



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ »**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΕΠΙ ΤΗΣ  
ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΛΑΖΑΡΟΥ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2019**



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Μελέτη συνθηκών αποθήκευσης επί της σταθερότητας εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου  
**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΛΑΖΑΡΟΥ**

**A.M.:** 51704

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

ΠΡΟΕΣΤΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Θωμάϊδης Νικόλαος**, Καθηγητής ΕΚΠΑ

**Μαρκάκη Παναγιώτα**, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

**Προεστός Χαράλαμπος**, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 02/07/2019



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του ΠΜΣ «Χημεία Τροφίμων» και επίσης εντάσσεται στο πλαίσιο του προγράμματος Εξειδικευμένης έρευνας προώθησης ελαιολάδου και προϊόντων ελιάς Βορείου Αιγαίου μέσω ανάδειξης του βιοδραστικού περιεχομένου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας.

Σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η προβολή των προϊόντων ελιάς που έχουν προέλευση από τα νησιά του Βόρειου Αιγαίου μέσω των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών και την αντοχή τους στην πάροδο του χρόνου.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης σε ένα εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο υπό διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, το δείγμα αποθηκεύτηκε για περίοδο έξι μηνών σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 25°C και στους 4°C αντίστοιχα. Ποσότητα του αρχικού δείγματος υπέστη διήθηση με καταχωρημένη μέθοδο (πατέντα), και αποθηκεύτηκε επίσης στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθησαν αναλύσεις στα τέσσερα (4) τελικά δείγματα στα παρακάτω χρονικά σημεία: στον χρόνο μηδέν (T<sub>0</sub>), στον πρώτο μήνα (T<sub>1</sub>), στον τρίτο μήνα (T<sub>2</sub>), και τέλος στον έκτο μήνα (T<sub>3</sub>) αποθήκευσης. Οι αναλύσεις που έγιναν περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό οξύτητας μέσω ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free fatty acids, FFA), τον προσδιορισμό αριθμού υπεροξειδίου, τη φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους (K232, ΔK), τον προσδιορισμό χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση υψηλής ανάλυσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (High performance liquid chromatography with diode array detector, HPLC-DAD), τον προσδιορισμό των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Fatty acid methyl esters, FAMES) και 1,2- και 1,3- διγλυκεριδίων με χρήση αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Gas chromatography with flame ionization detector, GC-FID), και τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων με χρήση υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας τύπου τετράπολο-χρόνου πτήσης ιόντων (Ultra-high performance reversed phase liquid chromatography with electrospray ionization coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry, RP-UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS). Επίσης, έγινε οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων, από εξωτερικό εργαστήριο.

Μετά το τέλος των έξι μηνών παρατηρήθηκαν μικρές μεταβολές στα δείγματα. Υπήρξε μια μικρή αύξηση στην οξύτητα των δειγμάτων, και αντίστοιχα παρατηρήθηκε μια ανοδική πορεία στον αριθμό υπεροξειδίων. Όπως ήταν αναμενόμενο, οι χρωστικές και οι τοκοφερόλες παρουσίασαν μείωση των συγκεντρώσεων τους. Αντίστοιχα, η ολική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων μειώθηκε. Επίσης μειώθηκε ο λόγος 1,2- προς 1,3- διγλυκεριδίων. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες μεταβολές. Ανοδική τάση παρουσιάστηκε στη σταθερά K232 και ΔΚ, αλλά δεν ξεπέρασαν ποτέ τα όρια της νομοθεσίας για το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο παρατηρήθηκε μείωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων. Γενικά το δείγμα που υπέστη διήθηση με καταχωρημένη μέθοδο έδειξε υψηλότερη σταθερότητα, ενώ συμπεραίνεται ότι η αποθήκευση στους 4°C διατηρεί καλύτερα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Χημεία Τροφίμων

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Σταθερότητα Εξαιρετικά Παρθένου Ελαιολάδου, σταθερότητα, αλλοίωση, φαινολικές ενώσεις, οργανοληπτικός έλεγχος.

## ABSTRACT

This thesis is carried out as part of the postgraduate program of “Food Chemistry” of National and Kapodistrian University of Athens, and is also a part of the research program for the promotion of olive oil and olive products of the North Aegean Islands, through their bioactive content and their unique quality characteristics.

The goal of this thesis is the elevation of the olive products derived from the North Aegean, with the evaluation of their quality characteristics and their development through the passage of time.

This thesis studies the stability of an extra virgin olive oil under different storage conditions. Specifically, the sample was stored for a period of six months at two different temperatures, of 25°C and 4 °C, respectively. A quantity of the sample was filtered with a patented method and was stored at the respective conditions, resulting into 4 final samples. Several chemistry analysis techniques were applied at four periods, initial time ( $T_1$ ), after 1 month ( $T_2$ ), after 3 months ( $T_2$ ), and after 6 months ( $T_3$ ). The analyses conducted included acidity (through free fatty acids method, FFA), peroxide value, K232,  $\Delta K$ , the determination of pigments and tocopherols by applying high resolution liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), the determination of 1,2- and 1,3- diglycerides and the determination of fatty acids methyl esters (FAMES) by applying gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), and the determination of phenolic bioactive compounds by applying Ultra-high performance liquid chromatography with negative electrospray ionization coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS). Also an organoleptic assessment was performed by an external laboratory. The performed analysis, took place on 4 time points, in order to evaluate the effects of temperature in a six-month storage period on extra virgin olive oil.

After the 6-month study, some changes in the quality parameters of the samples were observed. There was a small increase of the acidity and the peroxide value of the sample. Also, the constants K232 and  $\Delta K$  had shown an upward course over time. As it was expected, there was a decrease in both the pigments of the sample and the tocopherols. The phenolic content also suffered a decrease in the course of time. The 1,2- diglyceridis to 1,3-diglyceridis ratio decreased. The FAMES were not significantly affected. The

organoleptic assessment has shown a decrease of the quality characteristics for all the samples.

In conclusion, there was a significant difference on all the quality characteristics between the two samples (Control and patented sample). There were minor changes in the patented sample's characteristics, opposed to the Control sample's. Furthermore, the samples that were stored at 4°C showed less significant changes in the characteristics analyzed, proving that the storage of olive oil in lower temperatures helps maintain its quality longer.

**SUBJECT AREA:** Food Chemistry

**KEYWORDS:** Stability of extra virgin olive oil, stability, deterioration, phenolic compounds, organoleptic assessment.



Στην οικογένεια μου,  
και στους φίλους μου.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω την βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Προεστό για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Θωμαΐδη, για την πολύ σημαντική συμβολή του στην εκπόνηση της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μαριλένα Δασενάκη και την υποψήφια διδάκτορα Σοφία Δρακοπούλου για τη βοήθεια τους.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μιχάλη Πεντογέννη και τον Δρ. Αντώνη Κυριακόπουλο για την συνεργασία τους, όπως και τον ελληνικό γεωργικό οργανισμό ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ για την διεκπεραίωση του οργανοληπτικού ελέγχου.

Ιδιαίτερα πολύτιμη και ουσιαστική υπήρξε η τεράστια βοήθεια της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας Νατάσας Καλογιούρη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μάριου Κωστάκη τόσο για την έμπρακτη βοήθεια του, αλλά και για την υπομονή του καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής φοίτησης μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Δημήτρη Κανάκη, Ευαγγελία Κρητικού και Ιωάννη Μαρτάκου, για την τεράστια βοήθεια τους στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, συμβουλευοντας, καθοδηγώντας με, και προσφέροντας ψυχολογική υποστήριξη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την έμπρακτη βοήθεια που μου έχουν προσφέρει εξ αποστάσεως, και που παρόλες τις δυσκολίες συνέχισαν να με στηρίζουν σε όλη μου την πορεία στο πανεπιστήμιο.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>1</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>3</b>
1.1 Ελαιόλαδο και σημασία του .....	3
1.2 Ορισμός Ελαιολάδου .....	3
1.3 Κατηγορίες Ελαιολάδου .....	3
1.3.1 Παρθένο Ελαιόλαδο .....	3
1.3.2 Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο .....	4
1.3.3 Ελαιόλαδο .....	5
1.3.4 Βιομηχανικό ελαιόλαδο .....	5
1.4 Συστατικά Ελαιολάδου .....	7
1.4.1 Λιπαρά Οξέα .....	7
1.4.2 Τριγλυκερίδια .....	8
1.4.3 Φαινολικές ενώσεις .....	10
1.4.4 Υδρογονάνθρακες .....	12
1.4.5 Τοκοφερόλες .....	12
1.4.6 Χρωστικές ενώσεις .....	13
1.4.7 Αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες .....	14
1.4.8 Στερόλες .....	14
1.4.9 Τριτερπενοειδή οξέα .....	14
1.4.10 Πτητικές και αρωματικές ενώσεις .....	15
1.4.11 Άλλα δευτερεύοντα συστατικά .....	15
1.5 Σταθερότητα Ελαιολάδου .....	15
1.6 Σκοπός Εργασίας .....	16
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....</b>	<b>19</b>

2.1 Προσδιορισμός Ελεύθερων Λιπαρών Οξέων - Οξύτητα .....	19
2.1.1 Οξύτητα .....	19
2.2 Αριθμός Υπεροξειδίων .....	20
2.3 Φασματοφωτομετρική Εξέταση Υπεριώδους .....	20
2.4 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας GC-FID.....	21
2.5 Οργανοληπτική εξέταση Ελαιολάδου .....	22
2.6 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS	23
2.7 Προσδιορισμός χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση RP-HPLC-DAD .....	23
2.8 Προσδιορισμός 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας GC-FID .....	24
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....</b>	<b>25</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ .....</b>	<b>34</b>
4.1 Εισαγωγή .....	34
4.2 Φασματομετρία μοριακής απορρόφησης στο Υπεριώδες - Ορατό.....	34
4.2.1 Φασματοφωτόμετρο Ορατού – Υπεριώδους διπλής δέσμης .....	35
4.3 Αεριοχρωματογραφία .....	36
4.3.1 Χρωματογραφία Αέριου- Υγρού.....	36
4.3.2 Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) .....	37
4.4 Υγροχρωματογραφία .....	38
4.4.1. Χρωματογραφία Κατανομής .....	38
4.4.2 Εξαιρετικά υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με ανιχνευτή τετράπολο - χρόνου πτήσης. (RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS) .....	39
4.4.3 Υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων .	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....</b>	<b>46</b>
5.1 Δείγματα .....	46

5.2 Χρονική Συχνότητα Αναλύσεων .....	47
5.3 Πειραματικές Μέθοδοι .....	47
5.4 Προσδιορισμός Ελεύθερων Λιπαρών Οξέων – Οξύτητα.....	48
5.4.1 Αντιδραστήρια .....	48
5.4.2 Προετοιμασία Αντιδραστηρίων .....	48
5.4.3 Πειραματική Πορεία .....	48
5.5 Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίου .....	49
5.5.1 Αντιδραστήρια .....	49
5.5.2 Προετοιμασία Αντιδραστηρίων .....	49
5.5.3 Πειραματική Πορεία .....	50
5.6 Φασματοφωτομετρική Εξέταση Υπεριώδους .....	50
5.6.1 Αντιδραστήρια .....	50
5.6.2 Οργανολογία.....	50
5.6.3 Πειραματική πορεία .....	51
5.7 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των Λιπαρών Οξέων (FAMES) με Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή Ιονισμού φλόγας GC-FID .....	51
5.7.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες.....	51
5.7.2 Προετοιμασία Αντιδραστηρίων .....	52
5.7.3 Οργανολογία.....	52
5.7.3 Πειραματική Πορεία .....	52
5.8 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS	54
5.8.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες.....	54
5.8.2 Οργανολογία.....	54
5.8.3 Πειραματική Πορεία .....	55
5.8.4 Έλεγχος ποιότητας.....	57
5.8.5 Τεχνικές Σάρωσης .....	57

5.9 Προσδιορισμός χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση RP-HPLC-DAD .....	71
5.9.1 Αντιδραστήρια και πρότυπα .....	71
5.9.2 Οργανολογία.....	71
5.9.3 Πειραματική Πορεία .....	72
5.10 Προσδιορισμός 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας GC-FID .....	73
5.10.1 Αντιδραστήρια και πρότυπα .....	73
5.10.2 Οργανολογία.....	73
5.10.3 Πειραματική Πορεία .....	74
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΟ 6 ΜΗΝΩΝ</b> .....	<b>77</b>
6.1 Αποτελέσματα Οξύτητας .....	77
6.2 Αποτελέσματα Αριθμού Υπεροξειδίων .....	80
6.3 Αποτελέσματα Φασματοφωτομετρικής εξέτασης στο υπεριώδες .....	83
6.4 Αποτελέσματα προσδιορισμού μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων .....	88
6.5 Αποτελέσματα προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων .....	92
6.6 Αποτελέσματα προσδιορισμού χρωστικών και τοκοφερολών .....	97
6.7 Αποτελέσματα προσδιορισμού 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων .....	103
6.8 Αποτελέσματα Οργανοληπτικού ελέγχου του ελαιολάδου .....	105
6.9 Συνολικά Αποτελέσματα.....	109
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>113</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>118</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>120</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>122</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Διάταξη φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης .....	36
Σχήμα 2: Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας .....	38
Σχήμα 3: Συσκευή Ιοντισμού με Ηλεκτροφεκασμό .....	41
Σχήμα 4: Πορεία Ιόντων στα τμήματα του QTOF (maXis Impact, Bruker) .....	43
Σχήμα 5: Τρόπος λειτουργίας ανιχνευτή DAD .....	44
Σχήμα 6: Μεταβολή της οξύτητας στα 4 χρονικά σημεία.....	78
Σχήμα 7: Αποτελέσματα προσδιορισμού αριθμού υπεροξειδίων στα 4 χρονικά σημεία	82
Σχήμα 8: Αποτελέσματα σταθεράς $K_{232}$ .....	86
Σχήμα 9: Αποτελέσματα σταθεράς $K_{268}$ .....	87
Σχήμα 10: Ποσοστιαία αναλογία κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα 4 δείγματα σε περίοδο 6 μηνών.....	92
Σχήμα 11: Συνολικό φαινολικό προφιλ σε mg/kg στην πάροδο των 6 μηνών.....	97
Σχήμα 12: Αποτελέσματα για Λουτεΐνη σε mg/kg στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα .....	100
Σχήμα 13: Αποτελέσματα για Σκουαλένιο σε mg/kg στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα.....	101
Σχήμα 14: Αποτελέσματα για Τοκοφερόλη-α σε mg/kg στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα.....	102
Σχήμα 15: Αποτελέσματα Τοκοφερολών-β και γ σε mg/k στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα.....	103
Σχήμα 16: Λόγος 1,2/1,3 διγλυκερίδια στην πάροδο 6 μηνών για κάθε δείγμα.....	105
Σχήμα 17: Βαθμός χαρακτηριστικού "φρουτώδες" για κάθε δείγμα στα 4 χρονικά σημεία .....	107
Σχήμα 18: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων για τον χρόνο $T_0$ .....	108
Σχήμα 19: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων για τον χρόνο $T_3$ .....	108



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ελαϊκό Οξύ.....	8
Εικόνα 2: Δομή Τριγλυκεριδίων .....	9
Εικόνα 3: Βανιλλικό οξύ .....	11
Εικόνα 4: Τυροσόλη.....	11
Εικόνα 5: Πινορεζινόλη .....	11
Εικόνα 6: Ελαιευρωπαΐνη που αποτελείται από εστέρα του ελενολικού οξέος και την υδροξυτυροσόλη.....	12
Εικόνα 7: Σκουρόχρωμο γυάλινο μπουκάλι 500mL με πλαστικό πώμα ελεγχόμενης ροής .....	46
Εικόνα 8: Φασματοφωτόμετρο UV-1800 Shimadzu.....	51
Εικόνα 9: GC-450 Varian, Agilent .....	52
Εικόνα 10: UHPLC - QTOF/MS, Maxis Impact, Bruker Daltonics .....	55
Εικόνα 11: Agilent 1200 Series HPLC System .....	71



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά Ελαιολάδου βάσει του Κανονισμού (ΕΟΚ) 2568/91. ....	6
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές φαινολικές ενώσεις κάθε κατηγορίας.....	11
Πίνακας 3: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση .....	26
Πίνακας 4: Χρονική Συχνότητα Αναλύσεων .....	47
Πίνακας 5: Συνθήκες μεθόδου FAMES .....	53
Πίνακας 6: Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλουσης.....	56
Πίνακας 7: Λίστα στοχευμένων ενώσεων (Target List) .....	59
Πίνακας 8: Λίστα ύποπτων ενώσεων που έχουν ανιχνευθεί από προηγούμενες εργασίες .....	65
Πίνακας 9: Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλουσης.....	72
Πίνακας 10: Περιοχές που απορροφούν οι χρωστικές και οι τοκοφερόλες σε nm .....	73
Πίνακας 11: Συνθήκες Μεθόδου Ταυτοποίησης 1,2- και 1,3-διγλυκεριδίων .....	75
Πίνακας 12: Αποτελέσματα Οξύτητας ως προς % ελαϊκό οξύ .....	78
Πίνακας 13: Στατιστική μελέτη με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για την οξύτητα.....	80
Πίνακας 14: Αποτελέσματα Αριθμού Υπεροξειδίων εκφραζόμενα σε meq O <sub>2</sub> /kg.....	81
Πίνακας 15: Στατιστική μελέτη με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για τον αριθμό υπεροξειδίων .....	83
Πίνακας 16: Πίνακας αποτελεσμάτων απορρόφησης στο υπεριώδες .....	84
Πίνακας 17: Ποσοστιαία αναλογία FAMES.....	89
Πίνακας 18: Αναλογία επί %100 κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των δειγμάτων .....	91
Πίνακας 19: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης φαινολικών ενώσεων στα δείγματα .....	94
Πίνακας 20: Αποτελέσματα χρωστικών και τοκοφερολών στα 4 χρονικά σημεία σε mg/kg .....	99

Πίνακας 21: Ποσοστιαία αναλογία 1,2-DG και 1,3-DG στην πάροδο 6 μηνών για το κάθε δείγμα .....	104
Πίνακας 22: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος στα 4 χρονικά σημεία .....	106
Πίνακας 23: Αποτελέσματα για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων βάσει του κανονισμού ΕΟΚ 2568/91.....	110
Πίνακας 24: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων .....	118
Πίνακας 25: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους .....	120

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ερευνητική εργασία με τίτλο «Μελέτη συνθηκών αποθήκευσης επί της σταθερότητας εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου», εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019. Το πειραματικό κομμάτι της διατριβής αυτής έλαβε χώρα στα Εργαστήρια Χημείας Τροφίμων και Αναλυτικής Χημείας, στο τμήμα χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, με επιβλέποντες καθηγητές τους κ. Χαράλαμπο Προεστό και κ. Νικόλαο Θωμαΐδη. Τα δείγματα για το πειραματικό κομμάτι συλλέχτηκαν από το νησί της Λέσβου, ενώ η ερευνητική εργασία εντάσσεται στο πλαίσιο του προγράμματος «Εξειδικευμένη έρευνα προώθησης ελαιολάδου και προϊόντων ελιάς Βορείου Αιγαίου μέσω ανάδειξης του βιοδραστικού περιεχομένου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας».





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ελαιόλαδο και σημασία του

Το ελαιόλαδο αποτελεί το υπόβαθρο της Μεσογειακής Διατροφής, είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι της, το οποίο και την χαρακτηρίζει. Οι μεσογειακές χώρες έχουν κληρονομήσει αυτόν τον θησαυρό που πέραν των ευεργετικών ιδιοτήτων στην υγεία του ανθρώπου, με την εξαγωγή του, είχαν και μεγάλο οικονομικό όφελος [1]. Είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά που απαρτίζουν την κουλτούρα της Μεσογείου, και κυρίως της Ελλάδας, στην οποία παρουσιάζεται και η μεγαλύτερη ετήσια κατανάλωση ελαιολάδου ανά άτομο. Η κατανάλωση του έχει πλέον εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο, αφού η μοναδική του γεύση αλλά και οι ευεργετικές του ιδιότητες είναι πλέον ευρέως γνωστές. Ακόμη, λόγω του ότι αποτελεί πλούσια πηγή σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχει πάρει πρωταγωνιστικό ρόλο στην μαγειρική του σήμερα [2]–[4].

### 1.2 Ορισμός Ελαιολάδου

Ελαιόλαδο ονομάζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαίας της Ευρωπαϊκής (*Olea Europaea*) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες φυσικές σε κατάλληλες θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου [5].

### 1.3 Κατηγορίες Ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο διαχωρίζεται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με την οξύτητα του. Οι κατηγορίες του ελαιολάδου αναλύονται περαιτέρω παρακάτω.

#### 1.3.1 Παρθένο Ελαιόλαδο

Τα παρθένα ελαιόλαδα είναι έλαια που λαμβάνονται αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες θερμικές, οι οποίες δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. Τα έλαια αυτά, δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία, εκτός από την πλύση, την καθίζηση, τη φυγοκέντρηση και τη διήθηση. Τα έλαια

που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και μίγματα ελαίων με έλαια άλλης φύσης εξαιρούνται [5].

Τα Παρθένα ελαιόλαδα διαχωρίζονται περαιτέρω στις παρακάτω υποκατηγορίες, σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών [5]:

(α) Εξαιρετικό Παρθένο ελαιόλαδο: Παρθένο ελαιόλαδο όπου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης όσον αφορά το χαρακτηριστικό «Φρουτώδες» είναι μεγαλύτερος του 0 ( $M_f \geq 0$ ) ενώ δεν εντοπίζονται ελαττώματα ( $M_D = 0$ ). Η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι μικρότερη ή ίση του 0,8 g/100g ελαίου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [5].

(β) Παρθένο ελαιόλαδο: Ονομάζεται επίσης και «εκλεκτό». Είναι παρθένο ελαιόλαδο όπου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης όσον αφορά το χαρακτηριστικό «Φρουτώδες» είναι μεγαλύτερος του 0 ( $M_f \geq 0$ ) ενώ ο βαθμός ελαττωμάτων του δεν ξεπερνά το 3,5 ( $M_D \leq 3,5$ ). Ταυτόχρονα η ελεύθερη οξύτητα του, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι μικρότερη ή ίση του 2 g/100g ελαίου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [5].

(γ) Μειονεκτικό (LAMPANTE) παρθένο ελαιόλαδο: παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης όσον αφορά τα ελαττώματά του είναι μεγαλύτερος του 3,5 ( $M_D > 3,5$ ). Επιπλέον η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι ανώτερη των 2,0 g/100g ελαίου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [5].

### **1.3.2 Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο**

Ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό παρθένου ελαιόλαδου. Η ελεύθερη του οξύτητα εκφράζεται σε ελαϊκό οξύ, και δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 g/100g ελαίου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [5].

