από την στατική φάση παρασυρόμενα από την κινητή και διαχωρίζονται σε ζώνες. Τελικά τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά [61].

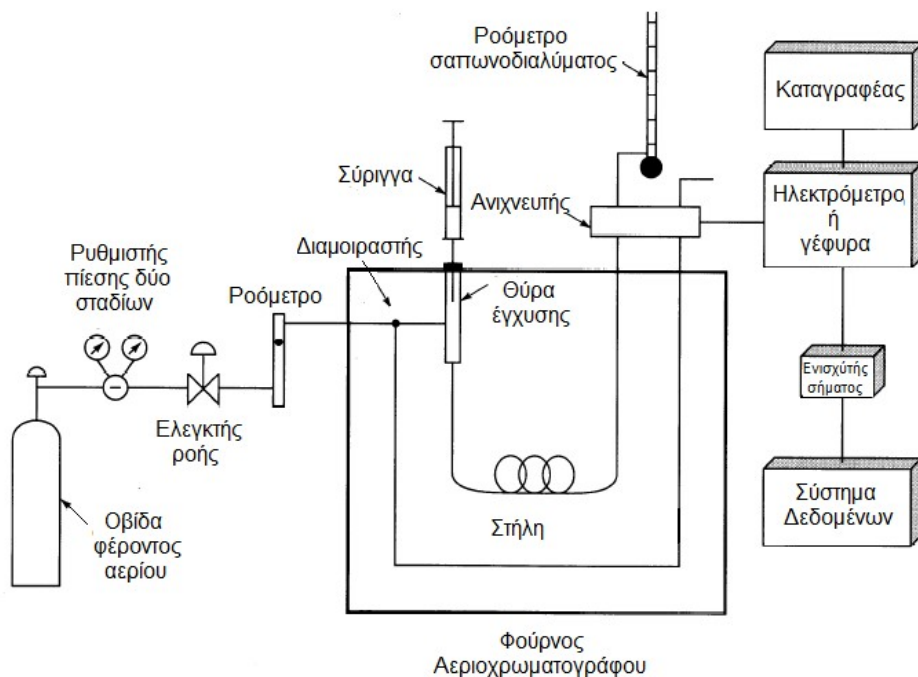
4.2 Αεριοχρωματογραφία

Στην αεριοχρωματογραφία ισχύουν οι ίδιες αρχές που αναφέρθηκαν παραπάνω με τη διαφορά ότι η κινητή φάση είναι αέριο. Συγκεκριμένα, καθώς το δείγμα εισάγεται στο όργανο, εξατμίζεται στον εισαγωγέα πριν εισαχθεί στη στήλη και μεταβαίνοντας στην αέρια κατάσταση ακολουθεί την πορεία του φέροντος αερίου που έχει επιλεγεί σαν κινητή φάση. Οι ενώσεις οι οποίες προσδιορίζονται με αέρια χρωματογραφία θα πρέπει να είναι ή να καθίσταται πτητικές, και κατά την μετάβασή τους στην αέρια φάση να μη διασπώνται. Επίσης, η στατική φάση δεν αλληλεπιδρά με τα συστατικά του δείγματος αλλά ο ρόλος της είναι η διακίνηση των προσδιοριζόμενων ουσιών κατά μήκος της στήλης.

Υπάρχουν δύο είδη αεριοχρωματογραφίας:

- Η χρωματογραφία αερίου-στερεού (GSC)
- Η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC)

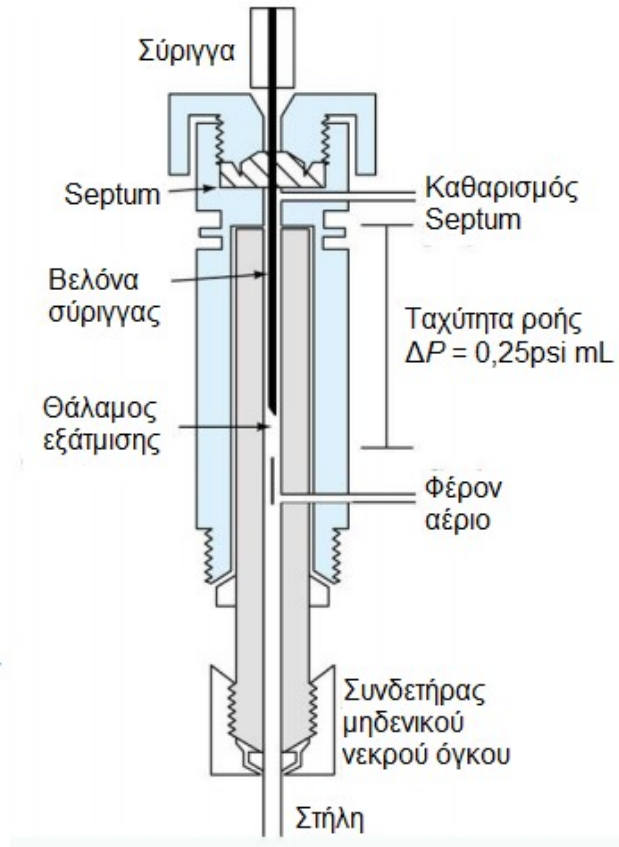
Η πιο διαδεδομένη είναι η χρωματογραφία αερίου-υγρού η οποία χάριν συντομίας αναφέρετε και ως αεριοχρωματογραφία (GC).



Εικόνα 5: Αναλυτικό διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου [61]

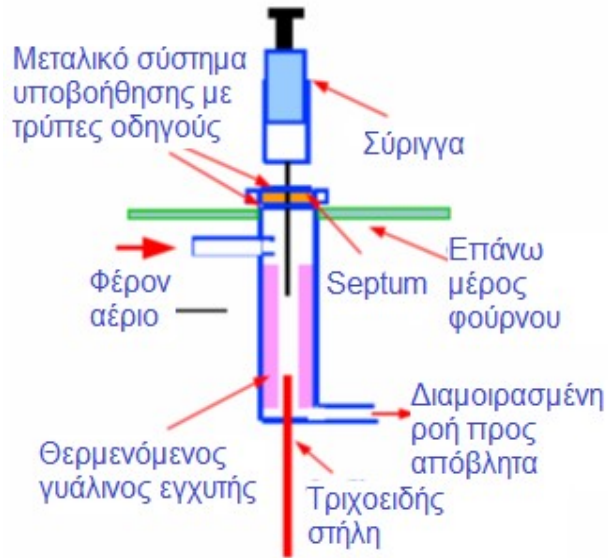
Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται τα βασικά μέρη ενός αέριου χρωματογράφου. Το φέρον αέριο από την φιάλη φτάνει στο όργανο όπου υπάρχει ένας διαμοιραστής ροής πριν τον εισαγωγέα, τον οποίο χρησιμοποιείται σε περίπτωση που η μέτρηση του ανιχνευτή σχετίζεται με ρεύμα. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις ανιχνευτών δεν χρειάζεται ο διαμοιρασμός αυτός. Στη συνέχεια το δείγμα περνάει μέσα από τη στήλη του χρωματογράφου, διαχωρίζονται οι αναλύτες κατά το πέρας τους από αυτή και στη συνέχεια φτάνουν στον ανιχνευτή όπου γίνεται η καταγραφή των δεδομένων[61].

Παρακάτω παρουσιάζεται μία γενική διάταξη ενός εισαγωγέα σε έναν αέριο χρωματογράφο. Το δείγμα θα πρέπει να εισάγεται γρήγορα καθώς η βραδεία εισαγωγή προκαλεί διεύρυνση των κορυφών. Κατά την εισαγωγή του δείγματος υπάρχει ένα αυτοσφραγιζόμενο ελαστικό γνωστό και ως septum. Στη συνέχεια το δείγμα εγχύεται εντός του θαλάμου εξάτμισης ο οποίος έχει θερμοκρασία συνήθως 50 °C περισσότερο από το σημείο βρασμού του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος, ώστε να ατμοποιείται το δείγμα ταχέως και μεταβαίνει από την υγρή στην αέρια κατάσταση [61].



Εικόνα 6: Διατομή στομίου άμεσης έγχυσης δείγματος σε σύστημα ταχέος μικροεξάτμιστή [61]

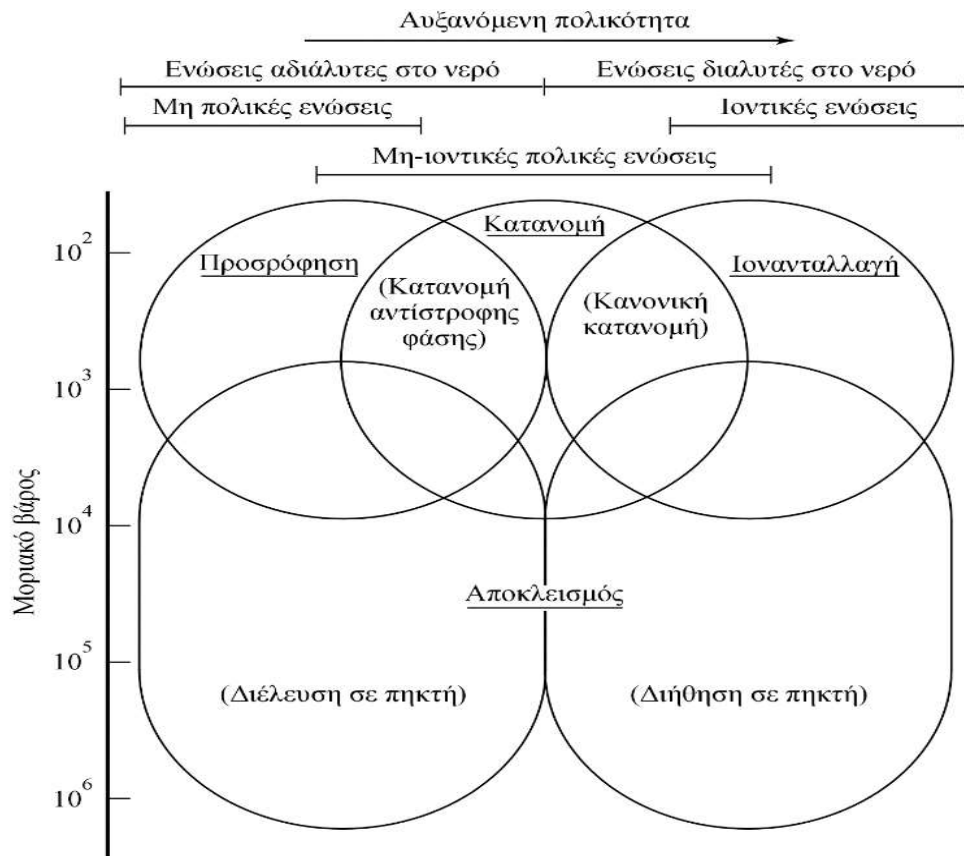
Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται εισαγωγείς οι οποίοι περιέχουν σύστημα διαχωρισμού (split). Σε αυτή την περίπτωση ένα μέρος του δείγματος περνάει από την κορυφή της στήλης και απομακρύνεται χωρίς να εισαχθεί σε αυτή. Ο εισαγωγέας αυτός χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που η τριχοειδής στήλη είναι τριμικρής διαμέτρου. Ο διαμορισμός αυτός περιγράφεται από το κλάσμα της εισακτέας ποσότητας προς τη ποσότητα που απομακρύνεται στην ατμόσφαιρα. Ένα από τα μειονεκτήματα του συστήματος διαμορισμού είναι ότι υπάρχει κίνδυνος μικροποσότητες ουσιών να μην εισάγονται στη στήλη αλλά να απομακρύνονται στην ατμόσφαιρα[61]. Τυπικό παράδειγμα είναι ο διαμορισμός 1:100, όπου το 1 % του ενέσιμου δείγματος εισάγεται στη στήλη ενώ το υπόλοιπο 99 % απομακρύνεται στην ατμόσφαιρα.



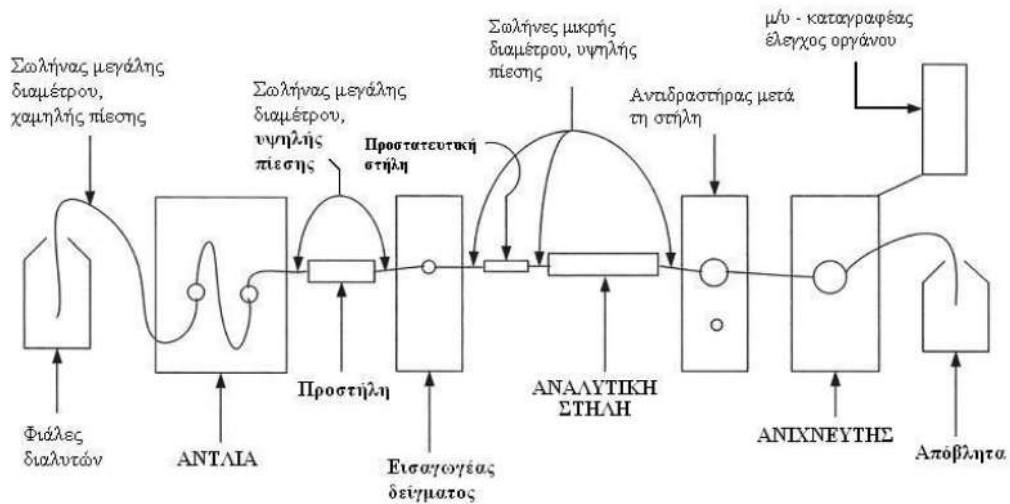
Εικόνα 7: Διατομή άμεσης έγχυσης δείγματος με σύστημα διαμοιρασμού [62]

4.3 Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Τα τελευταία χρόνια η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης έχει γίνει μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές διαχωρισμού. Ο λόγος είναι τα πλεονεκτήματα που έχει σε σχέση με άλλες τεχνικές διαχωρισμού. Τα πλεονεκτήματα αυτά είναι η αυξημένη ευαισθησία, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών. Η υγροχρωματογραφία χωρίζεται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους, βασισμένους στις ιδιότητες που έχουν οι υπό προσδιορισμό ουσίες. Στην εικόνα ένα τυπικό διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται οι διαφορετικές εφαρμογές της υγροχρωματογραφίας.



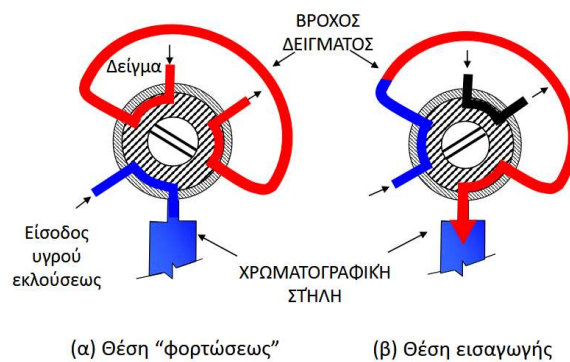
Εικόνα 8: Διάγραμμα εφαρμογών της υγροχρωματογραφίας [61]



Εικόνα 9: Αναλυτικό διάγραμμα ενός υγροχρωματογράφου [63]

Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται ένας υγροχρωματογράφος είναι:

- Τα δοχεία στα οποία περιέχονται οι κινητές φάσεις.
- Το σύστημα άντλησης το οποίο αποτελείται από τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση και μέσω αυτού ρυθμίζεται η πίεση και η ταχύτητα ροής, γίνεται έλεγχος της ροής, απαλλαγή από τους παλμούς και επιτυγχάνεται επαναληψιμότητα της ροής κατά 0,5 %.
- Το σύστημα έγχυσης του δείγματος, το οποίο πλέον είναι συνήθως με βρόγχους. Με το σύστημα των βρόγχων υπάρχει η δυνατότητα μεταβολής του όγκου του βρόγχου ώστε να γίνεται ελεγχόμενα η εισαγωγή της ποσότητας του δείγματος στον υγροχρωματογράφο. Επίσης προσδίδεται επαναληψιμότητα μερικών δεκάτων %.



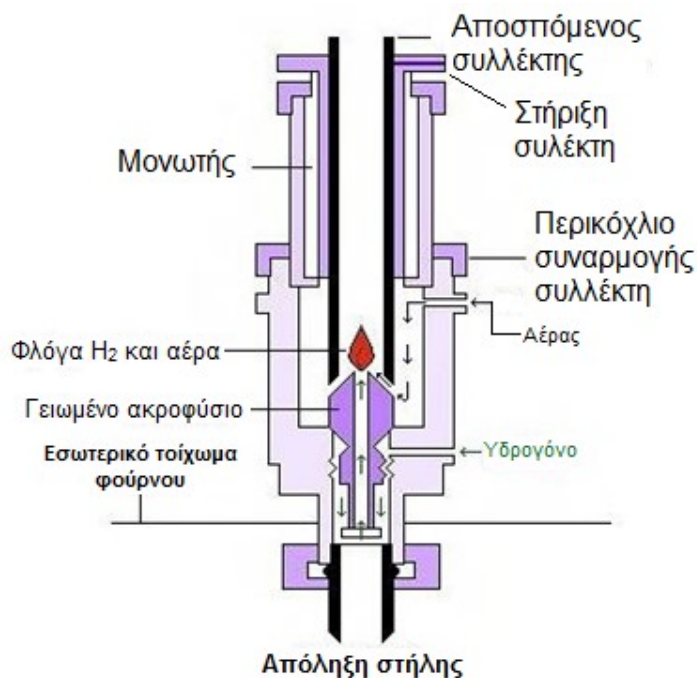
Εικόνα 10: Σύστημα έγχυσης με βρόγχους [63]

- Τη στήλη της χρωματογραφίας, η οποία αποτελείται από έναν ανοξείδωτο χαλύβδινο σωλήνα μικρής διαμέτρου. Οι στήλες είναι ανθεκτικές σε υψηλές πιέσεις και ανάλογα με τον προσδιορισμό που πραγματοποιείται γίνεται επιλογή στήλης με το κατάλληλο μήκος και πληρωτικό υλικό.
- Τον ανιχνευτή ο οποίος μπορεί να ανταποκρίνεται είτε σε μία ιδιότητα της κινητής φάσης (π.χ. δείκτης διάθλασης) η οποία μεταβάλλεται από τα συστατικά του δείγματος τα οποία εκλούνται, είτε σε μία ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού (π.χ. φθορισμός).

4.4 Ανιχνευτές

4.4.1 Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID)

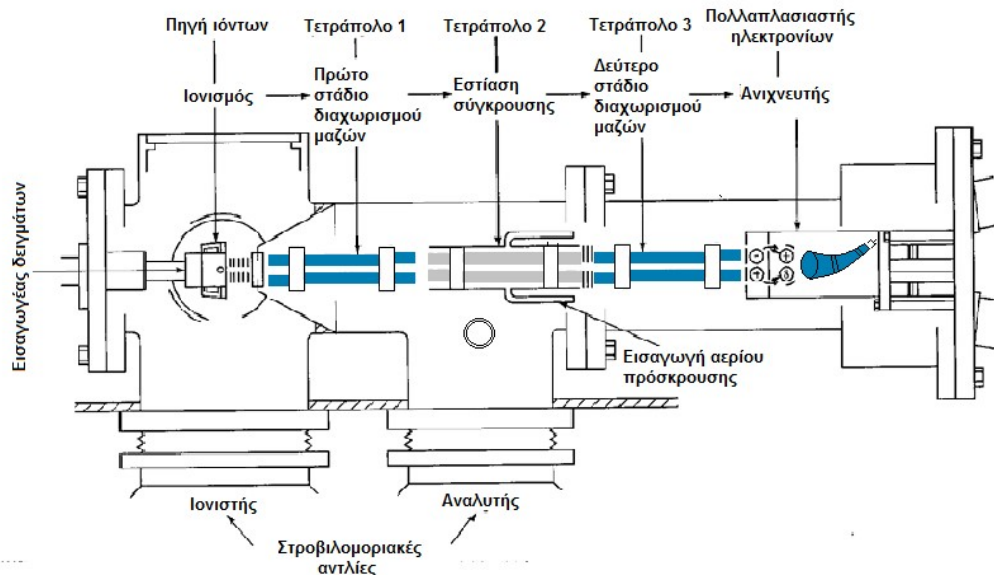
Ο πιο διαδεδομένος ανιχνευτής τον οποίο συζεύγνουν με αεριοχρωματογράφους, είναι ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID). Η αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή είναι η εισαγωγή του εκλούσματος από τη στήλη σε έναν καυστήρα, μέσα στον οποίο αναμιγνύεται με υδρογόνο και ατμοσφαιρικό αέρα και αναφλέγεται με ηλεκτρικά μέσα. Με αυτή τη διαδικασία οι οργανικές ενώσεις του δείγματος παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια τα οποία μέσω της φλόγας άγουν τον ηλεκτρισμό . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συλλέγεται το αναλυτικό σήμα από ένα ηλεκτροδιο-συλλέκτη το οποίο βρίσκεται ακριβώς επάνω από τη φλόγα και έχει σταθερό δυναμικό μερικών εκατοντάδων volt. Το τελικό ρεύμα το οποίο παράγεται ενισχύεται σε έναν τελεστικό ενισχυτή υψηλής εμπέδησης ώστε να μετρηθεί. Ο μηχανισμός του ιοντισμού των ενώσεων του άνθρακα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός, αλλά ξέρουμε ότι ο αριθμός των παραγόμενων ιόντων είναι περίπου ίσος με τα ανηγμένα άτομα άνθρακα που υπάρχουν στη φλόγα. Η απόκριση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ανιχνευτής αυτός θεωρείται ευαίσθητος ως προς τη μάζα και όχι ως προς τη συγκέντρωση. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η εσωτερική διάταξη ενός ανιχνευτή FID [61].



Εικόνα 11: Διατομή ενός τυπικού ανιχνευτή φλόγας

4.4.2 Ανιχνευτής συζευγμένης φασματομετρίας μάζων (MS/MS)

Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως μαζί με την αεριοχρωματογραφία. Στην τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται δύο φασματόμετρα μαζών συζευγμένα σε σειρά μεταξύ τους. Στο πρώτο φασματόμετρο γίνεται ιοντισμός των αναλυτών του δείγματος μέσω μίας πηγής ιοντισμού, και στη συνέχεια γίνεται απομόνωση των επιθυμητών ιόντων με βάση το m/z τους. Στη συνέχεια γίνεται η μεταφορά τους στο δεύτερο φασματόμετρο το οποίο περιέχει μία μικρότερη πηγή ιοντισμού με έναν απελευθερομένο από πεδία θάλαμο συγκρούσεων. Εκεί γίνεται θραυσματοποίηση των ιόντων αυτών με ένα αδρανές αέριο το οποίο οδηγείται με μεγάλη ταχύτητα προς αυτά. Με αυτό τον τρόπο παράγονται θυγατρικά ιόντα των μητρικών ιόντων. Από το δεύτερο φασματόμετρο γίνεται και η καταγραφή του φάσματος των θυγατρικών μορίων. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται ένας ανιχνευτής με σύστημα συζευγμένης φασματομετρίας μαζών [61].



Εικόνα 12: Σχηματικό διάγραμμα συζευγμένων ανιχνευτών φασματομετρίας μαζών

4.5 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μία τεχνική όμοια με τη χρωματογραφία στήλης. Χρησιμοποιούνται γυάλινες ή πλαστικές μικροστήλες στις οποίες έχει τοποθετηθεί προσροφητικό υλικό. Πρόκειται για μία μικρογραφία της χρωματογραφίας η οποία προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα [61][64].

Οι στόχοι της εφαρμογής αυτού του είδους χρωματογραφίας, εκτός από την απομάκρυνση παρεμποδίσσεων και την προσυγκέντρωση του δείγματος, είναι:

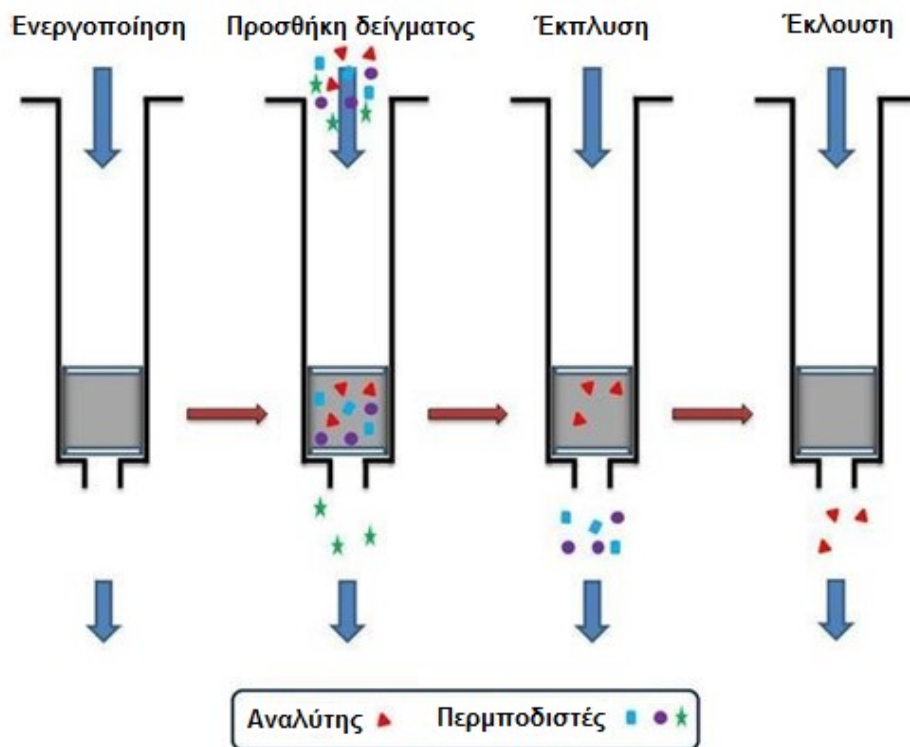
- Η κλασματική κατανομή των συστατικών τα οποία περιέχονται στο δείγμα, σε διάφορες ομάδες ενώσεων όπως γίνεται και στην κλασική χρωματογραφία στήλης.
- Η δέσμευση συστατικών, τα οποία μπορεί να είναι αναλύτες προς μέτρηση, που είναι πτητικά ή παρουσιάζουν ασταθή συμπεριφορά σε υγρό περιβάλλον.
- Η παραγωγοποίηση των συστατικών του δείγματος με αντίδραση μεταξύ αυτών και του προσροφητικού υλικού της στήλης, κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας.