### **1.3.3 Ελαιόλαδο**

Ελαιόλαδο που προέρχεται από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένου ελαιόλαδου, εξαιρούμενου του μειονεκτικού. Η ελεύθερη οξύτητα του, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1,5 g/100g ελαίου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή [5].

### **1.3.4 Βιομηχανικό ελαιόλαδο**

Ελαιόλαδο που δεν είναι δυνατό με οποιαδήποτε επεξεργασία ή οποιοδήποτε τρόπο να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παρασκευή προϊόντων διατροφής. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται τα έλαια που έχουν παλμιτικό οξύ σε θέση 2 των τριγλυκεριδίων ανώτερο του 2,2%, έχουν δηλαδή υποστεί αλλοίωση της μοριακής τους σύστασης, χωματέλαια, μουργέλαια κλπ. Αυτά τα έλαια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή σαπουνιού και γλυκερίνης [5].

Με τον όρο «Βιομηχανοποιήσιμο ελαιόλαδο» ονομάζονται τα ελαιόλαδα και τα εξευγενισμένα ελαιόλαδα με δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ή/και με οξύτητα μεγαλύτερη από τα καθορισμένα όρια, εκφραζόμενη πάντα σε ελαϊκό οξύ [5].

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της κάθε κατηγορίας ελαιολάδου βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91 [6].

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά Ελαιολάδου βάσει του Κανονισμού (ΕΟΚ) 2568/91.

Κατηγορία	Εξαιρετικά Παρθένο ελαιόλαδο	Παρθένο ελαιόλαδο	Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο
Οξύτητα (%)	≤ 0,8	≤ 2,0	>2,0	≤ 0,5	≤ 1,5
K270	≤ 0,20	≤ 0,25	>0,25	≤ 1,20	≤ 1,00
K270 υπεράνω αλουμίνιας	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,11	-	-
ΔΚ	≤ 0,01	≤ 0,01	-	≤ 0,16	≤ 0,13
K232	≤ 2,50	≤ 2,60	≤ 3,70	≤ 3,40	≤ 3,30
Δείκτης υπεροξειδίων (meqO <sub>2</sub> /kg)	≤ 20	≤ 20	>20	≤ 5	≤ 15
Οργανοληπτική αξιολόγηση	≥ 6,5	≥ 5,5	< 3,5	-	-
Αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες (mg/kg)	≤ 0,20	≤ 0,20	> 0,20	≤ 0,20	≤ 0,20
Μυριστικό οξύ %	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05
Λινολενικό οξύ %	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9	≤ 0,9
Αραχιδικό οξύ %	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6	≤ 0,6
Εικοσενοϊκό οξύ %	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4	≤ 0,4
Βεχενικό οξύ %	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2
Λιγνοκηρικό οξύ %	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2
Σύνολο trans ισομερών του ελαιϊκού οξέος %	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,20	≤ 0,20
Σύνολο trans ισομερών του λινελαϊκού + του λινολενικού οξέος %	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,30	≤ 0,30
Κεκορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 των τριγλυκεριδίων %	≤ 1,3	≤ 1,3	≤ 1,3	≤ 1,5	≤ 1,5
Στιγμασαδιένια mg/kg	≤ 0,15	≤ 0,15	≤ 0,50	-	-
Κήροι (mg/kg)	≤ 250	≤ 250	≤ 350	≤ 350	≤ 350
Σύνολο Στερολών (mg/kg)	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000	≥ 1000
Χοληστερόλη %	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Βρασσικαστερόλη %	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1
Καμπεστερόλη %	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0	≤ 4,0
Στιγμαστερόλη %	< Καμπεστερόλη	< Καμπεστερόλη	< Καμπεστερόλη	< Καμπεστερόλη	< Καμπεστερόλη
β-Σιτοστερόλη %	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0	≥ 93,0
Δ7-Στιγμαστενόλη %	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
Ερυθροδιόλη + Ουβαόλη %	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
Υγρασία και πτητικές ουσίες %	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,1	≤ 0,1
Αδιάλυτες ύλες στον πετρελαϊκό αιθέρα %	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05
Διαφορά ECN 42 – HPLC και ECN 42 θεωρητικός υπολογισμός	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3

## 1.4 Συστατικά Ελαιολάδου

Το έλαιο που προέρχεται από τον καρπό της ελιάς *Olea Europaea*, έχει συγκεκριμένη σύσταση, και αποτελείται από 2 κλάσματα, το σαπωνοποιήσιμο και το μη σαπωνοποιήσιμο. Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα καθιστά το 98,5-99,5% του ελαίου [7]. Στο σαπωνοποιήσιμο κλάσμα περιλαμβάνονται τα τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια και τα λιπαρά οξέα. Παράλληλα, το ασάπωνοποίητο κλάσμα περιέχει στερόλες, τριτερπενικές διαλκοόλες, αλειφατικές αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, φαινόλες, τοκοφερόλες, κήρους, χρωστικές, αρωματικά συστατικά και τα φωσφολιπίδια [7]. Τα συστατικά που βρίσκονται στο ασάπωνοποίητο κλάσμα, είναι αυτά που καθορίζουν τα μοναδικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, όπως την οσμή του, τη γεύση του, αλλά και το χρώμα του [1]. Στις παρακάτω παραγράφους αναπτύσσεται η κάθε κατηγορία συστατικών του ελαιόλαδου.

### 1.4.1 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, και η περιεκτικότητά τους ορίζει το είδος του ελαιολάδου, μέσω της ελεύθερης οξύτητας που εκφράζεται ως προς ελαϊκό οξύ, αλλά και την βρωσιμότητα του (trans-λιπαρά οξέα) [8].

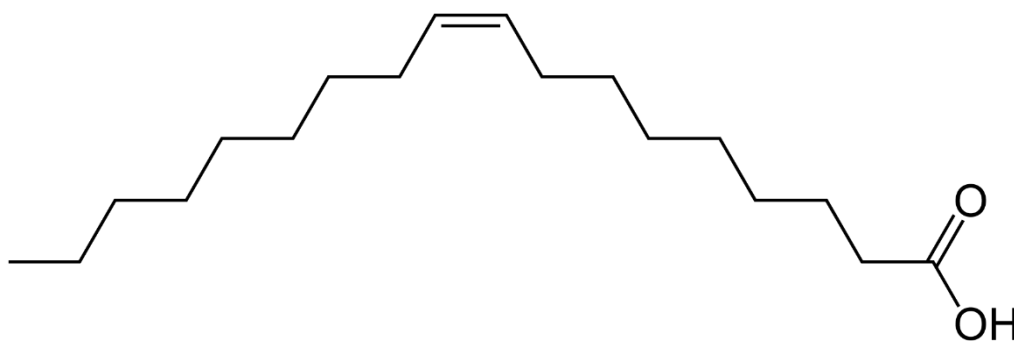
Κάποια από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο είναι το λαυρικό οξύ (C12:0), μυριστικό οξύ (C14:0), παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), αραχιδικό οξύ (C20:0), επταδεκανοϊκό οξύ (C17:0), βεχενικό οξύ (C22:0), και λιγνοκηρικό οξύ (C24:0) [1].

Ακόρεστα λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο περιέχουν 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).

Η σύσταση των λιπαρών οξέων δεν είναι σταθερή σε όλα τα δείγματα ελαιολάδου, έτσι εκδηλώνονται διαφορές στην περιεκτικότητά τους που εξαρτώνται από την γεωγραφική θέση της ελιάς, το υψόμετρο, το κλίμα, την

ποικιλία της ελιάς, αλλά και το στάδιο ωριμότητας του καρπού πριν την παραγωγή του ελαιολάδου [1][9]. Τα κύρια λιπαρά οξέα, που βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα είναι το ελαϊκό οξύ, το παλμιτικό και το λινελαϊκό οξύ. Βάσει των περιεκτικότητων αυτών των λιπαρών οξέων, τα ελαιόλαδα κατατάσσονται σε 2 τύπους, συγκεκριμένα, (α) στα ελαιόλαδα με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και χαμηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό και λινελαϊκό, και (β) στα ελαιόλαδα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και υψηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό και λινελαϊκό οξύ [1].

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1) παρουσιάζεται η δομή της ένωσης ελαϊκού οξέου.



Εικόνα 1: Ελαϊκό Οξύ

#### 1.4.2 Τριγλυκερίδια

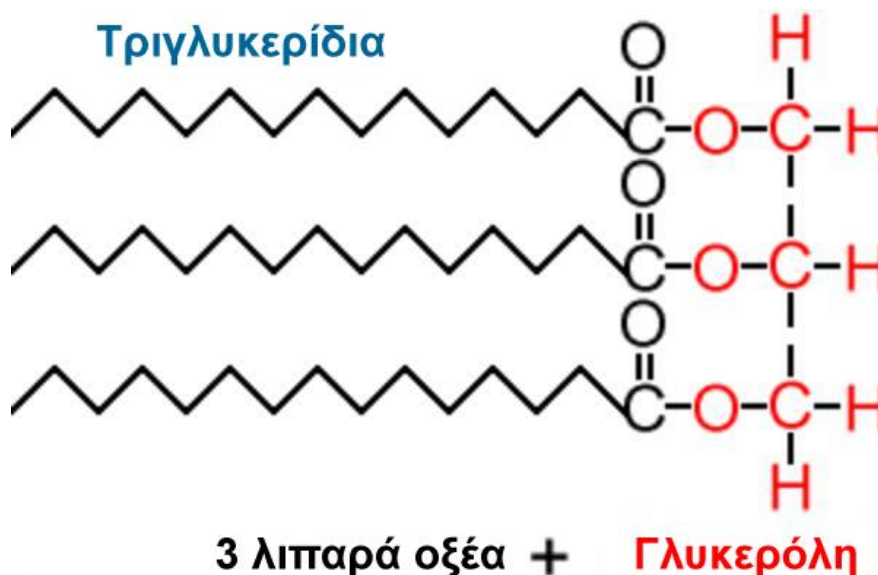
Το κύριο συστατικό του ελαιολάδου όμως είναι τα τριγλυκερίδια, σε ποσοστό 95-98% [8]. Τα τριγλυκερίδια αποτελούνται από την ένωση της γλυκερόλης και τρία λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη μπορεί να σχηματίσει τριεστέρα με 1, 2 ή 3 διαφορετικά λιπαρά οξέα. Τα τριγλυκερίδια που περιέχουν περισσότερα από 1 λιπαρό οξύ ονομάζονται μικτά τριγλυκερίδια [10], [11]. Μόνο όταν τα λιπαρά οξέα είναι εστεροποιημένα, θεωρείται το ελαιόλαδο καλής ποιότητας. Μια μονάδα τριακυλογλυκερόλης μπορεί να χάσει ένα λιπαρό οξύ για να γίνει μια διακυλογλυκερόλη - ή εάν χάνει δύο λιπαρά οξέα είναι μια μονοακυλογλυκερόλη. Το λιπαρό οξύ που χάνεται από την τριακυλογλυκερόλη ονομάζεται τότε «ελεύθερο λιπαρό οξύ» (free fatty acid, FFA), και μειώνει την

ποιότητα του ελαιολάδου, αφού με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η οξύτητα [8]. Η παρουσία διγλυκεριδίων ή μονογλυκεριδίων οφείλεται σε ατελή εστεροποίηση ή στην αντίδραση της υδρόλυσης. Συνήθως, η συγκέντρωση σε διγλυκερίδια σε ένα εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο είναι σε εύρος 1-2.8%, ενώ σε μονογλυκερίδια είναι μικρότερη του 0,25% [12], [13]. Επίσης, τα 1,2-διγλυκερίδια σε φρέσκο ελαιόλαδο τείνουν να ισομερίζονται σε 1,3-διγλυκερίδια, εφόσον τα τελευταία είναι σταθερότερα. Βάση αυτού, δίνεται πληροφορία όσον αφορά την ηλικία του δείγματος. Οι παράγοντες αποθήκευσης παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο για την κατανομή των λιπαρών οξέων [1].

Τα κύρια τριγλυκερίδια που βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο ελαιόλαδο είναι τα OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5-5,7%) και SOO(3-7%). Σε μικρότερο ποσοστό, υπάρχουν επίσης τα POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO και LLL [1].

Τα κύρια διγλυκερίδια που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι τα 1,2-διπαλμιτίνη και 1,3-διπαλμιτίνη, 1,2-διστεατίνη και 1,3-διστεατίνη, και το 1,2 ή 1,3-C34 που αποτελείται από γλυκερόλη, παλμιτικό οξύ και στεατικό οξύ [1], [14].

Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζεται η δομή των τριγλυκεριδίων.



Εικόνα 2: Δομή Τριγλυκεριδίων

### 1.4.3 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερεύοντα συστατικά του ελαιόλαδου, βρίσκονται στο πολικό κλάσμα του, που διαχωρίζεται κατά την εκχύλιση του ελαιόλαδου με μίγμα διαλυτών νερού-μεθανόλης [3], [7]. Η περιεκτικότητά τους στο παρθένο ελαιόλαδο, εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως την ποικιλία του ελαιόδεντρου, την γεωγραφική περιοχή, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, και τις τεχνολογικές επεξεργασίες [3]. Οι πολυφαινόλες έχουν συσχετιστεί με τη σταθερότητα, αλλά και με τα βιολογικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου. Καταβάλλεται προσπάθεια, με στόχο τη δημιουργία σχέσης μεταξύ της πρόσληψης φαινολικών ενώσεων μέσα από τη διατροφή, με τη μείωση κινδύνου για παθήσεις, όπως για παράδειγμα καρδιαγγειακής νόσου και καρκίνου, ενώ έρευνες έχουν ήδη συσχετίσει τις φαινόλες με τον ευεργετικό ρόλο του ελαιόλαδου, στον ανθρώπινο οργανισμό [7]. Οι πολυφαινόλες, παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διάρκεια ζωής του ελαιόλαδου, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Επιπλέον, επηρεάζουν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου εφόσον προσδίδουν την πικρία και τη στυφή γεύση του ελαιόλαδου, αλλά και την δριμύ μυρωδιά του [3]. Αυτές οι ενώσεις, είναι βιοδραστικές και έχουν πολλές ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό όπως αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, αντιδιαβητική δράση, αντικαρκινική δράση, αντιμικροβιακή δράση, αντιπικρή δράση, προστασία του δέρματος και αντιγηραντική δράση [15]–[17].

Υπάρχουν 6 κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται οι φαινολικές ενώσεις [1], [18]–[21]:

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

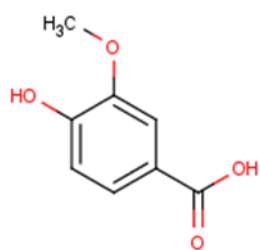
Στον πιο κάτω πίνακα (Πίνακας 2) εμφανίζονται παραδείγματα φαινολικών ενώσεων για την κάθε κατηγορία.



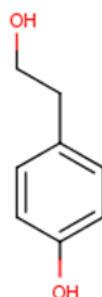
**Πίνακας 2: Χαρακτηριστικές φαινολικές ενώσεις κάθε κατηγορίας**

<b>Κατηγορία</b>	<b>Χαρακτηριστικές Ενώσεις</b>
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, βανιλλίνη
Φλαβονοειδή	Λουτεολίνη, απιγενίνη, ρουτίνη, 7-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, κερκετίνη
Σεκοϊροειδοειδή	Ελαιοευρωπαΐνη, άγλυκη ελαιοευρωπαΐνη, λινγκστροσίδη, άγλυκη λινγκστροσίδη, 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

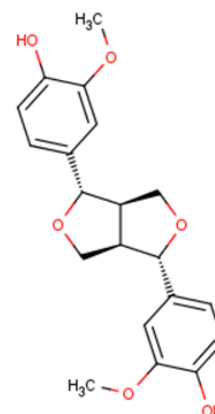
Οι εικόνες 3,4,5 και 6 παρουσιάζονται παραδείγματα φαινολικών ενώσεων:



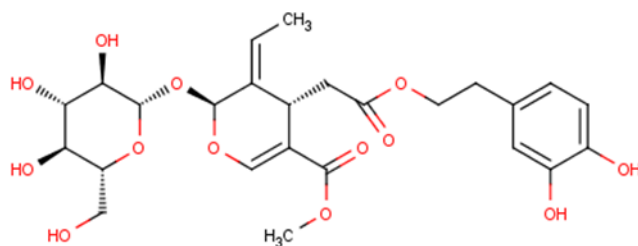
**Εικόνα 3: Βανιλλικό οξύ**



**Εικόνα 4: Τυροσόλη**



**Εικόνα 5: Πινορεζινόλη**



**Εικόνα 6: Ελαιοευρωπαϊνή που αποτελείται από εστέρα του ελενολικού οξέος και την υδροξυτυροσόλη**

#### 1.4.4 Υδρογονάνθρακες

Οι υδρογονάνθρακες είναι συστατικά που περιλαμβάνονται στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου. Δύο είναι οι σημαντικότεροι υδρογονάνθρακες, το σκουαλένιο που είναι το κύριο συστατικό του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαιολάδου, και το β-καροτένιο. Το β-καροτένιο ανήκει και στην κατηγορία των χρωστικών ουσιών του ελαιολάδου. Το σκουαλένιο περιέχει έξι ισοπρενικά μέρη και είναι ο τελευταίος μεταβολίτης που προηγείται του σχηματισμού στερόλης [1], [22]. Αυτός ο υδρογονάνθρακας αποτελεί βασικό ενδιάμεσο στη βιοσυνθετική οδό των στεροειδών, τόσο στα φυτά, όσο και στα ζώα. Η γεύση του χαρακτηρίζεται ήπια. Η συγκέντρωση του, έχει μεγάλο εύρος τιμών, από 200-7500 mg/kg, αφού επηρεάζεται από την ποικιλία του ελαιοδέντρου και τον τρόπο ελαιοποίησης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ευεργετική δράση του στην υγεία του ανθρώπου ενάντιας συγκεκριμένων μορφών καρκίνου [1]. Λόγω της μικρότερης συγκέντρωσης που παρουσιάζει το σκουαλένιο στα άλλα φυτικά έλαια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για να οριστεί η καθαρότητα ενός δείγματος ελαιολάδου [22]. Επιπλέον υδρογονάνθρακες που παρουσιάζονται στο ελαιολάδο είναι οι διτερπενικοί και τριτερπενικοί υδρογονάνθρακες, ισοπρενοειδείς πολυολεφίνες και ν-παραφίνες [1].

#### 1.4.5 Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες ανήκουν στο ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου, και περιλαμβάνονται στη βιταμίνη Ε. Υπάρχουν 4 τοκοφερόλες, α-τοκοφερόλη, β-τοκοφερόλη, γ-τοκοφερόλη και δ-τοκοφερόλη. Η α-τοκοφερόλη έχει την μεγαλύτερη βιολογική δράση και βρίσκεται σε υψηλότερη περιεκτικότητα στο

ελαιόλαδο, συνήθως 100-300 mg/kg, ενώ οι υπόλοιπες τοκοφερόλες βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις [23]. Οι τοκοφερόλες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οπότε οι υψηλές τιμές συγκεντρώσεων τους είναι επιθυμητές. Η συγκέντρωση σε τοκοφερόλες μπορεί να επηρεαστεί από το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς, αλλά και από την μέθοδο εκχύλισης που χρησιμοποιείται. Έχει βρεθεί ότι κατά τις διαδικασίες εξευγενισμού και υδρογόνωσης του ελαίου η συγκέντρωση τοκοφερόλης μειώνεται [1][24].

#### **1.4.6 Χρωστικές ενώσεις**

Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο έχει ένα χαρακτηριστικό χρώμα, το οποίο οφείλεται σε πράσινες και κίτρινες χρωστικές ενώσεις που περιέχει σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι ενώσεις αυτές είναι οι χλωροφύλλες και τα παράγωγα τους, αλλά και τα καροτενοειδή. Η περιεκτικότητα των χρωστικών επηρεάζεται από την ποικιλία ελιάς, την γεωγραφική θέση παραγωγής, το στάδιο ωρίμανσης, τον τρόπο εκχύλισης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Δεν υπάρχουν νομοθετικά όρια ως προς την παρουσία τους στα τρόφιμα. Οι χλωροφύλλες εντοπίζονται σαν φαιοφυτίνες, κυρίως σε φαιοφυτίνη-α, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να εντοπιστούν και προϊόντα αποικοδόμησης της φαιοφυτίνης, όπως η πυροφαιοφυτίνη-α. Η πυροφαιοφυτίνη-α βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση στα ραφιναρισμένα και στα εξευγενισμένα έλαια, γιατί για την παραγωγή της απαιτείται θέρμανση των ελαίων. Έτσι, η συγκέντρωση της πυροφαιοφυτίνης-α αυξάνεται με τον χρόνο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης φρεσκότητας του ελαίου [24], [25]. Προφανώς, η χλωροφύλλη-α εντοπίζεται μόνο σε φρέσκα ελαιόλαδα. Οι χλωροφύλλες είναι ευαίσθητες παρουσία φωτός, και μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του ελαιολάδου, καθώς και τη διάρκεια αποθήκευσης του. Το ίδιο ισχύει και για τα παράγωγα χλωροφύλλης. Οι ενώσεις αυτές, έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ενέργεια από το φως στο οξυγόνο τριπλής κατάστασης, παράγοντας οξυγόνο απλής κατάστασης, το οποίο αντιδρά με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα [26]. Από τα καροτενοειδή, στο ελαιόλαδο εντοπίζεται το β-καροτένιο και η λουτεΐνη [1], [27]. Οι δύο αυτές ενώσεις, είναι οι κυριότερες κίτρινες χρωστικές που υπάρχουν στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Τα καροτενοειδή, αποτελούν καταστολείς του οξυγόνου απλής κατάστασης, και έτσι προστατεύουν το ελαιόλαδο από την

οξειδωση λόγω παρουσίας φωτός. Ο ρόλος τους σαν αντιοξειδωτικά συσχετίζεται με την παρουσία τοκοφερολών [28].

#### **1.4.7 Αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες**

Οι κυριότερες κατηγορίες αλειφατικών και αρωματικών αλκοολών είναι οι λιπαρές αλκοόλες και οι διτερπενοειδείς αλκοόλες, που μπορούν να συναντηθούν στην ελεύθερη αλλά και στην εστεροποιημένη μορφή τους [1].

Λιπαρές αλκοόλες: Είναι ευθύγραμμες κορεσμένες αλκοόλες με περισσότερα από 16 άτομα άνθρακα, και βρίσκονται στην ελεύθερη αλλά και εστεροποιημένη μορφή. Οι κυριότερες λιπαρές αλκοόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι η εικοσιδυανόλη, η εικοσιτετρανόλη, η εικοσιεξανόλη και η εικοσιοκτανόλη. Οι περιεκτικότητες των εστεροποιημένων λιπαρών αλκοολών με λιπαρά οξέα είναι σημαντικές, αφού χρησιμοποιούνται για την διαφοροποίηση του ελαιόλαδου στις κατηγορίες του [1].