Μέσω της χρωματογραφίας στερεάς φάσης επιτυγχάνεται καθαρισμός του δείγματος, απομάκρυνση των παρεμποδιστών και αύξηση της συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Με αυτή τη τεχνική μπορούν να κατεργαστούν, εκτός από υγρά δείγματα, δείγματα τα οποία έχουν στερεά, ημιστερεά, κρεμώδη μορφή κλπ.

Όπως φαίνεται από την εικόνα η οποία ακολουθεί, τα στάδια από τα οποία αποτελείται η SPE είναι [64]:

- Η προσθήκη κατάλληλου διαλύτη ώστε να ενεργοποιηθεί το προσροφητικό υλικό της στήλης.
- Η φόρτωση του δείγματος. Κατά τη φόρτωση το δείγμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη και στη συνέχεια αποχύνεται στην κορυφή της στήλης. Στη συνέχεια διέρχεται από το προσροφητικό υλικό και τα συστατικά του καθώς και ορισμένες παρεμποδίσσεις συγκρατούνται από αυτό.
- Η εκπλύση των μικροστηλών με σκοπό την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών του υποστρώματος το οποίο μπορεί να έχουν κατακρατηθεί από το προσροφητικό υλικό.
- Η έκλυση των προσδιοριζόμενων συστατικών με την προσθήκη του κατάλληλου διαλύτη. Η έκλυση μπορεί να γίνει σε περισσότερα από ένα στάδια, με διαδοχική προσθήκη κατάλληλων διαλυτών, σε περίπτωση που είναι επιθυμητός ο διαχωρισμός πολλών ομάδων χημικών ουσιών (π.χ. διαχωρισμός άπολων και πολικών ενώσεων).



Εικόνα 13: Απεικόνιση σταδίων χρωματογραφίας στερεάς εκχύλισης [66]

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η εκχύλιση στερεάς φάσης ως τεχνική προκατεργασίας είναι τα ακόλουθα:

- Εκλεκτικότητα.
- Επαναληψιμότητα.
- Μεγάλη ταχύτητα.
- Μικρή κατανάλωση διαλυτών.
- Απλότητα στη χρήση.
- Δυνατότητα προκατεργασίας πολλών ειδών δειγμάτων.
- Υψηλές ανακτήσεις.
- Περιορισμός συνεκχύλισης συστατικών της μήτρας.
- Δυνατότητα εφαρμογής on-line και off-line στην αναλυτική τεχνική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Δείγματα

Τα δείγματα που αναλύθηκαν για την διεκπεραίωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, προήλθαν από τα νησιά του Βορείου Αιγαίου Λέσβο, Σάμο, Χίο, Ικαρία και Φούρνους, λόγω του προγράμματος ανάδειξης του ελαιολάδου του Βορείου Αιγαίου. Όλα τα ελαιόλαδα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν παραγωγής του διαστήματος από Νοεμβρίου 2017-Ιανουαρίου 2018. Τα δείγματα μετά την παραγωγή τους στάλθηκαν στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας σε διάφανους, καλά πωματισμένους και σφραγισμένους περιέκτες των 200 mL. Φυλάχθηκαν σε σκοτεινό μέρος για την προφύλαξή τους από τον ήλιο και σε θερμοκρασία 4 °C για την καλύτερη δυνατή διατήρηση της σύστασής τους.

5.2 Πρόγραμμα ανάλυσης των δειγμάτων

Οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν ήταν τα ποσοστά των 1,2 και 1,3 διγλυκεριδίων σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO29822:2012. Ο σκοπός του προσδιορισμού ήταν η εκτίμηση της φρεσκότητας των ελαιολάδων. Η προκατεργασία των δειγμάτων ξεκίνησε τον Ιούνιο του 2018 και ολοκληρώθηκε αρχές Σεπτεμβρίου του 2018. Τα επεξεργασμένα δείγματα φυλάχθηκαν σε συνθήκες βαθιάς ψύξης στους -80 °C πριν την ανάλυσή τους. Στην περίπτωση των τριγλυκεριδίων, η προκατεργασία των δειγμάτων ήταν μία αραίωση όπου τα δείγματα αφήνονταν να ξεπαγώσουν πρώτα και στη συνέχεια γινόταν η αραίωση και η μέτρηση τους.

5.3 Προσδιορισμός διγλυκεριδίων

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε μία μέθοδος προσδιορισμού διγλυκεριδίων σε ελαιόλαδο με σκοπό την διεξαγωγή του δείκτη φρεσκότητας των ελαιολάδων ο οποίος εκφράζεται ως ο λόγος της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων προς την περιεκτικότητα των 1,3-διγλυκεριδίων ως προς το

σύνολό τους, για το κάθε μετρούμενο ελαιόλαδο. Η μέθοδος προσδιορισμού των διγλυκεριδίων σε ελαιόλαδο έγινε με αεριοχρωματογραφία. Η μελέτη της μεθόδου ξεκίνησε σε έναν αεριοχρωματογράφο με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS/MS) όπου έγινε μελέτη των συνθηκών που περιγράφει η μέθοδος που μελετήθηκε, και στη συνέχεια σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που είχε γίνει, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών προκατεργασίας και μέτρησης των δειγμάτων. Η επαλήθευση της μεθόδου και η μέτρηση των 450 δειγμάτων από το Βόρειο Αιγαίο έγινε σε αέριο χρωματογράφο με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID). Η εναλλαγή των οργάνων έγινε καθώς αρχικά δεν υπήρχε ο GC-FID, και όταν εφτάσε στο εργαστήριο συνέχισαν εκεί οι μετρήσεις καθώς ο FID είναι καταλληλότερος για μετρήσεις λιπαρών ουσιών σε σχέση με τον MS/MS.

5.3.1 Αντιδραστήρια

Εξάνιο (καθαρότητας, HPLC-grade) (99 %) αγορασμένο από τη Honeywell Burdick&Jackson (Muskegon, MI, USA), η μεθανόλη(καθαρότητας, HPLC-grade) αγορασμένη από τη Merck (Darmstadt, Germany), Διαιθυλαιθέρας ACS αγορασμένος από τη Merck (Darmstadt, Germany), Πετρελαϊκός αιθέρας (40-65 °C RPE) αγορασμένος από την Carlo Erba Reagents S.A.S. (Val de Reuil, France), Ακετονιτρίλιο ACS αγορασμένο από τη Merck (Darmstadt, Germany) και N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) (for GC derivatization) αγορασμένο από τη Merck (Darmstadt, Germany).

5.3.2 Οργανολογία

Η ανάλυση έγινε με χρήση αεριοχρωματογραφίας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο αεριοχρωματογράφοι. Ο πρώτος είναι το μοντέλο 465-GC (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) από τη σειρά EVOQTQ-series, με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία δεδομένων είναι το BrukerMSWorkstation.



Εικόνα 14: Αέριοχρωματογράφος (GC) με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS)

Ο δεύτερος είναι ο το μοντέλο GC450 (Varian, Agilent, California, USA) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι το Galaxie Workstation.



Εικόνα 15: Αεριοχρωματογράφος(GC) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID)

5.3.3 Πειραματική πορεία

➤ Μέθοδος προκατεργασίας

• **SPE:**

Προετοιμασία δείγματος: Ζυγίζονται σε δοχείο erpedorf με τη βοήθεια ενός αναλυτικού ζυγού, 1 g ελαιολάδου. Στη συνέχεια προστίθενται 1 mL εξάνιο (HPLC-grade). Το δείγμα ανακινείται σε μηχανήματα vortex για 1 λεπτό και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία ώστε να ομοιογενοποιηθεί.

Ενεργοποίηση των στηλών SPE (silica 6 mL/ 1000 mg): Τοποθετούνται οι στήλες SPE στη συσκευή και ενεργοποιούνται προσθέτοντας 5mL μεθανόλης (HPLC-grade). Αφήνεται για 5 λεπτά ώστε να εισχωρήσει παντού ο διαλύτης και στη συνέχεια προστίθενται 5 mL εξανίου.

Στη συνέχεια αποχύνεται το δείγμα στην κορυφή της στήλης και ο περιέκτης (erpedorf) εκπλένεται 2 φορές με 1 mL εξανίου, το οποίο ομοίως αποχύνεται στη στήλη SPE. Αφήνεται η στάθμη να πέσει στο πρώτο βαμβάκι (φρίτα) ώστε το διάλυμα να έρθει σε πλήρη επαφή με το πληρωτικό υλικό της στήλης, όπου αφήνεται 5 λεπτά σε ηρεμία. Στη συνέχεια με τη βοήθεια κενού απομακρύνεται ο διαλύτης μέχρι να έχει ξηρανθεί πλήρως ο διαλύτης στη στήλη. Έπειτα προστίθενται 5 mL διαλύματος 9:1 Πετρελαϊκούαιθέρα:Διαιθυλεθαίρα για την έκλουση του άπολου τμήματος του ελαιολάδου και αφήνεται για 5 λεπτά με κλειστή τη στρόφιγγα. Σαν τελευταίο βήμα, ανοίγεται η στρόφιγγα και συλλέγεται το κλάσμα και το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά με άλλα 5 mL διαλύματος. Στη συνέχεια το έκλουσμα φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του στον χρωματογράφο.

• **Διαδικασία σιλανοποίησης για το GC-FID και GC-MS/MS:**

Σε vial των 2,0 mL προστίθενται 300 μL από το έκλουσμα της SPE και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 100 μL N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA), αντιδραστήριο παραγωγοποίησης, και 100 μL ακετονιτριλίου. Αναδεύεται για 1 λεπτό σε μηχανήματα vortex και αφήνεται να ολοκληρωθεί η αντίδραση σε φούρνο σε θερμοκρασία 60°C για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία ώστε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και το

περιεχόμενό του εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Η τελική ανασύσταση του δείγματος γίνεται με προσθήκη 650μLακετονιτριλίου.

Συνθήκες Αέριας Χρωματογραφίας: Χρησιμοποιήθηκαν 2 τριχοειδείς στήλες Bruker Agilent BR-5 GC Capillary Column WOOT Fused Silica, (15 m x 0,25 mm x 0,25 μm) συνδεδεμένες σε σειρά. Η στατική φάση των στηλών είναι συντηγμένη σίλικα πάχους 0.25 μm. Το σύστημα έγχυσης του οργάνου είναι με διαμοιραστή ροής (split).

Φέρον αέριο: Ήλιο

Βοηθητικά Αέρια για τον FID:

- Υδρογόνο καθαρότητας > 99,9 % απαλλαγμένο από οργανικές προσμείξεις.
- Συνθετικός αέρας απαλλαγμένος από οργανικές προσμείξεις.
- Άζωτο καθαρότητας > 99 %.

Οι συνθήκες ανάλυσης των οργάνων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συνθήκες αεριοχρωματογράφου και ανιχνευτών για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου και τη μέτρηση των δειγμάτων

<u>Αεριοχρωματογράφος (GC)</u>	
Θερμοκρασία Συστήματος Έγχυσης	340 °C
Θερμοκρασιακό πρόγραμμαφούρνου GC	Αρχικά παραμένει στους 200 °C για 2 λεπτά. Στη συνέχεια γίνεται αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 325 °C με ρυθμό 15 °C/min και παραμονή στους 325 °C για 10 λεπτά
Ροή φέροντος αερίου	1,0 mL/min
Αναλογία διαμοιρασμού	1:20
Όγκος έγχυσης	1μL
<u>FID</u>	
Θερμοκρασία ανιχνευτή	340 °C
Ροή βοηθητικών αερίων	Άζωτο: 25 mL/min Υδρογόνο: 30 mL/min Συνθετικός αέρας: 300 mL/min
Υδρογόνο/Ηλιο	Πίεση στην κορυφή της στήλης 15,4 kPa
<u>MS/MS</u>	
EI	Θετικός ιοντισμός
Εύρος μαζών (m/z)	10-1200 Da
Ρυθμός σάρωσης	14.000 Da/sec
Διακριτική ικανότητα	Από 1 Unit (0.7 Da) μέχρι 4 Da

5.3.4 Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε ως αφετηρία για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων είναι βασισμένη στην μέθοδο ISO29822:2012. Τα διγλυκερίδια τα οποία προσδιορίζονται σύμφωνα με όλες τις πρότυπες μεθόδους είναι ηδιπαλμιτίνη ή οποία έχει στο μόριό της 32 άτομα άνθρακα και αποτελείται από δύο αλυσίδες παλμιτικού οξέος, η διστεατίνη η οποία έχει στο μόριό της 36 άτομα άνθρακα και αποτελείται από δύο αλυσίδες στεατικού οξέος, και το ενδιάμεσο από αυτά διγλυκερίδιο το οποίο έχει συνολικά 34 άτομα άνθρακα, το οποίο αντιστοιχούσε δύο αλυσίδες, μία στεατικού και μία παλμιτικού οξέος. Τα διγλυκερίδια αυτά προσδιορίζονται και στις δύο μορφές που υπάρχουν εντός του ελαιολάδουχρωματογραφικά. Στη συνέχεια υπολογίζεται το άθροισμα των 1,2- και 1,3- διγλυκεριδίων από το εμβαδόν των κορυφών τους και ανάλογα με το εμβαδόν της κάθε μίας ξεχωριστά υπολογίζεται η περιεκτικότητά τους σε σχέση με το σύνολό τους. Ο τύπος για τον υπολογισμό των ποσοστιαίων περιεκτικότητων είναι:

$$\%D = \frac{A_x}{\sum A_{DAG}} 100\%$$

Όπου:

A_x : το εμβαδόν της κορυφής του 1,2- ή 1,3-διγλυκεριδίου

$\sum A_{DAG}$: Το άθροισμα των εμβαδών των 1,2- ή των 1,3- διγλυκεριδίων αντίστοιχα

Τέλος αυτό που υπολογίζεται είναι ο λόγος των δύο αθροισμάτων ο οποίος αντιστοιχεί σε έναν από τους δείκτες φρεσκότητας των ελαιολάδων και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$D = \frac{A_{1,2}}{A_{1,3}}$$

Όπου:

$A_{1,2}$: Είναι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών των 1,2- διγλυκεριδίων

$A_{1,3}$: Είναι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών των 1,3- διγλυκεριδίων

Ο λόγος αυτός θα πρέπει σύμφωνα με τη βιβλιογραφία να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερος ώστε να θεωρείται το υπό ανάλυση ελαιόλαδο φρέσκο.

5.3.5 Βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού διγλυκεριδίων

Η αρχική μελέτη της μεθόδου, έγινε σε αεριοχρωματογράφο με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών. Έγινε εφαρμογή των συνθηκών που έχει θεσπίσει το ISO 29822:2012, και στη συνέχεια, έγιναν αναλύσεις με σκοπό την εύρεση βέλτιστων συνθηκών ώστε να υπάρχει καλύτερη ευαισθησία .

Η πορεία της μεθόδου ISO 29822:2012 είναι:

- Ζύγιση 100 mg ελαιολάδου και διάλυση σε 1 mL τολουολίου.
- Μεταφορά του δείγματος σε στήλη SPE σίλικας και έκπλυση του δοχείου με 1 mL μείγματος ισοοκτανίου:διισοπροπυλαιθέρα (85:15).
- Εκπλυση δύο φορές της στήλης με 3,5 mL μείγματος ισοοκτανίου:διισοπροπυλαιθέρα (85:15) και απομάκρυνση των αποβλήτων.
- Το κλάσμα των διγλυκεριδίων συλλέγεται με την προσθήκη 3,5 mL διαιθυλεθέρα δύο φορές.
- Εξάτμιση του διαλύτη μέχρι το 1 mL σε περιστροφικό εξατμιστή 20 °C και στη συνέχεια προσθήκη 200 μL αντιδραστηρίου σιλιανοποίησης και παραμονή για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 mL ακετόνης και εισάγονται 1-2 μL στον αεριοχρωματογράφο.

Οι συνθήκες του GC-FID παρουσιάζονται στον Πίνακα 7:

Πίνακας 7: Συνθήκες GC-FID

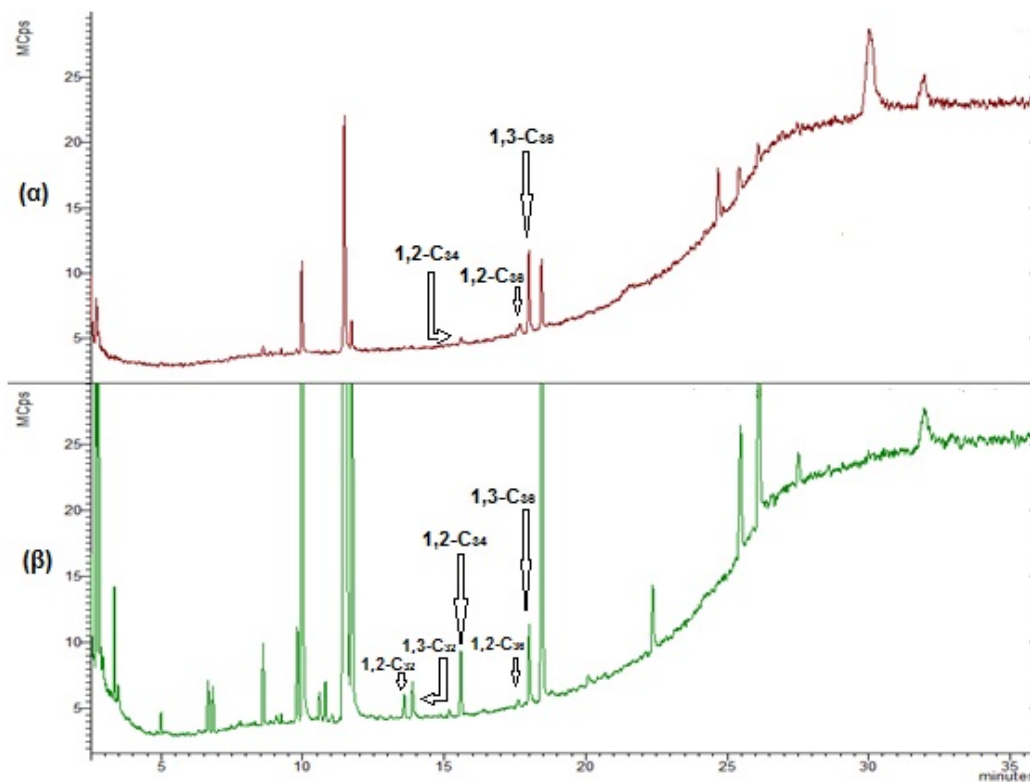
Εισαγώμενος όγκος	1 μL με διαμοίρασμα (1:50)
Φέρον αέριο	Υδρογόνο με ροή 2 mL/min
Αέρια FID	Υδρογόνο με ροή 33 mL/min και συνθετικός αέρας με ροή 420 mL/min
Θερμοκρασία εισαγωγέα	340 °C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	340 °C
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου	Αρχική θερμοκρασία 240 °C για 1 λεπτό Αύξηση με ρυθμό 10 °C/min στους 320 °C και παραμονή για 10 λεπτά

5.3.5.1 Προκατεργασία δείγματος

Έγινε σύγκριση μετρήσεων της διαδικασίας η οποία ακολουθείται σύμφωνα με το ISO 29822:2012 με προκατεργασία των δειγμάτων με SPE και χωρίς SPE ώστε να γίνει σίγουρο ότι δεν χάνονται ουσίες και ότι η SPE ενισχύει την ευαισθησία της μεθόδου. Η μέτρηση έγινε για δέκα διαφορετικά δείγματα ελαιολάδου από το νησί της Λέσβου. Λήφθηκαν 100 μL από τα δείγματα του χωρίς προκατεργασία με SPE και 100 μL από το έκλουσμα μετά από την επεξεργασία τους με SPE. Παρακάτω παρουσιάζονται συγκριτικά τα χρωματογραφήματα για δύο από τα δέκα δείγματα που μετρήθηκαν με τις δύο μεθόδους προκατεργασίας.

Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα χωρίς και με προκατεργασία με SPE. Σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκε η ίδια συμπεριφορά που παρουσιάζεται στις δύο παραπάνω συγκριτικές εικόνες. Με την προκατεργασία με SPE η ευαισθησία της μεθόδου ήταν εμφανώς

καλύτερη και παρατηρήθηκαν κορυφές οι οποίες δεν εμφανίζονταν καθόλου στην περίπτωση όπου γινόταν κατευθείαν σιλιανοποίηση στο δείγμα. Αυτό συμβαίνει καθώς κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης, γίνεται προσυγκέντρωση των διγλυκεριδίων και καθαρίζεται το δείγμα με αποτέλεσμα να έχουμε μειωμένη επίδραση μήτρας. Και τα δύο συνεισφέρουν στην αύξηση της ευαισθησίας όπως και παρατηρήθηκε.



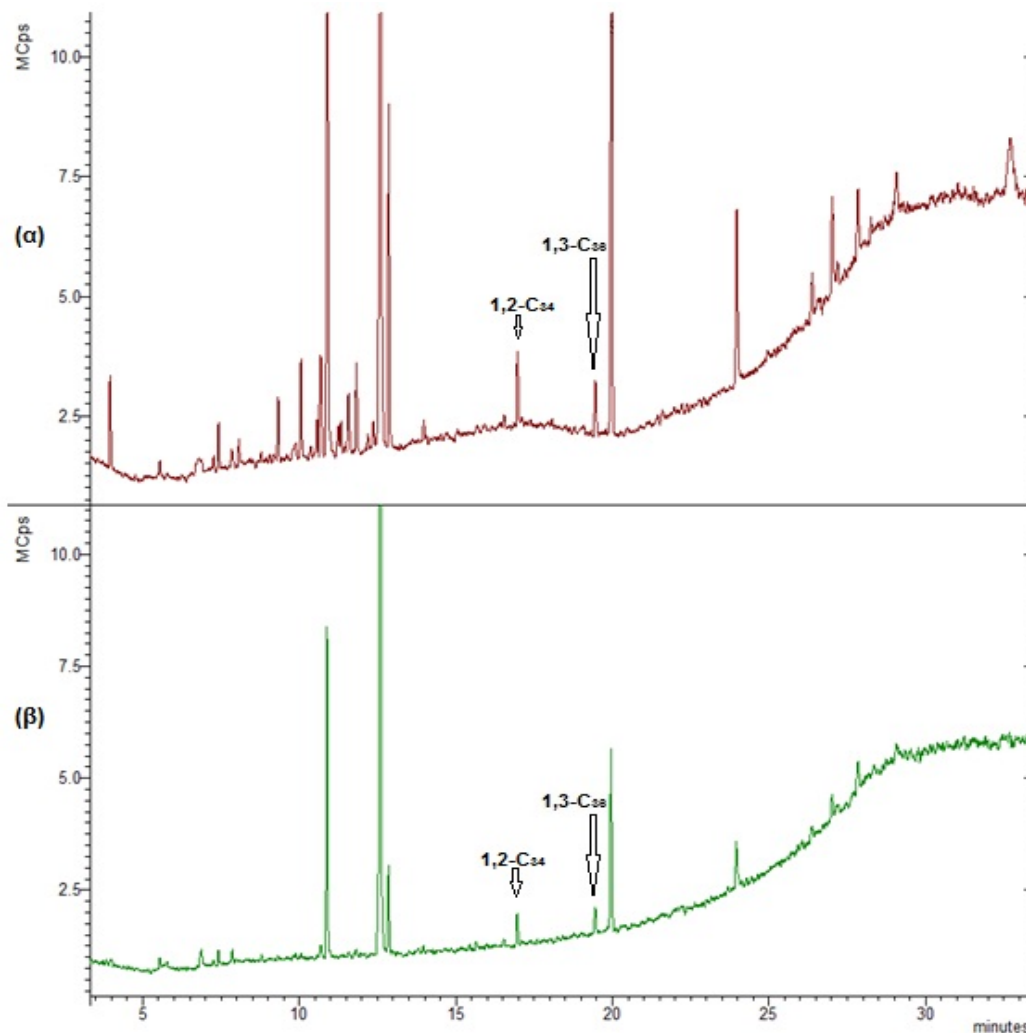
Εικόνα 16: Μέτρηση δειγμάτων (α) χωρίς προκατεργασία με SPE (β) με προκατεργασία με SPE

5.3.5.2 Διαμοιρασμός δείγματος

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο διαμοιρασμός του δείγματος πριν την εισαγωγή του στη στήλη. Το δείγμα μετρήθηκε σε συνθήκες διαμοιρασμού 1:20, 1:30, 1:40 και 1:50.

Από τα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω, όπου συγκρίνονται οι περιπτώσεις διαμοιρασμού 1:20 και 1:50 που ήταν οι δύο ακραίες περιπτώσεις, είναι φανερό ότι οι ουσίες οι οποίες βρίσκονται σε μικρές ποσότητες μέσα στο δείγμα, χάνονται κατά το διαμοιρασμό του

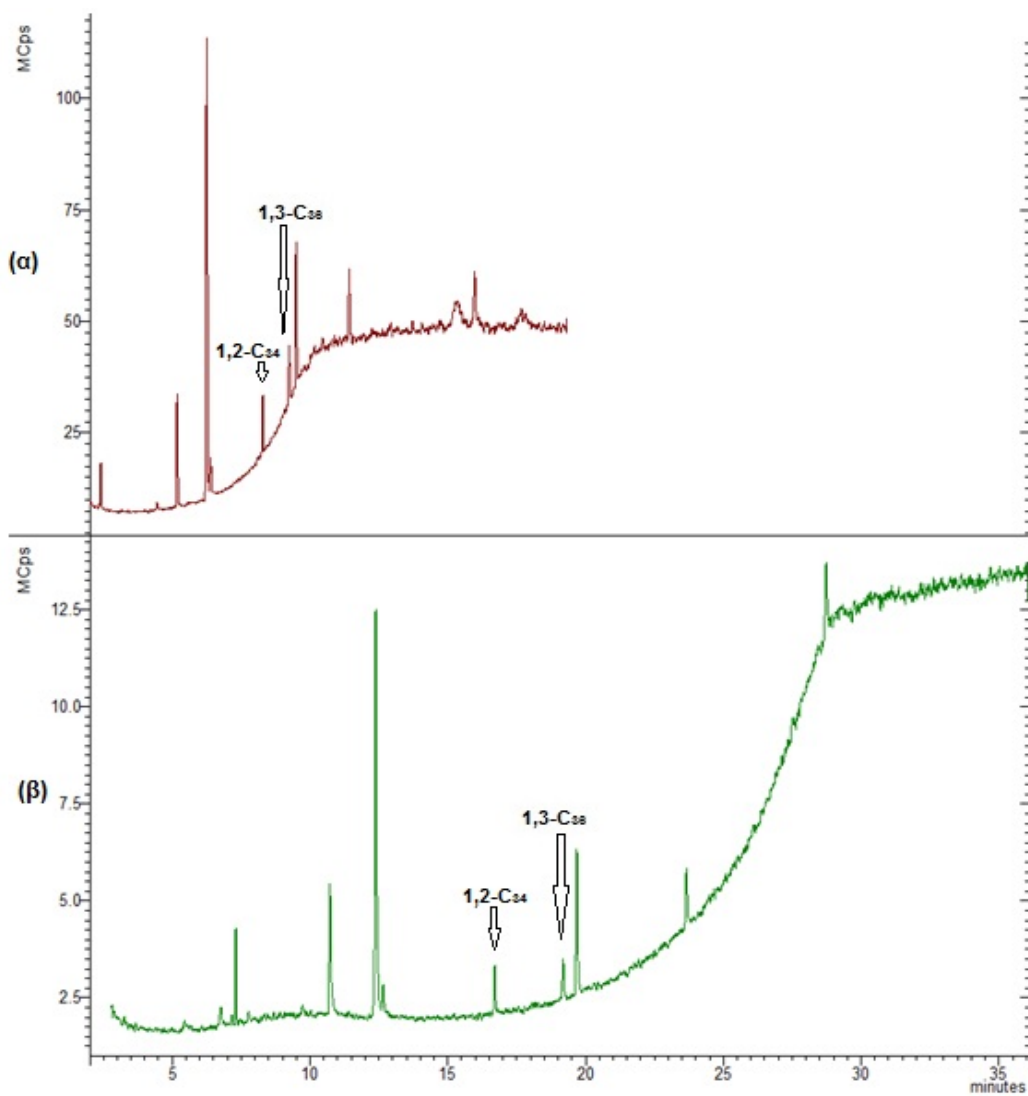
δείγματος με αναλογία 1:50 όπως φαίνεται στο χρωματογράφημα (β). Από τη άλλη πλευρά, παρατηρώντας το χρωματογράφημα (α), προκύπτει ότι με τον διαμορισμό 1:20 προκύπτουν οξείες και ευδιάκριτες κορυφές περισσότερων ουσιών για αυτό και επιλέχθηκε.



Εικόνα 17: Μέτρηση με συνθήκη διαμορισμού (α) 1:20 και (β) 1:50

5.3.5.3 Χρόνος χρωματογραφήματος

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια μείωσης του χρόνου κάθε χρωματογραφήματος. Ακολουθήθηκε διαφορετικό θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του χρωματογράφου όπου η αρχική θερμοκρασία είναι υψηλότερη και γίνεται αύξησή της με ταχύτερο ρυθμό. Η σύγκριση έγινε με μέτρηση του ίδιου δείγματος την ίδια ημέρα



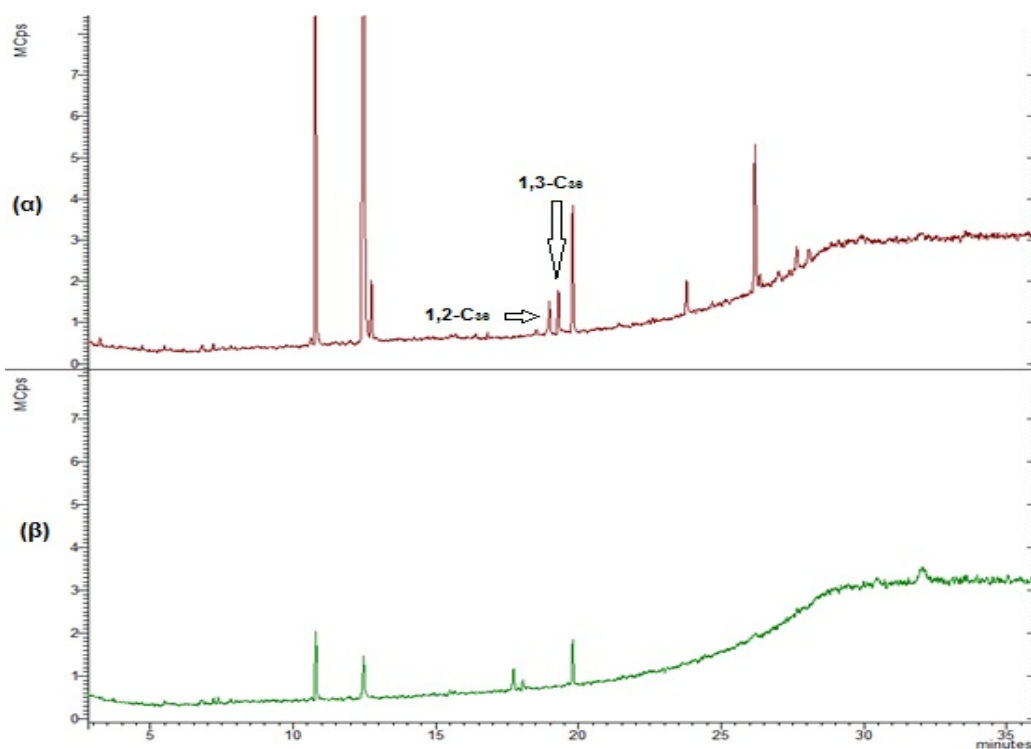
Εικόνα 18: Μέτρηση με αρχική θερμοκρασία φούρνου του αεριοχρωματογράφου (α) 200 °C και (β) 80 °C

.Κατά την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων παρατηρήθηκε ότι είχαν ίδιο αριθμό κορυφών και ήταν όμοιες μεταξύ τους αλλά με διαφορετικούς χρόνους ανάσχεσης και διαφορετικά εμβαδά. Έγινε σύγκριση των αντίστοιχων κορυφών ως προς τον χρόνο ανάσχεσης και ως προς το εμβαδόν τους. Το συμπέρασμα της σύγκρισης ήταν ότι με το δεύτερο θερμοκρασιακό πρόγραμμα παραλαμβάνονται οι ίδιες κορυφές και μάλιστα με μεγαλύτερο εμβαδόν. Αυτό θα πρέπει να οφείλεται στην αρχική θερμοκρασία του φούρνου που είναι υψηλή και κατά συνέπεια παραμένουν οι ουσίες μικρότερο χρονικό διάστημα εντός της ύλης.

5.3.5.4 Επιλογή διαλύτη κατά τη διάρκεια της σιλιανοποίησης

Κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου έγιναν μελετήθηκε ο διαλύτης σιλιανοποίησης. Ο λόγος για τον οποίο έγινε η μελέτη αυτή ήταν ότι κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση βρέθηκαν δημοσιεύσεις στις οποίες είχαν χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί διαλύτες μαζί με το αντιδραστήριο σιλιανοποίησης. Για αυτό τον λόγο δοκιμάστηκαν διαφορετικοί διαλύτες κατά το στάδιο της σιλιανοποίησης, ώστε να παρατηρηθεί η επίδραση που μπορεί να έχουν στην αντίδραση.

Αρχικά έγιναν μετρήσεις για την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη. Οι πρώτοι διαλύτες οι οποίοι επιλέχθηκαν ήταν το ακετονιτρίλιο και η ακετόνη.

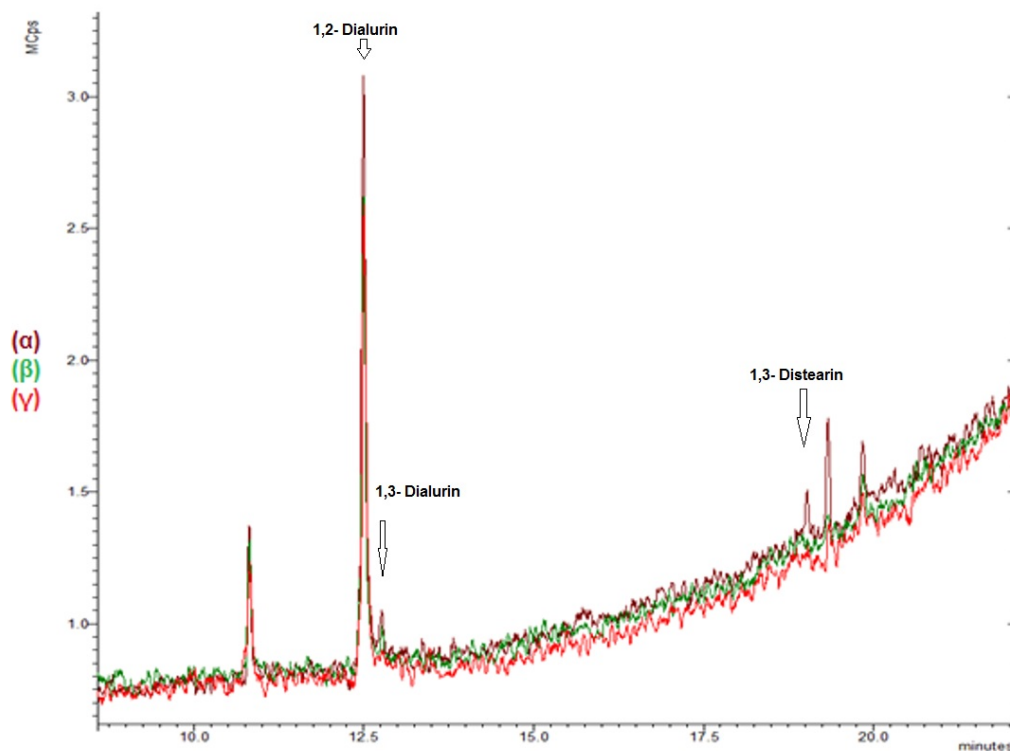


Εικόνα 19: Μέτρηση με προσθήκη διαφορετικών διαλυτών κατά τη διαδικασία της σιλιανοποίησης. (α) Ακετονιτρίλιου και (β) Ακετόνης

Στην Εικόνα 19 φαίνεται ότι η ακετόνη είναι ακατάλληλος διαλύτης για τη διαδικασία σιλιανοποίησης των διγλυκεριδίων, λόγω χαμηλής ευαισθησίας στην τελική μέτρηση.

Στη συνέχεια συγκρίθηκαν ως διαλύτες σιλιανοποίησης το εξάνιο, το ακετονιτρίλιο και το τολουόλιο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα

των μετρήσεων στο ίδιο δείγμα με αλλαγή του διαλύτη κάθε φορά, και ακολουθεί ένας πίνακας των κορυφών οι οποίες βρέθηκαν.



Εικόνα 20: Μέτρηση με προσθήκη διαφορετικών διαλυτών κατά τη διαδικασία της σιλιανοποίησης. (α) Ακετονιτριλίου (β) Εξανίου και (γ) Τολουολίου

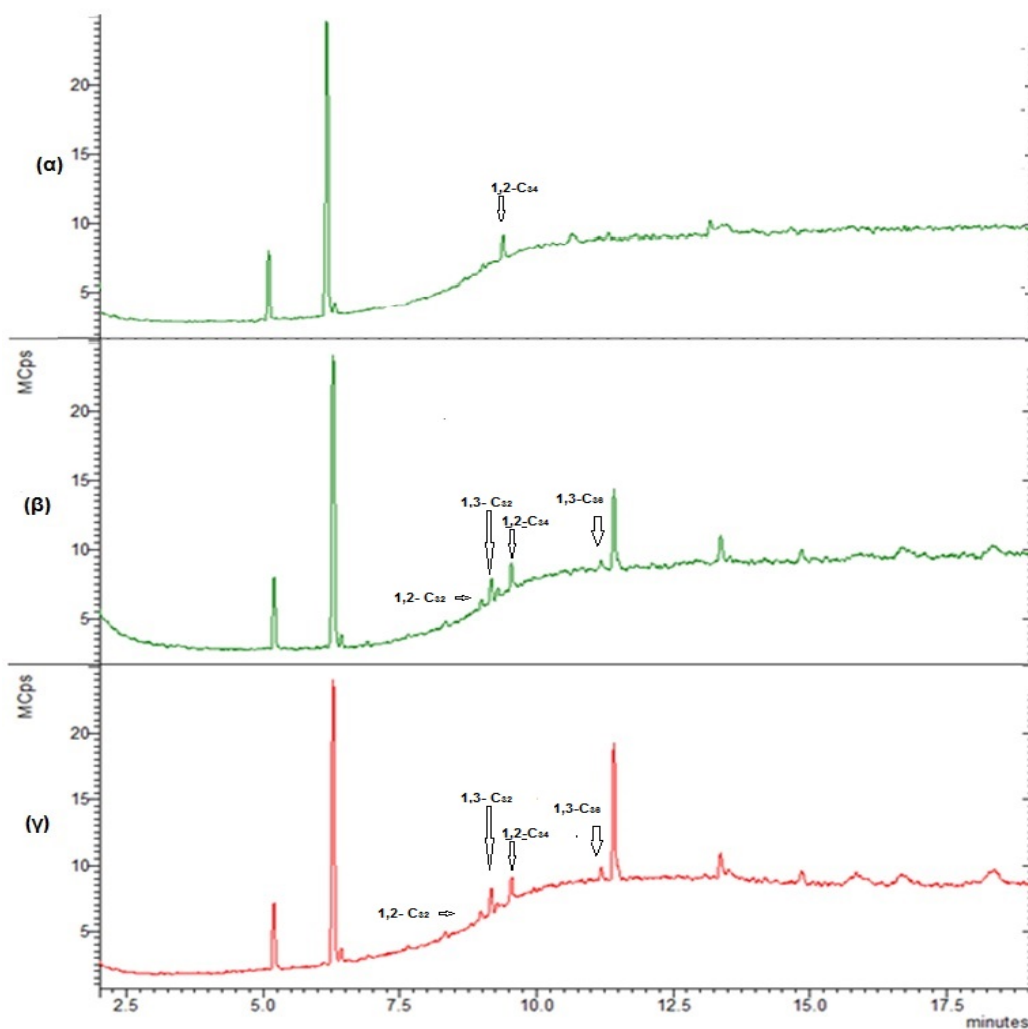
Πίνακας 8: Σύγκριση εμβαδών κορυφών

	1,2- Dilaurin		1,3- Dilaurin		1,3- Distearin	
	RT(min)	Peak Area (MCPs)	RT(min)	Peak Area (MCPs)	RT(min)	Peak Area (MCPs)
ACN	12,50	$1,0 \times 10^7$	12,76	680548	18.66	730758
HEX	12,50	$7,9 \times 10^6$	12,96	488622	-	-
TOL	12,50	$9,2 \times 10^6$	12,78	316699	-	-

Από τα εμβαδά της κάθε κορυφής φαίνεται ότι το ακετονιτρίλιο είναι ο καταλληλότερος διαλύτης καθώς λαμβάνονται ενισχυμένα σήματα για τις υπό προσδιορισμό ενώσεις των 1,2- και 1,3- Dilaurin (1,2- και 1,3- Διαλαουρίνης) και στο 18^ο λεπτό το 1,3- Distearin (1,2- Διστεαρίνη) μαζί με άλλες δύο κορυφές οι οποίες με τους υπόλοιπους διαλύτες δεν είναι διακριτές.

5.3.5.5 Επίδραση ποσότητας διαλύτη κατά τη σιλιανοποίηση

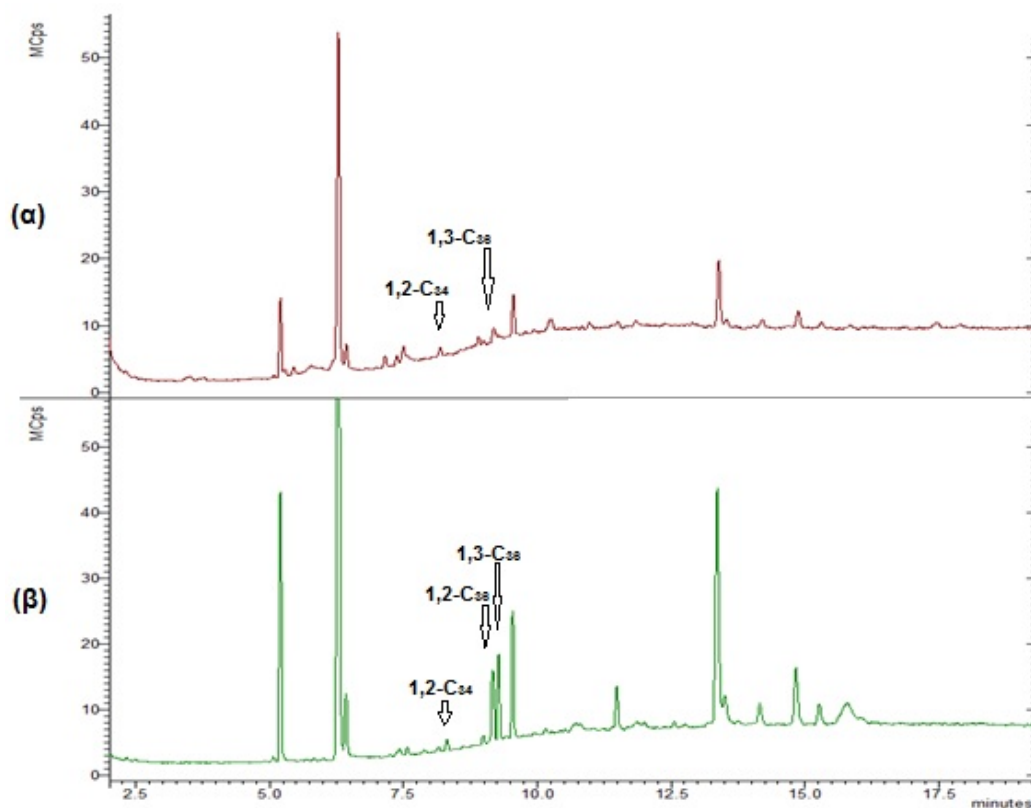
Το επόμενο βήμα ήταν να εξετασθεί εάν η προσθήκη διαλύτη κατά τη διάρκεια της σιλιανοποίησης επηρεάζει την ευαισθησία της μεθόδου. Ο τελικός όγκος των αντιδραστηρίων ο οποίος προστέθηκε ήταν 200μL. Έγιναν 5 διπλές μετρήσεις στο ίδιο δείγμα ελαιολάδου για κάθε περίπτωση.



Εικόνα 21: Χρωματογραφήματα με προσθήκη (α) 50 μL BSTFA και 150 μL ACN (β) 150 μL αντιδραστηρίου και 50 μL διαλύτη και (γ) 100μL αντιδραστηρίου σιλιανοποίησης και 100 μL ACN

Στην Εικόνα 21, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα στα οποία έγινε η σύγκριση. Παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα, διαπιστώνεται ότι με την προσθήκη 50μL BSTFA και 150 μL ACN, υπάρχει μειωμένη ευαισθησία του σήματος ως προς τα διγλυκερίδια που θα πρέπει να προσδιοριστούν. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση μεταξύ των χρωματογραφημάτων που πάρθηκαν με προσθήκη 100 μL αντιδραστηρίου σιλανοποίησης και 100 μL ACN και με την προσθήκη 150 μL αντιδραστηρίου και 50 μL διαλύτη. Με την προσθήκη 100 μL διαλύτη και 100 μL αντιδραστηρίου δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς την ευαισθησία των κορυφών. Μέσω αυτής της σύγκρισης εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι η προσθήκη 100 μL ακετονιτριλίου μαζί με 100 μL αντιδραστηρίου σιλανοποίησης είναι η βέλτιστη καθώς λιγότερη ποσότητα αντιδραστηρίου σιλανοποίησης οδηγεί σε χαμηλή ευαισθησία, ενώ μεγαλύτερη δεν προσδίδει κάποια βελτίωση.

5.3.5.6 Θερμοκρασία κατά τη σιλανοποίηση



Εικόνα 22: Μέτρηση (α) χωρίς θέρμανση και (β) με θέρμανση στους 60 °C, κατά τη σιλανοποίηση

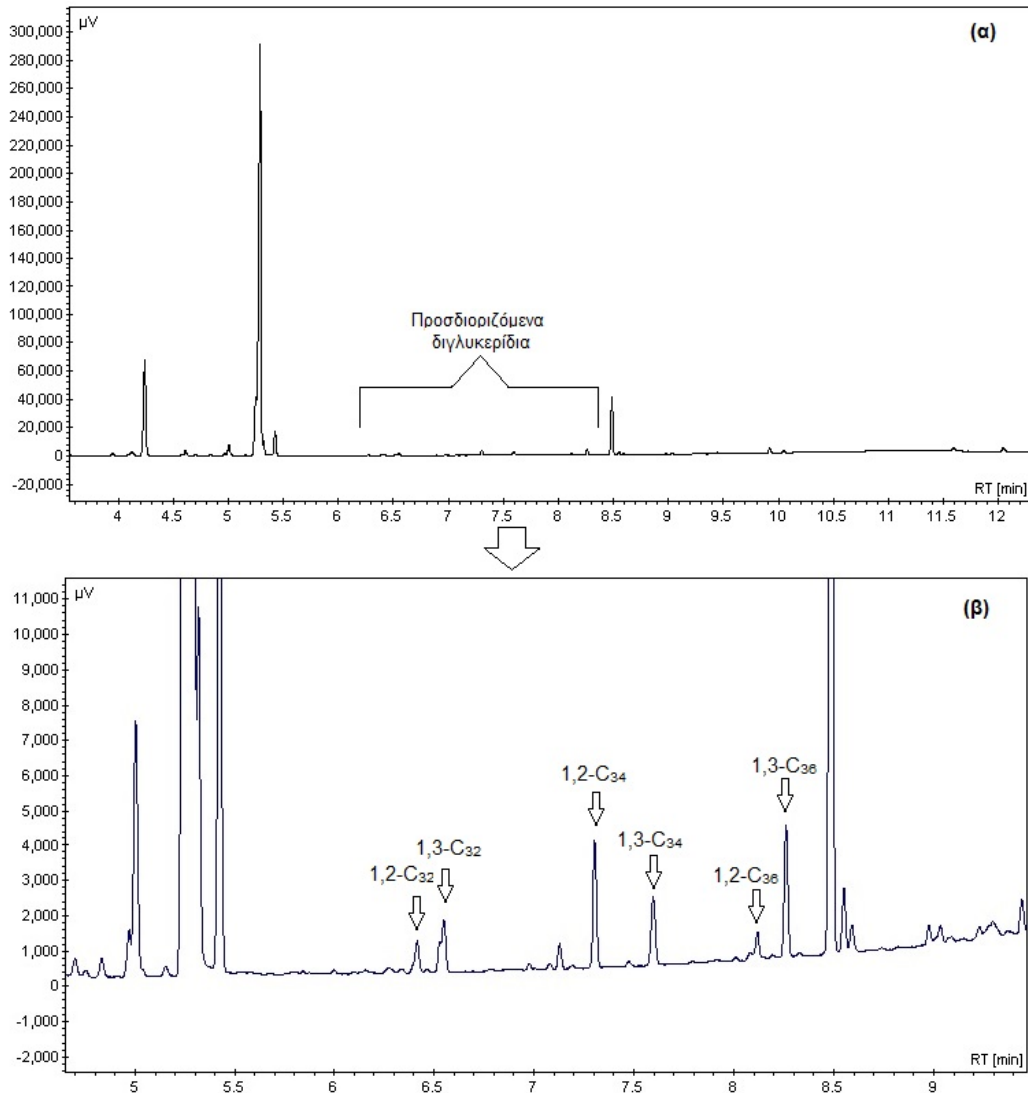
Τέλος, κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση βρέθηκαν δημοσιεύσεις στις οποίες η σιλανοποίηση των δειγμάτων γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου [10, 24, 25, 30, 36, 38] σε αντίθεση με την πρότυπη μέθοδο που ακολουθήθηκε. Για αυτό το λόγο, έγινε σύγκριση της σιλανοποίησης χωρίς θερμοκρασία με διαλύτη ακετονιτρίλιο και με θέρμανση στους 60 °C με τον ίδιο διαλύτη.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 22 η θέρμανση αποτελεί ένα απαραίτητο στάδιο για την άρτια ολοκλήρωση της διαδικασίας καθώς αυξάνει την απόδοση της σιλανοποίησης και την ευαισθησία της μεθόδου.