Διτερπενοειδή αλκοόλες: Οι κυριότερες άκυκλες διτερπενοειδής αλκοόλες που βρίσκονται στο αλειφατικό κλάσμα αλκοολών του ελαιόλαδου είναι η φυτόλη και η γερανυλγερανιόλη [1].

#### **1.4.8 Στερόλες**

Οι στερόλες είναι λιπίδια που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο γνησιότητας του ελαιόλαδου. Υπάρχουν 4 κατηγορίες στερολών στο ελαιόλαδο, οι κοινές στερόλες, οι 4-α-μεθυλοστερόλες, οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες και οι τριτερπενοειδείς διαλκοόλες. Οι περιεκτικότητά τους εξαρτάται από την ποικιλία ελιάς, αλλά και τις τεχνικές επεξεργασίας, που χρησιμοποιούνται κατά την εξαγωγή ελαιόλαδου [1].

#### **1.4.9 Τριτερπενοειδή οξέα**

Τα υδροξυπεντακυκλικά τριτερπενοειδή οξέα βρίσκονται σε μικρές περιεκτικότητες στο ελαιόλαδο. Είναι ενώσεις βιοδραστικές, που έχουν ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου. Το ολεανολικό οξύ και το μασλινικό οξύ είναι τα κύρια συστατικά ελαιόλαδου αυτής της κατηγορίας, και η περιεκτικότητά τους επηρεάζεται κατά την επεξεργασία ραφινάρισματος [1].

#### **1.4.10 Πτητικές και αρωματικές ενώσεις**

Στις πτητικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στο ελαιόλαδο περιέχονται υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες και κετόνες, οξέα, εστέρες, αιθέρες, παράγωγα φουρανίου, παράγωγα θειοφαινίου, πυραζόνες, θειόλες, και πυραζίνες. Αναγνωρίστηκαν περίπου διακόσιες ογδόντα πτητικές ενώσεις, όμως μόνο εξήντα επτά από αυτές συμβάλλουν στο άρωμα του παρθένου ελαιόλαδου, λόγω των περιεκτικότητων τους [1].

#### **1.4.11 Άλλα δευτερεύοντα συστατικά**

Σε αυτή την κατηγορία εμπεριέχονται τα φωσφολιπίδια και οι πρωτεΐνες. Τα δυο αυτά συστατικά βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις εφόσον οι ποσότητες τους μειώνονται έντονα κατά το φιλτράρισμα και το ραφινάρισμα του ελαιόλαδου [1].

### **1.5 Σταθερότητα Ελαιολάδου**

Η διάρκεια ζωής του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων. Κάποιοι από αυτούς μπορεί να είναι το στάδιο ωρίμανσης του καρπού κατά την συγκομιδή, η επεξεργασία, το φιλτράρισμα, και ο τρόπος αποθήκευσης. Από τις παραπάνω πληροφορίες, μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι δεν υπάρχει μια σταθερή διάρκεια για όλα τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα. Για τους καταναλωτές, το κυριότερο χαρακτηριστικό του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου που θα επιλέξουν για κατανάλωση, είναι το να είναι φρέσκο, αφού το συνδέουν αυτόματα με την ποιότητα και την ασφάλεια τροφίμων. Επίσης, ο καταναλωτής αντιλαμβάνεται την ημερομηνία λήξης ενός τρόφιμου ως το χρόνο που αυτό μπορεί να καταναλωθεί. Σαφέστατα, όλα τα ελαιόλαδα, με την πάροδο του χρόνου παρουσιάζουν σταδιακά αρνητικά χαρακτηριστικά, και έτσι υποβιβάζονται σε χαμηλότερες κατηγορίες, π.χ. από εξαιρετικά παρθένο σε παρθένο ελαιόλαδο. Αυτό δεν τα καθιστά ακατάλληλα για κατανάλωση, απλά αποτελούν πλέον ελαιόλαδο χαμηλότερης ποιότητας. Επομένως, ο χρόνος ζωής του ελαιολάδου αποτελεί ένα σύνθετο πρόβλημα για να υπολογιστεί, το οποίο η βιομηχανία ελαιολάδου είναι υποχρεωμένη να λύσει. Ο έλεγχος για τον υπολογισμό του χρόνου ζωής του εξαιρετικά παρθένου

ελαιολάδου μπορεί να γίνει σε συνθήκες πραγματικού χρόνου και επιταχυνόμενες συνθήκες. Στον έλεγχο στον πραγματικό χρόνο φανερώνονται οι πραγματικές αλλαγές στο δείγμα με την πάροδο του χρόνου, όμως όπως είναι λογικό είναι χρονοβόρες. Έτσι, προτιμάται η επιταχυνόμενη συνθήκη χρόνου, όπου προσδιορίζεται ο χρόνος ζωής του ελαιολάδου αποθηκευμένου σε συνθήκες διαφορετικές από τις κανονικές συνθήκες αποθήκευσης. Με αυτή όμως την μέθοδο υπάρχει η περίπτωση λάθος υπολογισμού της διάρκειας ζωής λόγω των δραστικών συνθηκών που επικρατούν στις μεθόδους αυτές [29][30]. Τα μοντέλα υπολογισμού για την ημερομηνία λήξης χωρίζονται σε κινητικά μοντέλα και εμπειρικά. Τα κινητικά μοντέλα που αναπτύχθηκαν, βασίζονται στον ρυθμό που οι κρίσιμες χημικές παράμετροι, όπως οξύτητα, υπεροξειδία κλπ., επηρεάζονται κάτω από πειραματικές συνθήκες από τον χρόνο αποθήκευσης, το φως και τη θερμοκρασία. Παράλληλα, τα εμπειρικά μοντέλα αναπτύσσονται βάσει της συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών πειραματικών συνθηκών με τις χημικές παραμέτρους του δείγματος. Έχουν αναπτυχθεί προηγμένες στατιστικές αναλύσεις σε αναλυτικά δεδομένα για την ανάπτυξη μοντέλων παλινδρόμησης που επιτρέπουν την πρόβλεψη της μέγιστης διάρκειας ζωής του δείγματος, ως συνάρτησης των χημικών του παραμέτρων [31].

## **1.6 Σκοπός Εργασίας**

Ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας αποθήκευσης σε συνάρτηση με την πάροδο του χρόνου σε δείγμα ελαιολάδου. Επίσης, γίνεται σύγκριση της σταθερότητας δείγματος που υπέστη διήθηση με καταχωρημένη μέθοδο (πατέντα), και αυτούσιου χωρίς να διηθηθεί. Οι αναλύσεις που διεξάγονται στα πλαίσια αυτού του πειράματος είναι ο προσδιορισμός ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free fatty acids, FFA), ο προσδιορισμός του αριθμού υπεροξειδίων, η φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους (K232, ΔK) με χρήση φασματοφωτομέτρου, ο προσδιορισμός χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (High performance liquid chromatography with diode array detector, HPLC-DAD), ο προσδιορισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Fatty acid methyl esters, FAMES) και ο προσδιορισμός 1,2-

και 1,3- διγλυκεριδίων με χρήση αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Gas chromatography with flame ionization detector, GC-FID), και ο προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση υγροχρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας τύπου τετράπολο-χρόνου πτήσης ιόντων (Ultra-high performance reversed phase liquid chromatography with electrospray ionization coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry, RP-UHPLC/ESI/QTOF/MS). Για την μελέτη προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων με χρήση UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της στοχευμένης και της «ύποπτης» σάρωσης. Από εξωτερικό εργαστήριο γίνεται επίσης και οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων.

Κομμάτι επίσης της εργασίας είναι η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων κατά την πάροδο του χρόνου στις κατάλληλες κατηγορίες που θέτονται από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, λόγω των αλλαγών των χαρακτηριστικών του.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Στην εργασία αυτή, όπως έχει προαναφερθεί, εκτελούνται αναλύσεις για τον προσδιορισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων, τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων, φασματοφωτομετρική εξέταση υπεριώδους (K232, ΔΚ), προσδιορισμός μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) με χρήση GC-FID, και οργανοληπτικός έλεγχος, βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91 σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών του ελαιολάδου [6]. Για την ανάλυση των FAMES ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της Agilent [32]. Επίσης, γίνεται προσδιορισμός 1,2- και 1,3- διγλυκεριδίων με χρήση GC-FID βάσει του ISO 29822:2012 της Αιθιοπίας [33]. Επιπλέον ο προσδιορισμός χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση HPLC-DAD και ο προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση UHPLC-Q-TOF-MS/MS γίνεται με μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του πανεπιστημίου μας.

#### **2.1 Προσδιορισμός Ελεύθερων Λιπαρών Οξέων - Οξύτητα**

Βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91, η κατηγοριοποίηση ενός δείγματος ελαιολάδου γίνεται μέσω της οξύτητας του. Συνεπώς αυτή η παράμετρος αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του [6].

##### **2.1.1 Οξύτητα**

Οξύτητα ορίζεται η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) στο ελαιόλαδο. Εκφράζεται σε βαθμό οξύτητας ή σε αριθμό οξύτητας. Ο βαθμός οξύτητας αποτελεί τα γραμμάρια ελαϊκού οξέος ανά 100 γραμμάρια λιπαρής ύλης, ενώ ο αριθμός οξύτητας αποδίδει τον αριθμό των μικρογραμμαρίων υδροξειδίου του καλίου (ΚΟΗ) που απαιτούνται για την εξουδετέρωση των λιπαρών οξέων σε 1 γραμμάριο λιπαρής ύλης. Η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι επιθυμητό να είναι χαμηλή, αφού η υψηλή περιεκτικότητα προδίδει ότι το ελαιόλαδο προέρχεται από καρπούς που είχαν ασθενήσει, και επίσης υποδουλώνει λανθασμένες συνθήκες αποθήκευσης. Την αιτία για την παρουσία των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο αποτελεί η λιπολυτική δράση της λιπάσης, που είναι ένζυμο που βρίσκεται στον καρπό, και δρα επί

των τριγλυκεριδίων διασπώντας τα σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Γενικά η οξύτητα μεταβάλλεται αργά, όταν το ελαιόλαδο αποθηκεύεται στις συνθήκες συνθήκες [4], [34] Το ποσοστό ελαϊκού οξέος θα πρέπει να είναι μικρότερο ή ίσο του 0,8%, για να εμπίπτει ένα ελαιόλαδο στην κατηγορία Εξαιρετικά Παρθένο Ελαιόλαδο [5]. Η μέθοδος αυτή είναι ογκομετρική και αναγράφεται στον Κανονισμό 2568/91 [6].

## **2.2 Αριθμός Υπεροξειδίων**

Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφράζει την ποσότητα των ουσιών που είναι ικανά να οξειδώσουν το ιωδιούχο κάλιο (KI) υπό τις συνθήκες της πειραματικής πορείας που επεξηγείται στον κανονισμό ΕΟΚ αριθμού 2568/91. Οι μονάδες μέτρησης είναι τα χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά χιλιόγραμμο δείγματος (meq O<sub>2</sub>/kg) [6]. Οι ενώσεις αυτές είναι τα υδροϋπεροξειδία, και δημιουργούνται κυρίως από την αντίδραση του οξυγόνου με το ελαιόλαδο. Αποτελεί δείκτη αρχικού σταδίου τάγγισης. Η τάγγιση, ή οξειδωση, στο ελαιόλαδο μπορεί να είναι ενζυματική, χημική, ή φωτοχημική. Επίσης μπορεί να δώσει πληροφορίες για την αντοχή του στο χρόνο, αφού υψηλός αριθμός υπεροξειδίων υποδεικνύει ότι το ελαιόλαδο έχει υποστεί οξειδωτικές αλλοιώσεις, οπότε θα έχει μικρή αντοχή στο χρόνο [4]. Από τα πιο πάνω, καταλήγουμε ότι ο αριθμός υπεροξειδίων είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον τρόπο αλλά και το χρόνο αποθήκευσης του ελαιολάδου. Είναι φανερό ότι η χρήση των σκουρόχρωμων συσκευασιών έχει σκοπό να αποφύγει την φωτοχημική τάγγιση του ελαιολάδου, αυξάνοντας έτσι το χρόνο ζωής του. Η μέθοδος αυτή είναι ογκομετρική και το όριο για να θεωρηθεί το ελαιόλαδο εξαιρετικά παρθένο, είναι μικρότερο ή ίσο του 20 meq O<sub>2</sub>/kg [6].

## **2.3 Φασματοφωτομετρική Εξέταση Υπεριώδους**

Η φασματοφωτομετρική εξέταση του ελαιολάδου στο υπεριώδες αποτελεί άλλη μια ανάλυση για τον χαρακτηρισμό της ποιότητας του. Με αυτή τη μέθοδο λαμβάνονται πληροφορίες για την κατάσταση αποθήκευσης του δείγματος, και τις μεταβολές που προκλήθηκαν κατά τις τεχνολογικές διεργασίες που αυτό υπέστη. Τα συγκεκριμένα μήκη κύματος που έχουν επιλεγεί βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91, παρουσιάζουν τα συζυγιακά διένια και

τριένια που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα λόγω των διαδικασιών εξευγενισμού, αλλά και λόγω της οξειδωσης που επέρχεται στο δείγμα με την πάροδο του χρόνου κατά την αποθήκευση [6]. Έτσι, με τη μέθοδο αυτή μετράται η απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, και από εκεί υπολογίζονται οι σταθερές  $K_{nm}$  για το κάθε μήκος κύματος, και η  $\Delta K$  που αποτελεί μαθηματική σχέση των υπολειπόμενων σταθερών  $K$ . Στα 268nm απορροφούν οι καρβονυλικές ενώσεις και τα συζυγή τριένια, και έτσι η σταθερά  $K_{268}$  υποδείχνει προχωρημένου σταδίου οξειδωση ή δείκτη ύπαρξης ραφιναρισμένου ελαιολάδου. Στα 232nm απορροφούν τα υδροϋπεροξειδία και τα συζυγή διένια, τα οποία αποτελούν ένδειξη αρχικού σταδίου οξειδωσης ή ενδιάμεσου σταδίου οξειδωσης. Η  $K_{232}$  είναι η μέτρηση που συνήθως υπερβαίνει το καθορισμένο όριο για χαρακτηρισμό του ελαιολάδου, οπότε αποτελεί τον σημαντικότερο δείκτη σε αυτή την ανάλυση για τον προσδιορισμό της εμπορικής κατηγοριοποίησης του. Επίσης, γίνεται υπολογισμός της παραμέτρου  $\Delta K$  που είναι η απόλυτη τιμή απόσβεσης του δείγματος και υπολογίζεται με ειδικό τύπο, με βάση τις απορροφήσεις του δείγματος στα καθορισμένα νανόμετρα 268nm, 264nm και 272nm, όταν γίνεται χρήση ισοοκτανίου για διαλύτη. Η  $\Delta K$  αποτελεί κριτήριο διάκρισης ενός κακής ποιότητας ελαιολάδου, από ένα νοθευμένο δείγμα με ραφιναρισμένο έλαιο. Όσον αφορά τις μονάδες μέτρησης των σταθερών  $K$  και  $\Delta K$ , δεν υπάρχουν και τα αποτελέσματα αποτελούνται μόνο από αριθμητική ένδειξη [4]. Τα νομοθετικά όρια για την εμπορική κατηγοριοποίηση του ελαιολάδου σε εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο είναι τα παρακάτω [5]:

(α)  $K_{232} \leq 2,5$

(β)  $K_{268} \leq 0,22$

(γ)  $\Delta K \leq 0,01$

#### **2.4 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας GC-FID**

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η συνολική συγκέντρωση των λιπαρών οξέων, δηλαδή η συγκέντρωση των ελεύθερων και των δεσμευμένων λιπαρών οξέων, με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας. Τα δεσμευμένα λιπαρά

οξέα, είναι αυτά που απαρτίζουν τα τριγλυκερίδια μαζί με τη γλυκερόλη. Με τη μέθοδο αυτή μετατρέπονται όλα τα λιπαρά οξέα στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους (FAMES). Αφού ταυτοποιηθούν και ποσοτικοποιηθούν είναι δυνατό να εντοπιστεί πιθανή νοθεία στο δείγμα, αφού τα ελαιόλαδα έχουν διαφορετικό προφίλ λιπαρών οξέων από ότι άλλα φυτικά έλαια, όπως παραδείγματος χάριν το σπορέλαιο. Είναι επίσης πιθανό να αποτελέσει ένδειξη για παρουσία ραφινέ ελαιολάδου σε παρθένα ελαιόλαδα [4]. Η μέθοδος επεξηγείται στον κανονισμό ΕΟΚ αριθμού 2568/91, και αφορά όλα τα φυτικά έλαια [6]. Στη μέθοδο αυτή, όπως αναγράφεται χρησιμοποιείται αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID).

## **2.5 Οργανοληπτική εξέταση Ελαιολάδου**

Ο οργανοληπτικός έλεγχος αποτελεί μία ακόμα μέθοδο ταξινόμησης και επισήμανσης ενός ελαιολάδου στην κατάλληλη εμπορική του κατηγορία. Ο έλεγχος αυτός γίνεται μόνο για τα παρθένα ελαιόλαδα. Η μέθοδος αυτή γίνεται από ομάδα κατάλληλα εκπαιδευμένου προσωπικού, και για τον χαρακτηρισμό των αρνητικών και θετικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου χρησιμοποιείται ειδικό λεξιλόγιο. Στις θετικές ιδιότητες συγκαταλέγονται τα παρακάτω τρία επίθετα: φρουτώδες, πικρό και πικάντικο. Στις αρνητικές ιδιότητες συγκαταλέγονται αρκετοί χαρακτηρισμοί, ανάμεσα σε αυτούς οι παρακάτω: ατρόχαδο, μουχλιασμένο, κρασώδες-ξυδάτο, ταγγό κλπ. Η εξέταση γίνεται σε ειδική αίθουσα γευσιγνωστικής δοκιμασίας βάση του προτύπου IOC/T.20/Doc No 6 και το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό ποτήρι [35]. Για να θεωρείται ένα δείγμα εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο θα πρέπει να μην εμφανίζει καθόλου αρνητικά χαρακτηριστικά, δηλαδή η διάμεσος τιμή των ελαττωμάτων να είναι μηδέν ( $M_D = 0$ ), ενώ θα πρέπει ο βαθμός του χαρακτηριστικού «Φρουτώδες» να είναι μεγαλύτερος του 0 ( $M_f \geq 0$ ). Η αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων που αναφέρεται στον κανονισμό 1308/2013, εκτελείται βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91 [6][36].

## **2.6 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS**

Ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων γίνεται με μέθοδο που έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών [37]. Όπως έχει προαναφερθεί, οι ενώσεις αυτές έχουν συσχετιστεί με τη διάρκεια ζωής του ελαιολάδου, λόγω του ό,τι αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά. Επίσης επηρεάζουν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, προσδίδοντας την πικρή και πικάντικη γεύση [3]. Τέλος, λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων, οι οποίες έχουν προαναφερθεί, και βάσει του κανονισμού 432/2012 της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), υπάρχει ο πιο κάτω ισχυρισμός υγείας: «Οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συμβάλλουν στην προστασία των ανθρώπινων κυττάρων από το οξειδωτικό στρες» [38]. Αυτός ο ισχυρισμός όμως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο όταν το ελαιόλαδο περιέχει 5 mg υδροξυτυροσόλης ή παραγώγων της ανά 20 g ελαιολάδου. Επίσης θα πρέπει να αναγράφεται και να είναι φανερό στον καταναλωτή πως η ευεργετική αυτή δράση λαμβάνεται με την κατανάλωση 20 g του ελαιολάδου [38]. Έτσι, μέσω αυτής της μεθόδου γίνεται προσπάθεια να εντοπιστούν τα δείγματα ελαιολάδων τα οποία έχουν συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων που εντάσσονται στον πιο πάνω ισχυρισμό υγείας ίση ή μεγαλύτερη των 250 mg/kg. Χρησιμοποιείται εξαιρετικά υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης συζευγμένη με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με ανιχνευτή τετράπολο - χρόνου πτήσης [39].

## **2.7 Προσδιορισμός χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση RP-HPLC-DAD**

Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίζονται οι τοκοφερόλες (α-τοκοφερόλη, β-τοκοφερόλη, γ-τοκοφερόλη και δ-τοκοφερόλη), αλλά και η χλωροφύλλη, η α-φαιοφυτίνη και η πυροφαιοφυτίνη. Επίσης, προσδιορίζονται τα καροτενοειδή β-καροτένιο και η λουτεΐνη, και το σκουαλένιο. Οι τοκοφερόλες περιλαμβάνονται στη βιταμίνη Ε, ενώ το β-καροτένιο αποτελεί προβιταμίνη τη ρετινόλη, που

είναι η βιταμίνη Α [34]. Ακόμα, η χλωροφύλλη, η φαιοφυτίνη και η πύροφαιοφυτίνη μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το πόσο φρέσκο είναι το δείγμα. Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά απλή και έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ. Χρησιμοποιείται υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων.

## **2.8 Προσδιορισμός 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας GC-FID**

Η μέθοδος αυτή έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει γίνει μελέτη επαλήθευσης της σύμφωνα με πρότυπα δείγματα αναφοράς που λήφθηκαν από τον COI (International Olive Council). Η μέθοδος αναπτύχθηκε βάσει του προτύπου του ISO 29822:2012 της Αιθιοπίας [33]. Έτσι, προσδιορίζονται τα 1,2- και 1,3- διγλυκερίδια και ποσοτικοποιούνται. Τα 1,2-διγλυκερίδια υπάρχουν λόγω ατελείς βιοσύνθεσης τριγλυκεριδίων, και εκδηλώνουν ένα φρέσκο και καλής ποιότητας ελαιόλαδο. Αντίθετα, τα 1,3-διγλυκερίδια σχηματίζονται από ισομερίωση 1,2-διγλυκεριδίων ή από μερική υδρόλυση τριγλυκεριδίων. Υψηλό ποσοστό 1,3-διγλυκεριδίων δηλώνει ένα παλιό ή κακώς διατηρημένο ελαιόλαδο [4]. Τα διγλυκερίδια που μελετήθηκαν είναι τα 1,2-διπαλμιτίνη και 1,3-διπαλμιτίνη, 1,2-διστεατίνη και 1,3-διστεατίνη, και 1,2-C34 και 1,3-C34. Λόγω των παραπάνω, η μελέτη τους κατά τη διάρκεια 6 μηνών είναι ενδιαφέρουσα. Η οργανολογία που χρησιμοποιείται είναι αεριοχρωματογραφία συνδεδεμένη με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

Πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν επιτευχθεί για το ελαιόλαδο, λόγω της υψηλής του διατροφικής αξίας, και έχουν προταθεί διαφορετικοί μέθοδοι προσδιορισμού των συστατικών του. Σε αυτή την εργασία, εκτός από τις αναλύσεις ρουτίνας που γίνονται για το χαρακτηρισμό του ελαιολάδου, προσδιορίζονται φαινολικές ενώσεις, οι χρωστικές ενώσεις χλωροφύλλη, φαιοφυτίνη, πυροφαιοφυτίνη, λουτεΐνη και β-καροτένιο, το σκουαλένιο, τα λιπαρά οξέα και τα 1,2- και 1,3-διγλυκερίδια. Ακολουθεί ένας βιβλιογραφικός πίνακας (Πίνακας 3) με τις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται από άλλους ερευνητές, για τον προσδιορισμό των πιο πάνω ενώσεων.