5.3.6 Επαλήθευση της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην ISO29822:2012. Για το λόγο αυτό επαληθεύτηκε με ένα δείγμα αναφοράς που έχει πιστοποιημένες τιμές από διεργαστηριακή σύγκριση. Η επαλήθευση έγινε στον GC-FID ο οποίος είχε μόλις παραληφθεί από το εργαστήριο και τα πειράματα συνεχίστηκαν σε αυτό το όργανο. Το δείγμα αναφοράς ήταν το COI CHEM 2017 M1.

Το δείγμα αναφοράς μετρήθηκε σε δύο διαφορετικές μέρες από πέντε επαναλήψεις (Πίνακας 8) και ταυτοποιήθηκαν οι έξι κορυφές οι οποίες σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο ISO χρειάζονται ώστε να βρεθεί ο λόγος μεταξύ των 1,2- και 1,3-διγλυκεριδίων (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: (α) Χρωματογράφημα από τον GC-FID κατά τη μέτρηση του προτύπου, (β) μεγέθυνση της περιοχής με τα προσδιοριζόμενα διγλυκερίδια

Τα ποσοστά των 1,2 και 1,3-διγλυκεριδίων βρέθηκαν εντός των ορίων του διεργαστηριακού ελέγχου και είναι ελαφρώς μειωμένα όσον αφορά τα 1,2-διγλυκερίδια το οποίο είναι φυσιολογικό καθώς το δείγμα έχει μετρηθεί 1 χρόνο πριν και έναμέρος θα έχει μετατραπεί σε 1,3-διγλυκερίδια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα καθώς και το SD και RSD των μετρήσεων.

Πίνακας 9: Παρουσίαση αποτελεσμάτων για την μέτρηση του διεργαστηριακού δείγματος

Δείγμα	% 1,2	%1,3	Λόγος 1,2/1,3
1,1	31,55	68,45	0,46
1,2	30,65	69,35	0,44
2,1	27,98	72,02	0,39
2,2	28,34	71,66	0,40
3,1	31,05	68,95	0,45
3,2	31,26	68,74	0,45
4,1	29,70	70,30	0,42
4,2	30,34	69,66	0,44
5,1	30,43	69,57	0,44
5,2	30,32	69,68	0,44
Μέσος Όρος	30,16	69,84	0,43
Τυπική Απόκλιση	1,18	1,18	0,02
%RSD	3,91	1,69	5,53

Πίνακας 10: Παρουσίαση αποτελεσμάτων του διεργαστηριακού ελέγχου

COI CHEM 2017 M1					
Παράμετρος	Αριθμός εργαστηρίων	Μέσος Όρος	Αβεβαιότητα	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
Ποσοστό 1,2-διγλυκεριδίων	64	37,62	0,67	30,10	45,15
Ποσοστό 1,3-διγλυκεριδίων	64	62,36	0,67	56,12	68,60

Συγκρίνοντας τις τιμές που βρήκαμε σε σχέση με τα όρια και τη μέση τιμή που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, παρατηρήσαμε ότι είναι πολύ κοντά. Επιπλέον το ISO29822:2012 αναφέρει ότι τα αποτελέσματα από τη μέτρηση δύο ίδιων δειγμάτων είναι εντός προδιαγραφών εάν η τυπική απόκλιση τους είναι μικρότερη του 5 %.

5.4 Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων

Σύμφωνα με την βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε στο Κεφάλαιο 3, η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων σε ελαιόλαδο έγινε με υγροχρωματογραφία και ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών σε σειρά και η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε βάση του φάσματος των ιόντων που προκύπτουν (full scan mode).

5.4.1 Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο (καθαρότητας, LC-MS) αγορασμένο από τη Merck (Darmstadt, Germany).

5.4.2 Οργανολογία

Ο υγροχρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο UHPLC Accela Pump με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών TSQ Access Triple Quadrupole Mass Spectrometer της Thermo Fisher Scientific (Waltham,

USA). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία δεδομένων είναι το Thermo Xcalibur Software.



Εικόνα 24: Υγροχρωματογράφος(LC) με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) [67]

5.4.3 Πειραματική πορεία

➤ Μέθοδος προκατεργασίας

Η προκατεργασία η οποία ακολουθήθηκε, με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ήταν η αραίωση των δειγμάτων ελαιολάδου σε ακετονιτρίλιο με αναλογία 5 % v/v. Η παρασκευή έγινε με προσθήκη 50 μ L δείγματος και 950 μ L ακετονιτρίλιου.

➤ Συνθήκες μέτρησης

Οι συνθήκες μέτρησης οι οποίες εφαρμόστηκαν κατά τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 11: Συνθήκες LC/MS/MS κατά τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων

Συνθήκες LC	
Αναλυτική στήλη	ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HT, 2,1×100mm, 1,8-Micron, 600 Bar
Όγκος έγχυσης	10 µL
Κινητή φάση	Ισοκρατικά με 100 % Ακετονιτρίλιο
Ροή	0,2 mL/min
Θερμοκρασία στήλης	30 °C
Διάρκεια χρωματογραφήματος (min)	100
Συνθήκες APCI	Θετικός ιοντισμός
Συνθήκες MS	
Λειτουργία Σάρωσης	Full scan
Εύρος σάρωσης (m/z)	200-1000
Συνθήκες πηγής ιοντισμού	Ένταση κορώνας: 3 µA

5.4.4 Μεθοδολογία για την ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων

Για την ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων στο φασματόμετρο μαζών χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan), όπως προτείνεται και στην βιβλιογραφία και από το φάσμα των μαζών και τα ιόντα που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν τα τριγλυκεριδία.

Αναλυτικότερα, καθώς τα τριγλυκεριδία αποτελούνται από λιπαρά οξέα τα οποία μπορούν να υπάρξουν σε πολλούς συνδυασμούς, παρουσιάζοντας έτσι μια σειρά πολλών ισοβαρών τριγλυκεριδίων, δυσχεραίνοντας την ταυτοποίησή τους. Στη μελέτη για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων, δεν λαμβάνονται τόσο πολύ υπόψη τα μοριακά ιόντα, αλλά τα θραύσματα που προκύπτουν μετά την θραυσματοποίηση των τριγλυκεριδίων στην πηγή (in-source fragmentation). Τα ιόντα που προκύπτουν είναι, πέρα από τα μοριακά ιόντα που βρίσκονται σε χαμηλή ένταση, τα ψεύδο-διγλυκεριδία (ιόντα των αντίστοιχων διγλυκεριδίων αλλά από τη

θραυσματοποίηση των τριγλυκεριδίων), τα ακυλιομένα ιόντα των αντίστοιχων λιπαρών οξέων και τα κετενικά ιόντα των ψευδο-διγλυκεριδίων, όπως θα αναλυθούν παρακάτω [68,69].

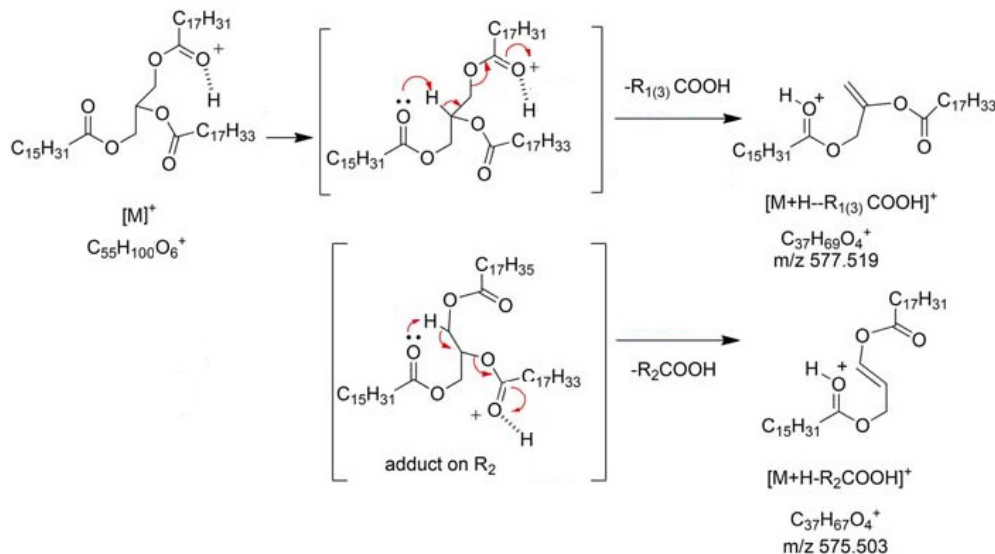
Πιο αναλυτικά, στην ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων σημαντικό ρόλο έχει η δομή του. Ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών λιπαρών οξέων που έχει το κάθε τριγλυκερίδιο, χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- 1) Τα τριγλυκερίδια τα οποία αποτελούνται από ένα είδος λιπαρού οξέος στο μόριο της γλυκερόλης. Στο φάσμα μαζών παρουσιάζονται συνήθως τρεις κορυφές ιόντων ταυτοποίησης, μία από το ακυλιομένο ιόν των ψευδο-διγλυκεριδίων ή του λιπαρού οξέος, μία από το κετενικό ιόν και μία από το ίδιο το ψευδοδιγλυκερίδιο [68,69].
- 2) Τα τριγλυκερίδια τα οποία έχουν δύο είδη λιπαρών οξέων στο μόριο της γλυκερόλης. Σε τριγλυκερίδια τέτοιου είδους παρουσιάζεται το πρόβλημα της ισομέριας διότι το τριγλυκερίδιο μπορεί να έχει τη μορφή AAB, ABA ή ABB. Στο φάσμα μαζών τους παρουσιάζονται τρεις κατηγορίες ιόντων που υποστηρίζουν την ταυτοποίηση. Οι κορυφές αυτές που αντιστοιχούν στα ακυλιομένα ιόντα είτε των λιπαρών οξέων είτε των ψευδο-διγλυκεριδίων, στα αντίστοιχα κετενικά ιόντα και στα ιόντα των ψευδο-διγλυκεριδίων. Για την ακριβή ταυτοποίηση λαμβάνεται υπόψη ο λόγος των κορυφών των ιόντων, μέσω του οποίου μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα ως προς τη δομή του τριγλυκεριδίου [68,69].
- 3) Τα τριγλυκερίδια τα οποία έχουν τρία είδη λιπαρών οξέων στο μόριο της γλυκερόλης εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά με τα τριγλυκερίδια της προηγούμενης κατηγορίας. Η διαφορά βρίσκεται στο μεγαλύτερο αριθμό κορυφών που προκύπτουν, λόγω των περισσότερων συνδυασμών που μπορούν να προκύψουν από την θραυσματοποίηση τους [68,69].

5.4.4.1 Μελέτη των μοντέλων θραυσματοποίησης των τριγλυκεριδίων

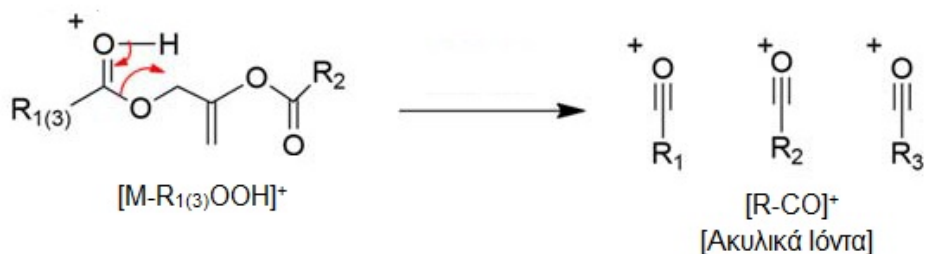
Τα ιόντα που προκύπτουν από τη θραυσματοποίηση των τριγλυκεριδίων στην πηγή και συνήθως υπάρχουν σε αφθονία σε ένα φάσμα ενός τριγλυκεριδίου, είναι αυτά των ιόντων ψευδο-διγλυκεριδίων. Ο μηχανισμός σύμφωνα με τον

οποίο προκύπτουν τα ψευδοδιγλυκερίδια $[M+H-RCOOH]^+$ είναι η απομάκρυνση ενός λιπαρού οξέος υπό τη μορφή καρβοξυλικού οξέος και συμβολίζονται ως $[RCOOH]$ (όπου το R αντιστοιχεί στην αλυσίδα του εστεροποιημένου λιπαρού οξέος που έφυγε). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ο αναλυτικός μηχανισμός [68,69].



Σχήμα 1: Μηχανισμός σχηματισμού των ψευδο-διγλυκεριδίων [68]

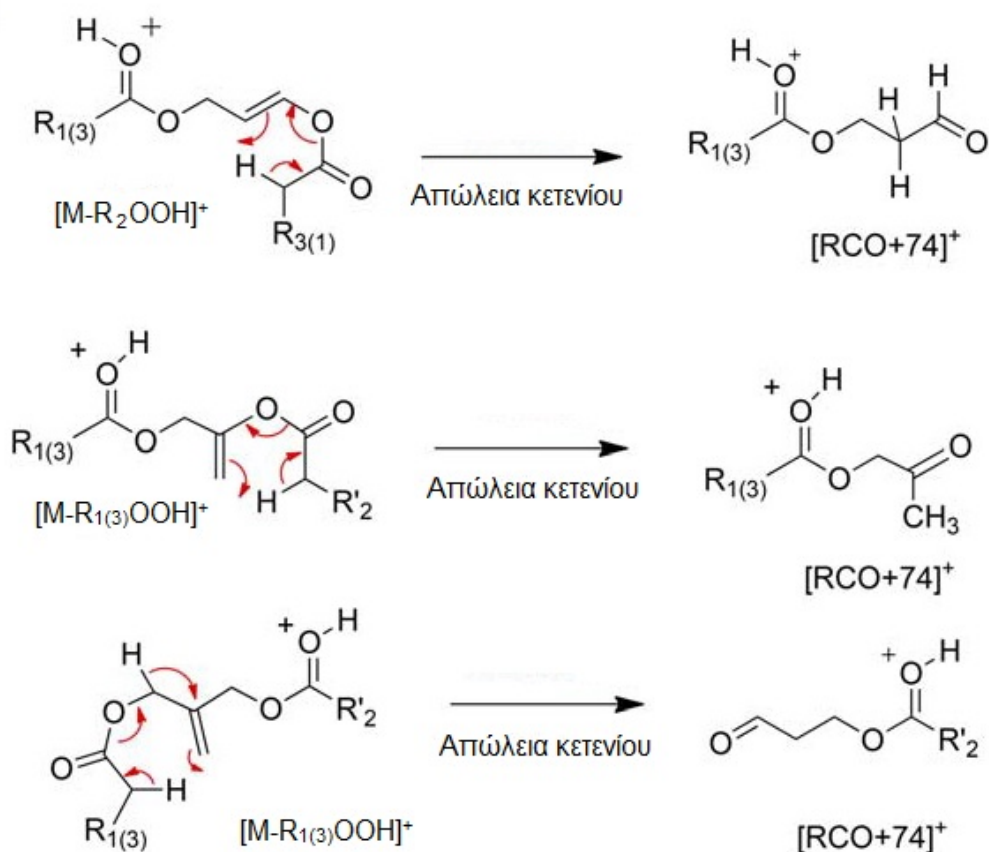
Στη συνέχεια, από τα ψευδο-διγλυκερίδια ή τα μοριακά ιόντα, λόγω του θετικού ιοντισμού και μέσω της μετατόπισης των ηλεκτρονίων του φορτισμένου καρβονυλικού οξυγόνου, προκύπτουν τα ακυλικά ιόντα των λιπαρών οξέων το οποία συμβολίζονται ως $[RCO]^+$. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται αναλυτικά ο μηχανισμός.



Σχήμα 2: Μηχανισμός σχηματισμού ακυλικών ιόντων των λιπαρών οξέων [68]

Κατά τη θραυσματοποίηση των ψευδο-διγλυκεριδίων, εκτός από τα ακυλικά παραλαμβάνονται σε μεγάλο ποσοστό και σταθερα ιόντα κετενίων. Τα ιόντα κετενίου που προκύπτουν, έχουν m/z μεγαλύτερο κατά 74 Da από το αντίστοιχο ακυλιομένο ιόν που θα προέκυπτε από τον προηγούμενο μηχανισμό.

Ένας πιθανός μηχανισμός για το σχηματισμό του ιόντος, είναι η μετατόπιση ενός φορτισμένου πρωτονίου από έναν απομακρυσμένο διπλό δεσμό, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός κετενίου το οποίο περιλαμβάνει μία από τις δύο αλυσίδες λιπαρού οξέος του ψευδο-διγλυκεριδίου. Τα κετένια που προκύπτουν συμβολίζονται ως $[RCO+74]^+$. Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται ο μηχανισμός.



Σχήμα 3: Μηχανισμός σχηματισμού κετικών ιόντων [68]

Όλα τα είδη των ιόντων που προκύπτουν αποτελούν το κλειδί για την ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων.

5.4.4.2 Μάζες ιόντων των τριγλυκεριδίων

Το επόμενο βήμα ήταν η καταγραφή σε πίνακες των αναμενόμενων m/z όλων των πιθανών ιόντων που θα προκύψουν κατά τη θραυσματοποίηση των τριγλυκεριδίων.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται τα ακυλικά ιόντα των λιπαρών οξέων που προέκυψαν.

Πίνακας 12: Παρουσίαση m/z των ακυλικών ιόντων των λιπαρών οξέων

Πλήρες όνομα	Συμβολισμός	Αριθμός ανθράκων: Βαθμός ακορεστότητας	[RCO] ⁺ m/z
Παλμιτικό οξύ	P	16:0	239
Παλμιτελαϊκό οξύ	Po	16:1	237
Στεατικό οξύ	S	18:0	267
Ελαϊκό οξύ	O	18:1	265
Λινελαϊκό οξύ	L	18:2	263
Λινολενικό οξύ	Ln	18:3	261
Στεαριδονικό οξύ	St	18:4	259

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα ιόντα κετενίων που προκύπτουν από τη διάσπαση των ψευδο-διγλυκεριδίων.

Πίνακας 13: Παρουσίαση m/z των ΚΕΤΕΝΙΚΩΝ Ιόντων των λιπαρών οξέων

Πλήρες όνομα	Συμβολισμός	Αριθμός ανθράκων: Βαθμός ακορεστότητας	[RCO+74] ⁺ m/z
Παλμιτικό οξύ	P	16:0	313
Παλμιτελαϊκό οξύ	Po	16:1	311
Στεατικό οξύ	S	18:0	341
Ελαϊκό οξύ	O	18:1	339
Λινελαϊκό οξύ	L	18:2	337
Λινολενικό οξύ	Ln	18:3	335
Στεαριδονικό οξύ	St	18:4	333

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα ιόντα των ψευδο-διγλυκεριδίων.

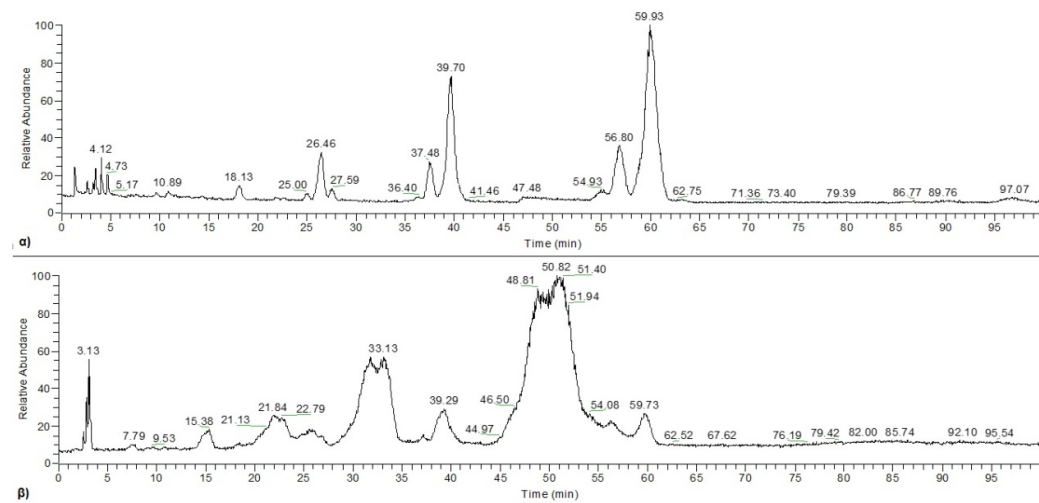
Πίνακας 14: Παρουσίαση m/z των ψευδοδιγλυκεριδίων

[M+H-RCOOH] ⁺	m/z	[M+H-RCOOH] ⁺	m/z
PoPo	547	LnLn	595
PPo	549	LLn	597
PP	551	OLn	599
PoLn	571	LL	599
PLn	573	SLn	601
PoL	573	OL	601
PL	575	SL	603
PoO	575	OO	603
PO	577	SO	605
PoS	577	SS	607
PS	579		

Με τη χρήση των προηγούμενων πινάκων, έγινε η ταυτοποίηση των τριγλυκεριδίων στα δείγματα ελαιολάδου που μετρήθηκαν.

5.4.4.3 Μελέτη διαλύτη

Εξετάστηκε η επιλογή του διαλύτη, για την αραίωση των δειγμάτων ελαιολάδου. Επειδή παρατηρήθηκε πολύ καλή διάλυση του ελαιολάδου και του προτύπου στο εξάνιο δοκιμάστηκε και η επιλογή του συγκεκριμένου διαλύτη. Το αποτέλεσμα της σύγκρισης ήταν ότι με το εξάνιο δεν παραλαμβάνουμε καθόλου καθαρή εικόνα σε αντίθεση με το ακετονιτρίλιο όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 27.



Εικόνα 25: Χρωματογραφήματα με διάλυση του ελαιολάδου α) σε ακετονιτρίλιο και β) σε εξάνιο

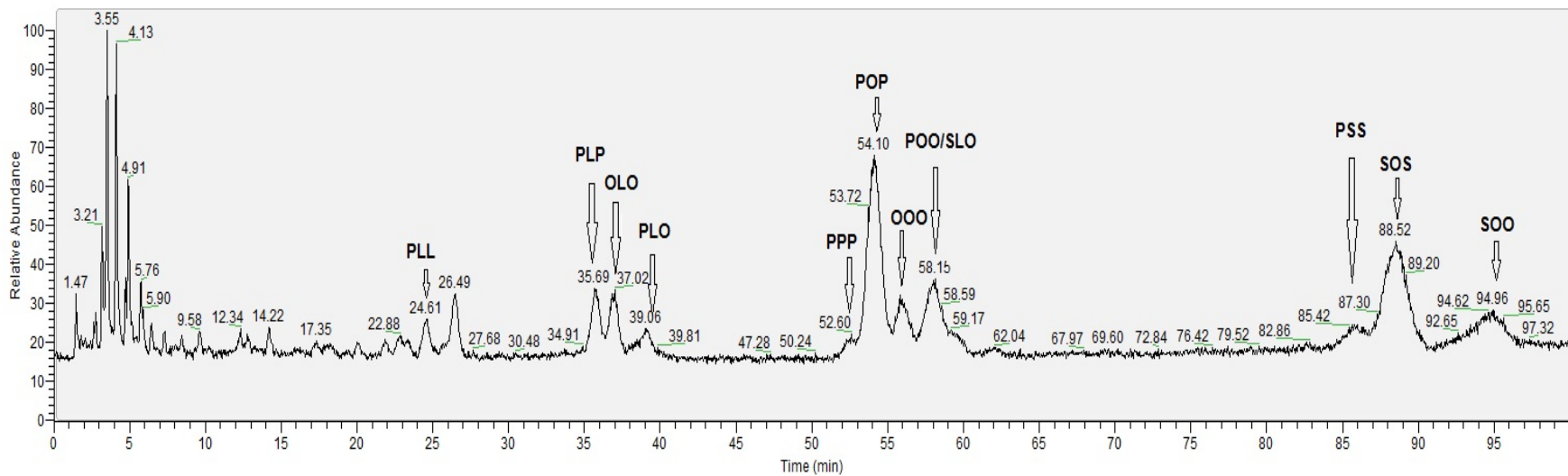
5.4.4.4 Ταυτοποίηση των κορυφών

Η ταυτοποίηση των κορυφών επιβεβαιώθηκε με τη χρήση πιστοποιημένου υλικού αναφοράς από βούτυρο κακάο με πιστοποιημένες τιμές για τα τριγλυκερίδια (IRMM-801, European Commission, Geel, Belgium). Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα τριγλυκερίδια που περιέχονται στο πρότυπο.

Πίνακας 15: Παρουσίαση των τριγλυκεριδίων που βρίσκονται στο πρότυπο

Συμβολισμός	Πλήρες όνομα	% ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
PPP	1,2,3-tripalmitoyl-glycerol	0,2
MOP	1-myristoyl-2-oleoyl-3-palmitoyl-glycerol	0,3
PPS	1,2-dipalmitoyl-3-stearoyl-glycerol	0,7
POP	1,3-dipalmitoyl-2-oleyl-glycerol	16,0
PLP	1,3-dipalmitoyl-2-linoleoyl-glycerol	1,8
PSS	1,2-distearoyl-3-palmitoyl-glycerol	0,9
POS	1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-glycerol	39,4
POO	1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-glycerol	2,0
PLS	1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-stearoyl-glycerol	3,2
PLO	1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-oleoyl-glycerol	0,3
SSS	1,2,3-tristearoyl-glycerol	0,4
SOS	1,3-distearoyl-2-oleyl-glycerol	27,9
SOO	1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-glycerol	2,9
SLS / OOO / SLO	1,3-distearoyl-2-linoleoyl-glycerol / 1,2,3-oleoyl-glycerol / 1-stearoyl-2-linoleoyl-3-oleoyl-glycerol	1,9
SOA	1-stearoyl-2-oleoyl-3-arachidoyl-glycerol	1,1
AOO	1,2-dioleoyl-3-arachidoyl-glycerol	0,1

Σύμφωνα με τις αναγραφόμενες οδηγίες του κατασκευαστή του υλικού, για την παρασκευή του προτύπου θα πρέπει πριν το άνοιγμα να θερμανθεί στους 50 °C ώστε να προκύψει υγρό ομογενές μίγμα, και να ζυγισθούν τουλάχιστον 50 mg για την παρασκευή του. Η διάλυσή του έγινε σε 1 mL ακετονιτριλίου. Το χρωματογράφημα του προτύπου παρουσιάζεται στην Εικόνα 28 όπου έχουν σημειωθεί πάνω οι κορυφές. Οι κορυφές ταυτοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία που προαναφέρθηκε.

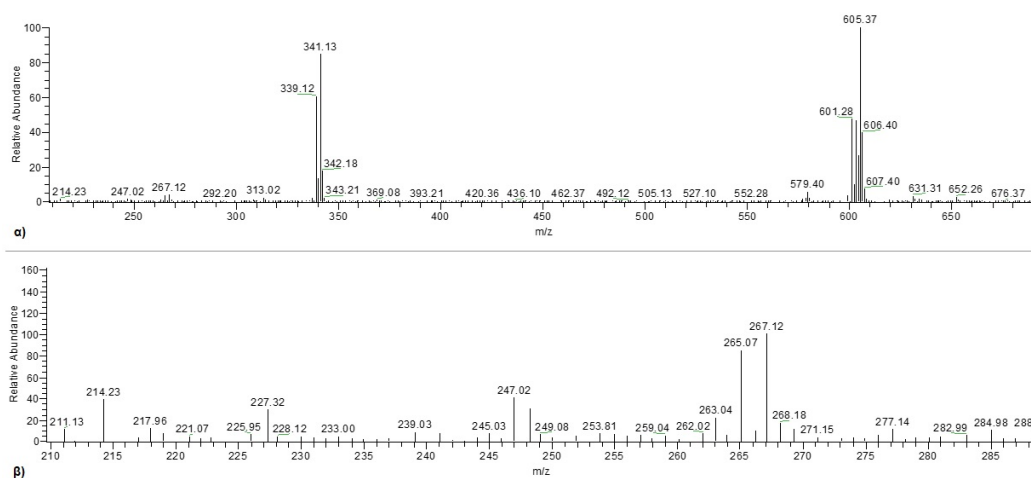


Εικόνα 26: Χρωματογράφημα πιστοποιημένου υλικού αναφοράς IRMM-801, βούτυρο από κακάο

Κατά την ταυτοποίηση των κορυφών βρέθηκαν τα τριγλυκερίδια SOO, SOS, PPS, POO, SLS, OOO, POP, PPP, PLO, OLO, PLP, PLL. Δεν βρέθηκαν όλα τα τριγλυκερίδια που παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Αυτό πιθανό να συνέβη διότι ή κάποια ήταν σε πολύ χαμηλά ποσοστά ή δεν ιοντίζονται επαρκώς, ή δεν εκλύονται μέσα στα 100 λεπτά του χρωματογραφήματος.

Για τα τριγλυκερίδια που ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν κατά την ανάλυση του προτύπου, ακολουθεί αναλυτική περιγραφή με το φάσμα κάθε τριγλυκεριδίου.

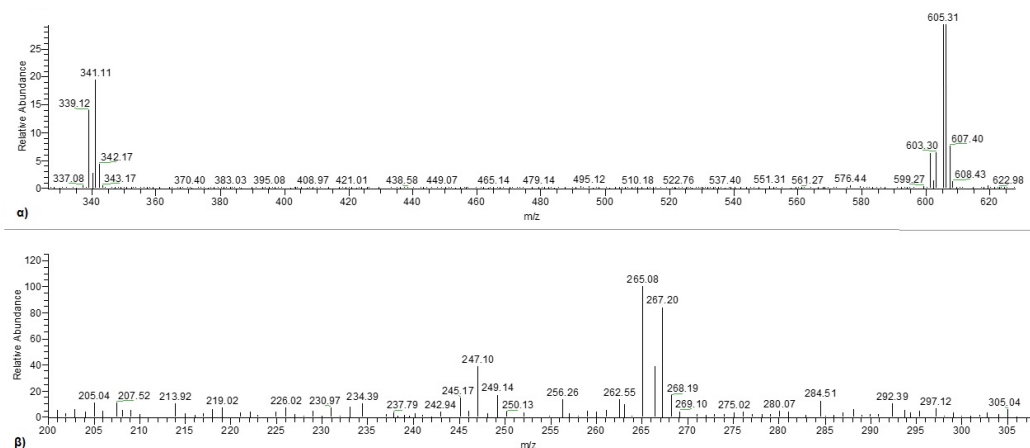
1) SOO



Εικόνα 27: Φάσμα της κορυφής στα 94,96 λεπτά η οποία ανήκει στο SOO

Η κορυφή εκλύεται στα 94,96 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 27. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 265 και 267 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των O και S αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 339 και 341. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 605 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο SO και μια κορυφή πιο μικρής έντασης στα 603 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OO. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο SOO.

2) SOS

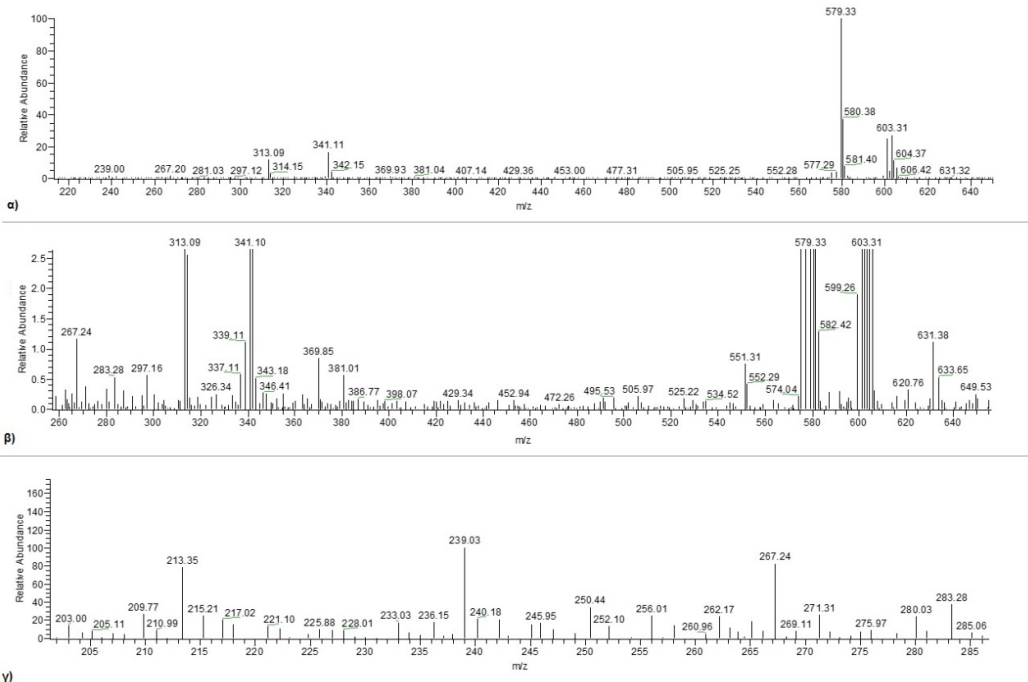


Εικόνα 28: Φάσμα της κορυφής στα 88,52 λεπτά η οποία ανήκει στο SOS

Η κορυφή εκλούεται στα 88,52 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 28. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 265 και 267 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των O και S αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 339 και 341. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 605 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο SO. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο SOS.

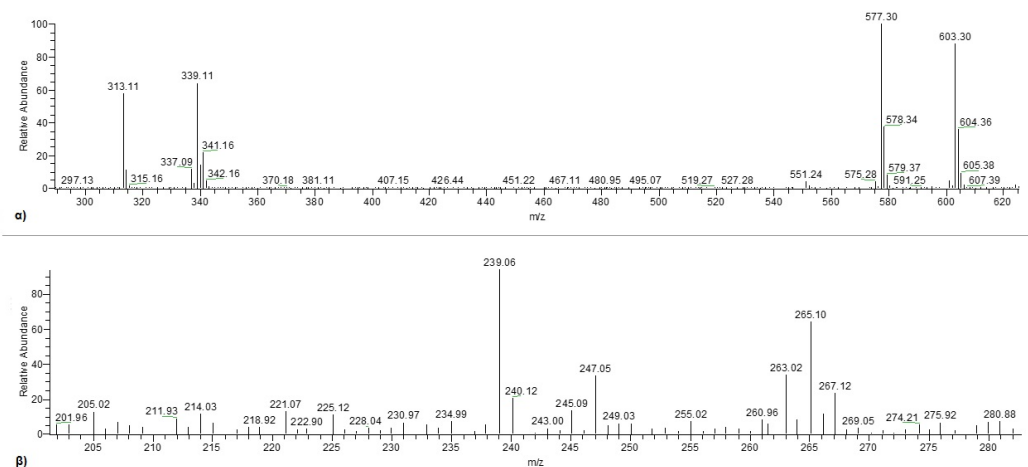
3) PPS

Η κορυφή εκλούεται στα 87,30 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 29. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 239 και 267 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των P και S αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 313 και 341. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 579m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο PS και μία κορυφή μικρή στα 551 η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο PP. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο PPS.



Εικόνα 29: Φάσμα της κορυφής στα 87,30 λεπτά η οποία ανήκει στο PPS

4) POO/SOL



Εικόνα 30: Φάσμα της κορυφής στα 58,15 λεπτά η οποία ανήκει στα POO και SLS

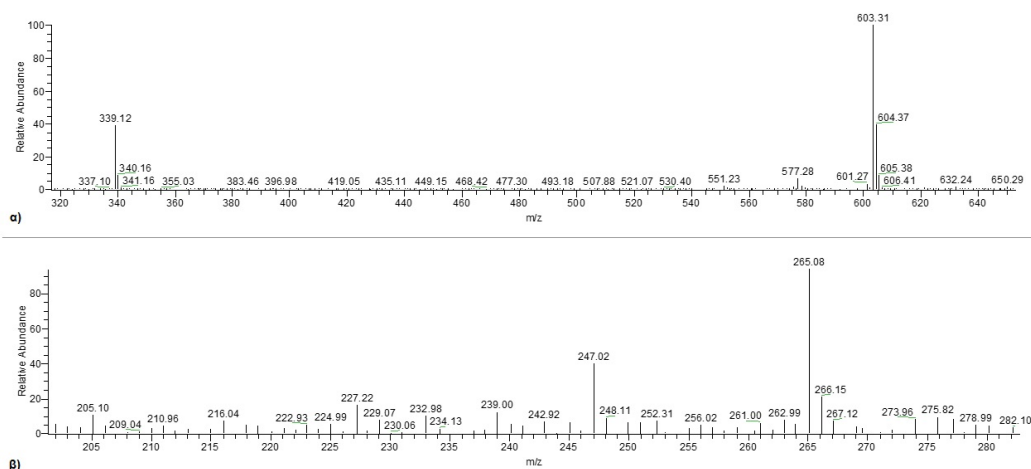
Το φάσμα της κορυφής στα 58,15 λεπτά παρουσιάζεται στην Εικόνα 32.

Η κορυφή εκλούεται στα 58,15 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 30. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 239 και 265 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των P και O

αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 313 και 339. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 577 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο PO και μία κορυφή μικρή στα 603 η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OO. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο POO.

Σε αυτή την κορυφή παρατηρήθηκαν και τα ακυλικά ιόντα των S, O και L στα 267, 265 και 263 m/z . Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 341, 339 και 337. Τέλος, εκτός από την κορυφή στα 603 m/z που αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο SL, υπάρχει και μία μικρή κορυφή μεταξύ των 604-605 m/z η οποία πιθανόν να αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο SO. Από αυτές τις μικρές κορυφές εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι πιθανόν το τριγλυκερίδιο SLO συνεκλύεται.

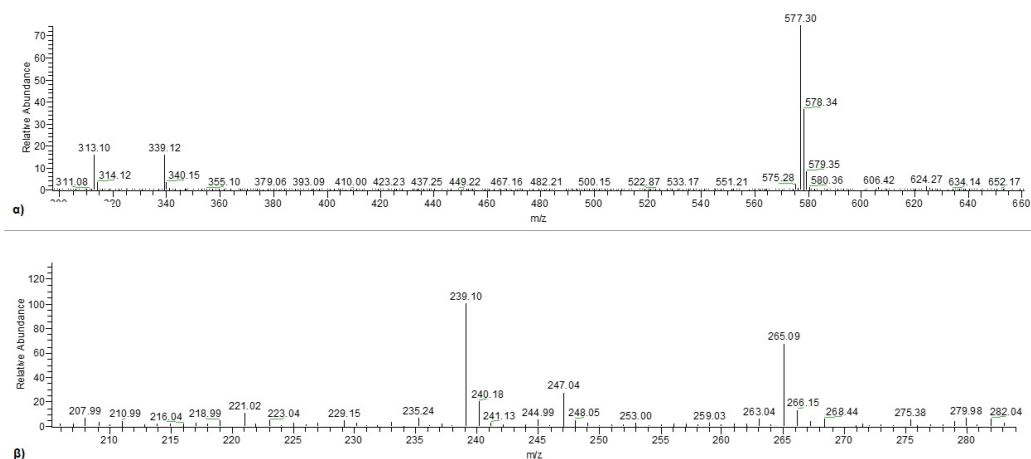
5) 000



Εικόνα 31: Φάσμα της κορυφής στα 56,32 λεπτά η οποία ανήκει στο 000

Η κορυφή εκλύεται στα 56,32 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 31. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζεται μία κορυφή στα 265 m/z η οποία ανήκει στο ακυλιωμένο ιόν του O. Στη συνέχεια εμφανίζεται το κετενικό του ιόν στα 339 m/z . Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 603 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OO. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο 000.

6) POP

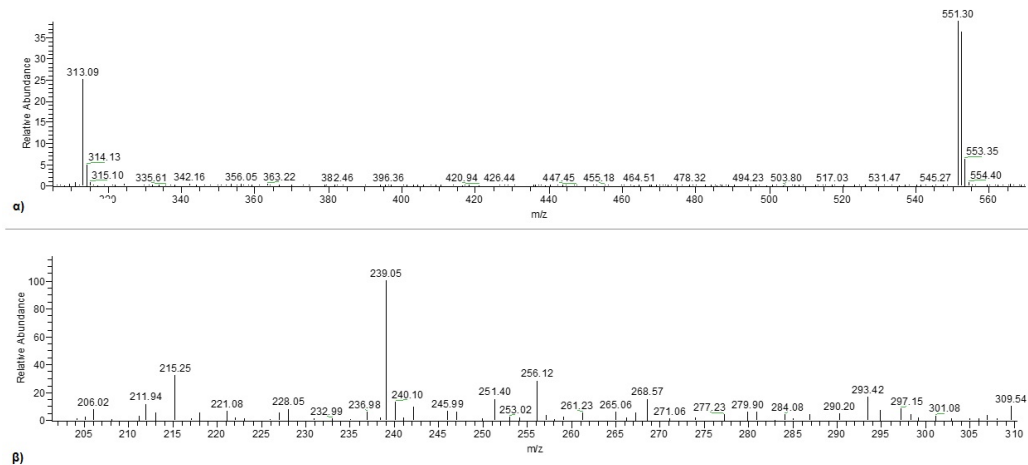


Εικόνα 32: Φάσμα της κορυφής στα 54,10 λεπτά η οποία ανήκει στο POP

Η κορυφή εκλούεται στα 54,10 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 32. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 239 και 265 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των Ρ και Ο αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 313 και 339. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 577m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο ΡΟ. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο POP.

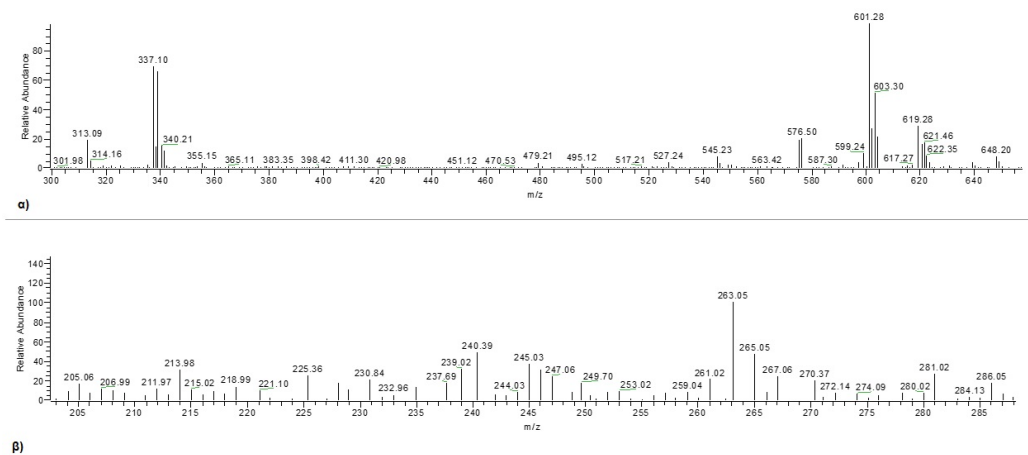
7) PPP

Η κορυφή εκλούεται στα 52,60 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 33. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζεται μία κορυφή στα 239 m/z η οποία ανήκει στο ακυλιωμένο ιόν του Ο. Στη συνέχεια εμφανίζεται το κετενικό του ιόν στα 313 m/z. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 551 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο ΡΡ. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο PPP.



Εικόνα 33: Φάσμα της κορυφής στα 52,60 λεπτά η οποία ανήκει στο PPP

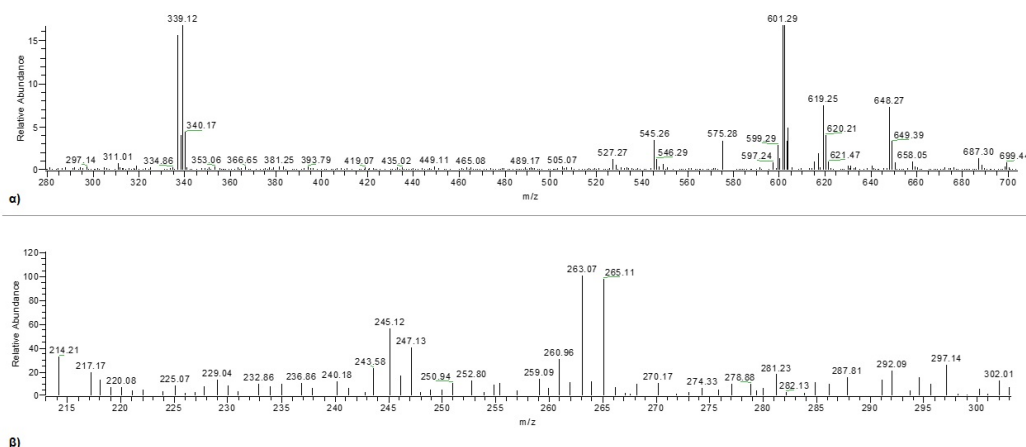
8) PLO



Εικόνα 34: Φάσμα της κορυφής στα 39,06 λεπτά η οποία ανήκει στο PLO

Η κορυφή εκλούεται στα 39,06 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 34. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 239, στα 263 και 265 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των P, L και O αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετηνικά ιόντα τους με m/z 313, 337 και 339. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 601m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OL και δύο κορυφές 575 και 576,5 m/z που αντιστοιχούν στα ψευδοδιγλυκερίδια PL και PO αντίστοιχα. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο PLO.

9) OLO

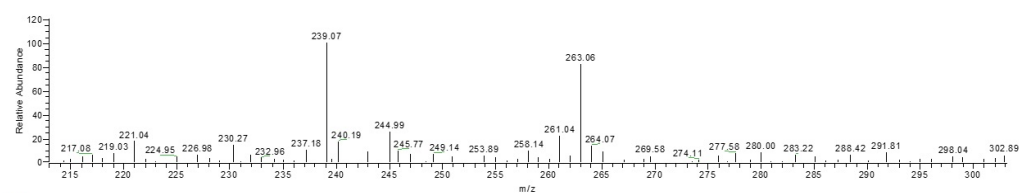
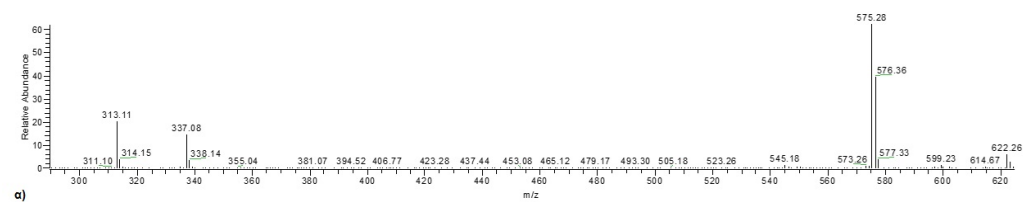


Εικόνα 35: Φάσμα της κορυφής στα 37,02 λεπτά η οποία ανήκει στο OLO

Η κορυφή εκλούεται στα 37,02 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 35. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 263 και 265 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των Lκαι Oαντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 337 και 339. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 601m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OL. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο OLO.

10) PLP

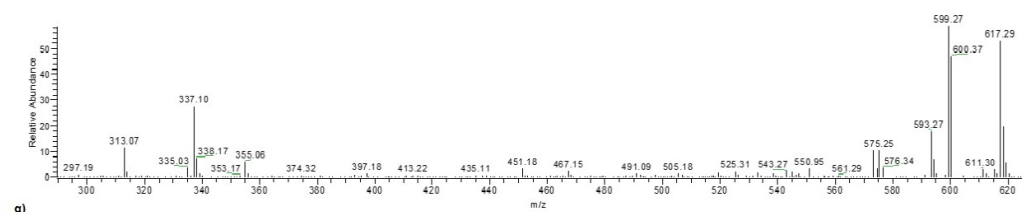
Η κορυφή εκλούεται στα 35,69 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 36. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 239 και 263 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των Ρκαι L αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 313 και 337. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 575m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο PL. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο PLP.



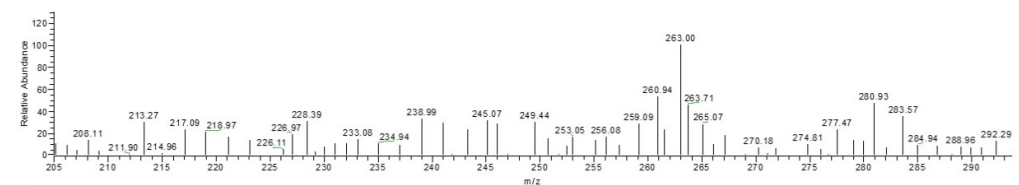
β)

Εικόνα 36: Φάσμα της κορυφής στα 35,69 λεπτά η οποία ανήκει στο PLP

11) PLL



α)



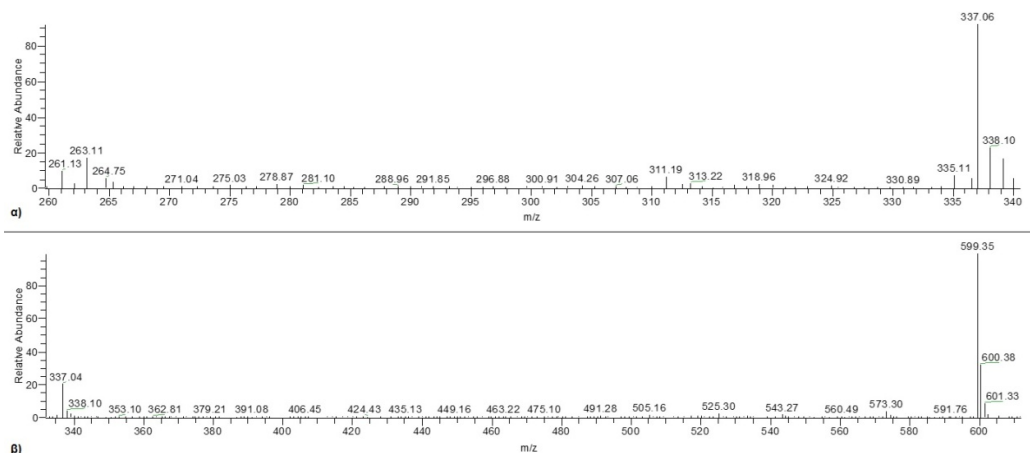
β)

Εικόνα 37: Φάσμα της κορυφής στα 24,61 λεπτά η οποία ανήκει στο PLL

Η κορυφή εκλούεται στα 24,61 λεπτά και το φάσμα της παρουσιάζεται στην Εικόνα 37. Όπως φαίνεται από το φάσμα παρουσιάζονται κορυφές στα 239 και 263m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των P και L αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 313 και 337. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 599m/z η και μία πιο μικρή στα 575 οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο LL και PL αντίστοιχα. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο PLL.

Για τα δείγματα τα τριγλυκερίδια που ανιχνεύθηκαν ήταν τα LLLn, LLL, LnOL και OLnO. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα τους και περιγράφεται ο τρόπος για τη ταυτοποίησή τους.