**Πίνακας 3: Βιβλιογραφική Ανασκόπηση**

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΤΗΣ 9 ΙΟΥΛΙΟΥ 1991	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΑΡΙΘΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ  ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ, ΣΥΖΥΓΗ ΔΙΕΝΙΑ  ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ (FAMES)	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΗ  ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ  ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΡΑΦΙΑ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΙΟΝΙΣΜΟΥ ΦΛΟΓΑΣ (GC-FID)	/	ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ	/	[6]
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΜΕ ΟΓΚΟΜΕΤΡΗΣΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΡΟΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΗΣΗ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΡΟΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ	/	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ	9	[40]
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΘ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΤΗ FOURIER	/	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ  ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ  ΣΠΟΡΕΛΑΙΟ	44	[41]
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΡΙΧΟΕΙΔΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΔΙΟΔΟΥ (CE-DAD)	/	ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	1	[42]



Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΧΕΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΜΕ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ	ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ  ΜΕΘΟΔΟΣ FOLIN-CIOCALTEAU ΓΙΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	/	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ SURI ΚΑΙ MANZANILLO	21	[43]
ΠΟΛΛΑΠΛΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ	ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	/	ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ	83	[44]
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ 5 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ, ΣΥΖΥΓΗ ΔΙΕΝΙΑ ΠΤΗΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΠΡΟΦΙΛ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ  ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΗΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΑΣ (SPME-GC/MS)  ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ ΦΛΟΓΑΣ (GC-FID)	/	ΧΟΝΤΡΟΛΙΑ, ΚΟΥΤΣΟΥΡΕΛΙΑ, ΚΟΛΟΒΗ, ΤΟΠΙΚΗ ΜΑΚΡΗΣ, ΜΑΝΑΚΗ	74	[45]
ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΥΔΡΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ, ΣΥΖΥΓΗ ΔΙΕΝΙΑ Α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΦΑΙΟΦΥΤΙΝΗ ΣΚΟΥΑΛΕΝΙΟ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ  ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	/	/	40	[46]

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΑΠΟ ΗΛΙΕΛΑΙΟ ΜΕ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ FAMES	ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ (FAMES)	ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	/	/	2	[47]
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ, α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗΣ, ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΕ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	ΣΚΟΥΑΛΕΝΙΟ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΑΛΔΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΗΣ ΑΓΛΥΚΗΣ ΟΛΕΟΕΥΡΩΠΑΙΝΗ ΑΚΕΤΟΞΥ-ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΤΥΡΟΣΟΛΗ ΟΜΟΒΑΝΙΛΙΚΟ ΟΞΥ ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ α-ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ	ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ UV ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟ:ΑΚΕΤΟΝΗ:ΕΞΑΝΙΟ 3:2:5	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ PICUAL	1	[48]
ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ ΒΑΝΙΛΙΚΟ ΟΞΥ Ρ-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ ΜΑΖΑΣ με ESI ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ (UHPLC-MS)	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΜΕ ΜΕΘΗ-H <sub>2</sub> O ΚΑΙ ΜΥΡΜΗΚΙΚΟ ΟΞΥ 0,01%	ΕΞΕΥΓΕΝΙΣΜΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ (MROO ΚΑΙ IROO) ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟ (POO) ΕΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ (EVOO) ΗΛΙΕΛΑΙΟ (SFO) ΣΟΓΙΕΛΑΙΟ (SBO)	14	[49]

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΥΘΕΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ ΒΑΝΙΛΙΚΟ ΟΞΥ Ρ-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ ΕΛΕΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ ΟΞΙΚΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΤΥΡΟΣΟΛΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΒΑΝΙΛΙΝΗ ΥΔΡΟΞΥ-ΕΛΕΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ ΔΕΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ- ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ ΥΔΡΟΞΥ- ΔΕΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ- ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ ΣΥΡΙΓΓΑΡΕΣΙΝΟΛΗ ΠΙΝΟΡΕΖΙΝΟΛΗ ΑΚΕΤΟΞΥΠΙΝΟΡΕΖΙΝΟΛΗ ΑΓΛΥΚΗ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ	ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΗΛΕΚΤΡΟΦΕΚΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟ- ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ (RP- UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS)	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΜΕ H <sub>2</sub> O 90% 10% CH <sub>3</sub> OH 5mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> – 100% CH <sub>3</sub> OH 5mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	ΚΟΛΩΒΗ ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	19	[37]

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
	ΑΓΛΥΚΗ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ					
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΤΟΠΟΘΕΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΤΙΑ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΤΟΥΡΚΙΑΣ ΜΕ ΤΟ ΑΙΓΑΙΟ, ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΕΣ ΓΙΑ 2 ΣΥΝΕΧΟΜΕΝΑ ΕΤΗ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΕΤΟΣ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ ΚΑΙ ΤΗ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΘΕΣΗ	<p>ΤΥΡΟΣΟΛΗ</p> <p>ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ</p> <p>ΒΑΝΙΛΙΝΗ</p> <p>ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ</p> <p>ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ</p> <p>P-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ</p> <p>M-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ</p> <p>ΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΟ ΟΞΥ</p> <p>ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ</p> <p>ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ</p>	<p>ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ (HPLC-DAD)</p>	<p>ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΜΕ ΝΕΡΟ ΜΕ ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ 0,2% - ΜΕΘΑΝΟΛΗ 90:10</p>	<p>ΕΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ</p>	47	[50]
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	<p>ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ</p> <p>ΤΥΡΟΣΟΛΗ</p> <p>ΔΙΑΚΕΤΟΞΥ – ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ (ΔΙΑΛΔΕΪΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ)</p> <p>ΔΙΑΚΕΤΟΞΥ ΛΙΓΚΣΤΡΟΣΙΝΗ</p> <p>ΑΓΛΥΚΗ (ΔΙΑΛΔΕΪΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ)</p>	<p>HPLC ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ UV</p> <p>MS ΜΕ ΠΗΓΗ ESI ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ</p> <p>NMR ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ</p>	<p>ΑΙΘΑΝΟΛΗ-H<sub>2</sub>O ΜΕ 2% ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ, 30:70</p>	<p>ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΙΣΠΑΝΙΚΟ, ΙΤΑΛΙΚΟ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΟ</p>	/	[51]

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΤΟ ΦΑΙΝΟΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΑ ΚΑΙ Η ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΚΟΥ ΈΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΡΒΕΚΙΝΑ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΝΟΤΙΑ ΚΑΤΑΛΟΝΙΑ	ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΤΥΡΟΣΟΛΗ ΟΞΙΚΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ ΕΛΕΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ ΥΔΡΟΞΥ-ΕΛΕΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ ΔΕΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ-ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ ΥΔΡΟΞΥ-ΔΕΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ-ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ ΣΥΡΙΓΓΑΡΕΣΙΝΟΛΗ ΠΙΝΟΡΕΖΙΝΟΛΗ ΑΚΕΤΟΞΥΠΙΝΟΡΕΖΙΝΟΛΗ ΔΕΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ-ΛΙΝΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΑΓΛΥΚΗ ΥΔΡΟΞΥ-ΔΕΚΑΡΒΟΞΥΜΕΘΥΛ-ΛΙΝΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΑΓΛΥΚΗ 10-ΥΔΡΟΞΥ-ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ ΛΟΥΤΕΟΛΙΝΗ ΛΙΝΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΑΓΛΥΚΗ ΑΠΙΓΕΝΙΝΗ ΜΕΘΥΛ-ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΑΓΛΥΚΗ.	HPLC ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ DAD ESI-TOF/MS	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ ΝΕΡΟΥ ΜΕ 0,25% ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ - ΜΕΘΑΝΟΛΗ	ΈΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΑΡΒΕΚΙΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΟΝΙΑ	32	[52]

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ, ΣΕ 3 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ	ΚΑΤΕΧΙΝΗ ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ FOLIN- CIOCALTEU		BLANQUETA, COBRANC, OSA, GALEGA	3	[53]
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΕΚΟΪΡΟΙΔΟΕΙΔΩΝ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕΣΩ ΗSMS ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΣ MS	ΆΓΛΥΚΗ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ ΆΓΛΥΚΗ ΛΙΝΓΚΣΤΡΟΣΙΔΗ ΆΓΛΥΚΟ ΕΛΕΝΟΛΙΚΟ ΟΞΥ	HPLC: ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΤΗΛΗΣ C18 FUSED-CORE  MS: ΜΕ ΧΡΗΣΗ EXACTIVE HCD ORBITRAP ΚΑΙ Q- EXACTIVE HYBRID ORBITRAP MS, ΕΞΟΠΛΙΣΜΕΝΑ ΜΕ ESI	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ: ΝΕΡΟ ΜΕ 0,1% ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ – ΜΕΘΑΝΟΛΗ ΜΕ 0,1% ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ	PICUAL ARBEQUINA FRANTOIO CORATINA	4	[54]
ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΧΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ: ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΠΙΠΕΔΑ	ΛΟΥΤΕΪΝΗ ΦΑΙΟΦΥΤΙΝΗ Α ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ	ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (HPLC) ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ (DAD)	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ: n-ΕΞΑΝΙΟ ΚΑΙ ΙΣΟΠΡΟΠΑΝΟΛΗ	ΑΜΦΥΣΗΣ ΑΘΗΝΟΛΙΑ ΚΟΡΟΝΕΙΚΗ ΜΑΝΑΚΙ ΛΙΑΝΟΛΙΑ ΚΟΛΟΒΗ ΧΟΝΔΡΟΛΙΑ ΘΡΟΥΜΠΟΛΙΑ	52	[28]
ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ ΚΑΙ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ HPLC ΣΕ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ	ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (HPLC) ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ (DAD)	ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ: Α) ΝΕΡΟ: 0,05 ΟΞΙΚΟ ΤΕΤΡΑΒΟΥΤΥΛΑΜΜΩΝΙΟ:ΜΕΘΑΝΟΛΗ 1:1:8 Β) ΑΚΕΤΟΝΗ: ΜΕΘΑΝΟΛΗ 1:1	ARBEQUINA BLANQUETA CORNICABRA HOJIBLANCA PICUAL LECHIN	50	[27]

Σκοπός Πειράματος	Ένωση	Μέθοδος	Κινητή Φάση	Ποικιλίες Ελιάς/Ελαιολάδου	Αριθμός Δειγμάτων	Αναφορά
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΣΕ ΟΛΙΓΟΠΟΛΥΜΕΡΗ, ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΟΞΙΔΩΜΕΝΑ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΔΙΕΝΙΑ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ	ΔΙΧΛΩΡΟΜΕΘΑΝΙΟ	/	/	[55]
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	ΕΛΕΥΘΕΡΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΔΙΕΝΙΑ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗ β-ΚΑΡΟΤΕΝΙΟ ΦΑΙΟΦΥΤΙΝΗ-α ΤΟΚΟΦΕΡΟΛΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 1,2-ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ 1,3-ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ	ΟΓΚΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΕ ΟΡΑΤΟ ΚΑΙ ΥΠΕΡΥΘΡΟ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ FOLIN-CIUCALTEAU GC-FID	/	CORATINA	/	[56]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

#### 4.1 Εισαγωγή

Στην μελέτη αυτή που αφορά τη σταθερότητα του ελαιολάδου κατά την αποθήκευση του χρησιμοποιούνται τα παρακάτω όργανα:

- Φασματοφωτόμετρο Ορατού – Υπεριώδους διπλής δέσμης
- Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID)
- Εξαιρετικά υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με ανιχνευτή τετράπολου χρόνου πτήσης (UHPLC-Q-TOF-MS/MS)
- Υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (HPLC-DAD)

Σε αυτό το κεφάλαιο, ακολουθούν οι βασικές αρχές και η οργανολογία των αναλυτικών οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν, σύμφωνα με την παραπάνω σειρά.

#### 4.2 Φασματομετρία μοριακής απορρόφησης στο Υπεριώδες - Ορατό

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας  $T$ , ή της απορρόφησης  $A$  των διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής  $b$  cm. Η συγκέντρωση  $c$  ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την μαθηματική έκφραση του Νόμου του Beer:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (1)$$

Όπου,

$P_0$ : Ισχύ ακτινοβολίας που εισέρχεται στο δείγμα σε Watt

$P$ : Ισχύ ακτινοβολίας διαβιβαζόμενης από το δείγμα σε Watt

$A$ : Απορρόφηση

$T$ : Διαπερατότητα



b: διαδρομή απόσβεσης σε εκατοστά (οπτική διαδρομή)

c: Συγκέντρωση αναλύτη σε g/L ή mol/L

ε: γραμμομοριακή απορροφητικότητα [57]

#### 4.2.1 Φασματοφωτόμετρο Ορατού – Υπεριώδους διπλής δέσμης

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στις φασματικές περιοχές υπεριώδους και ορατού χρησιμοποιείται ευρέως στον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών οργανικών αλλά και ανόργανων ουσιών. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βιολογικές ουσίες. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή μήκους κύματος 190-800nm.

##### 4.2.1.1 Οργανολογία:

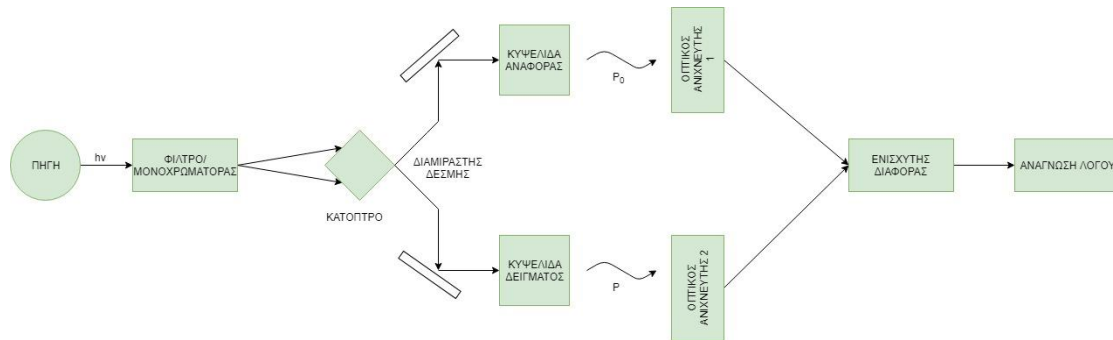
Για τη μέτρηση απορρόφησης στην υπεριώδη, την ορατή και την εγγύς-υπέριυθη περιοχή, η οργανολογία αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα: Πηγή, επιλογείς μήκους κύματος, υποδοχείς δειγμάτων, μεταλλάκτες ακτινοβολίας και επεξεργαστές σημάτων, και διατάξεις ανάγνωσης μετρήσεων.

Πηγή ακτινοβολίας: Απαιτείται μια πηγή συνεχούς φάσματος εκπομπής, της οποίας δεν μεταβάλλεται η ισχύς για μεγάλη περιοχή τιμών μήκους κύματος.

- Λυχνία Δευτερίου: Με ηλεκτρική διέγερση δευτερίου υπό χαμηλή πίεση παράγεται ένα συνεχές φάσμα εκπομπής στην υπεριώδη περιοχή. Ο μηχανισμός παραγωγής του συνεχούς φάσματος περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός διεγερμένου μοριακού σωματιδίου το οποίο στη συνέχεια διίσταται σε δύο ατομικά σωματίδια με εκπομπή φωτονίου στην υπεριώδη περιοχή. Έτσι παράγεται συνεχές φάσμα στην περιοχή 190-400nm [57], [58].

##### 4.2.1.2 Φασματοφωτόμετρο Διπλής Δέσμης:

Σε αυτά τα όργανα σχηματίζονται δύο δέσμες με τη βοήθεια ενός κατόπτρου σχήματος V που ονομάζεται διαμοιραστής δέσμης (beam splitter). Έτσι η μία δέσμη διέρχεται από το διάλυμα αναφοράς και κατευθύνεται σε φωτομεταλλάκτη, ενώ η άλλη από το δείγμα και κατευθύνεται σε άλλο φωτομεταλλάκτη, ίδιο με τον προηγούμενο. Στη συνέχεια τα σήματα από τους φωτομεταλλάκτες ενισχύονται, προσδιορίζεται με ηλεκτρονικά μέσα ο λόγος τους, και παρουσιάζεται στο όργανο ανάγνωσης, όπως φανερώνεται στο πιο κάτω σχήμα (Σχήμα 1) [57], [58]:



**Σχήμα 1: Διάταξη φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης**

### 4.3 Αεριοχρωματογραφία

Με τον όρο χρωματογραφία αναφερόμαστε σε ένα μεγάλο φάσμα μεθόδων, οι οποίες βοηθούν στον διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες, όταν αυτά προέρχονται από σύνθετα μίγματα. Ένα μεγάλο ποσοστό των διαχωρισμών αυτών δεν είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας άλλη μέθοδο ανάλυσης. Σε όλα τα είδη χρωματογραφικού προσδιορισμού το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση (mobile phase). Αυτή η φάση μπορεί να είναι είτε αέριο είτε υγρό είτε υπερκρίσιμο ρευστό. Έπειτα, η φάση αυτή εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω της στατικής φάσης (stationary phase), η οποία υπάρχει στη στήλη ή σε μία στερεή επιφάνεια. Οι δύο αυτές φάσεις διαφέρουν στην πολικότητα, έτσι ώστε οι ενώσεις του δείγματος να αλληλοεπιδρούν και με τις δύο και να κατανέμονται ανάλογα στην κινητή και στη στατική φάση. Τα συστατικά που δεν κατακρατούνται από την στατική φάση, εκλύονται πρώτα, ενώ σταδιακά εκλύονται και τα συστατικά που κατακρατούνται από αυτήν. Άρα, αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης των τελευταίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας διαφορετικές ζώνες, αφού εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους και να γίνεται εφικτός ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους [57].

#### 4.3.1 Χρωματογραφία Αέριου- Υγρού

Η χρωματογραφία αέριου-υγρού βασίζεται στην κατανομή του δείγματος στις δύο φάσεις: της αέριας κινητής, και μιας υγρής φάσης η οποία είναι

προσκολλημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού ή στα τοιχώματα ενός τριχοειδούς σωλήνα [57].

Φέρον Αέριο: Το αέριο της κινητής φάσης πρέπει να είναι χημικώς αδρανές, έτσι συνήθως χρησιμοποιείται ήλιο, ενώ πιο σπάνια υδρογόνο, άζωτο και αργό, που διατίθεται πεπεσμένο σε οβίδες [57].

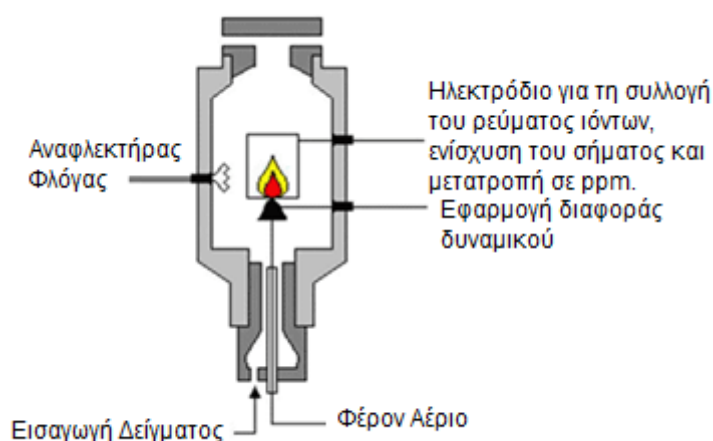
Σύστημα έγχυσης δείγματος: Όταν γίνεται χρήση τριχοειδής στήλης απαιτείται πολύ μικρός όγκος δείγματος, έτσι γίνεται χρήση του διαμοιραστή δείγματος (sample splitter), ο οποίος οδηγεί μικρή ποσότητα του δείγματος στη στήλη, ενώ το υπόλοιπο δείγμα οδηγείται στα απόβλητα. Στους αεριοχρωματογράφους όμως, υπάρχει και η επιλογή εισαγωγής του δείγματος χωρίς διαχωρισμό (splitless injection), όπου οδηγεί όλο το δείγμα μέσα στη στήλη [57].

Φούρνος στήλης: Η θερμοκρασία της στήλης είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας ο οποίος πρέπει να ελέγχεται συνεχόμενα εφόσον επιθυμούνται αναπαραγωγίσιμα αποτελέσματα. Η θερμοκρασία της στήλης εξαρτάται από το σημείο βρασμού του δείγματος αλλά και τον απαιτούμενο βαθμό διαχωρισμού. Συχνά απαιτείται προγραμματισμός θερμοκρασίας (temperature programming), κατά τον οποίο η θερμοκρασία της στήλης αυξάνεται σταδιακά ή σε βήματα κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Αναλύτες χαμηλής πτητικότητας προσδιορίζονται αφού μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα τους.

#### **4.3.2 Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID)**

Η αεριοχρωματογραφία με τριχοειδής στήλη, έχει επικρατήσει σαν τεχνική διαχωρισμού, σε σχέση με την πακεταρισμένη στήλη, λόγω του ότι είναι αποτελεσματικότερες. Ένας από τους πιο διαδεδομένους ανιχνευτές σε αυτού του είδους τη χρωματογραφία, είναι ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID). Με τη χρήση του FID, το υγρό έκλυσης από τη στήλη κατευθύνεται σε φλόγα αέρα – H<sub>2</sub>. Μια πληθώρα οργανικών ενώσεων, κατά την πυρόλυση τους σε αυτή τη φλόγα παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια, τα οποία είναι ικανά να άγουν τον ηλεκτρισμό μέσω της φλόγας αέρα- H<sub>2</sub>. Με τη μέτρηση του ρεύματος που παράγεται από τη συλλογή των φορτισμένων αυτών φορέων, επιτυγχάνεται η ανίχνευση των ενώσεων. Μεταξύ ακροφύσιου του καυστήρα και ενός

ηλεκτροδίου – συλλέκτη πάνω ακριβώς από τη φλόγα εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού μερικών εκατοντάδων volt. Το παραγόμενο ρεύμα ( $\sim 10^{-12}$  A) εισάγεται σε τελεστικό ενισχυτή υψηλής εμπέδησης για μέτρηση. Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας θεωρείται ως ανιχνευτής ευαίσθητος προς τη μάζα, και όχι προς τη συγκέντρωση, εφόσον αποκρίνεται προς τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που εισάγονται σε αυτόν ανά μονάδα χρόνου [57]. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η δομή του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.



Σχήμα 2: Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας

#### 4.4 Υγροχρωματογραφία

Η υγροχρωματογραφία, όπως και η αέρια, αποτελεί τεχνική διαχωρισμού ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες. Στην υγροχρωματογραφία η κινητή φάση είναι υγρή.

##### 4.4.1. Χρωματογραφία Κατανομής

Στη χρωματογραφία κατανομής η στατική φάση είναι ένα δεύτερο υγρό που δεν αναμειγνύεται με την υγρή κινητή φάση. Στους πρώτους τύπους χρωματογραφίας κατανομής χρησιμοποιούνταν στήλες υγρού-υγρού, οι οποίες στα σύγχρονα συστήματα LC, αντικαταστάθηκαν με στήλες υγρής-συνδεδεμένης-φάσης (liquid-bonded-phase). Στη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης, η στατική φάση δεσμεύεται με χημικό δεσμό στην επιφάνεια του υλικού στήριξης. Τα υλικά στήριξης για την πλειονότητα των

υλικών πλήρωσης στη χρωματογραφία κατανομής συνδεδεμένης φάσης παρασκευάζονται από άκαμπτη πυριτία ή σύνθεση που βασίζεται σε πυριτία. Αυτά τα στερεά σχηματίζονται ως ομοιόμορφα, πορώδη και μηχανικώς σκληρά σωματίδια με συνήθη διάμετρο 3-5 μm.

Ανάλογα με τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης διακρίνονται δύο τύποι χρωματογραφίας κατανομής:

- Χρωματογραφία κανονικής φάσης: Η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, τετραχλωράνθρακας κ.ά.
- Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: Η κινητή φάση είναι κάποιος πολικός διαλύτης (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ύδωρ κ.ά.), ενώ η στατική φάση είναι μη πολική (συνήθως ένας υδρογονάνθρακας C8 ή C18).

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο. Αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου έκλουσης των μη πολικών ενώσεων. Το αντίθετο συμβαίνει στη χρωματογραφία κανονικής φάσης.

Κατά τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η διατήρηση των οργανικών αναλυτών από τις πολικές ενώσεις (π.χ. νερό) επάνω σε αυτά τα υλικά SPE οφείλεται κατά κύριο λόγο στις ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου στον αναλύτη και στις λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια του πυριτίου. Αυτές οι μη πολικές - μη πολικές ελκτικές δυνάμεις συνήθως ονομάζονται δυνάμεις van der Waals, ή δυνάμεις διασποράς. Για να εκλουστεί μία προσροφημένη ένωση από έναν αντίστροφης φάσης SPE σωλήνα ή δίσκο, χρησιμοποιούμε ένα μη πολικό διαλύτη ώστε να διαταραχθούν οι δυνάμεις που δεσμεύουν την ένωση με το υλικό πλήρωσης [57].

#### **4.4.2 Εξαιρετικά υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας με ανιχνευτή τετράπολο - χρόνου πτήσης. (RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS)**

##### **4.4.2.1 Εξαιρετικά υψηλής απόδοσης υγροχρωματογραφία (UHPLC):**

Η εξαιρετικά υψηλής απόδοσης υγροχρωματογραφία (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, Ultra-HPLC) χρησιμοποιεί την ίδια μεθοδολογία διαχωρισμού, όπως η συμβατική HPLC, αλλά συνήθως χρησιμοποιεί στήλες,

πληρωμένες με μικροσωματίδια διαμέτρου μικρότερης από 2  $\mu\text{m}$ . Αυτού του μικρού μεγέθους τα σωματίδια αυξάνουν δραματικά την απόδοση της στήλης, την ευαισθησία ως προς τη μάζα του αναλύτη, τη διαχωριστική ικανότητα και τη ταχύτητα. Ενώ, η οργανολογία για Ultra-HPLC απαιτεί μονάδες παρόμοιες με της συμβατικής HPLC, το μικρότερο μέγεθος σωματιδίων πληρώσεως της στήλης δημιουργεί πολύ αυξημένες πιέσεις στα άκρα της στήλης, με αποτέλεσμα να απαιτούνται αντλίες πολύ υψηλών πιέσεων. Σημειώνεται ότι απαιτούνται πιέσεις 20.000 psi και πάνω, απ' όπου πήρε και το όνομά της η τεχνική UHPLC [57], [59].

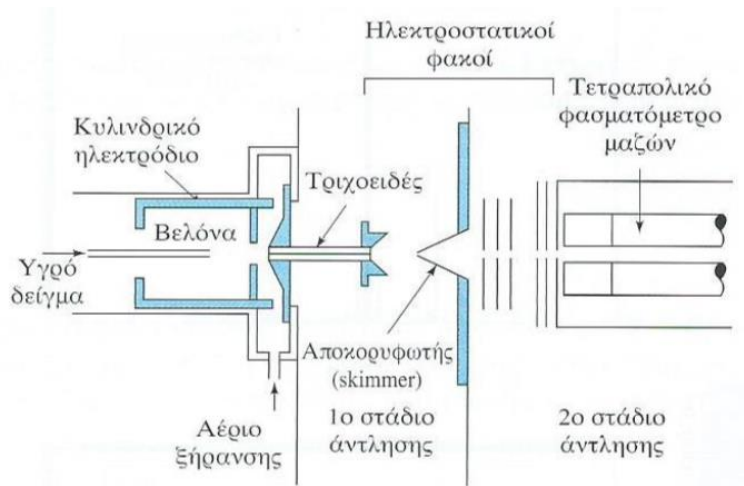
#### 4.4.2.2 Φασματομετρία Μαζών:

Με τον όρο φασματομετρία μαζών ορίζεται μια οικογένεια προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος, που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) (φάσμα μάζας). Στο φάσμα μάζας το λαμβανόμενο σήμα καλείται κορυφή και η θέση της κορυφής εκφράζει τον λόγο  $m/z$  του ιόντος. Η ένταση της κορυφής ενός ιόντος αντιστοιχεί στην αφθονία αυτού στο χώρο ανίχνευσης. Η κορυφή με τη μεγαλύτερη ένταση καλείται βασική κορυφή. Συχνά, η κορυφή που βρίσκεται στο μεγαλύτερο  $m/z$  προκύπτει από την ανίχνευση του μοριακού ιόντος και συνήθως ακολουθείται από αρκετές κορυφές σε μικρότερα  $m/z$ , οι οποίες αντιστοιχούν σε ιόντα-θραύσματα του μοριακού ιόντος [57], [58].

#### 4.4.2.3 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό:

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) ανήκει στις μαλακές πηγές εκρόφησης. Πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το διάλυμα διέρχεται μέσω μιας τριχοειδούς βελόνας, με ταχύτητα της τάξης μερικών  $\mu\text{L}/\text{min}$ , η οποία βρίσκεται σε υψηλό δυναμικό μερικών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, με αποτέλεσμα την δημιουργία φορτισμένων σταγονιδίων. Τα σταγονίδια διέρχονται στη συνέχεια μέσω δεύτερου τριχοειδούς, στο οποίο ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη. Η εξάτμιση των φορτισμένων σταγονιδίων συντελείται με τη βοήθεια ροής θερμού αζώτου. Με τη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων λόγω της

εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα φορτίου αυξάνει, τα ιόντα κινούνται στην επιφάνεια της σταγόνας και όταν οι απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων μέσα στη σταγόνα ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση, η σταγόνα σπάει και ελευθερώνονται ιόντα. Τα ιόντα ανάλογα με τον ιοντισμό που έχουν υποστεί μπορεί να έχουν φορτιστεί θετικά ή αρνητικά. Στο θετικό ιοντισμό η σύγκρουση ιόντων και μορίων μεταφέρει ένα άτομο H στο ιόν και σχηματίζεται το πρωτονιωμένο ψευδομοριακό ιόν  $[M+H]^+$ , αλλά και κάποια ιόντα προσθήκης μετά από προσκόλληση κατιόντων, όπως τα  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ . Στον αρνητικό ιοντισμό αποσπάται ένα άτομο H από το ιόν και σχηματίζεται το αποπρωτονιωμένο ψευδομοριακό ιόν  $[M-H]^-$ . Από τον αποκορυφωτή θα περάσουν ιόντα θετικού ή αρνητικού φορτίου και θα οδηγηθούν στον αναλυτή όπου επικρατούν συνθήκες κενού [57], [58]. Στο πιο κάτω σχήμα (Σχήμα 3) παρουσιάζεται η συσκευή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.



**Σχήμα 3: Συσκευή Ιοντισμού με Ηλεκτροψεκασμό**

#### 4.4.2.4 Διαδοχική Φασματομετρία Μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) με τεχνολογία QTOF:

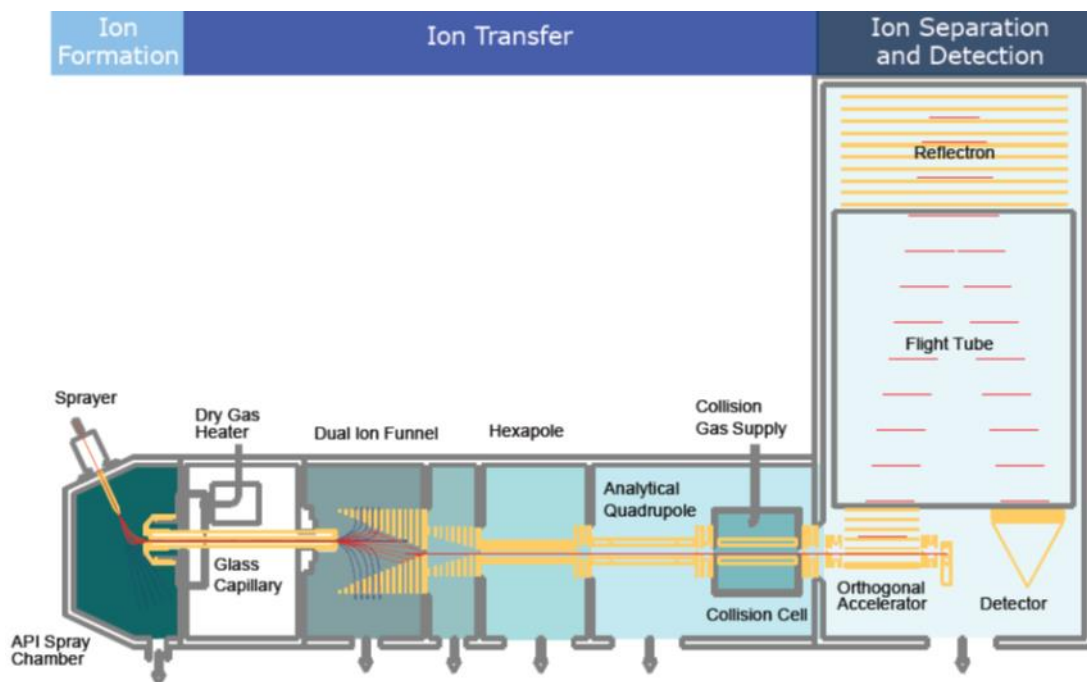
Το QTOF (quadrupole–time-of-flight) είναι ένα υβριδικό όργανο που χρησιμοποιείται για διαδοχική φασματομετρία μαζών και έχει εξαιρετικές δυνατότητες ανίχνευσης και ταυτοποίησης για ενώσεις μεγάλου εύρους μαζών σε διάφορες μήτρες, εξαιτίας της υψηλής διακριτικής ικανότητας στη μέτρηση της ακριβούς μάζας του πρόδρομου και των παραγόμενων ιόντων [60]. Το

QTOF αποτελείται από τρία τμήματα σε σειρά: ένα τετράπολο (quadrupole, Q), μία κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell) και έναν αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης (time of flight, TOF). Το τετράπολο είναι χαμηλής διακριτικής ικανότητας όργανο και χρησιμοποιείται σε ρουτίνα αναλύσεων. Στην κυψελίδα συγκρούσεων υπάρχει περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar, He, N<sub>2</sub>). Τα πρόδρομα ιόντα συγκρούονται με τα αέρια μόρια και παράγονται ιοντικά θραύσματα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται Collision Induced Dissociation (CID).

Μπορούμε να εφαρμόσουμε διάφορες λειτουργίες για τη λήψη φασμάτων MS και MS/MS. Μια από αυτές είναι η λειτουργία bbCID (broadband Collision Induced Dissociation). Στη λειτουργία αυτή το σύστημα του QTOF εφαρμόζει δύο διαφορετικές ενέργειες σύγκρουσης στην κυψελίδα συγκρούσεων και έτσι δημιουργούνται ταυτόχρονα τα δύο φάσματα μαζών. Για τη δημιουργία του φάσματος MS χρησιμοποιείται χαμηλή ενέργεια, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την επιτάχυνση των ιόντων, και έτσι δεν έχουμε ιδιαίτερη θραυσματοποίηση, αλλά πληροφορίες για τα πρόδρομα ιόντα, καθώς τα ιόντα διέρχονται από το τετράπολο και την κυψελίδα συγκρούσεων και διαχωρίζονται στο TOF. Η μικρή θραυσματοποίηση που ενδέχεται να βλέπουμε στο φάσμα MS προέρχεται από συγκρούσεις στην πηγή, διαδικασία που περιγράφεται ως in-source Collision Induced Dissociation (in-source CID). Για τη δημιουργία του φάσματος MS/MS εφαρμόζεται υψηλή ενέργεια στην κυψελίδα συγκρούσεων και έτσι έχουμε θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος. Όλα τα πρόδρομα ιόντα θραυσματοποιούνται ταυτόχρονα, χωρίς να έχει προηγηθεί απομόνωση, μέσω συγκρούσεων με τα ουδέτερα αέρια μόρια της κυψελίδας συγκρούσεων (N<sub>2</sub>) (Collision Induced Dissociation, CID) και τα παραγόμενα ιόντα 85 διαχωρίζονται στο TOF. Έτσι, με το φάσμα MS/MS μπορούμε να ταυτοποιήσουμε ενώσεις που δεν δίνουν θραύσματα ή δίνουν χαμηλής έντασης θραύσματα όταν γίνεται θραυσματοποίηση στην πηγή [58].

Πιο κάτω (Σχήμα 4) φαίνεται η πορεία ιόντων στο QTOF.





Σχήμα 4: Πορεία Ιόντων στα τμήματα του QTOF (maXis Impact, Bruker)

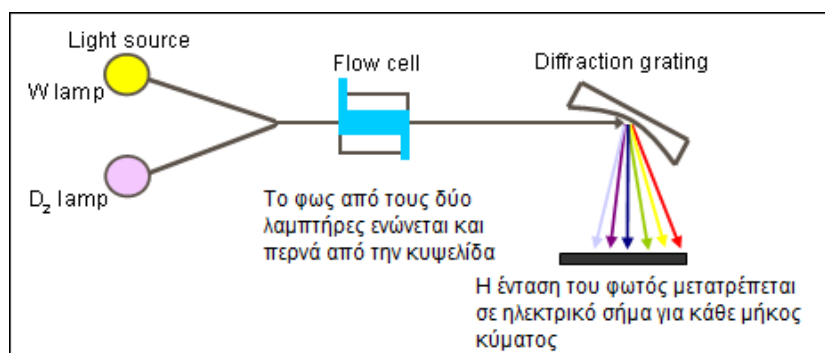
#### 4.4.2.5 Σύζευξη υγροχρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (HPLC-MS)

Συζευγμένη τεχνική ονομάζεται η τεχνική που προκύπτει όταν δύο ή περισσότερες τεχνικές ή όργανα διαχωρισμού συνδέονται για τη δημιουργία ενός νέου και αποτελεσματικότερου οργάνου [57]. Η σύζευξη υγροχρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών συνδυάζει την ικανότητα της υγροχρωματογραφίας να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος και της φασματομετρίας μαζών να τα ταυτοποιεί. Στην υγροχρωματογραφία γίνεται ταυτοποίηση των κορυφών ενός δείγματος συγκρίνοντας τους χρόνους ανάλυσης τους με αυτούς από ανάλυση προτύπων. Όμως, πολλές ουσίες έχουν παρόμοιους χρόνους ανάλυσης και δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν ή δε διαχωρίζονται πλήρως και έτσι δεν μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά. Με τη φασματομετρία μαζών ταυτοποιούνται ουσίες, καθώς διαθέτουν μοναδικά φάσματα μαζών. Όμως, αν οι ουσίες αυτές είναι συστατικά ενός μίγματος, τότε το φάσμα μαζών θα είναι πολύπλοκο, καθώς θα περιέχει ιόντα από όλα τα συστατικά και δε θα μπορεί να γίνει αξιόπιστη ταυτοποίηση, ιδιαίτερα αν η προσδιοριζόμενη ουσία βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση. Έτσι, με τη σύζευξη των δύο τεχνικών στο φασματόμετρο μαζών εισάγονται διαχωρισμένες ουσίες και η ταυτοποίηση είναι αξιόπιστη, ακόμα και αν ο

διαχωρισμός δεν είναι ικανοποιητικός, διότι ενώσεις με κοντινούς χρόνους ανάσχεσης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών [57].

#### 4.4.3 Υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων

Σε αυτή τη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων, κοινός γνωστό ως DAD ή PDA. Ο ανιχνευτής DAD χρησιμοποιεί μια σειρά φωτοδιόδων, και με αυτό τον τρόπο μπορεί να παρακολουθεί ταυτόχρονα μεγάλο εύρος των περιοχών υπεριώδους (UV) και ορατού. Το φως ανιχνεύεται και διασπείρεται από ένα σταθερό μονοχρωμάτορα σε όλα τα μήκη κύματος, παρέχοντας διαχωριστική ικανότητα περίπου 1 nm. Το σχεδιάγραμμα λειτουργίας του, παρουσιάζεται στο Σχήμα 5. Μέσω της HPLC, οι ενώσεις του δείγματος εκκλύονται ανάλογα με την πολικότητα τους σε συγκεκριμένο χρόνο ανάκτησης. Με τη βοήθεια του DAD, λαμβάνεται το φάσμα του δείγματος, και η ανίχνευση των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν γίνεται ευκολότερη. Παρέχεται πλήρες φάσμα για κάθε κορυφή του χρωματογραφήματος, για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιθυμητών ενώσεων [61].



Σχήμα 5: Τρόπος λειτουργίας ανιχνευτή DAD



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

#### 5.1 Δείγματα

Με αφορμή το πρόγραμμα Εξειδικευμένης έρευνας προώθησης ελαιολάδου και προϊόντων ελιάς Βορείου Αιγαίου μέσω ανάδειξης του βιοδραστικού περιεχομένου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας, μελετήθηκε η σταθερότητα ενός Εξαιρετικά παρθένου Ελαιολάδου, σε περίοδο 6 μηνών. Το δείγμα αυτό παράχθηκε τον Δεκέμβριο του 2018 και προέρχεται από τη Λέσβο. Σε αυτή τη μελέτη, λήφθηκαν δείγματα σε 2 διαφορετικές ποσότητες: α) στο ακατέργαστο διηθημένο (Control), και β) στο διηθημένο ελαιόλαδο βάση πατέντας ( Σταθερό Παραγόμενο Ελαιόλαδο, ΣΠΕ) [62]. Οι δυο διαφορετικές ποσότητες, μεταγγίστηκαν σε μπουκάλια και αποθηκεύτηκαν στους 4 °C και 25 °C αντίστοιχα, καταλήγοντας έτσι σε 4 συνολικά δείγματα:

1. ΣΠΕ 25 °C
2. ΣΠΕ 4 °C
3. CONTROL 25 °C
4. CONTROL 4 °C

Τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια των 500mL (Marasca Unag, PP 31.5) που προμηθεύτηκαν από το εμπόριο. Τα πώματα ήταν πλαστικά ελεγχόμενης ροής με ασφάλεια (Εικόνα 7). Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος, για την προφύλαξη τους από τον ήλιο.



Εικόνα 7: Σκουρόχρωμο γυάλινο μπουκάλι 500mL με πλαστικό πώμα ελεγχόμενης ροής

## 5.2 Χρονική Συχνότητα Αναλύσεων

Η μελέτη της σταθερότητας απαιτεί την παρακολούθηση των μεταβολών διάφορων χαρακτηριστικών του ελαιολάδου σε συχνά χρονικά διαστήματα. Παρακάτω, επισημαίνεται η συχνότητα των αναλύσεων στην διάρκεια των 6 μηνών. Σε κάθε χρονικό σημείο, όπως είναι προφανές, εκτελούνταν και οι οκτώ αναλύσεις.

T<sub>0</sub>: με την παραλαβή των δειγμάτων

T<sub>1</sub>: με το πέρας του πρώτου μήνα

T<sub>2</sub>: στον 3ο μήνα παραλαβής των δειγμάτων

T<sub>3</sub>: στον 6ο μήνα παραλαβής των δειγμάτων

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) παρουσιάζονται οι μήνες που διεξάχθηκαν οι χημικές αναλύσεις.

**Πίνακας 4: Χρονική Συχνότητα Αναλύσεων**

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΕΚ	ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙΟΣ	ΙΟΥ
ΣΠΕ 25 °C	✓	✓	-	✓	-	-	✓
ΣΠΕ 4 °C	✓	✓	-	✓	-	-	✓
CONTROL 25 °C	✓	✓	-	✓	-	-	✓
CONTROL 4 °C	✓	✓	-	✓	-	-	✓

## 5.3 Πειραματικές Μέθοδοι

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιούνται συνολικά οκτώ διαφορετικές μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό και την κατηγοριοποίηση του ελαιολάδου, αλλά και τη μελέτη των μεταβολών στις διαφορετικές θερμοκρασίες κατά την πάροδο του χρόνου. Οι επτά από τις οκτώ μεθόδους πραγματοποιήθηκαν στα Εργαστήρια Χημείας Τροφίμων και Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ στη Μυτιλήνη. Παρακάτω, ακολουθούν οι πειραματικές μέθοδοι και πορείες των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη.

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι αναλυτικής καθαρότητας ενώ το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο με σύστημα καθαρισμού νερού Direct-Q 3 UV (Millipore Direct-Q UV, Bedford, MA, USA).

## **5.4 Προσδιορισμός Ελεύθερων Λιπαρών Οξέων – Οξύτητα**

### **5.4.1 Αντιδραστήρια**

Αιθανόλη 99,8% από την Acros Organics, Διαιθυλαιθέρας ACS από Merck (Darmstadt, Germany), Υδροξείδιο του καλίου από Sigma-Aldrich, έτοιμο διάλυμα εργαστηρίου Φαινολοφθαλεΐνης.

### **5.4.2 Προετοιμασία Αντιδραστηρίων**

- Διάλυμα Διαιθυλαιθέρα-Αιθανόλης

Το διάλυμα παράγεται με την μίξη ίσων όγκων από το κάθε αντιδραστήριο (1:1 v/v) και χρησιμοποιείται ως ο διαλύτης της μεθόδου. Εξουδετερώνεται με την προσθήκη αιθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (KOH) 0,01 M, μετά την προσθήκη 0,3 mL διαλύματος φαινολοφθαλεΐνης/100 mL του μείγματος.