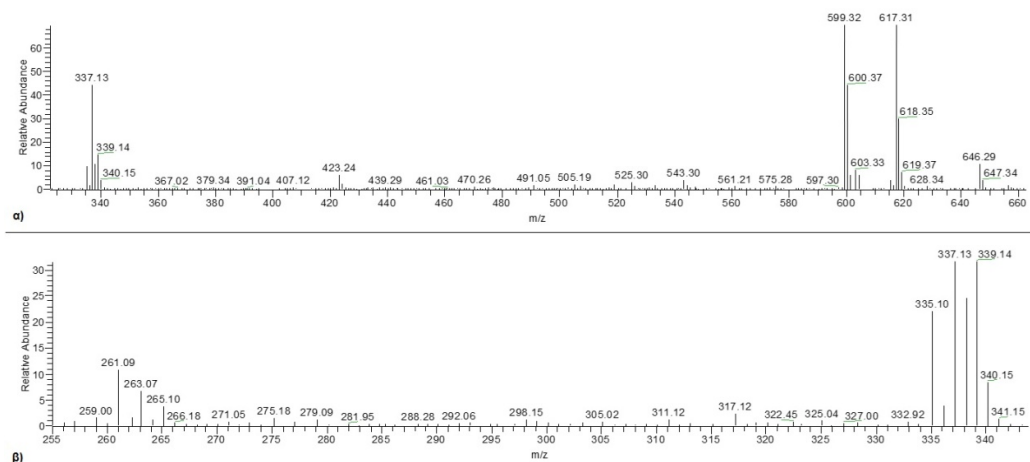
- **LLLn**



Εικόνα 38: Φάσμα της κορυφής η οποία ανήκει στο LLLn

Όπως φαίνεται από το φάσμα στην Εικόνα 38, παρουσιάζονται κορυφές στα 261 και 263 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των Ln και L αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 335 και 337. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 599 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο LL. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο LLLn.

- **LLL/LnOL**

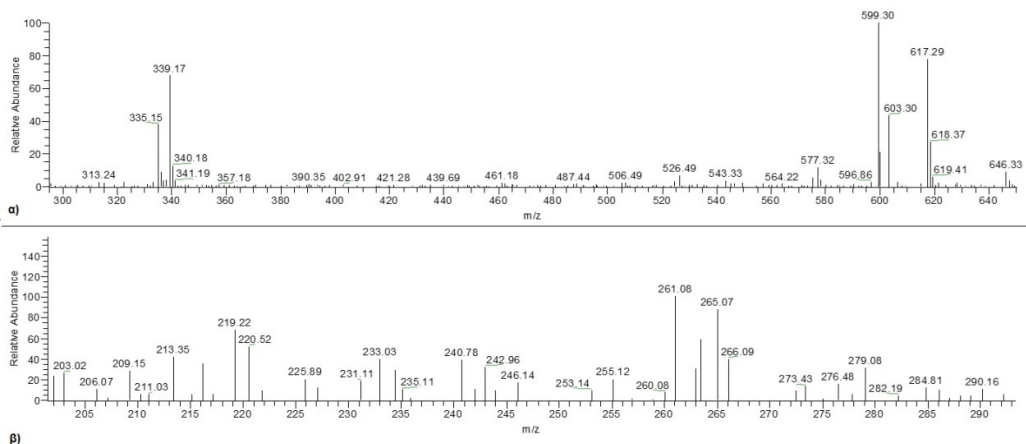


Εικόνα 39: Φάσμα της κορυφής η οποία ανήκει στα LLL και LnOL

Όπως φαίνεται από το φάσμα στην Εικόνα 39, παρουσιάζεται μία έντονη κορυφή στα 261 η οποία ανήκει στο ακυλιωμένα ιόν του L . Στη συνέχεια εμφανίζεται το κετενικό ιόν του με m/z 337. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 599 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο LL. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο LLL.

Σε αυτή την κορυφή παρατηρήθηκαν και τα ακυλικά ιόντα των O και Ln στα 265 και 261 m/z . Στη συνέχεια εκτός από την κορυφή στα 599 m/z που αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OLn, υπάρχει και μία μικρή κορυφή μεταξύ των 600-601 m/z η οποία πιθανόν να αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OL. Από αυτές τις μικρές κορυφές εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι πιθανόν το τριγλυκερίδιο LnOL συνεκλύεται. Το O είναι στο κέντρο καθώς τα ψευδοδιγλυκερίδια σε αφθονία το έχουν κοινό λιπαρό οξύ.

- **OLnO**



Εικόνα 40: Φάσμα της κορυφής η οποία ανήκει στο OLnO

Όπως φαίνεται από το φάσμα στην Εικόνα 40, παρουσιάζονται κορυφές στα 261 και 265 m/z οι οποίες ανήκουν στα ακυλιωμένα ιόντα των Ln και O αντίστοιχα. Στη συνέχεια εμφανίζονται τα κετενικά ιόντα τους με m/z 335 και 339. Τέλος εμφανίζεται μία κορυφή μεγάλης έντασης στα 599 m/z η οποία αντιστοιχεί στο ψευδοδιγλυκερίδιο OLn. Με αυτά τα στοιχεία προκύπτει ότι είναι το τριγλυκερίδιο OLnO.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

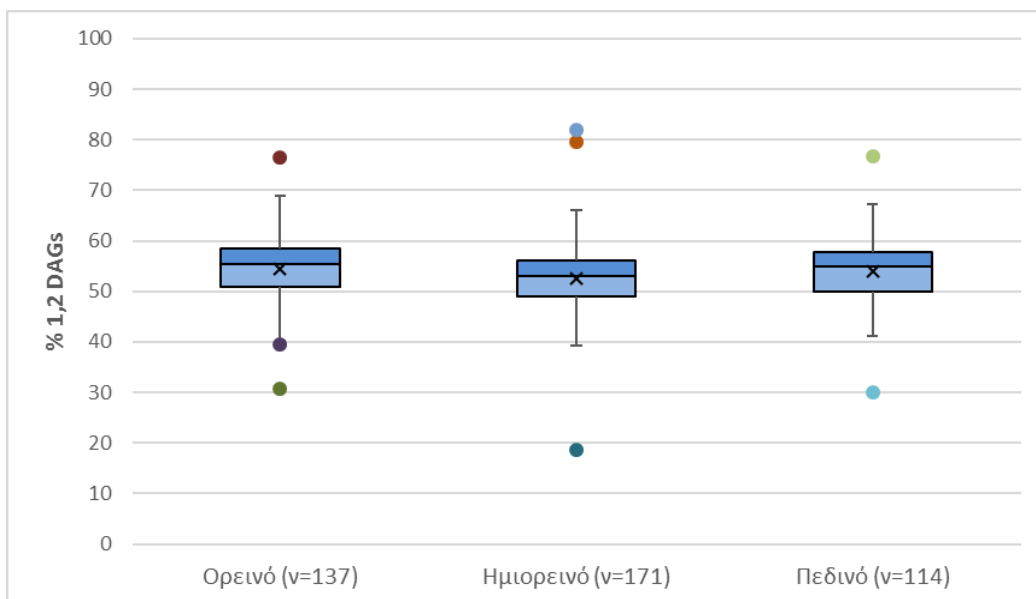
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αποτελέσματα της μέτρησης των διγλυκεριδίων

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των δειγμάτων εκφράστηκαν ως ποσοστιαίες περιεκτικότητες των 1,2 και 1,3-διγλυκεριδίων και στη συνέχεια βρέθηκε ο λόγος των δύο περιεκτικότητων που εκφράζει τον δείκτη φρεσκότητας, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 5.4. Μετά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων αυτών έγινε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση διαφορετικές παραμέτρους που πιθανόν να επηρεάζουν τις περιεκτικότητες των δύο ομάδων διγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο. Οι παράμετροι ήταν το υψόμετρο, η ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, η μέθοδος φυγοκέντρησης, το είδος της καλλιέργειας, ο χρόνος μάλαξης, η καλλιεργητική φροντίδα των παραγωγών, οι ημέρες μέχρι την ελαιοποίηση του καρπού, η περιοχή - ζώνη και τα νησιά από τα οποία παράχθηκε το ελαιόλαδο. Για όλες τις παραμέτρους σχεδιάστηκαν σχεδιαγράμματα Box and Whiskers Plot στο Excel και υπολογίστηκε η διάμεση τιμή, ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και το εύρος.

6.1.1 Υψόμετρο

Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ως προς την πιθανή επιρροή στη συγκέντρωση των διγλυκεριδίων ήταν το υψόμετρο. Από τα 452 δείγματα πληροφορίες για το υψόμετρο υπήρχαν για τα 422. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα σχεδιαγράμματα των συγκρίσεων για τα 1,2-διγλυκερίδια αντίστοιχα μαζί με τους πίνακες δεδομένων που έχουν εξαχθεί για ορεινό, ημιορεινό και πεδινό υψόμετρο. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κατηγοριών των δειγμάτων



Σχήμα 4: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση το υψόμετρο

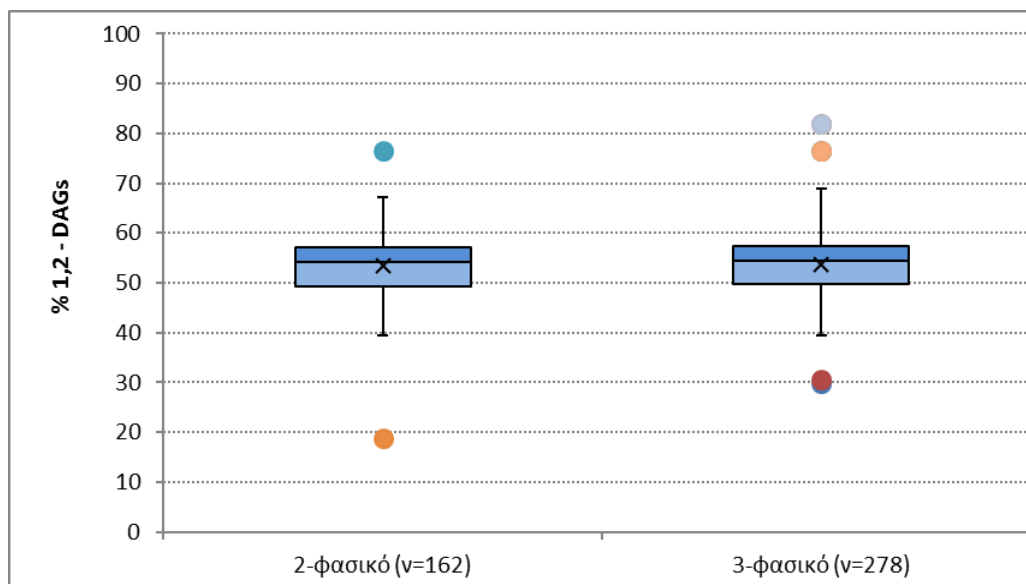
Πίνακας 16: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάσει υψομέτρου

	Ορεινό (v=137)	Ημιορεινό (v=171)	Πεδινό (v=114)
Διάμεση τιμή (%)	55,4	52,9	54,9
Μέσος όρος (%)	54,4	52,7	53,9
Τυπική απόκλιση (%)	6,1	6,5	6,5
Εύρος (%)	30,7-76,6	18,8-81,9	29,9-76,6

6.1.2 Μέθοδος φυγοκέντρησης

Η συγκεκριμένη παράμετρος έχει να κάνει με τη μέθοδο φυγοκέντρησης. Υπάρχουν δύο τρόποι φυγοκέντρησης του ελαιολάδου ώστε να φτάσουμε στο τελικό προϊόν. Η πρώτη είναι η διφασική, όπου γίνεται φυγοκέντρηση των αλεσμένων ελιών και διαχωρίζονται σε ελαιόλαδο και ελαιοπυρήνα σαν στερεό υπόλειμμα. Η δεύτερη είναι η τριφασική όπου γίνεται φυγοκέντρηση με προσθήκη νερού και παράγονται τρεις φάσεις, το ελαιόλαδο, το νερό και η ελαιοπυρήνα. Στην πρώτη μέθοδο το μειονέκτημα είναι ότι αποβάλλονται μεγάλοι όγκοι υγρών αποβλήτων, ενώ στη δεύτερη ότι παράγεται

ελαιοπυρήνα με αυξημένη υγρασία που την καθιστά δύσκολη στον χειρισμό και την επεξεργασία. Από τα 452 δείγματα στα 440 είχαν καταγραφεί πληροφορίες για τη μέθοδο με την οποία φυγοκεντρήθηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών των δειγμάτων.



Σχήμα 5: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση την μέθοδο φυγοκέντρωσης

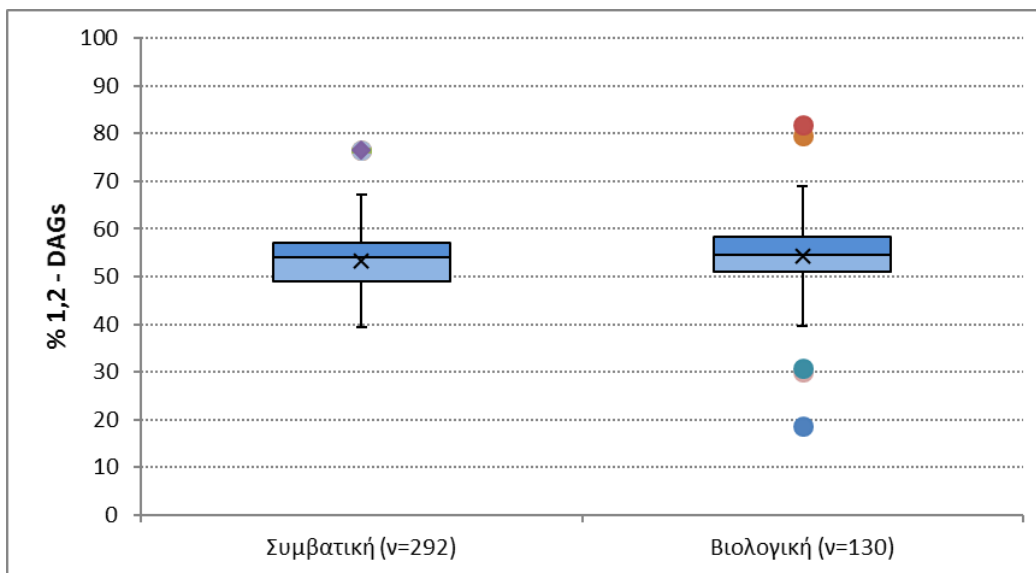
Πίνακας 17: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάσει της μεθόδου φυγοκέντρωσης

	2-φασικό (n=162)	3-φασικό (n=278)
Διάμεση τιμή (%)	54,1	54,4
Μέσος όρος (%)	53,3	53,7
Τυπική απόκλιση (%)	6,3	6,2
Εύρος (%)	18,8 - 76,6	29,9 - 81,9

6.1.3 Είδος καλλιέργειας

Τα δείγματα των ελαιολάδων που αναλύθηκαν προέκυψαν από δύο διαφορετικά είδη καλλιέργειας, συμβατική και βιολογική. Στις βιολογικές καλλιέργειες αποφεύγεται η προσθήκη συνθετικών λιπασμάτων, ζιζανιοκτόνων, ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών και οποιονδήποτε άλλων

συνθετικών ουσιών που παρεμβαίνουν στη φυσική ανάπτυξη του ελαιοκαρπού. Από την άλλη στις συμβατικές καλλιέργειες προστίθενται συνήθως συμβατικές ουσίες και υλικά τα οποία βοηθούν την ανάπτυξη του καρπού. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών των δειγμάτων.



Σχήμα 6: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το είδος καλλιέργειας

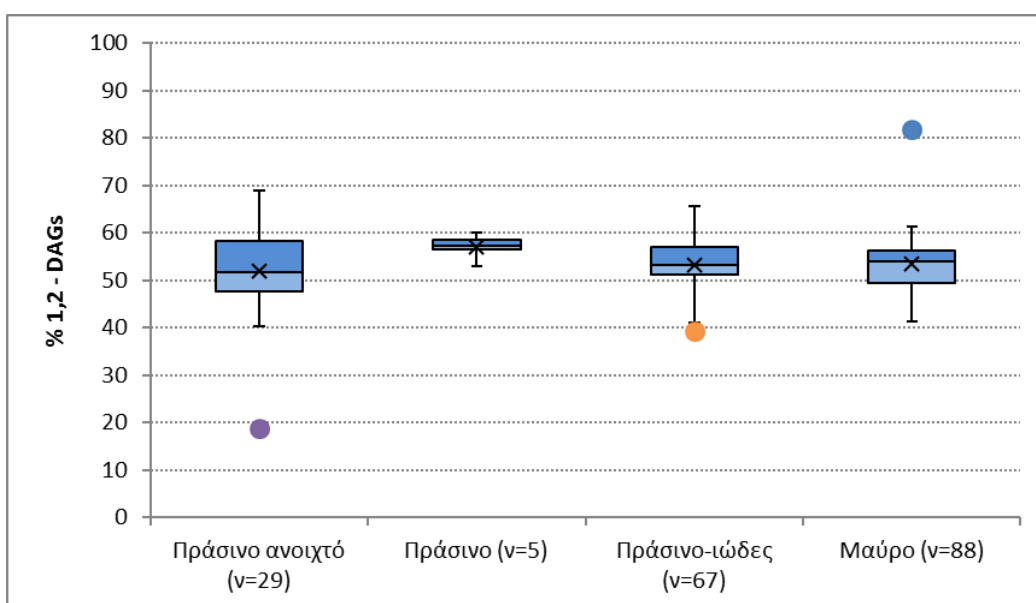
Πίνακας 18: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάσει του είδους καλλιέργειας

	Συμβατική (n=292)	Βιολογική (n=130)
Διάμεση τιμή (%)	54,0	54,6
Μέσος όρος (%)	53,3	54,2
Τυπική απόκλιση (%)	5,8	7,7
Εύρος (%)	39,4 - 76,6	18,8 - 81,9

6.1.4 Στάδιο ωρίμανσης

Στη συνέχεια ο παράγοντας ο οποίος μελετήθηκε ήταν το στάδιο ωρίμανσης του ελαιοκαρπού. Οι ελαιοκαρποί οι οποίοι συλλέχθηκαν και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν ώστε να παραχθεί το ελαιόλαδο, βρίσκονταν σε 4

διαφορετικά στάδια ωρίμανσης τα οποία διαχωρίζονται βάση του χρώματος τους και έχει να κάνει με την ανάπτυξη της σάρκας του καρπού. Ο καρπός της ελιάς *Olea Europaea* αρχικά είναι πράσινος ανοιχτός και στη συνέχεια παίρνει διαδοχικά απόχρωση πράσινη, πράσινη ιώδη και μαύρη. Εξετάστηκε εάν η συγκομιδή καρπών σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης επηρεάζει την συγκέντρωση των 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων στο παραγόμενο ελαιόλαδο, σε 189 από τα 452 δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών των δειγμάτων.



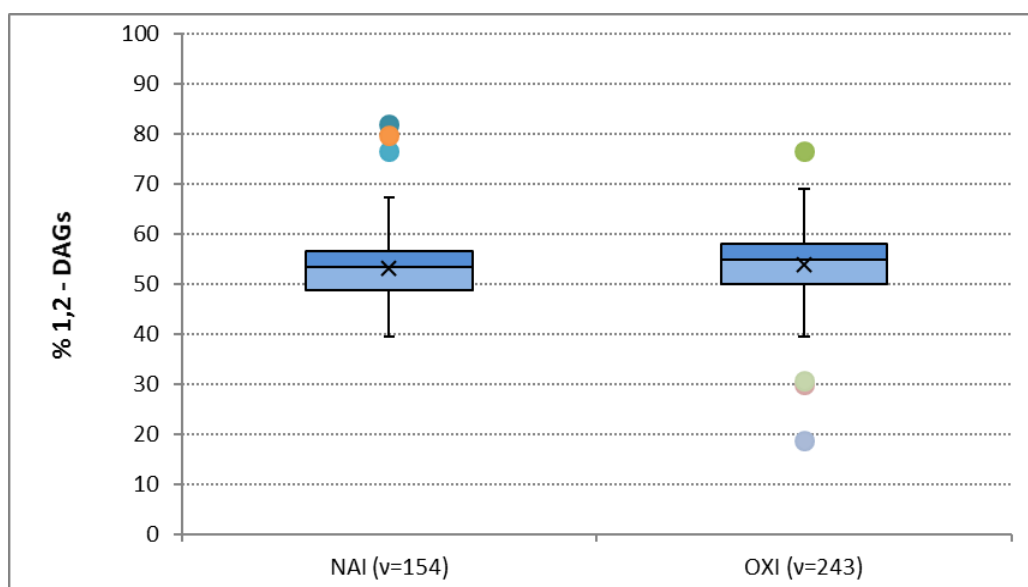
Σχήμα 7: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το στάδιο ωρίμανσης του καρπού

Πίνακας 19: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση του σταδίου ωρίμανσης του καρπού

	Πράσινο ανοιχτό (n=29)	Πράσινο (n=5)	Πράσινο-ιώδες (n=67)	Μαύρο (n=88)
Διάμεση τιμή (%)	51,6	57,2	53,3	54,1
Μέσος όρος (%)	51,9	57,1	53,2	53,4
Τυπική απόκλιση (%)	9,2	2,6	5,5	5,5
Εύρος (%)	18,8 - 68,9	53,1 - 60,1	39,4 - 65,6	41,3 - 81,9

6.1.5 Προσθήκη νερού κατά τη μάλαξη

Ορισμένοι παραγωγοί έκανα προσθήκη νερού στις καλλιέργειες τους κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και ωρίμανσης των ελαιοκαρπών. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων 397 δειγμάτων από τα 452, με βάση την προσθήκη ή όχι νερού, ώστε να διαπιστωθεί εάν επηρεάζει την συγκέντρωση των διγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών των δειγμάτων



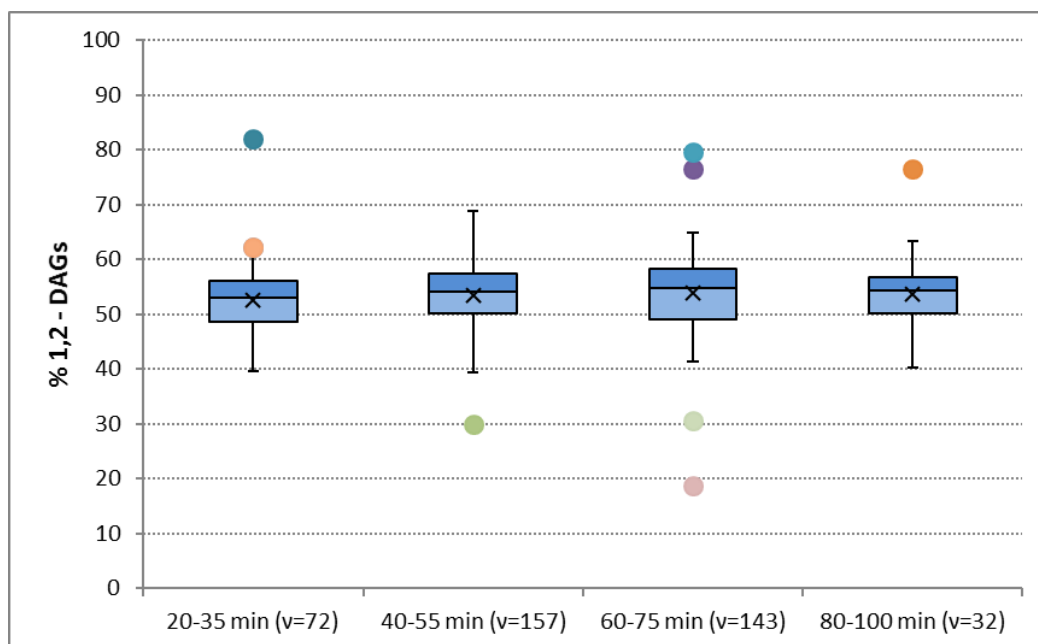
Σχήμα 8: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τη προσθήκη νερού

Πίνακας 20: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάσει της προσθήκης νερού

	NAI (v=154)	OXI (v=243)
Διάμεση τιμή (%)	53,2	54,9
Μέσος όρος (%)	53,2	53,7
Τυπική απόκλιση (%)	6,4	6,6
Εύρος (%)	39,4 - 81,9	18,8 - 76,6

6.1.6 Χρόνος μάλαξης

Ο επόμενος παράγοντας ο οποίος εξετάστηκε ως προς την πιθανή επίδραση που μπορεί να έχει στη συγκέντρωση των διγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο ήταν ο χρόνος μάλαξης. Για να γίνει αποτελεσματικά ο διαχωρισμός του ελαιολάδου θα πρέπει η ελαιοζύμη να ομογενοποιηθεί καλά και να γίνει πιο συνεκτική. Η διαδικασία αυτή γίνεται μέσα στον μαλακτήρα σε επιλεγμένη θερμοκρασία και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών των δειγμάτων



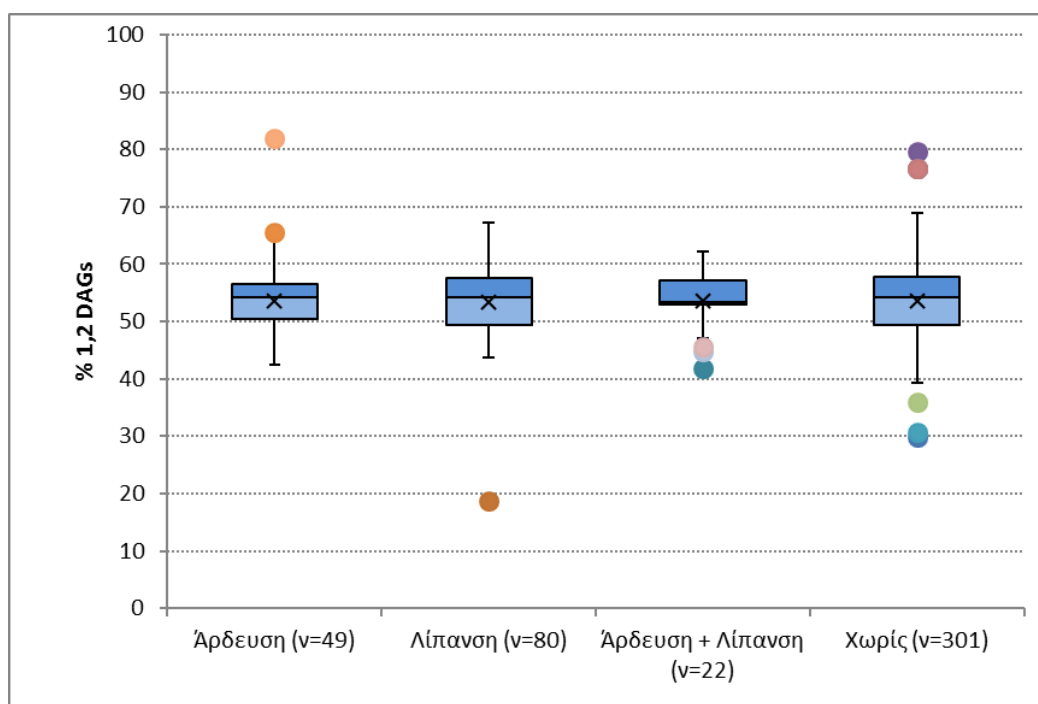
Σχήμα 9: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση το χρόνο μάλαξης