- Φαινολοφθαλεΐνη

Διάλυμα 10 g/L σε αιθανόλη 95% (v/v).

- Υδροξείδιο του Καλίου KOH 0,1 M

Φέρονται σε βρασμό 1 L αιθανόλης, με 8 g υδροξειδίου του καλίου και 0,5 g ρινισμάτων αργιλίου και συνεχίζεται επί μια ώρα ο βρασμός με κάθετο ψυκτήρα. Έπειτα το διάλυμα διηθείται και διαλύονται στο διάλυμα 7,0132 g KOH, για διάλυμα συγκέντρωσης 0,5 M. Έπειτα, λαμβάνονται 100 mL από το παραπάνω διάλυμα και αραιώνονται με αιθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL, για την παρασκευή διαλύματος 0,1 M.

### **5.4.3 Πειραματική Πορεία**

Ζυγίζονται 10 g δείγματος με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού ακρίβειας 4 δεκαδικών, σε κωνική φιάλη. Σε 2<sup>η</sup> κωνική φιάλη προστίθενται 50 mL διαλύματος Διαιθυλεθαίρα-Αιθανόλης, 3 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης, και σταγόνες του αιθανολικού διαλύματος KOH 0,1 M μέχρι το διάλυμα να

αποκτήσει ρόδινο χρώμα. Έτσι, προεξουδετερώνεται το διάλυμα. Στη συνέχεια προστίθεται το περιεχόμενο της 2<sup>η</sup> κωνικής φιάλης στην πρώτη, και ακολουθεί ανάδευση μέχρι η λιπαρή ύλη να διαλυθεί. Στη συνέχεια ακολουθεί ογκομέτρηση με το αιθανολικό διάλυμα ΚΟΗ 0,1 Μ με ταυτόχρονη ανάδευση, μέχρι το διάλυμα να αποκτήσει ρόδινη χροιά που να παραμένει. Για κάθε δείγμα γίνεται διπλή επανάληψη.

### **Τιτλοδότηση διαλύματος ΚΟΗ 0,1 Μ**

Ζυγίζονται 0,14 g όξινου φθαλικού καλίου (ΚΗΡ), διαλύεται με 50 mL υπερκάθαρο νερό και αφού προστεθούν 3 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης, ογκομετρείται με το διάλυμα ΚΟΗ, για να βρεθεί ο ακριβείς τίτλος του. Γίνεται τριπλή επανάληψη και λαμβάνεται ο μέσος όρος.

## **5.5 Προσδιορισμός Αριθμού Υπεροξειδίου**

### **5.5.1 Αντιδραστήρια**

Οξικό οξύ (99,8%) από Fluka (Buchs, Switzerland), χλωροφόρμιο (99,8%) από Macron (Pennsylvania, USA), Άμυλο για ιωδομετρία από Alfa Aesar, Ιωδιούχο Κάλιο (>99%) από Chembiotin, Θειοθειικό Νάτριο (>99,5%) από Carlo Erba, και έτοιμο διάλυμα εργαστηρίου Ιωδικού καλίου.

### **5.5.2 Προετοιμασία Αντιδραστηρίων**

- Διάλυμα Χλωροφόρμιο:Οξικό οξύ

Παρασκευάζεται διάλυμα Χλωροφορμίου με Παγόμορφο οξικό οξύ 40:60 v/v.

- Κορεσμένο Ιωδιούχο κάλιο

Ζυγίζονται 144 g ΚΙ σε 100 mL νερού σε θερμοκρασία δωματίου

- Θειοθειικό Νάτριο 0,01 Μ

Ζυγίζονται 1,5811 g Θειοθειικού Νατρίου  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  σε ογκομετρική 1000 mL και αραιώνονται με υπερκάθαρο νερό μέχρι τη χαραγή.

- Άμυλο

Ζυγίζονται 2 g άμυλο ( $C_6H_{10}O_5$ ) και σε αυτά προστίθενται 25 mL  $H_2O$ . Το διάλυμα αναδεύεται και στη συνέχεια σε αυτό προστίθενται 250 mL  $H_2O$  που έχει φτάσει σε σημείο βρασμού. Αφήνεται να βράσει για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτό 1 g βορικού οξέος. Σκεπάζεται με ύαλο, και αφήνεται να βράσει για 2 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, πωματίζεται και διατηρείται στο ψυγείο.

### 5.5.3 Πειραματική Πορεία

Ζυγίζονται 5 g δείγματος σε αναλυτικό ζυγό ακρίβειας 4 δεκαδικών, σε κωνική φιάλη 250 mL. Σε αυτό προστίθενται 25 mL διαλύματος Χλωροφόρμιου: Οξικού Οξέος 40:60 v/v και ακολουθεί έντονη ανακίνηση. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL κορεσμένου διαλύματος KI και αφού πωματιστεί η φιάλη αναδεύεται για 1 λεπτό. Το δείγμα αφήνεται στο σκοτάδι για 5 λεπτά πωματισμένο, και έπειτα προστίθεται σε αυτό 75 mL  $H_2O$  και 2 mL άμυλο. Ακολουθεί ογκομέτρηση με Θειοθειικό Νάτριο  $Na_2S_2O_3$  0,01 M, μέχρι ο δείκτης να αλλάξει χρώμα, και έτσι το διάλυμα να γίνει υπόλευκο. Για κάθε δείγμα γίνεται διπλή επανάληψη. Πραγματοποιείται τυφλό πείραμα.

### Τιτλοδότηση $Na_2S_2O_3$ 0,01 M

Η τιτλοδότηση γίνεται με 1 g KI, στο οποίο προστίθενται 50 mL  $H_2O$ , 500  $\mu$ L ιωδικό κάλιο  $KIO_3$ , 2 mL  $H_2SO_4$  και 2 mL άμυλο. Γίνεται τριπλή επανάληψη, και με το μέσο όρο υπολογίζεται ο ακριβής τίτλος του διαλύματος.

## 5.6 Φασματοφωτομετρική Εξέταση Υπεριώδους

### 5.6.1 Αντιδραστήρια

Ισοοκτάνιο (99%) από Fluka (Buchs, Switzerland).

### 5.6.2 Οργανολογία

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε Φασματοφωτόμετρο ορατού - υπεριώδους διπλής δέσμης UV-1800 της εταιρείας Shimadzu, το οποίο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εικόνα 8). Οι κυψελίδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χαλαζία με μήκος διαδρομής 10 mm. Για την εύρεση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται το λογισμικό UV-Probe.



**Πηγή ακτινοβολίας:** Λυχνία Δευτερίου D<sub>2</sub>



**Εικόνα 8: Φασματοφωτόμετρο UV-1800 Shimadzu**

### **5.6.3 Πειραματική πορεία**

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL ζυγίζονται 250 mg δείγματος και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με ισοοκτάνιο. Ταυτόχρονα ζυγίζονται 0,05 mg του ίδιου δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και αραιώνονται με τον ίδιο τρόπο. Το δείγμα ανακινείται. Στη συνέχεια, οι κυψελίδες χαλαζία εκπλένονται τρεις φορές με ισοοκτάνιο και ακολουθεί η εισαγωγή τους στο φασματοφωτόμετρο. Ελέγχεται η απορρόφηση η οποία πρέπει να είναι μικρότερη του 0,01, και μηδενίζεται. Έπειτα, τοποθετείται το δείγμα στην μπροστινή κυψελίδα και λαμβάνεται το φάσμα 200-300 nm. Τέλος, λαμβάνονται οι απορροφήσεις στα ακόλουθα μήκη κύματος: 232 nm, 268 nm, 272 nm και 264 nm. Η κυψελίδα εκπλένεται τρεις φορές με ισοοκτάνιο στο ενδιάμεσο των μετρήσεων για το κάθε δείγμα.

## **5.7 Προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των Λιπαρών Οξέων (FAMES) με Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή Ιονισμού φλόγας GC-FID**

### **5.7.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες**

Εξάνιο HPLC (99%) από Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA), η μεθανόλη HPLC (99.8%) από Merck (Darmstadt, Germany). Υδροξείδιο του καλίου (>85%) από Sigma-Aldrich, Θειικό Νάτριο (>99%) από Chem-Lab NV

(Belgium), το πρότυπο ήταν Supelco 74 Component FAME mix της Sigma – Aldrich.

### 5.7.2 Προετοιμασία Αντιδραστηρίων

- Μεθανολικό Διάλυμα KOH 2 M:

Ζυγίζονται 1,1221 g KOH και στη συνέχεια διαλύονται σε 10 mL Μεθανόλη GC.

### 5.7.3 Οργανολογία

Η ανάλυση έγινε με τη χρήση Αέριος Χρωματογραφίας ( GC 450, Varian, Agilent, California, USA) (Εικόνα 9), με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID). Αναλυτική στήλη υψηλής πολικότητας J&W DB-23 GC της Agilent (60 m, 0.25 mm, 0.15 μm). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι το Galaxie Workstation.



Εικόνα 9: GC-450 Varian, Agilent

### 5.7.3 Πειραματική Πορεία

Ζυγίζεται σε erpendorff 0,005 g δείγματος και προστίθεται 750 μL εξάνιο. Αφού γίνει ανάδευση με Vortex, προστίθενται 100 μL KOH/MeOH 2 M. Γίνεται ανάδευση σε vortex και προσθήκη 0,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, και επαναλαμβάνεται η ανάδευση με vortex. Το δείγμα καταψύχεται για 30min, και στη συνέχεια λαμβάνονται 100 μL υπερκείμενου σε φιαλίδιο, και αραιώνονται με 900 μL

εξάνιο. Το δείγμα αποθηκεύεται στο ψυγείο μέχρι να γίνει η ένεση 1  $\mu\text{L}$  στο όργανο.

**Συνθήκες Αέριας Χρωματογραφίας:** Χρησιμοποιείται στήλη υψηλής πολικότητας J&W DB-23 GC της Agilent (60 m, 0.25 mm). Η στατική φάση της στήλης είναι κυανοπροπυλοσιλικόνη πάχους 0.15  $\mu\text{m}$ . Το σύστημα έγχυσης είναι με διαμοιραστή ροής (split).

**Φέρον αέριο:** Ήλιο

**Αναλυτική Στήλη:** DB-23, (50%-κυανοπροπυλ)-μεθυλοπολυσιλοξάνιο.

**Βοηθητικά Αέρια:** - Υδρογόνο καθαρότητας > 99,9% απαλλαγμένο από οργανικές προσμείξεις.

- Συνθετικός αέρας απαλλαγμένος από οργανικές προσμείξεις.

- Άζωτο καθαρότητας > 99%.

Οι συνθήκες ανάλυσης παραδίδονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) :

**Πίνακας 5: Συνθήκες μεθόδου FAMES**

Θερμοκρασία Συστήματος Έγχυσης	250 °C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	280 °C
Θερμοκρασία κλίβανου	50 °C για 1 min, αύξηση θερμοκρασίας με ταχύτητα 25 °C/min μέχρι τους 175 °C, αύξηση θερμοκρασίας 4 °C/min μέχρι τους 230 °C, παραμονή για 10 min
Υδρογόνο	40 mL/min
Συνθετικός Αέρας	450 mL /min
Ήλιο	30 mL/min
Αναλογία διαμοιρασμού	1:50
Όγκος έγχυσης	1 $\mu\text{L}$

Το κάθε χρωματογράφημα διαρκεί 30 λεπτά και εκτελείται με σταθερή πίεση 33 PSI. Για την ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων χρησιμοποιείται πρότυπο στην αρχή κάθε ανάλυσης.

## **5.8 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων με χρήση RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS**

### **5.8.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες**

Μεθανόλη (LC-MS) και υδροξείδιο του νατρίου (>99%) αγοράστηκαν από τη Merck (Darmstadt, Germany). Οξικό αμμώνιο ( $\geq 99.0\%$ ) για HPLC και μυρμηκικό οξύ (LC-MS Ultra) αγοράστηκαν από τη Fluka (Buchs, Switzerland). Ισοπροπανόλη αγοράστηκε από τη Fisher Scientific (Geel, Belgium). Τα πρότυπα που αγοράστηκαν ήταν :συριγγικό οξύ 95% από Extrasynthèse (Genay, France), γαλλικό οξύ 98%, φερουλικό οξύ 98%, εριοδικτυόλη 98%, επικατεχίνη 97%, π-κουμαρικό 98%, ομοβανιλλικό οξύ 97%, κερκετίνη 98%, ελαιοευρωπαϊνή 98%, πινορεζινόλη 95% και συρινγγαλδεΐδη 98% από Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), υδροξυτυροσόλη 98% και λουτεολίνη 98% από Santa Cruz Biotechnologies, καφεϊκό οξύ 99%, ναριγενίνη 99%, βανιλλίνη 99%, αιθυλο-βανιλλίνη 98%, απιγενίνη 97% και τυροσόλη 98% από Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Οι άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή, άγλυκη λινγιστροσίδη, ολεοκορονάλη, ολεομισιονάλη, το ολεοκανθαλικό οξύ, ολεοκανθάλη και ολεασίνη, απομονώθηκαν από το ερευνητικό εργαστήριο του Καθ. Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών προϊόντων του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κυρίου Προκοπίου Μαγιάτη. Από τα πιο πάνω παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης 1000 ppm που φυλάσσονται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Από αυτά παρασκευάστηκαν διαλύματα διάφορων συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση μέσω καμπύλης αναφοράς.

### **5.8.2 Οργανολογία**

Η ανάλυση έγινε με σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC) (Dionex UltiMate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific, Germany)

συζευγμένο με φασματόμετρο μαζών QTOF (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany), που φαίνεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10: UHPLC - QTOF/MS, Maxis Impact, Bruker Daltonics

### 5.8.3 Πειραματική Πορεία

Σε erpendorff ζυγίζονται 0,5 g δείγματος. Στη συνέχεια προστίθεται 400  $\mu\text{L}$  διαλύτη Μεθανόλη:Νερό 80:20. Έπειτα προστίθενται 100  $\mu\text{L}$  εσωτερικού προτύπου συριγγαλδεΐδης, με τελική συγκέντρωση 2 ppm. Γίνεται ανάδευση με vortex για 1 λεπτό και το δείγμα αφήνεται να ηρεμήσει για να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Παραλαβή εκχυλίσματος και διήθηση από φίλτρο μεμβράνης αναγεννημένης κυτταρίνης 0,2  $\mu\text{m}$  CHROMAFIL RC σε φιαλίδιο. Ακολουθεί αποθήκευση στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι να γίνει ένεση στο όργανο 5  $\mu\text{L}$ .

**Συνθήκες Υγροχρωματογραφίας:** Χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Liquid Chromatography):

**Αναλυτική Στήλη:** Acclaim RSLC 120 C18 (2.2  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , 2.1  $\times$  100 mm), Dionex Bonded Silica Products, Thermo Scientific  $\pi$  Προσθήκη: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 $\mu\text{m}$ , VanGuard, Waters (Ireland), thermostated at 30  $^{\circ}\text{C}$ .

**Κινητή φάση:** A:90%  $\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 5 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  B:100%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 5 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

Πιο κάτω υπάρχει αναλυτικά σε πίνακα (Πίνακας 6) το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης της μεθόδου.

**Πίνακας 6: Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλουσης**

<b>Χρόνος έκλουσης (min)</b>	<b>Ροή (mL/min)</b>	<b>%B</b>
0.0	0.200	1.0
1.0	0.200	1.0
3.0	0.200	39.0
14.0	0.400	99.9
16.0	0.480	99.9
16.1	0.480	1.0
19.0	0.480	1.0
19.1	0.200	1.0
20.0	0.200	1.0

**Συνθήκες Φασματομετρίας Μαζών:** Στο φασματόμετρο μαζών QTOF, ο προσδιορισμός των ενώσεων έγινε σε αρνητικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (negative ESI) σύμφωνα με τις παρακάτω παραμέτρους:

Δυναμικό στην άκρη του τριχοειδούς: 500 V

Δυναμικό στο τριχοειδές: 3500 V

Αέριο εκνέφωσης (N<sub>2</sub>): 2,0 bar

Αέριο ξήρανσης (N<sub>2</sub>): 8,0 L/min

Θερμοκρασία ξήρανσης: 200 °C

Το φασματόμετρο ρυθμίστηκε σε λειτουργία bbCID (broad-band Collision Induced Dissociation). Με τη χαμηλή ενέργεια σύγκρουσης (4 eV) παρέχει ένα πλήρες φάσμα σάρωσης (MS), ενώ η υψηλή ενέργεια σύγκρουσης (25 eV) παρέχει φάσμα στο οποίο όλα τα ιόντα ήταν θραυσματοποιημένα (bbCID

MS/Ms). Με αυτό τον τρόπο η ανάλυση δίνει τόσο το φάσμα του MS, αλλά και το φάσμα MS/MS, χρησιμοποιώντας δύο ενέργειες σύγκρουσης με καταγραφή φάσματος με εύρος μαζών 50-1000 m/z και ρυθμό σάρωσης 2,00 Hz. Η βαθμονόμηση του φασματομέτρου μαζών QTOF έγινε με διάλυμα βαθμονόμησης (calibrant) φορμικού νατρίου, το οποίο αποτελείται από συμπλέγματα φορμικού νατρίου συγκέντρωσης 10mM σε μίγμα νερού:ισοπροπανόλης (1:1).

#### **Βαθμονόμηση σε δύο επίπεδα:**

- Εξωτερική βαθμονόμηση (external calibration) που πραγματοποιείται πριν από κάθε ανάλυση.
- Εσωτερική βαθμονόμηση (internal calibration) που γίνεται στην αρχή κάθε χρωματογραφήματος.

#### **5.8.4 Έλεγχος ποιότητας**

Παρασκευάστηκαν λευκά δείγματα (blanks) και εγχύθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα για την ανίχνευση πιθανής μόλυνσης. Επίσης, παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QC). Παρασκευάστηκε ένα QC δείγμα με τους αναλύτες στοχευμένης σάρωσης, σε τελική συγκέντρωση 2 mg/L. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων παρεμβαλλόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (κάθε 5 δείγματα) η ανάλυση ενός δείγματος QC ώστε να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μέσω σύγκρισης του εμβαδού των κορυφών συγκεκριμένων ενώσεων (π.χ. ελαιοευρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη) στα δείγματα QC. Αν υπήρχε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των τιμών, αυτό θα σήμαινε ότι συνέβη κάποιο λάθος κατά την ανάλυση και πρέπει να επαναληφθεί.

#### **5.8.5 Τεχνικές Σάρωσης**

Στη μέθοδο για τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο ακολουθήθηκαν δύο τεχνικές σάρωσης:

- Σάρωση Στοχευμένων ενώσεων (Target Screening)

Δημιουργήθηκε μια λίστα στοχευμένων ενώσεων (target list) η οποία αποτελείται από 28 φαινολικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί στο ελαιόλαδο ή/και σε άλλα τμήματα του δέντρου αλλά συγκεντρώνουν πιθανότητες να βρίσκονται και στο ελαιόλαδο. Η λίστα (Πίνακας 7) περιλάμβανε φαινολικές ενώσεις και από τις πέντε βασικές κατηγορίες για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα πρότυπα. Αρχικά, για την εύρεση του θεωρητικού  $m/z$  της κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Isotope Pattern. Έπειτα, αφού έγινε ανάλυση των δειγμάτων, βρέθηκε ο χρόνος ανάσχεσης της κάθε ένωσης με τη βοήθεια των λογισμικών Target Analysis 1.3 (Bruker Daltonik GmbH) και Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH) και συγκρίθηκε με εκείνο των αντίστοιχων προτύπων. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε το εμβαδόν των κορυφών που αντιστοιχεί σε κάθε ένωση. Τέλος, τα φάσματα MS/MS των δειγμάτων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα MS/MS φάσματα των προτύπων ουσιών (Πίνακας 7) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των MS/MS θραυσμάτων που βρέθηκαν με θραύσματα που αναφέρονται σε προηγούμενες εργασίες [37].



Πίνακας 7: Λίστα στοχευμένων ενώσεων (Target List)

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	[M-H]-	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα	Μοριακός Τύπος Θραυσμάτων
Απιγενίνη	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	269,0455	8,24	149,0248 151,0037	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Καφεϊκό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	179,0350	1,9	135,045 134,036	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O
Κατεχίνη	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	289,0718	3,87	203,071 123,045	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
Χλωρογενικό οξύ	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,0878	2,7	191,056	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>
Κινναμικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	147,0451	4,5	147,045	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
Εριοδουκτιόλη	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	287,0561	6,4	151,004 135,045	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
Φερουλικό οξύ	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	193,0506	1,39	134,0370 178,0271	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Γαλλικό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169,0142	1,25	125,0246	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	[M-H]-	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα	Μοριακός Τύπος Θραυσμάτων
Ομοβανιλλικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	181,0506	2,4	59,0134 122,0369 137,0610 154,0266	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Υδροξυτυροσόλη	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	153,0557	3,53	123,0446	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>
Καμπφερόλη	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285,0404	8,0	229,051 185,061 133,030	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
Ολεοκορονάλη	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	361,1293	8,3	259,098 291,087	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>
Λουτεολίνη	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	285,0404	7,55	133,0295 151,0036	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Ναριγενίνη	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271,0612	7,2	119,050 151,004 177,019	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	[M-H]-	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα	Μοριακός Τύπος Θραυσμάτων
Ολεασίνη	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	319,1188	5,8	69,0342 95,0502 123,0451 139,0608 165,0556 183,0660	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>
Ολεοκανθάλη	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	303,1238	6,6	124,0531 137,0608 147,0453 165,0556 183,0662	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>
Ολεοκανθαλικό οξύ	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	319,1187	5,2	199,061 111,09	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
Ολεομισιονάλη	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	377,1242	6	111,0087 149,0241 263,0926 275,0923	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub>

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	[M-H]-	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα	Μοριακός Τύπος Θραυσμάτων
Ελαιοευρωπαϊνή	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>	539,1770	5,96	59,0138 89,0244 101,0242 111,0083 121,0295 307,0823 377,1242	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub>
Άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	377,1242	7,29	111,0088 149,0244 195,0644 275,0919 307,0823	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>
Άγλυκη λιγκοστροσίδη	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	361,1291	8,30	259,0975 291,0875	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>
p-κουμαρικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	163,0401	2,6	119,0506 93,0349	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O
Πινορεζινόλη	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	357,1344	6,49	151,0399	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>

ΕΝΩΣΗ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	[M-H]-	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα	Μοριακός Τύπος Θραυσμάτων
Κερκετίνη	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	301,0354	7,2	121,0294 151,0024	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Συρινγικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197,0455	2	182,0218	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
Τυροσώλη	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	137,0608	4,07	81,0262 93,0345 112,0530	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Βανιλλικό οξύ	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	167,0349	1,6	152,010 125,024	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
Βανιλίνη	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	151,0401	4,73	71,0140 95,0140 108,0217 136,0162	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>

- Σάρωση «ύποπτων» ενώσεων (Suspect Screening)

Η σάρωση «ύποπτων» ενώσεων (Πίνακας 8), γίνεται για ενώσεις οι οποίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία αλλά δεν υπάρχουν πρότυπα για αυτές. Στην περίπτωση της παρούσας εργασίας δεν πραγματοποιήθηκε ύποπτη σάρωση. Συλλέκτηκαν πληροφορίες από προηγούμενες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν με την ίδια μέθοδο στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, και στη συνέχεια αναζητήθηκαν οι «ύποπτες ενώσεις» που είχαν προηγουμένως ταυτοποιηθεί και ημιποσοτικοποιηθεί [37].

Πίνακας 8: Λίστα ύποπτων ενώσεων που έχουν ανιχνευθεί από προηγούμενες εργασίες

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] <sup>-</sup> m/z θεωρητικό	[M-H] <sup>-</sup> m/z πειραματικό	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα m/z	Μοριακός Τύπος θραυσμάτων
Ελενολικό Οξύ	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	241,0714	241,0714	4,51	59,0137 95,0496 127,0400 151,0402 171,0300	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub>
Ισομερές I Ελενολικού οξέος	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	241,0722	241,0714	3,92	95,0494	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O
Ισομερές II Ελενολικού οξέος	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	241,0722	241,0714	1,31	95,0494	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] <sup>-</sup> m/z θεωρητικό	[M-H] <sup>-</sup> m/z πειραματικό	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα m/z	Μοριακός Τύπος θραυσμάτων
Μεθυλεστέρας Ελενολικού οξέος	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	255,0874	255,0874	4,58	67,0189 69,0346 185,0455	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>
Υδροξυλιωμένη μορφή ελενολικού οξέος	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	257,0667	257,0667	1,36	59,0104 137,0603 181,0535	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>
Υδροξυλιωμένη μορφή ισομερούς ελενολικού οξέος	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	257,0667	257,0665	1,41	-	-
Αιθυλεστέρας Υδροξυτυροσόλης	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	195,0660	195,0662	6,71	134,0373 149,0608 161,0246	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>
Ισομερές αιθυλεστέρα υδροξυτυροσόλης	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	195,0660	195,0662	5,74	59,0136 134,0373 161,0246	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>



Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] <sup>-</sup> m/z θεωρητικό	[M-H] <sup>-</sup> m/z πειραματικό	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα m/z	Μοριακός Τύπος θραυσμάτων
Άγλυκη 10-υδροξυ-ελαιουρωπαΐνη	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	393,1193	393,1191	4,82	137,0244 181,0502	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>
Συρινγκαρεζινόλη	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	417,1554	417,1556	6,18	127,0408 181,0503	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>
Oleoside	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	389,1089	389,1087	7,91	113,0244 139,0032 149,0240 165,0552 183,0666	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>
Oleoside Ισομερές	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	389,1089	389,1087	5,7	165,0552	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>
1-υδροξυπινορεζινόλη	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	373,1292	373,1292	6,39	121,0294 151,0401 163,0402	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] <sup>-</sup> m/z θεωρητικό	[M-H] <sup>-</sup> m/z πειραματικό	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα m/z	Μοριακός Τύπος θραυσμάτων
Ισομερές 1-υδρόξυπινореζινόλης	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	373,1292	373,1294	6,42	-	-
Ολεανολικό οξύ	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	455,3535	455,3540	13,94	44,9980 120,0940 152,1202 407,3316	CHO <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O C <sub>29</sub> H <sub>43</sub> O
Μασλινικό οξύ	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	471,3484	471,3485	12,82	44,9982 405,3156 423,3423	CHO <sub>2</sub> C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> O C <sub>29</sub> H <sub>43</sub> O <sub>2</sub>
1-ακετόξυπινореζινόλη	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	415,1398	415,1399	6,42	151,0402 280,0951 343,1188	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] <sup>-</sup> m/z θεωρητικό	[M-H] <sup>-</sup> m/z πειραματικό	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα m/z	Μοριακός Τύπος θραυσμάτων
Άγλυκη μεθυλ-ελαιουρωπαΐνη	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	391,1412	391,1418	7,51	59,0140 67,0192 99,0456 111,0087 137,0608 291,0875	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub>
Άγλυκη 10-υδροξυ-10-μεθυλ-ελαιουρωπαΐνη	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	407,1347	407,1347	6,71	99,0453 111,0087 121,0295 135,0453 137,0243 149,0245 163,0402 179,0351 195,0665 241,0871	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] <sup>-</sup> m/z θεωρητικό	[M-H] <sup>-</sup> m/z πειραματικό	t <sub>R</sub> (min)	Θραύσματα m/z	Μοριακός Τύπος θραυσμάτων
10-υδροξυ-δεκαρβοξυμέθυλ-ελαιοευρωπαϊνή άγλυκη	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	335,1150	335,1151	4,28	59,0139 85,0296 121,0292 151,0401 153,0557 155,0716 199,0613	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>

## 5.9 Προσδιορισμός χρωστικών και τοκοφερολών με χρήση RP-HPLC-DAD

### 5.9.1 Αντιδραστήρια και πρότυπα

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα Χλωροφύλλη-α (απομόνωση από σπανάκι), λουτεΐνη  $\geq 99\%$ , σκουαλένιο  $\geq 98\%$ , β-καροτένιο (συνθετικό)  $\geq 97\%$ , τοκοφερόλη α (συνθετική)  $\geq 96\%$ , τοκοφερόλη γ (συνθετική)  $\geq 96\%$ , τοκοφερόλη δ (συνθετική)  $\geq 96\%$ . Όλες οι πρότυπες ουσίες αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich. 2-προπανόλη 99.5% HPLC, μεθανόλη 99% και ακετονιτρίλιο 99% HPLC από Merck (Darmstadt, Germany). Για κάθε αναλύτη παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1000 ppm (mg/L) και τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Από αυτά, παρασκευάστηκαν χαμηλότερης συγκέντρωσης πρότυπα από τα οποία σχεδιάστηκε καμπύλη αναφοράς που βοήθησε στην ποσοτικοποίηση.

### 5.9.2 Οργανολογία

Η ανάλυση γίνεται με χρήση υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης HPLC (Agilent 1200 Series HPLC System) (Εικόνα 11), με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι το LC Chemstation.



Εικόνα 11: Agilent 1200 Series HPLC System

### 5.9.3 Πειραματική Πορεία

Λαμβάνονται 100 µL δείγματος σε vial και ζυγίζεται το βάρος τους σε αναλυτικό ζυγό τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 mL 2-προπανόλης και αναδεύεται για 1 λεπτό με την βοήθεια vortex. Στην συνέχεια γίνεται ένεση στο όργανο 20 µL.

**Συνθήκες Υγροχρωματογραφίας:** Χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed Phase Liquid Chromatography):

**Αναλυτική Στήλη:** Waters Spherisorb ODS2 C18 (80Å, 5 µm, 4.6 mm X 250 mm)

**Κινητή φάση:** Βαθμιδωτή έκλυση όπου A: Μεθανόλη B: Ακετονιτρίλιο

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) φαίνεται αναλυτικά το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης της μεθόδου.

Πίνακας 9: Πρόγραμμα Βαθμιδωτής Έκλυσης

ΧΡΟΝΟΣ (min)	A%	B%
0	50%	50%
7	50%	50%
12	100%	0%
15	100%	0%
15.1	50%	50%
30	50%	50%

Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι περιοχές που απορροφά η κάθε ένωση:

**Πίνακας 10: Περιοχές που απορροφούν οι χρωστικές και οι τοκοφερόλες σε nm**

Ένωση	Περιοχή απορρόφησης σε nm
Χλωροφύλλη	410 nm και 660 nm
Καροτενοειδή	450 nm και 430 nm
Τοκοφερόλες	295 nm
Σκουαλένιο	210 nm

## **5.10 Προσδιορισμός 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας GC-FID**

### **5.10.1 Αντιδραστήρια και πρότυπα**

Εξάνιο HPLC (99%) από Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA), η μεθανόλη HPLC-MS και ακετονιτρίλιο HPLC-MS από LiChrosolv. Διαιθυλαιθέρας ACS από Merck (Darmstadt, Germany), πετρελαϊκός αιθέρας αναλυτικής καθαρότητας από Carlo Erba, N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide με trimethylchlorosilane 99% από Sigma-Aldrich, SI-1 στήλες πυριτικής φάσης 6 mL/1000 mg από Phenomenex. Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε πρότυπο αναφοράς από τον COI.

### **5.10.2 Οργανολογία**

Η ανάλυση έγινε με τη χρήση Αεριοχρωματογραφίας ( GC 450, Varian, Agilent, California, USA) με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (FID). Αναλυτική στήλη χρησιμοποιήθηκε στήλη J&W BR-5 GC μη πολική της Agilent (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι το Galaxie Workstation.

### 5.10.3 Πειραματική Πορεία

Σε erpendrorff ζυγίζεται 1 g δείγματος και σε αυτό προστίθεται 1 mL εξανίου. Ακολουθεί ανακίνηση σε vortex για 1 λεπτό, και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για να ομογενοποιηθεί. Ακολουθεί εκχύλιση στερεής φάσης – υγρού (SPE).

SPE: Ενεργοποιούνται οι στήλες πυριτίας 6 mL/1000 mg προσθέτοντας 5 mL μεθανόλης και αφήνονται να ισορροπήσουν για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται με ροή 1 σταγόνα / 2 δευτερόλεπτα και η ίδια πορεία ακολουθείται με 5 mL εξανίου. Έπειτα εκλούεται το δείγμα και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με εξάνιο. Με τη βοήθεια κενού, απομακρύνεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού. Ακολουθεί προσθήκη 10 mL διαλύματος Πετρελαϊκού : Διαθυλαιθέρα 9:1 για την έκλουση των αναλυτών. Το πιο πάνω κλάσμα συλλέγεται και αποθηκεύεται στους -80 °C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας.

Λαμβάνονται 300 µL του πιο πάνω αναλύτη σε φιαλίδιο και εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Σε αυτό προστίθενται 100 µL BSTFA ως αντιδραστήριο συλانوποίησης και 100 µL ακετονιτρίλιο. Αφού θερμανθεί στους 60 °C για 20 λεπτά, το δείγμα αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Τέλος, ακολουθεί ανασύσταση με 650 µL ακετονιτρίλιο.

**Συνθήκες Αέριας Χρωματογραφίας:** Χρησιμοποιείται στήλη J&W BR-5 GC μη πολική της Agilent (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm).

**Φέρον αέριο:** Ήλιο

**Αναλυτική Στήλη:** BR-5, (5% φαινυλο)-μεθυλοπολυσιλοξάνιο

**Βοηθητικά Αέρια:** - Υδρογόνο καθαρότητας > 99,9% απαλλαγμένο από οργανικές προσμείξεις.

- Συνθετικός αέρας απαλλαγμένος από οργανικές προσμείξεις.

- Άζωτο καθαρότητας > 99%.

Η ανάλυση πραγματοποιείται με σταθερή ροή 1,0 mL/min με σύστημα βαθμιδωτής θερμοκρασίας.



Οι συνθήκες αναλύσεις παραδίδονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 11: Συνθήκες Μεθόδου Ταυτοποίησης 1,2- και 1,3-διγλυκεριδίων**

Θερμοκρασία εισαγωγή	340 °C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	340 °C
Υδρογόνο	30 mL/min
Συνθετικός Αέρας	300 mL/min
Carrier gas	Ήλιο 1 mL/min (σταθερή ροή)
Θερμοκρασία φούρνου	200 °C που παραμένουν για 2 λεπτά, αύξηση θερμοκρασίας με ταχύτητα 15 °C/λεπτό μέχρι τους 325 °C. Σταθερή θερμοκρασία στους 325°C για 10 λεπτά.
Αναλογία διαμοιρασμού	1:50
Όγκος έγχυσης	1 µL



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΟ 6 ΜΗΝΩΝ

Οι αναλύσεις που διεξάχθηκαν σε αυτή την μεταπτυχιακή εργασία, περιλάμβαναν τον προσδιορισμό λιπαρών οξέων, τον αριθμό υπεροξειδίων, φασματοφωτομετρική εξέταση απορρόφησης στο υπεριώδες, προσδιορισμό των FAMES, προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, προσδιορισμό χρωστικών και τοκοφερόλης, και τέλος προσδιορισμό 1,2- και 1,3-διγλυκεριδίων. Τέλος, έγινε και οργανοληπτικός έλεγχος από το εξωτερικό εργαστήριο ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ. Με τα παραπάνω δεδομένα, είμαστε σε θέση τόσο να παρατηρήσουμε τις μεταβολές που συμβαίνουν στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, αλλά και να κατηγοριοποιήσουμε τα δείγματα ελαιολάδου βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91 [6].

#### 6.1 Αποτελέσματα Οξύτητας

Τα αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων υπολογίστηκαν βάσει του κανονισμού 2568/91 [6]. Όπως φαίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\frac{V \times c \times M}{10 \times m} = \% \text{ ελαϊκό οξύ (2)}$$

V = όγκος σε mL του τιτλοδοτημένου διαλύματος ΚΟΗ

c = συγκέντρωση σε mol/L του τιτλοδοτημένου διαλύματος ΚΟΗ

M = 282 g/mol που είναι το γραμμομοριακό βάρος του ελαϊκού οξέος

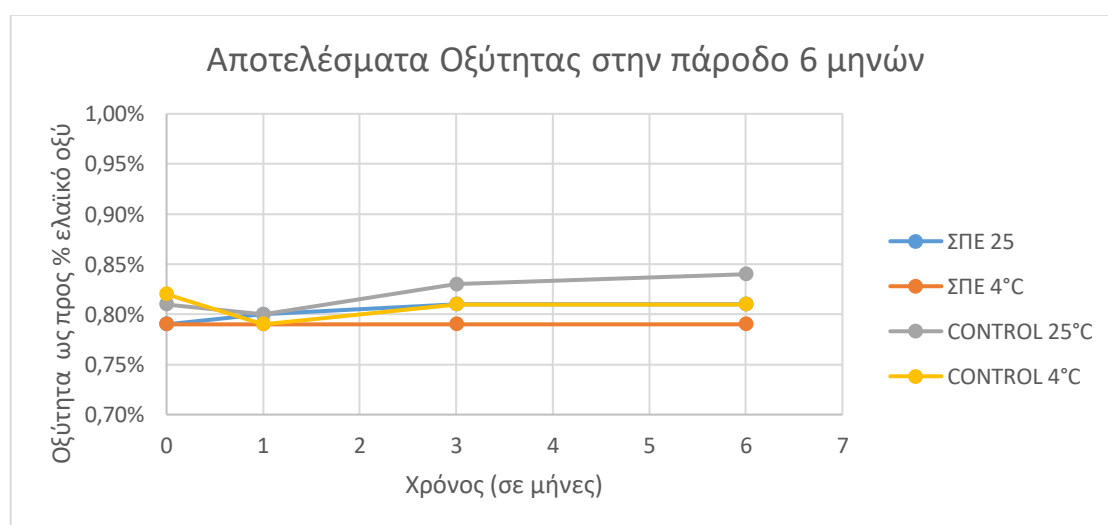
m = μάζα του δείγματος σε γραμμάρια

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) αναγράφονται τα αποτελέσματα για την κάθε χρονική στιγμή στην πάροδο των έξι μηνών που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς % ελαϊκού οξέος.

**Πίνακας 12: Αποτελέσματα Οξύτητας ως προς % ελαιικό οξύ**

T <sub>0</sub>	ΣΠΕ 25 °C	0,79%
	ΣΠΕ 4 °C	0,79%
	CONTROL 25 °C	0,81%
	CONTROL 4 °C	0,82%
T <sub>1</sub>	ΣΠΕ 25 °C	0,80%
	ΣΠΕ 4 °C	0,79%
	CONTROL 25 °C	0,80%
	CONTROL 4 °C	0,79%
T <sub>2</sub>	ΣΠΕ 25 °C	0,81%
	ΣΠΕ 4 °C	0,79%
	CONTROL 25 °C	0,83%
	CONTROL 4 °C	0,81%
T <sub>3</sub>	ΣΠΕ 25 °C	0,81%
	ΣΠΕ 4 °C	0,79%
	CONTROL 25 °C	0,84%
	CONTROL 4 °C	0,81%

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 6) φαίνεται η οξύτητα του κάθε δείγματος σε όλα τα χρονικά σημεία που εξεταστικέ, στην πάροδο 6 μηνών. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων σε γραφική παράσταση, θα κάνει πιο εύκολη την ανάλυση τους.



**Σχήμα 6: Μεταβολή της οξύτητας στα 4 χρονικά σημεία**

Η οξύτητα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κατηγοριοποίησης του ελαιολάδου. Οξύτητες μεγαλύτερες του 0,8% ως προς ελαϊκό οξύ, κατατάσσουν τα αντίστοιχα δείγματα στην κατηγορία του παρθένου ελαιολάδου. Είναι γνωστό πως η οξύτητα είναι μια πρακτικά σταθερή ιδιότητα του ελαιολάδου, που δεν μεταβάλλεται σε μικρά χρονικά διαστήματα, όπως προβάλλεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι τιμές των δειγμάτων, κυμαίνονται από το 0,79% μέχρι και το 0,84%. Θεωρητικά τα δείγματα κατατάσσονται στην κατηγορία «Εξαιρετικά Παρθένο Ελαιόλαδο», εφόσον και τα 4 δείγματα μετά τον 6 μήνα ( $T_3$ ) δεν έχουν ξεπεράσει τα νομοθετικά όρια [5], [6]. Οι διαφορές στις τιμές που παρατηρήθηκαν έχουν τυπικό σφάλμα μικρότερο του 2%, ένα ποσοστό που εντάσσεται στα τυχαία σφάλματα αυτής της ογκομετρικής μεθόδου. Άρα ουσιαστικά, τα δείγματα δεν παρουσίασαν καμιά σημαντική μεταβολή στην οξύτητα τους.

Στην περίπτωση της οξύτητας, πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) για στάθμη εμπιστοσύνης (confidence level) 95 %. Έγινε χρήση των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν κατά τη διπλή επανάληψη ογκομέτρησης σε όλα τα δείγματα. Κατά τον στατιστικό αυτό έλεγχο, ελέγχεται αν η διακύμανση έχει στατιστικά σημαντική διαφορά βάσει του p-value. Όταν η παράμετρος αυτή είναι μεγαλύτερη του 0,05, τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 13) με τις τιμές οξύτητας του κάθε δείγματος και το αντίστοιχο p-value.

**Πίνακας 13: Στατιστική μελέτη με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για την οξύτητα**

Δείγμα/Χρονικό σημείο	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	p-value
ΣΠΕ 25 °C	0,78%	0,80%	0,81%	0,82%	0,53
	0,80%	0,81%	0,81%	0,79%	
ΣΠΕ 4 °C	0,80%	0,80%	0,79%	0,79%	0,89
	0,78%	0,79%	0,79%	0,79%	
CONTROL 25 °C	0,81%	0,79%	0,83%	0,84%	0,009
	0,82%	0,80%	0,83%	0,84%	
CONTROL 4 °C	0,82%	0,80%	0,81%	0,80%	0,30
	0,82%	0,79%	0,80%	0,83%	

Με βάση τα πιο πάνω δεδομένα, καταλήγουμε στο ότι το μοναδικό δείγμα που εμφανίζει στατιστικά σημαντική μεταβολή είναι το δείγμα Control 25 °C. Ενώ τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν p-value μεγαλύτερη του 0,05, άρα δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.

Παρόλα αυτά, είναι γνωστό πως το νομοθετικό όριο δίνεται με ένα δεκαδικό ψηφίο (0,8%). Με βάση αυτό, μετατρέποντας τα πιο πάνω αποτελέσματα με ένα δεκαδικό ψηφίο καταλήγουμε σε μια τιμή, η οποία είναι 0,8%. Οπότε, τα δείγματα έχουν παραμείνει εξαιρετικά παρθένα.

## 6.2 Αποτελέσματα Αριθμού Υπεροξειδίων

Τα αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων υπολογίστηκαν βάσει του κανονισμού 2568/91 [6]. Παρακάτω, φανερώνεται ο τύπος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m} \text{ meq } O_2/kg \text{ (3)}$$

V = όγκος του θειοθειικού νατρίου διορθωμένος με την τυφλή δοκιμή σε mL

T = η ακριβής μοριακότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου σε mol/L

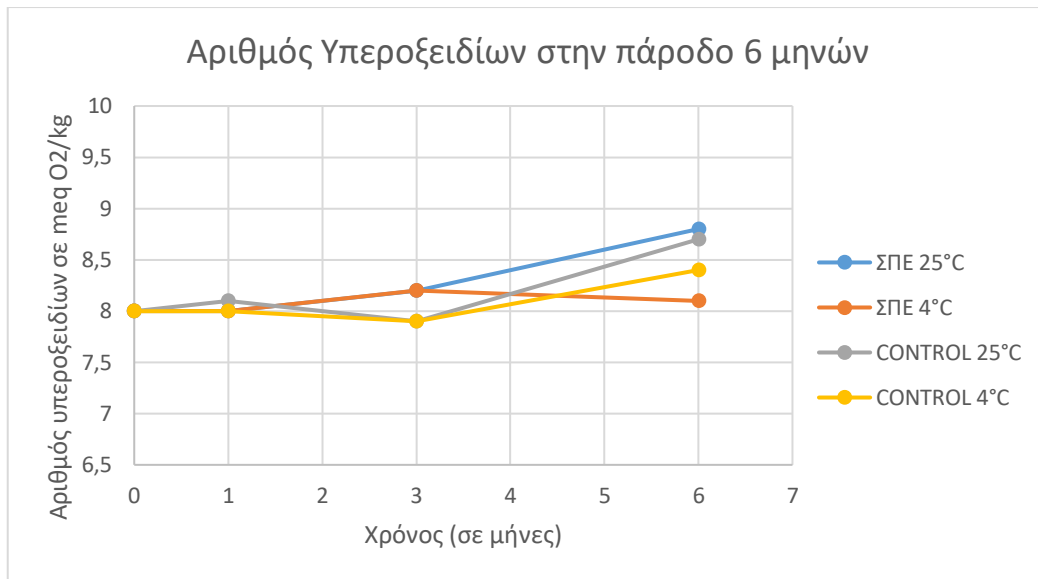
m = το βάρος του δείγματος σε g

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14) αναγράφονται τα αποτελέσματα για την κάθε χρονική στιγμή στην πάροδο των έξι μηνών που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση. Τα αποτελέσματα εκφράζονται χρησιμοποιώντας για μονάδα μέτρησης τα χιλιοστοισοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά κιλό δείγματος (meq O<sub>2</sub>/kg).