Πίνακας 21: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάσει του χρόνου μάλαξης

	20-35 min (v=72)	40-55 min (v=157)	60-75 min (v=143)	80-100 min (v=32)
Διάμεση τιμή (%)	52,9	54,2	54,9	54,4
Μέσος όρος (%)	52,5	53,4	54,0	53,6
Τυπική απόκλιση (%)	6,2	5,9	7,1	7,1
Εύρος (%)	39,5 - 81,9	29,9 - 68,9	18,8 - 79,6	40,2 - 76,6

6.1.7 Καλλιεργητική φροντίδα

Στη συνέχεια εξετάστηκε ο παράγοντας της καλλιεργητικής φροντίδας. Για τη μελέτη αυτής της παραμέτρου υπήρχαν επαρκή στοιχεία για όλα τα δείγματα που παραλήφθηκαν στο εργαστήριο. Η καλλιεργητικές φροντίδες οι οποίες έγιναν από ορισμένους παραγωγούς ήταν η άρδευση και η λίπανση των δέντρων ελαίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών των δειγμάτων



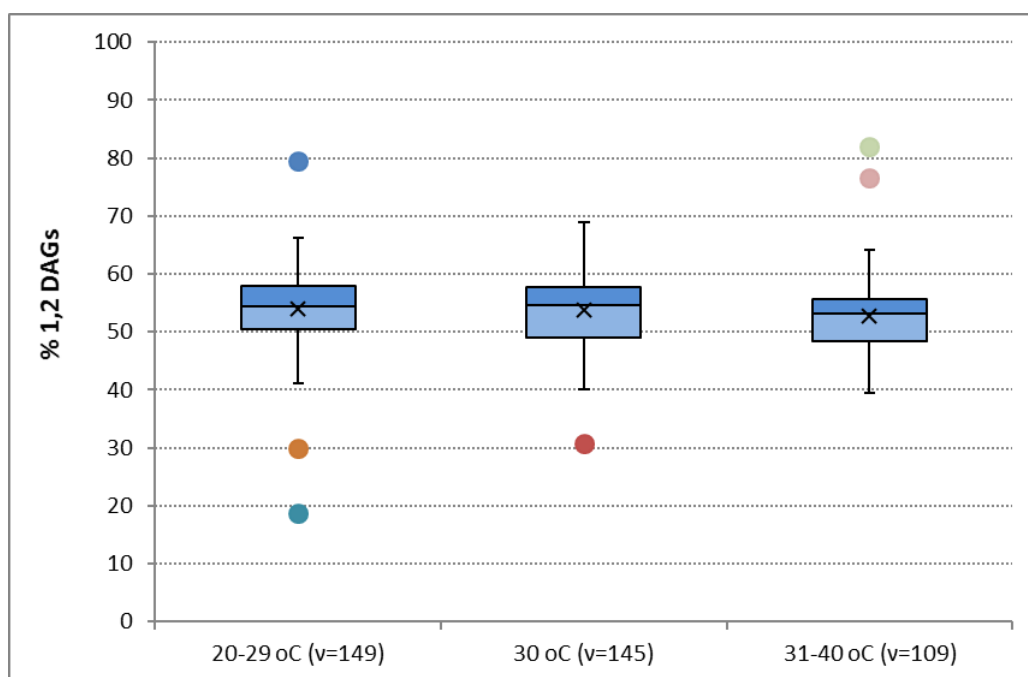
Σχήμα 10: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση την καλλιεργητική φροντίδα

Πίνακας 22: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάσει της καλλιεργητικής φροντίδας

	Άρδευση (n=49)	Λίπανση (n=80)	Άρδευση+ Λίπανση (n=22)	Χωρίς (n=300)
Διάμεση τιμή (%)	54,1	54,3	53,3	54,3
Μέσος όρος (%)	53,5	53,5	53,5	53,5
Τυπική απόκλιση (%)	4,8	6,3	5,1	6,6
Εύρος (%)	42,5 - 81,9	18,8 - 67,1	41,8 - 62,2	29,9 - 79,6

6.1.8 Θερμοκρασία μάλαξης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.1.6, κατά την παραγωγή του ελαιολάδου γίνεται μάλαξη της ελαιοζύμης προς την ομοιογενοποίηση και την βέλτιστη συνεκτικότητά της, με σκοπό να παραληφθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα ελαιολάδου. Κατά τη διάρκεια της μάλαξης εφαρμόζεται θερμοκρασία στο μαλακτήρα με σκοπό να βοηθηθεί το στάδιο μάλαξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κατηγοριών των δειγμάτων.



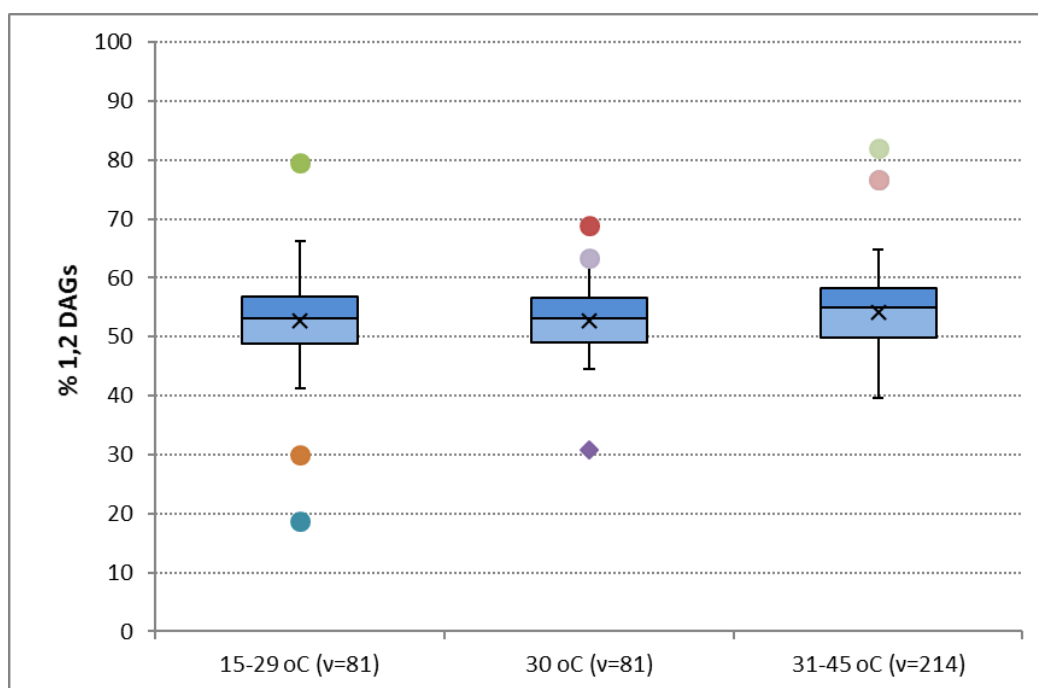
Σχήμα 11: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση τη θερμοκρασία μάλαξης

Πίνακας 23: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάσει της θερμοκρασίας μάλαξης

	20-29 °C (v=149)	30 °C (v=145)	31-40 °C (v=88)
Διάμεση τιμή (%)	54,5	54,7	53,1
Μέσος όρος (%)	53,9	53,7	52,7
Τυπική απόκλιση (%)	7,0	5,9	6,5
Εύρος (%)	18,8 - 79,6	30,7 - 68,9	39,4 - 81,9

6.1.9 Θερμοκρασία διαχωριστήρα

Αφού έχει γίνει η μάλαξη η ελαιοζύμη μεταφέρεται στον διαχωριστήρα όπου γίνεται φυγοκέντριση. Μέσω της φυγοκέντρισης διαχωρίζονται τα στερεά υπολοίματα του πυρήνα της ελιάς μαζί με τους χυμούς από το ελαιόλαδο. Στο διαχωριστήρα για να βοηθηθεί ο διαχωρισμός αυτός εφαρμόζεται συνήθως θερμοκρασία από 15-45 °C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κατηγοριών των δειγμάτων



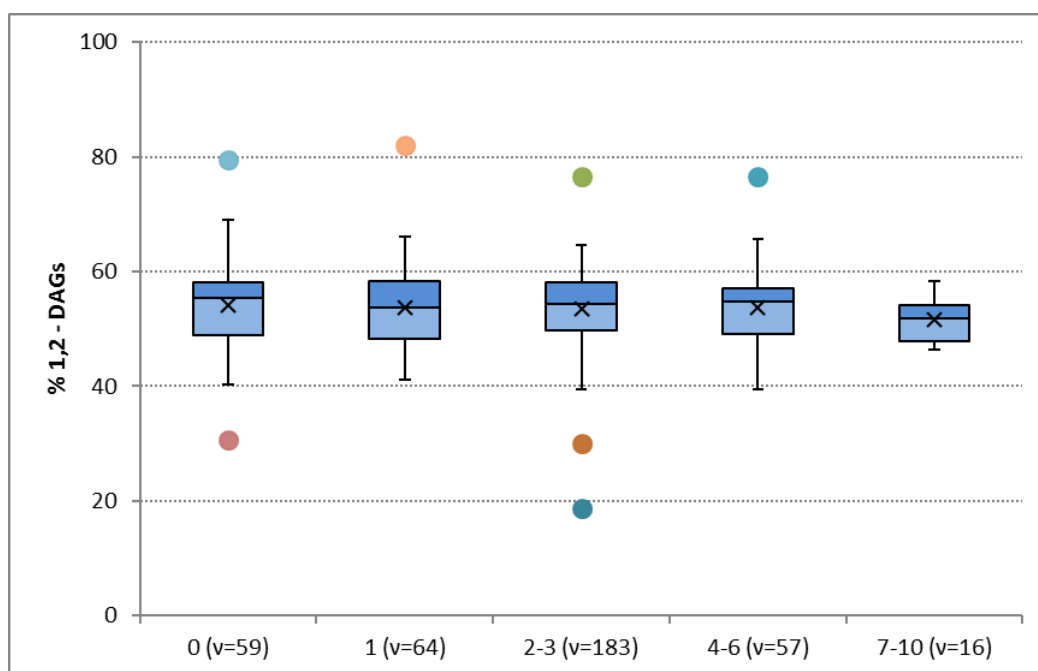
Σχήμα 12: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση τη θερμοκρασία του διαχωριστήρα

Πίνακας 24: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάσει της θερμοκρασίας του διαχωριστήρα

	15-29 °C (n=81)	30 °C (n=81)	31-40 °C (n=214)
Διάμεση τιμή (%)	53,2	53,2	55,1
Μέσος όρος (%)	52,7	52,8	54,2
Τυπική απόκλιση (%)	7,8	5,6	6,3
Εύρος (%)	18,8 - 79,6	30 - 68,9	39,5 - 81,9

6.1.10 Ημέρες μέχρι την ελαιοποίηση

Μετά τη συγκομιδή των ελαιοκαρπών μεταφέρονται στο ελαιοτριβείο ώστε να επεξεργαστούν και να εξαχθεί το ελαιόλαδο από αυτές. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα και ο πίνακας των αποτελεσμάτων για 379 δείγματα από τα 452, τα οποία ελαιοποιήθηκαν σε διαφορετικά διαστήματα ημερών μετά τη συγκομιδή των ελαιοκαρπών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πέντε κατηγοριών των δειγμάτων



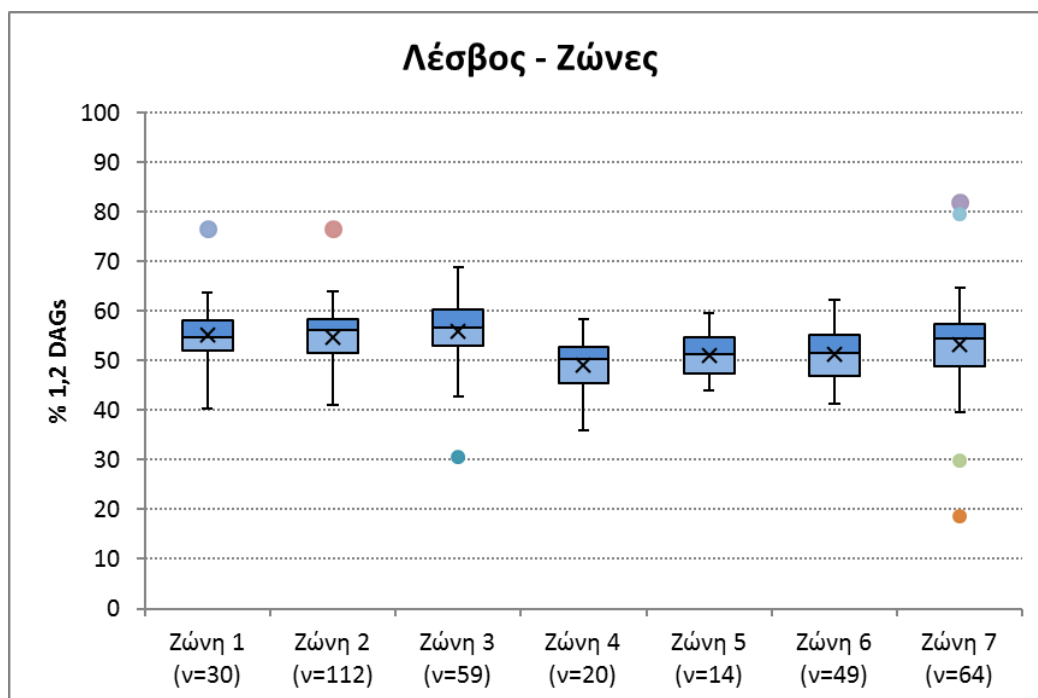
Σχήμα 13: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση τις μέρες μέχρι την ελαιοποίηση

Πίνακας 25: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάσει των ημερών μέχρι την ελαιοποίηση

	0 (v=59)	1 (v=65)	2- 3(v=183)	4-6 (v=57)	7-10 (v=16)
Διάμεση τιμή (%)	55,4	53,6	54,4	54,7	51,8
Μέσος όρος (%)	54,1	53,8	53,5	53,8	51,6
Τυπική απόκλιση (%)	6,8	7,0	6,6	6,3	3,9
Εύρος (%)	30,7 - 79,6	41,1 - 81,9	18,8 - 76,6	39,5 - 76,6	46,3 - 58,4

6.1.11 Ζώνες στο νησί της Λέσβου

Για το νησί της Λέσβου από όπου προήρθε και ο μεγαλύτερος αριθμός των δειγμάτων, έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων των διγλυκεριδίων των δειγμάτων τα οποία χωρίστηκαν βάση της γεωτοπικής θέσης των ελαιοκαλλιιεργειών. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε σε ζώνες περιοχών του νησιού. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα και ο πίνακας αποτελεσμάτων των 348 δειγμάτων της Λέσβου για τη συγκέντρωση των 1,2-διγλυκεριδίων..



Σχήμα 14: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων με βάση τις ζώνες των περιοχών στη Λέσβο

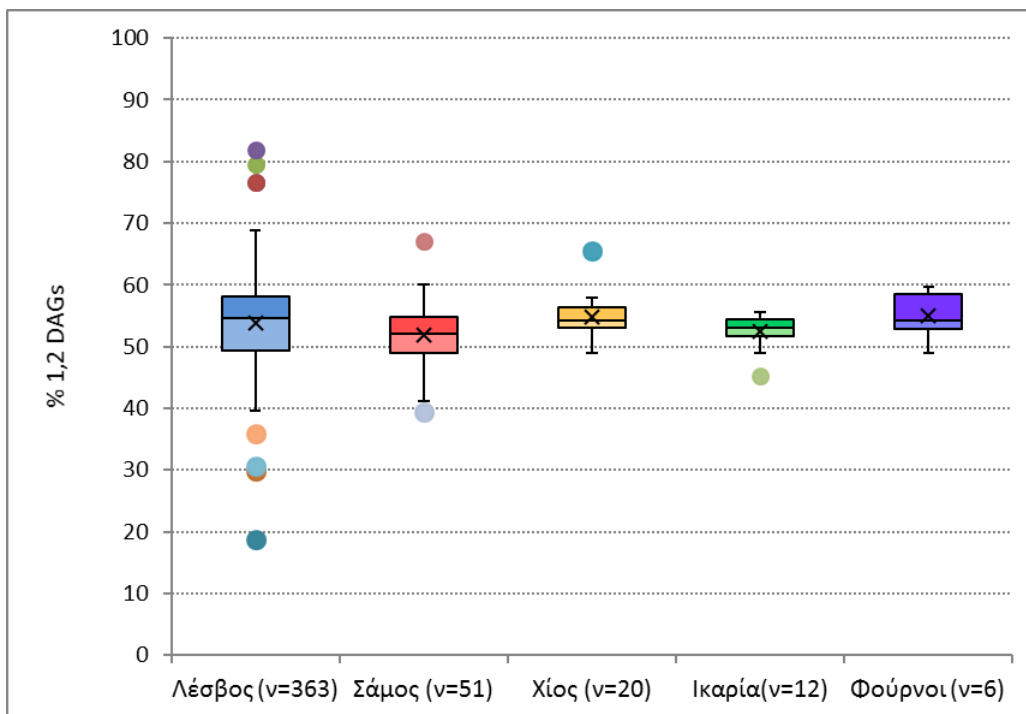
Πίνακας 26: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάσει των περιοχών των ζωνών στη Λέσβο

	Ζώνη 1 (v=30)	Ζώνη 2 (v=112)	Ζώνη 3 (v=59)	Ζώνη 4 (v=20)	Ζώνη 5 (v=14)	Ζώνη 6 (v=49)	Ζώνη 7 (v=64)
Διάμεση τιμή (%)	54,7	56,2	56,8	50,3	51,2	51,4	54,4
Μέσος όρος (%)	55,2	54,8	55,8	49,0	51,2	51,2	53,3
Τυπική απόκλιση (%)	6,7	5,7	6,7	5,9	4,7	5,0	9,0
Εύρος (%)	40,3 - 76,6	41,1 - 76,6	30,7 - 68,9	35,9 - 58,5	44 - 59,6	41,3 - 62,2	18,8 - 81,9

Μετά από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με ANOVA βρέθηκε το p -value μικρότερο του 0,05, το οποίο σημαίνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν. Από τον Πίνακα 30 όμως φαίνεται να μην υπάρχει σημαντική τάση διαφοροποίησης μεταξύ των διάμεσων τιμών. Όμως από τις διακυμάνσεις φαίνεται ότι μόνο η 7 ζώνη έχει μεγαλύτερη διακύμανση από τις υπόλοιπες οπότε πιθανόν η διαφοροποίηση να οφείλεται στην ζώνη 7.

6.1.12 Νησιά Βορείου Αιγαίου

Έγινε επίσης σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα νησιά από τα οποία παραλήφθηκαν τα δείγματα ελαιολάδου ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κατηγοριών των δειγμάτων.



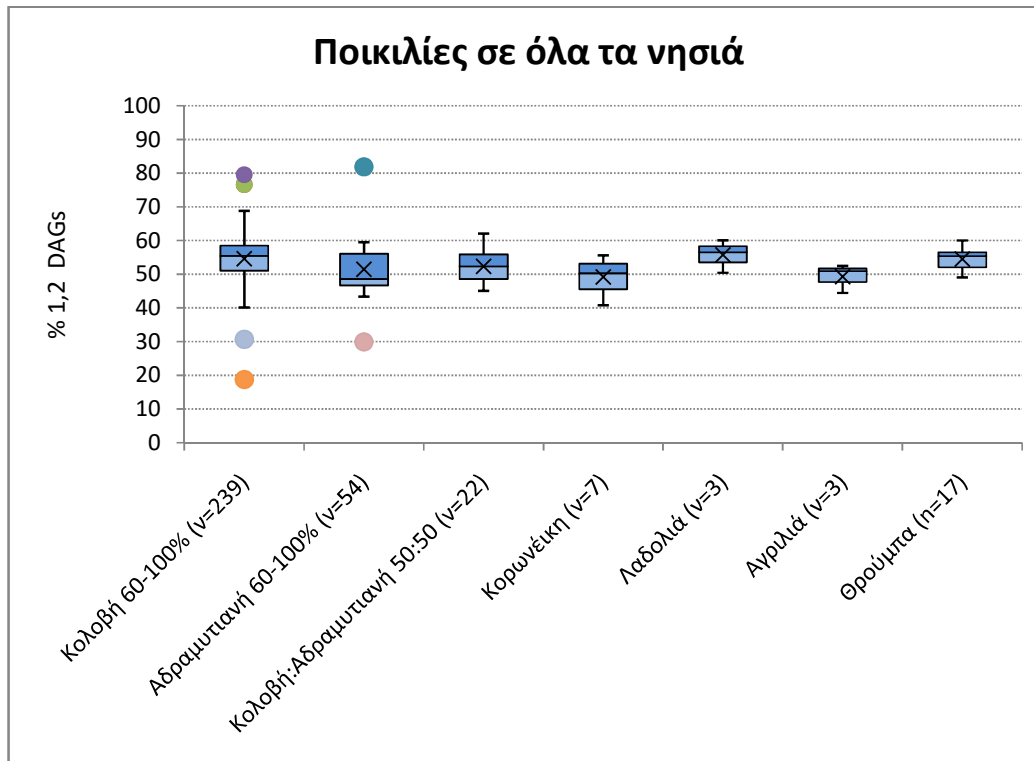
Σχήμα 15: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση τα νησιά του Βορείου Αιγαίου

Πίνακας 27: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων βάση των νησιών του Βορείου Αιγαίου

	Λέσβος (v=363)	Σάμος (v=51)	Χίος (v=20)	Ικαρία (v=12)	Φούρνοι (v=6)
Διάμεση τιμή (%)	54,7	52,0	54,2	53,1	54,3
Μέσος όρος (%)	53,8	51,8	54,7	52,5	54,9
Τυπική απόκλιση (%)	6,8	5,0	3,6	3,0	4,2
Εύρος (%)	18,8 - 81,9	39,4 - 67,1	49 - 65,6	45,2 - 55,7	49,1 - 59,7

6.1.13 Ποικιλίες

Τέλος πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανάμεσα σε όλα τα νησιά, με εξεταζόμενο παράγοντα τις ποικιλίες που υπήρχαν. Αφού τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με ANOVA, ομαδοποιήθηκαν σε 7 κατηγορίες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα και τον αντίστοιχο πίνακα. Από την στατιστική ανάλυση με ANOVA που έγινε εκ νέου, δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κατηγοριών των δειγμάτων.



Σχήμα 16: Διάγραμμα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλικεριδίων με βάση τις ποικιλίες που υπάρχουν στα νησιά του Βορείου Αιγαίου

Πίνακας 28: Αποτελέσματα σύγκρισης της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων βάση τις ποικιλίες που υπάρχουν στα νησιά του Βορείου Αιγαίου

	Κολοβή 60- 100% (v=239)	Αδραμυτιανή 60-100% (v=54)	Κολοβή:Α δραμυτιαν ή 50:50 (v=22)	Κορωνέικ η (v=7)	Λαδολιά (v=3)	Αγγιλιά (v=3)	Θρού μπα (n=17)
Διάμεση τιμή (mg/kg)	55.5	50.7	52.3	50.3	56.5	50.9	55.4
Μέσος όρος (mg/kg)	54.7	51.4	52.4	49.2	55.7	49.3	54.6
Τυπική απόκλιση (mg/kg)	6.8	7.0	5.0	5.4	4.9	4.2	3.2
Εύρος (mg/kg)	18,8- 79,6	29,9 - 81,9	45,2 - 62,2	40,9 - 55,7	50,5 - 60,2	44,5 - 52,5	49,1 - 60,1

6.2 Αποτελέσματα της μέτρησης των τριγλυκεριδίων

Τα δείγματα τα οποία μετρήθηκαν ήταν το πιστοποιημένο υλικό αναφοράς και δείγματα από όλα τα νησιά. Αναλυτικότερα, τα δείγματα που επιλέχτηκαν ήταν δύο από κάθε νησί, και για το νησί της Λέσβου όπου είχε γίνει ο διαχωρισμός των ζωνών, επιλέχτηκαν δύο από κάθε ζώνη ώστε να υπάρχει αντιπροσωπευτικός αριθμός δειγμάτων από κάθε επιλεγμένη κατηγορία (νησιά, ζώνες). Το πιστοποιημένο υλικό αναφοράς επιλέχτηκε ώστε να γίνει ο έλεγχος της αναλυτικής διαδικασίας, μέσω της ταυτοποίησης των τριγλυκεριδίων που περιέχονται σε αυτό.

Στον Πίνακα 28 παρουσιάζονται οι % περιεκτικότητες των τριγλυκεριδίων που βρέθηκαν στα δείγματα ελαιολάδου και των τριγλυκεριδίων που ταυτοποιήθηκαν στο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς. Ο υπολογισμός των περιεκτικότητων έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$T = \frac{A_{TAG}}{\sum A_{TAGs}}$$

Όπου: A_{TAG} είναι το εμβαδόν της κορυφής του τριγλυκεριδίου

Και $\sum A_{TAGs}$ είναι το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών όλων των τριγλυκεριδίων που ταυτοποιήθηκαν.

Πίνακας 29: Περιεκτικότητες τριγλυκεριδίων

	SOO	SOS	PPS	POO/SLO	OOO	POP	PPP	PLO	OLO	PLP	PLL	OLO	LLL/LnOL	LLLn
C.B.	10,8	25,0	3,6	10,3	5,0	26,2	1,9	2,7	5,3	5,8	3,3	-	-	-
I02	-	1,6	-	37,3	27,5	5,3	-	10,4	9,5	0,2	-	0,8	2,5	4,4
I04	-	-	-	21,2	34,9	9,1	-	8,7	15,3	2,2	-	2,8	2,8	3,1
Φ04	-	-	-	46,3	17,5	4,8	-	14,9	8,9	-	-	-	3,4	4,0
Φ06	-	-	-	24,3	28,2	10,8	-	9,8	13,7	3,2	-	2,1	4,2	3,8
Σ30	-	-	-	25,1	32,0	7,3	-	10,4	13,9	1,9	-	2,7	3,2	3,6
Σ04	-	-	-	17,3	13,3	3,7	-	12,6	9,8	1,7	-	1,0	5,1	35,5
X13	-	-	-	18,8	28,2	8,6	-	10,9	20,1	3,4	-	1,7	3,5	5,0
X20	-	-	-	53,9	22,9	5,5	-	1,5	8,5	-	-	2,9	2,9	1,9
1111	-	2,3	-	47,6	10,2	2,1	-	12,4	18,3	3,6	-	-	1,7	1,8
1282	2,4	0,6	-	46,5	12,2	2,8	-	20,8	5,4	0,5	-	1,3	6,1	0,8
2170	2,7	-	-	52,3	11,0	2,3	-	17,9	4,4	0,9	-	4,3	3,3	0,9
2237	2,8	-	-	42,1	14,3	4,3	-	18,7	6,7	1,1	-	4,7	3,6	2,0
3317	2,3	2,2	-	31,4	27,5	5,1	-	11,6	11,1	0,9	-	3,3	2,8	1,9
3175	3,7	-	-	47,1	11,7	2,6	-	21,5	5,7	1,1	-	3,1	2,9	0,6
4161	3,1	1,1	-	43,3	16,8	3,1	-	17,4	7,4	0,8	-	2,9	3,2	1,0
4292	1,7	2,1	-	28,2	27,9	5,8	-	11,8	13,1	1,9	-	2,0	3,5	2,1
5201	2,1	1,2	-	37,9	18,9	4,1	-	17,2	9,6	1,4	-	3,1	2,9	1,5
5142	2,1	1,7	-	36,7	19,8	4,6	-	16,7	9,2	1,4	-	2,9	3,1	1,9
6005	1,9	1,7	-	31,3	22,1	5,7	-	14,7	12,5	2,4	-	2,7	2,9	2,1
6351	2,0	1,16	-	33,2	21,6	4,5	-	16,3	10,6	2,3	-	2,8	3,2	2,3
7253	3,6	0,71	-	41,5	13,6	3,3	-	19,6	6,5	2,2	-	3,8	3,9	1,3
7015	1,2	1,72	-	34,1	21,7	5,3	-	16,4	10,5	1,4	-	2,7	3,0	2,0
8363	1,7	1,3	-	35,5	31,9	6,5	-	7,9	8,2	2,3	-	2,4	1,4	0,9
8344	2,7	1,2	-	55,7	13,2	3,7	-	14,1	4,315	-	-	1,2	2,4	1,5

Από τον Πίνακα 28 παρατηρείτε ότι τα τριγλυκερίδια PPS, PPP και PLL ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς στο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, αλλά δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα ελαιολάδων, το οποίο είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία.

Στην συνέχεια παρατηρείται ότι στο ελαιόλαδο ανιχνεύονται τα τριγλυκερίδια OLO, LLL, LnOL και LLLn τα οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν στο ελαιόλαδο. Στο πρότυπο δεν υπήρχαν και δεν ανιχνεύτηκαν διότι το βούτυρο του κακάο έχει διαφορετικό προφίλ τριγλυκεριδίων από το ελαιόλαδο.

Τέλος, από τον πίνακα φαίνεται ότι στα δείγματα ελαιόλαδου από το νησί της Λέσβου, ανιχνεύονται σε μικρές ποσότητες τα τριγλυκερίδια SOO και SOS που στα υπόλοιπα νησιά δεν έχουν ανιχνευτεί (εκτός από το SOS στο ένα δείγμα της Ικαρίας).

Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται οι σχετικοί χρόνοι ανάλυσης των τριγλυκεριδίων του προτύπου και οι μέσοι όροι των σχετικών χρόνων ανάλυσης των αντίστοιχων κορυφών στα δείγματα, ως προ της κορυφή του ΡΟΟ.

Πίνακας 30: Σχετικοί τυπικοί χρόνοι προτύπου και δειγμάτων

Τριγλυκερίδιο	RT_R κορυφών προτύπου	ΣRT_R κορυφών δειγμάτων
SOO	1,63	1,60
SOS	1,52	1,53
PPS	1,47	-
POO/SLO	1	1
OOO	0,96	0,94
POP	0,93	0,92
PPP	0,90	-
PLO	0,67	0,66
OLO	0,64	0,63
PLP	0,61	0,61
PLL	0,42	-

Από τον Πίνακα 29 παρατηρήθηκε ότι οι σχετικοί χρόνοι ανάλυσης των τριγλυκεριδίων που ανιχνεύτηκαν στο πιστοποιημένο δείγμα αναφοράς είναι

πανομοιότυποι με τους μέσους όρους των σχετικών χρόνων ανάσχεσης των δειγμάτων ελαιολάδου, το οποίο αποτελεί επιβεβαίωση της ταυτοποίησης των τριγλυκεριδίων στα δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διατριβή καταλήξαμε στα παρακάτω συμπεράσματα. Από τη μελέτη βελτιστοποίησης της μεθόδου για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η προκατεργασία με εκχύλιση στερεάς φάσης επιλέχθηκε ως καταλληλότερη.
- Στο στάδιο της σιλανοποίησης των διγλυκεριδίων η προσθήκη ακετονιτριλίου μαζί με το αντιδραστήριο σιλανοποίησης που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας.
- Η επίδραση της θερμοκρασίας είναι σημαντική για την απόδοση της αντίδρασης σιλανοποίησης και της αύξησης της ευαισθησίας.
- Τέλος, βρέθηκε η αναλογία διαλύτη - αντιδραστηρίου σιλανοποίησης που παρέχει καλύτερα αποτελέσματα.

Μετά από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων εξάχθηκαν τα εξής συμπεράσματα:

- Περίπου η μισή ποσότητα των 1,2-διγλυκεριδίων είχε σημειωθεί σε 1,3-διγλυκερίδια μετά από ένα χρόνο φύλαξης των δειγμάτων σε σκοτεινό χώρο και σε θερμοκρασία 4 °C. Σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας είναι αναμενόμενη η μετατροπή αυτή με την πάροδο ενός χρόνου.
- Τα δείγματα τα οποία μετρήθηκαν είχαν δείκτη φρεσκότητας κοντά στο 1, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι αναμενόμενο καθώς μετρήθηκαν ένα χρόνο μετά την παραγωγή τους.
- Ο μόνος παράγοντας ο οποίος βρέθηκε να επηρεάζει στατιστικά σημαντικά την περιεκτικότητα των διγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο, ήταν η 7 ζώνη η οποία παρουσιάζει τη διαφορά αυτή οφείλεται στη μεγάλη διακύμανση τιμών που έχει, σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Τέλος, στον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων ταυτοποιήθηκε η παρουσία των διαφορετικών ειδών των τριγλυκεριδίων σε αντιπροσωπευτικά δείγματα των ελαιόλαδων του προγράμματος και ενός πιστοποιημένου υλικού αναφοράς. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν ανάλογα με τα νησιά και σε ζώνες περιοχών στην περίπτωση της Λέσβου. Μετά το πέρας των μετρήσεων διαπιστώθηκε ότι:

- Έγινε επιτυχής χρωματογραφικός διαχωρισμός των τριγλυκεριδίων στο υλικό αναφοράς IRMM-801 και στα δείγματα.
- Ήταν εφικτή η ταυτοποίηση τριγλυκεριδίων στο πρότυπο και στα δείγματα ανάλογα με τα παραγώμενα ιόντα κατά τη θραυσματοποίησή του στην πηγή ιοντισμού.
- Στο υλικό αναφοράς ταυτοποιήθηκαν τα τριγλυκερίδια SOO, SOS, PPS, POO, SLS, OOO, POP, PPP, PLO, OLO, PLP, PLL
- Στα δείγματα ελαιολάδου ταυτοποιήθηκαν τα τριγλυκερίδια SOO, SOS, POO, SLS, OOO, POP, PLO, OLO, PLP, OLO, LLL, LnOL, LLLn τα οποία προβλέπονται και από τη βιβλιογραφία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 31: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Olea Europea	Ευρωπαϊκή ελιά
Lampante	Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο
High Performance Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας υψηλής απόδοσης
Gas Chromatography	Αεριοχρωματογραφία
Mass Spectrometry	Φασματομετρία μαζών
Tandem mass spectrometry	Συζευγμένη φασματομετρία μαζών
Split	Διαμοιρασμός
High Performance Liquid Chromatography	Υψηλής απόδοσης Υγροχρωματογραφία
Flame Ionization Detector	Ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
EVOO	Extra Virgin Olive Oil
OOO	Trioleine
POO	1-palmitoyl-2,3-dioleoyl-glycerol
OOL	1,2-dioleoyl-3-linoleoyl-glycerol
POL	1-palmitoyl-2-oleyl-3-linoleoyl-glycerol
SOO	1-stearoyl-2,3-dioleoyl-glycerol
POP	1,3-dipalmitoyl-2-oleyl-glycerol
POS	1-palmitoyl-2-oleyl-3-stearoyl-glycerol
OLnL	1-oleyl-2-linolenyl-3-linoleoyl-glycerol
LOL	1,2-dilinoleoyl-2-oleyl-glycerol
OLnO	1,2-dioleoyl-2-linolenyl-glycerol
PLnL	1-palmitoyl-2-linoleonyl-3-linoleoyl-glycerol
LLL	Trilinolein
PoPoPo	Tripalmitolein
SLnLn	1-stearoyl-2,3-dilinolenyl-glycerol
PoPoL	1,2-dipalmitoleyl-3-linoleoyl-glycerol
PPoLn	1-palmitoyl-2-palmitoleyl-3-linolenyl-glycerol
OLLn	1-oleyl-2-linoleoyl-3-linolenyl-glycerol
PLLn	1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-linolenyl-glycerol
PoOLn	1-palmitoleyl-2-oleyl-3-linolenyl-glycerol
ECN	Equivalent Chain Number
DG	Diacylglycerol
EOK	Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα
ISO	International Organization for Standardization
EC	European Commission
USDA	United States Department of Agriculture
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography

GC	Gas Chromatography
MS	Mass Spectrometry
RP	Reverse Phase
MS/MS	Tandem mass spectrometry
FID	Flame Ionization Detector
EI	Electron ionization
NaOH	Καυστικόνάτριο
GSC	Gas Solid Chromatography
GLC	Gas Liquid Chromatography
ACN	Acetonitrile
IOC	International Olive Oil Council
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide
SD	Standard Deviation
RSD	Relative Standard Deviation
PoPo	Dipalmitolein
PPo	1-palmitoyl-2-palmitoleyl-glycerol
PP	Dipalmitin
PoLn	1-palmitoleyl-2-linolenyl-glycerol
PLn	1-palmitoyl-2-linolenyl-glycerol
PoL	1-palmitoleyl-2-linoleoyl-glycerol
PL	1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycerol
PoO	1-palmitoleyl-2-oleoyl-glycerol
PO	1-palmitoyl-2-oleoyl-glycerol
PoS	1-palmitoleyl-2-stearoyl-glycerol
PS	1-palmitoyl-2-stearoyl-glycerol
LnLn	Dilinolenin
LLn	1-linoleoyl-2-linolenyl-glycerol
OLn	1-oleyl-2linolenyl-glycerol
LL	Dilinolein
SLn	1-stearoyl-2-linolenyl-glycerol
OL	1-oleyl-2-linoleoyl-glycerol
SL	1-stearoyl-2-linoleoyl-glycerol
OO	Diolein

SO	1-stearoyl-2-oleoyl-glycerol
SS	Distearin

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. AlimentLab, *Ανάλυση Ελαιολάδου-AlimentLab*, <https://www.alimentlab.gr/> [Τελευταία επίσκεψη 10 Απρ. 2019].
2. D. Boskou, *Olive Oil*, Elsevier Science, 2015, pp.21-39.
3. *Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων Κοινής χρήσης, Εδώδιμα λίπη και έλαια*, Άρθρο 71, έκδοση 18, Ιούλιος 2015.
4. D. Boskou, *Olive Oil: Chemistry and Technology*, AOCS Press, vol 2, 2006, pp.63-80.
5. EndocrineClinics, *Τριγλυκερίδια*, Endocrine.gr, (2019) <https://endocrine.gr/index.php/component/k2/item/53-2016-08-31-12-50-54> [Τελευταία επίσκεψη 17 Μάι 2019],
6. R. Mailer, *Chemistry and quality of olive oil, primefacts*, Vol.227, 2006.
7. Courses.ecampus.oregonstate.edu, (2019). *ANS 312 -- Applied Animal Nutrition Feedstuffs and Ration Formulation -- OSU Extended Campus - Oregon State University*. https://courses.ecampus.oregonstate.edu/ans312/one/lipids_story.htm [Τελευταία επίσκεψη 17 Απρ. 2019].
8. A. Quintero-Flórez, L. SinausiaNieva, A. Sánchez-Ortíz, G. Beltrán, and J. Perona, *The Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oil from Different Cultivars Is Determinant for Foam Cell Formation by Macrophages*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 63, no.30, 2015, pp.6731-6738.
9. C. Gertz, *Rapid Assessment of Quality Parameters in Olive Oil using FTNIR and Conventional Standard Method*, *Workshop "Authentication of Olive Oil"*, 2013, pp.53-55.
10. J. Ran, *Comparison of Chemical Quality Standards for New Zealand Extra Virgin Olive Oil*, 2014, pp.53-55.

11. A. Lanzón, T. Albi, A. Cert, and J. Gracián, The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 71, no. 3, 1994, pp.285-291.
12. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3626?lang=en®ion=GR> [Τελευταία επίσκεψη 22 Απρ. 2019].
13. J. Lou-Bonafonte, C. Arnal, M. Navarro, J. and Osada, Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development, *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 56, no. 7, 2012, pp.1043-1057.
14. H. Kelebek, S. Kesen, and S. Selli, Comparative Study of Bioactive Constituents in Turkish Olive Oils by LC-ESI/MS/MS, *International Journal of Food Properties*, vol 18, no. 10, 2015, pp.2231-2245.
15. E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, and M. La Guardia, The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health, *Nutrition Research Reviews*, vol. 18, no. 1, 2005, pp.98.
16. R. Owen, R. Haubner, G. Würtele, W. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, Olives and olive oil in cancer prevention, *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 13, no. 4, 2004, pp.319-326.
17. S. H. Omar, Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, *Scientia Pharmaceutica*, vol. 78, no. 2, 2010, pp.133-154.
18. Μ. Τσιμίδου, Πολυφαινόλες και οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιολάδου, *Ελιά & Ελαιόλαδο*, Τεύχος 3, 1998, σελ.53-57.
19. E. Antonini, A. Farina, A. Leone, E. Mazzara, S. Urbani, R. Selvaggini, M. Servili, and P. Ninfali, Phenolic compounds and quality parameters of family farming versus protected designation of origin (PDO) extra-virgin olive oils, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 43, 2015, pp.75–81.
20. S. Şahin, M. Bilgin, and M. Dramur, Investigation of Oleuropein Content in Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and

- Soxhlet Methods, *Separation Science and Technology*, vol. 46, no. 11, 2011, pp.1829-1837.
21. N. Kalogeropoulos, M.Tsimidou, Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils, *Antioxidants*, vol. 3, no. 2, 2014, pp.387-413.
 22. E. Psomiadou, and M. Tsimidou, Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 81, no. 7, 2001, pp.640-647.
 23. D. Grigoriadou, A.Androulaki, E.Psomiadou, and M. Tsimidou, Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil, *Food Chemistry*, vol. 105, no.2, 2007, pp.675-680.
 24. J. Ayton, R. J. Mailer, and K. Graham, The Effects of Storage on Extra Virgin Olive Oil Quality, *RIRDC Publication*, No 12/024, 2012, pp.10-11.
 25. E. Valli, A. Bendini, and C. Cavani, *Analytical methods for evaluating the quality and the genuineness of olive oils*, 2013, pp.48-49.
 26. G. Ciafardini, B.A. Zullo, G. Cioccia, and A. Irìde, Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil, *International Journal of Food and Microbiology*, vol. 107, no. 1, 2006, p.28.
 27. R. M. Alonso-Salces, M. V. Holland, and C. Guillou. ¹H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil, *Food Control*, vol. 22, no. 12, 2011, p.2043.
 28. B. Nieva-Echevarria, E. Goicoechea, M.J. Mazamnos, and M.D. Guillén, A method based on ¹H-NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures, *Food Research International*, vol. 66, 2014, p. 380.
 29. L.L. Zhou, C. Li, X.C. Weng, X.M. Fang, and Z.H. Gu, ¹⁹F-NMR method for the determination of quality of virgin olive oil, *Grasas y Aceites*, Vol 66, no. 4, 2015, p.3.
 30. Federal Democratic Republic of Ethiopia, Ethiopian Standard ISO 29822:2012. *Vegetable fats and oils- Isomeric diacylglycerols-*

Determination of relative amounts of 1,2- and 1,3- diacylglycerols, 2012, pp. 2-4.

31. M. D'Imperio, M. Gobbino, A. Picanza, S. Costanzo, A. D. Corte, and L. Mannina, Influence of Harvest Method and Period on Olive oil Composition: an NMR and Statistical Study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 20, 2010, p. 11044.
32. L. Castellani, A.M. Serrilli, F. Bonadies, and A. Bianco, Natural phenols and diglycerides in virgin olive oil and their relation, *Natural Product Research*, vol. 22, no. 16, 2008, p. 1414.
33. A.S. Singh, and M. Mukhipadhyay, Lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in organic solvent medium: Optimization using response surface methodology, *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 33, no. 4, 2016, p. 1249.
34. A. Spyros, A. Philippidis, and P. Dais, Kinetics of Diglyceride Formation and Isomerization in Virgin Olive Oils by Employing ^{31}P NMR Spectroscopy, Formulation of a Quantitative Measure to Assess Olive Oil Storage History, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 2, 2004, pp. 157-164.
35. P. Fronimaki, A. Spyros, S. Christopphoridou, and P. Dais, *Determination of the Diglyceride Content in Greek Virgin Olive Oils and Some Commercial Olive Oil by Employing ^{31}P NMR Spectroscopy*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 8, 2002, pp. 2207-2213.
36. H. Zhu, M. S. Clegg, C. F. Shoemaker, and S. C. Wang, Characterization of diacylglycerol isomer in edible oils using gas chromatography-ion trap electron ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, vol. 1305, 2013, pp. 194-202.
37. K. Nagy, D. Bongiorno, G. Avellone, P. Agozziono, L. Ceraulo, and K. Vekey, High Performance liquid chromatography-mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils, *Journal of Chromatography A*, vol. 1078, no. 1-2, 2005, pp. 90-97.

38. C. Plank, and E. Lorbeer, Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 697, no.1-2, 1995, pp.461-468.
39. B. M. Ham, J. T. Jacob, Monica M. Keese, and R. B. Cole, Identification, quantification and comparison of major non-polar lipids in normal and dry eye tear lipidomes by electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, vol.39, no. 112004, pp: 1321-1336.
40. H. Nang Lau, C. Pua, Y. Choo, A. Ma, and C. Chuah, Simultaneous quantification of free fatty acids, free sterols, squalene, and acylglycerol molecular species in palm oil by high-temperature gas chromatography-flame ionization detection, *Lipids*, vol. 40, no. 5, 2005, pp.523-528.
41. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/determination-of-triglycerides.html> [Τελευταία επίσκεψη 5 Μαΐου 2019].
42. M. Fasciotti, and A. Pereira Netto, Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC–APCI–MS–MS, *Talanta*, vol. 81, no. 3, 2010, pp.1116-1125.
43. E. Christopoulou, M. Lazaraki, M. Komaitis, and K. Kaselimis, (2004). Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils, *Food Chemistry*, vol. 84, no. 3, 2004, pp.463-474.
44. T. Puangsri, S. Abdulkarim, and H. Ghazali, Properties of carica papaya L. (papaya) seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods, *Journal of Food Lipids*, vol. 12, no. 1, 2005, pp.62-76.
45. A. El-Hamdy, and N. El-Fizga, Detection of olive oil adulteration by measuring its authenticity factor using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 708 no. 2, 1995, pp.351-355.

46. M. Lída, M. Holčápek and M. Boháč, Statistical Evaluation of Triacylglycerol Composition in Plant Oils Based on High-Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry Data,*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57 no.15, 2009, pp.6888-6898.
47. F. Jahaniaval, Y. Kakuda and M. Marcone, Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five *Amaranthus* accessions and their comparison to other oils,*Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 77, no. 8, 2000, p.847.
48. N. Andrikopoulos, I. Giannakis, and V. Tzamtzis, Analysis of Olive Oil and Seed Oil Triglycerides by Capillary Gas Chromatography as a Tool for the Detection of the Adulteration of Olive Oil,*Journal of Chromatographic Science*, vol. 39 no. 4, 2001, pp.137-145.
49. J. Parcerisa, I. Casals, J. Boatella, R. Codony, and M. Rafecas, Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas–liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols),*Journal of Chromatography A*, vol. 881, no. 1-2, 2000, pp.149-158.
50. H. R. Mottram, S. E. Woodbury, and R. Evershed, Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegetable oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry,*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 11, no. 12, 1997, pp.1240-1252.
51. F. Aranda, S. Gómez-Alonso, R. M. Rivera del Álamo, M. D. Salvador, and G. Fregapane, Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars,*Food Chemistry*, vol. 86, no. 4, 2004, pp.485-492.
52. S. Samaram, H. Mirhosseini, C. P. Tan, and H. M. Ghazali, Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) and Solvent Extraction of Papaya Seed Oil: Yield, Fatty Acid Composition and Triacylglycerol Profile,*Molecules*, vol. 18, no. 10, 2013, pp.12474-12487.

53. S. Gerbig and Z. Takáts, Analysis of triglycerides in food items by desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 24, no. 15, 2010, pp.2186-2192.
54. C. Pacheco, C.Palla, G. H.Crapiste, and M.E. Carrín, Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats, *Food Analytical Methods*, vol. 7, no. 10, 2014, pp.2013-2022.
55. R. Mateos, M. Trujillo, M. C. Pérez-Camino, W.Moreda, and A. Cert, Relationships between Oxidative Stability, Triacylglycerol Composition, and Antioxidant Content in Olive Oil Matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 14, 2005, pp.5766-5771.
56. J. Ayton, R. J. Mailer, and K. Graham, The Effects of Storage on Extra Virgin Olive Oil Quality, *RIRDC Publication*, No 12/024. 2012, pp. 10-11.
57. J.L. Barjol, Olive oil: Trends in quality and product category shares, *Workshop "Authentication of Olive Oil"*, 2013, pp. 3-9.
58. J. R. Izquierdo. Frauds in olive oil Sector in Spain, *Workshop "Authentication of Olive Oil"*, European Commission, Madrid, Spain, 10-11 June 2013.
59. Ε.Κ. 2568/91, Σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού.
60. C. Gertz, Rapid Assessment of Quality Parameters in Olive Oil using FTNIR and Conventional Standard Method, *Workshop "Authentication of Olive Oil"*, 2013, pp. 53-55.
61. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S. R., Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Ελληνική Μετάφραση Καραγιάννη-Ευσταθίου-Χανιωτάκη, Εκδόσεις Κωσταράκη, 5η Έκδοση, 2005, σελ.785-789,816-834.

62. C. Gertz, Rapid Assessment of Quality Parameters in Olive Oil using FTNIR and Conventional Standard Method, *Workshop "Authentication of Olive Oil"*, 2013, pp. 53-55.
63. Ε. Μπακέας, Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος "Τεχνικές Διαχωρισμού", ΕΚΠΑ, 2008.
64. Ν. Θωμαΐδης, Σημειώσεις μαθήματος "Ενόργανη Ανάλυση II", Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2015, σελ. 4.
65. Μ. Κουππάρης. Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος "Τεχνικές Διαχωρισμού", ΕΚΠΑ, 2018.
66. P. Lucci, D.Pacetti, O. Nunez, and G. N.Frega, Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis, *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, 2012, p. 129.
67. Selectscience.net, *Thermo Scientific™ TSQ Quantum™ Access MAX Triple Quadrupole Mass Spectrometer from Thermo Fisher Scientific | SelectScience*, <https://www.selectscience.net/products/thermo-scientific-tsq-quantum-access-max-triple-quadrupole-mass-spectrometer/?prodID=204074> [Τελευταία επίσκεψη 23/10/2019].
68. R. C. Murphy, Tandem mass spectrometry of lipids, Cambridge: Royal Society of Chemistry, RSC Publ, 2015, pp. 105-117.
69. W. J.Griffiths, *Metabolomics, metabonomics, and metabolite profiling*, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008, pp. 164-165.