**Πίνακας 14: Αποτελέσματα Αριθμού Υπεροξειδίων εκφραζόμενα σε meq O<sub>2</sub>/kg**

T <sub>0</sub>	ΣΠΕ 25 °C	8,0
	ΣΠΕ 4 °C	8,0
	CONTROL 25 °C	8,0
	CONTROL 4 °C	8,0
T <sub>1</sub>	ΣΠΕ 25 °C	8,0
	ΣΠΕ 4 °C	8,0
	CONTROL 25 °C	8,1
	CONTROL 4 °C	8,0
T <sub>2</sub>	ΣΠΕ 25 °C	8,2
	ΣΠΕ 4 °C	8,2
	CONTROL 25 °C	7,9
	CONTROL 4 °C	7,9
T <sub>3</sub>	ΣΠΕ 25 °C	8,8
	ΣΠΕ 4 °C	8,1
	CONTROL 25 °C	8,7
	CONTROL 4 °C	8,4

Στο παρακάτω γράφημα (Σχήμα 7) παρουσιάζεται η μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων για το κάθε δείγμα, στα 4 χρονικά σημεία (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, και T<sub>3</sub>).



**Σχήμα 7: Αποτελέσματα προσδιορισμού αριθμού υπεροξειδίων στα 4 χρονικά σημεία**

Ο αριθμός υπεροξειδίων είναι ένας ευαίσθητος παράγοντας ποιότητας του ελαιολάδου, που επηρεάζεται ιδιαίτερα παρουσία οξυγόνου, οπότε απότομη αύξηση τους θα υπεδείκνυε κακές συνθήκες αποθήκευσης. Στα πιο πάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι ο αριθμός υπεροξειδίων παρουσιάζει μικρή άνοδο στο πέρασμα των 6 μηνών και στα 4 δείγματα. Παρατηρείται ότι στους 25 °C τα δείγματα παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές από ότι στους 4 °C. Ταυτόχρονα, η διαφοράς μεταξύ του Control και του ΣΠΕ είναι μικρές, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μια καθαρή εικόνα για τη μεταβολή τους στο χρόνο. Γενικά όμως, φανερώνεται πως στη θερμοκρασία των 4 °C, ο αριθμός υπεροξειδίων αυξάνεται με πιο αργό ρυθμό.

Παρόλα αυτά, λόγω του ότι η μέθοδος είναι ογκομετρική, και σε αυτή την παράμετρο πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) για στάθμη εμπιστοσύνης (confidence level) 95 %. Έγινε χρήση των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν κατά τη διπλή επανάληψη ογκομέτρησης σε όλα τα δείγματα. Κατά τον στατιστικό αυτό έλεγχο, ελέγχεται αν η διακύμανση έχει στατιστικά σημαντική διαφορά βάσει του p-value. Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 15) με τις τιμές οξύτητας του κάθε δείγματος και το αντίστοιχο p-value.



**Πίνακας 15: Στατιστική μελέτη με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα για τον αριθμό υπεροξειδίων**

Δείγμα/ Χρονικό σημείο	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	p-value
ΣΠΕ 25 °C	7,88	7,92	8,33	8,63	0,032
	8,12	8,11	8,10	8,97	
ΣΠΕ 4 °C	8,02	8,02	8,23	7,87	0,54
	8,00	8,00	8,19	8,28	
CONTROL 25 °C	7,95	8,10	7,94	8,95	0,067
	8,13	8,12	7,89	8,41	
CONTROL 4 °C	7,85	7,87	7,93	8,41	0,061
	8,12	8,13	7,91	8,43	

Με βάση τον στατιστικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε, καταλήγουμε στο ότι το μοναδικό δείγμα που εμφανίζει στατιστικά σημαντική μεταβολή είναι το δείγμα ΣΠΕ 25 °C. Ενώ τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν p-value μεγαλύτερη του 0,05, άρα δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Μάλιστα, το δείγμα ΣΠΕ 25 °C παρουσιάζει στατιστική διαφορά μετά τον έκτο μήνα, δηλαδή στην μέτρηση T<sub>3</sub>. Όπως όμως είναι φανερό, κανένα από τα δείγματα δεν ξεπερνά τα νομοθετικά όρια ( $\geq 20$  mg O<sub>2</sub>/kg). Άρα όλα τα δείγματα παραμένουν στην κατηγορία εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου.

### 6.3 Αποτελέσματα Φασματοφωτομετρικής εξέτασης στο υπεριώδες

Για τη φασματοφωτομετρική εξέταση των δειγμάτων, υπολογίστηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα με τη χρήση του κανονισμού 2568/91, και τις τιμές βάρους και απορρόφησης [6]. Παρακάτω, φανερώνεται ο τύπος υπολογισμού τόσο των σταθερών K (K<sub>264</sub>, K<sub>268</sub>, K<sub>272</sub>, K<sub>232</sub>), αλλά και της ΔΚ:

- Για τις σταθερές K

$$K_{nm} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s} \quad (4)$$

Όπου:

$E_\lambda$  = απορρόφηση

$c$  = συγκέντρωση mol/100 ml

$s$  = διάμετρος κυψελίδας σε cm

- Για τη σταθερά  $\Delta K$

$$\Delta K = \left| K_{268} - \left( \frac{K_{264} + K_{272}}{2} \right) \right| \quad (5)$$

Πιο κάτω (Πίνακας 16), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν στα 4 χρονικά σημεία. Οι σταθερές  $K$  και  $\Delta K$  δεν έχουν μονάδες μέτρησης. Στη νομοθεσία υπάρχουν όρια μόνο για τις σταθερές  $K_{232}$ ,  $K_{268}$  και  $\Delta K$ .

**Πίνακας 16: Πίνακας αποτελεσμάτων απορρόφησης στο υπεριώδες**

Χρονική Στιγμή	Δείγμα	$K_{232}$	$K_{268}$	$K_{272}$	$K_{264}$	$\Delta K$
$T_0$	ΣΠΕ 25 °C	1,52	0,111	0,108	0,119	0,002
	ΣΠΕ 4 °C	1,52	0,105	0,103	0,112	0,003
	CONTROL 25 °C	1,54	0,112	0,115	0,115	0,002
	CONTROL 4 °C	1,54	0,113	0,11	0,110	0,002
$T_1$	ΣΠΕ 25 °C	1,62	0,112	0,109	0,121	0,003
	ΣΠΕ 4 °C	1,57	0,110	0,107	0,118	0,003
	CONTROL 25 °C	1,59	0,112	0,109	0,121	0,003
	CONTROL 4 °C	1,52	0,118	0,115	0,126	0,003
$T_2$	ΣΠΕ 25 °C	1,75	0,112	0,109	0,119	0,002
	ΣΠΕ 4 °C	1,62	0,109	0,106	0,117	0,002
	CONTROL 25 °C	1,75	0,122	0,119	0,130	0,002

	CONTROL 4 °C	1,66	0,119	0,116	0,127	0,003
T <sub>3</sub>	ΣΠΕ 25 °C	1,79	0,122	0,120	0,129	0,002
	ΣΠΕ 4 °C	1,77	0,113	0,110	0,110	0,002
	CONTROL 25 °C	1,79	0,124	0,122	0,130	0,002
	CONTROL 4 °C	1,76	0,116	0,114	0,124	0,003

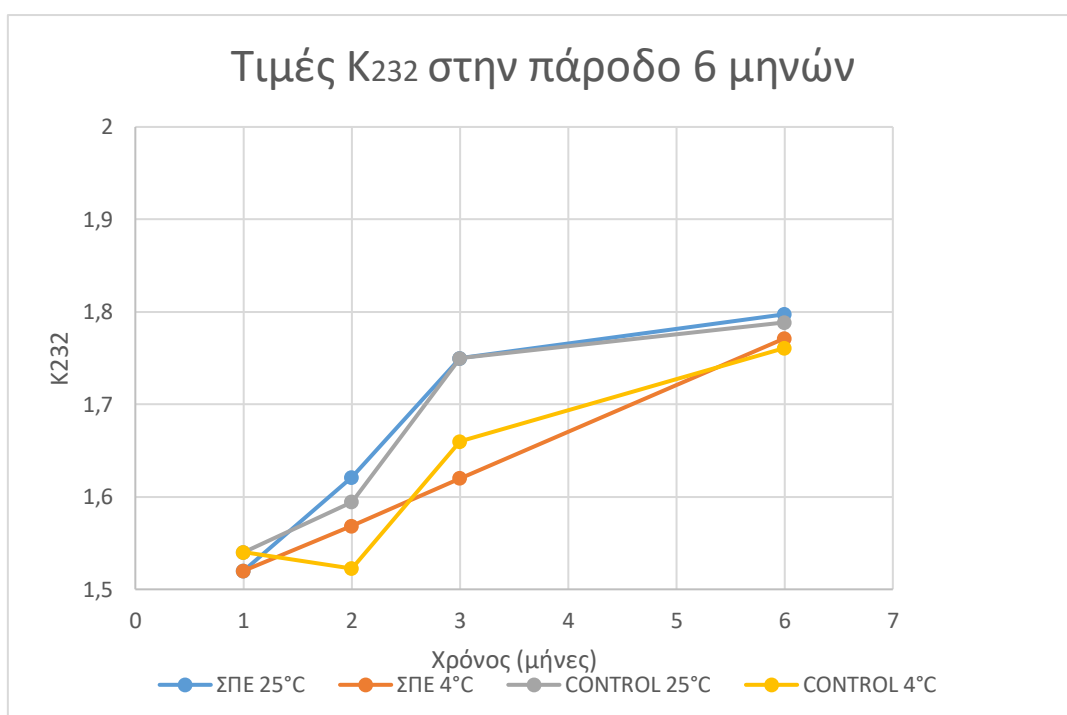
Βάσει του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91, ένα ελαιόλαδο θεωρείται εξαιρετικά παρθένο όταν οι πιο κάτω σταθερές έχουν μικρότερες ή ίσες τιμές με τις αναγραφόμενες [6]:

$$K_{232} \leq 2,50$$

$$K_{268} \leq 0,20$$

$$\Delta K \leq 0,01$$

Πιο κάτω, ακολουθεί γραφική παράσταση (Σχήμα 8) που παρουσιάζει τα αποτελέσματα της σταθεράς  $K_{232}$  για καλύτερη εξαγωγή των ανάλογων πορισμάτων.

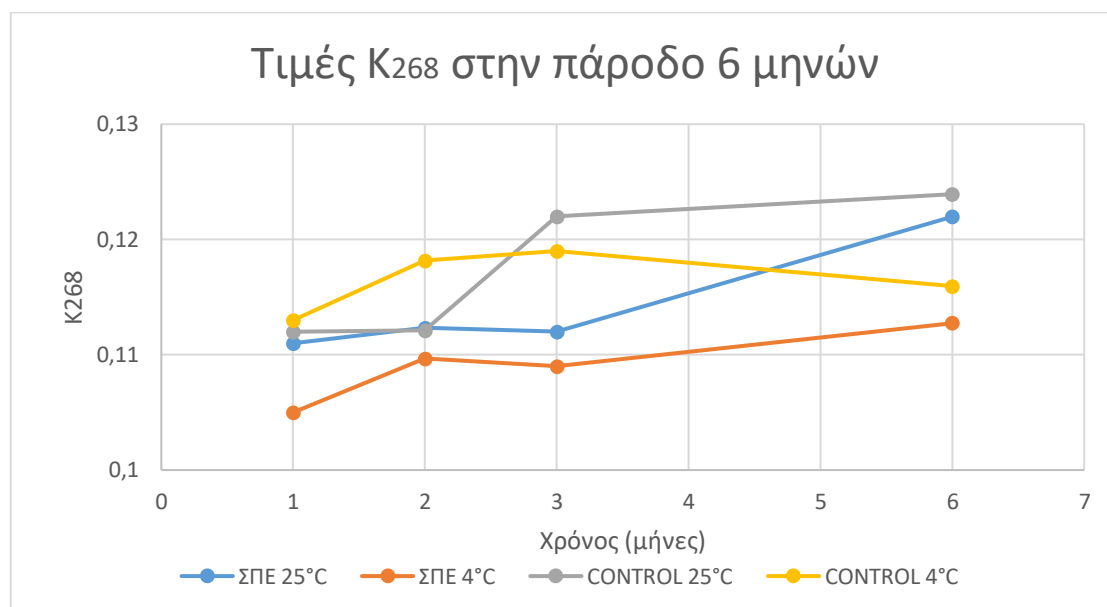


**Σχήμα 8: Αποτελέσματα σταθεράς  $K_{232}$**

Όπως έχει προαναφερθεί, η σταθερά  $K_{232}$  προβάλλει τα αρχικά στάδια οξείδωσης του ελαίου κατά την αποθήκευση του [4]. Από την πιο πάνω γραφική παράσταση (Σχήμα 8) φανερώνεται ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) παρουσίασαν μια σταδιακή αύξηση της σταθεράς  $K_{232}$ , χωρίς να υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα τους. Ταυτόχρονα, στα δύο δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C, οι τιμές της σταθεράς  $K_{232}$  παρουσίασαν μικρότερη αύξηση, συγκριτικά με τα δείγματα των 25 °C. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα δείγματα σε αυτή την παράμετρο

διαχωρίστηκαν βάσει θερμοκρασίας, όπως παρατηρείται στο Σχήμα 8, ενώ διαφορές μεταξύ Control και ΣΠΕ είναι αμελητέες. Πέραν από αυτό, οι τιμές που παρουσιάζει η  $K_{232}$  είναι μικρότερες του νομοθετικού ορίου, όπως είναι φανερό.

Στο πιο κάτω γράφημα (Σχήμα 9), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σταθεράς  $K_{268}$ :



**Σχήμα 9: Αποτελέσματα σταθεράς  $K_{268}$**

Η σταθερά  $K_{268}$  φανερώνει προχωρημένο στάδιο οξείδωσης στο ελαιόλαδο. Όπως είναι φανερό, τα δείγματα δεν ξεπερνούν τα νομοθετικά όρια [5]. Προκαλεί ενδιαφέρον ο διαχωρισμός που παρατηρείται στο πιο πάνω σχήμα (Σχήμα 9). Σε όλα τα δείγματα παρατηρείται αύξηση. Την πιο έντονη αύξηση παρουσιάζει το Control στους 25 °C. Σε αυτή την γραφική παράσταση, παρουσιάζεται διαφοροποίηση λόγω της θερμοκρασίας αποθήκευσης, όπως και πιο πάνω (Σχήμα 8). Τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C έχουν χαμηλότερες τιμές από ότι τα αντίστοιχα τους δείγματα στους 25 °C. Ταυτόχρονα, οι τιμές του Control είναι υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές του ΣΠΕ, στις αντίστοιχες συνθήκες αποθήκευσης. Συνεπάγεται πως, με βάση τα πιο πάνω δεδομένα, τα δείγματα που υπέστησαν διήθηση με την καταχωρημένη μέθοδο (πατέντα) φανερώνουν χαμηλότερη οξείδωση στην

αντίστοιχη θερμοκρασία, αφού έχουν χαμηλότερες τιμές της σταθεράς  $K_{268}$ , ενώ είναι ιδανικότερη η αποθήκευσή τους στους 4 °C.

Τέλος, η ΔΚ δεν μεταβάλλεται στην περίοδο 6 μηνών, σε κανένα από τα δείγματα. Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στις τιμές κυμαίνονται από 0,002 σε 0,003, που πρακτικά θεωρούνται σταθερές. Λόγω των πιο πάνω δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο πόρισμα διαφοροποίησης τους. Με αυτά καταλήγουμε στο ότι η σταθερά ΔΚ δεν έχει μεταβληθεί στην περίοδο των 6 μηνών, και παραμένει σημαντικά μικρότερη από το νομοθετικό όριο για εξαιρετικά παρθένα και παρθένα ελαιόλαδα. [6]

#### **6.4 Αποτελέσματα προσδιορισμού μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων**

Κατά τον προσδιορισμό των FAMES, ο υπολογισμός και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του κανονισμού 2568/91, όπως και στα πιο πάνω πειράματα. Οπότε, ο τρόπος κανονικοποίησης και εξαγωγής των αποτελεσμάτων μπορεί να βρεθεί αναλυτικά στον κανονισμό [6].

Η ποιοτική ανάλυση έγινε βάσει προτύπου, ενώ για την ποσοτική ανάλυση έγινε κατάλληλη χρήση συντελεστών διόρθωσης και βρέθηκε η ποσοστιαία αναλογία των κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως ορίζεται στον πιο πάνω κανονισμό.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 17) απεικονίζεται η ποσοστιαία αναλογία των ολικών λιπαρών οξέων που βρέθηκαν στα δείγματα, στα 4 χρονικά σημεία που έγινε η ανάλυση.

**Πίνακας 17: Ποσοστιαία αναλογία FAMES**

Λιπαρό Οξύ	T <sub>0</sub>				T <sub>1</sub>				T <sub>2</sub>				T <sub>3</sub>			
	ΣΠΕ 25 °C	ΣΠΕ 4 °C	CONTROL 25 °C	CONTROL 4 °C	ΣΠΕ 25 °C	ΣΠΕ 4 °C	CONTROL 25 °C	CONTROL 4 °C	ΣΠΕ 25 °C	ΣΠΕ 4 °C	CONTROL 25 °C	CONTROL 4 °C	ΣΠΕ 25 °C	ΣΠΕ 4 °C	CONTROL 25 °C	CONTROL 4 °C
C8:0	0,016	0,010	0,02	0,02	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002	0,01	0,01	0,01	0,005
C14:0	0,012	0,012	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02
C16:0	10,2	10,2	10,2	10,2	10,3	10,3	10,4	10,3	10,6	10,7	10,6	10,6	10,4	10,3	10,4	10,4
C16:1	0,494	0,491	0,501	0,503	0,502	0,492	0,491	0,494	0,506	0,506	0,505	0,507	0,483	0,478	0,482	0,485
C17:0	0,063	0,058	0,06	0,07	0,07	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
C17:1	0,064	0,063	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
C18:0	2,27	2,26	2,26	2,26	2,29	2,28	2,25	2,25	2,38	2,46	2,43	2,45	2,32	2,30	2,317	2,28
C18:1n9c	73,5	73,5	73,5	73,4	73,1	73,2	73,4	73,5	72,5	72,5	72,5	72,4	72,9	73,1	73,0	73,0
C18:2n6t	1,71	1,73	1,77	1,74	1,66	1,63	1,61	1,65	1,67	1,68	1,71	1,64	1,58	1,56	1,45	1,41
C18:2n6c	9,67	9,71	9,68	9,70	9,93	9,94	9,92	9,89	10,1	9,99	10,1	10,1	10,0	10,1	10,1	10,2

	T <sub>0</sub>				T <sub>1</sub>				T <sub>2</sub>				T <sub>3</sub>			
C18:3n3	1,00	0,99	1,00	1,00	1,01	1,02	0,97	0,96	1,06	1,07	1,06	1,06	1,04	1,02	1,04	1,05
C20:0	0,379	0,378	0,381	0,377	0,383	0,391	0,335	0,349	0,406	0,407	0,398	0,406	0,409	0,412	0,420	0,412
C20:1(n9)	0,374	0,372	0,377	0,377	0,368	0,371	0,306	0,303	0,388	0,392	0,379	0,383	0,377	0,388	0,388	0,386
C21:0	0,007	0,005	0,003	0,005	0,04	0,02	0,02	0,03	0,006	0,005	0,003	0,004	0,007	0,002	0,006	0,006
C22:0	0,155	0,150	0,150	0,153	0,135	0,149	0,106	0,113	0,151	0,114	0,134	0,141	0,151	0,146	0,155	0,143
C23:0	0,017	0,018	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,02
C24:0	0,060	0,052	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05

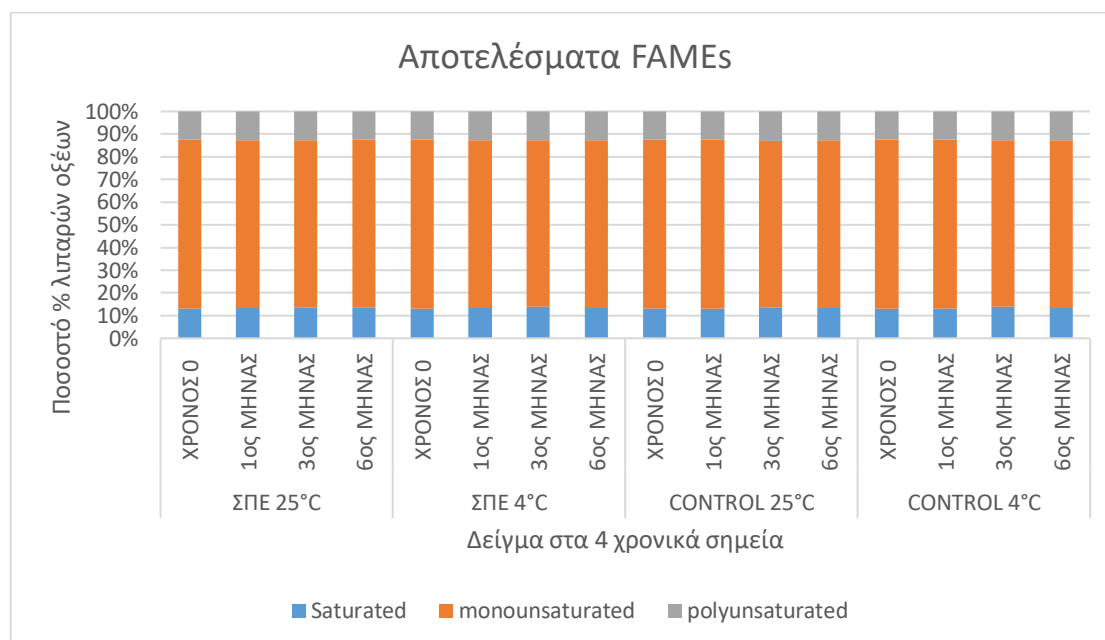


Στον πιο πάνω πίνακα (Πίνακας 17) παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα όλων των λιπαρών οξέων. Παρακάτω (Πίνακας 18), απεικονίζεται η αναλογία σε κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα που παρουσιάστηκε στα δείγματα κατά το πέρασμα των έξι μηνών.

**Πίνακας 18: Αναλογία επί %100 κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των δειγμάτων**

Χρόνος	Δείγματα	Κορεσμένα	Μονοακόρεστα	Πολυακόρεστα
T <sub>0</sub>	ΣΠΕ 25 °C	13,17%	74,44%	12,39%
	ΣΠΕ 4 °C	13,17%	74,39%	12,44%
	CONTROL 25 °C	13,16%	74,40%	12,44%
	CONTROL 4 °C	13,19%	74,37%	12,44%
T <sub>1</sub>	ΣΠΕ 25 °C	13,32%	74,08%	12,60%
	ΣΠΕ 4 °C	13,30%	74,12%	12,58%
	CONTROL 25 °C	13,21%	74,29%	12,50%
	CONTROL 4 °C	13,20%	74,30%	12,50%
T <sub>2</sub>	ΣΠΕ 25 °C	13,70%	73,47%	12,83%
	ΣΠΕ 4 °C	13,82%	73,44%	12,74%
	CONTROL 25 °C	13,70%	73,44%	12,86%
	CONTROL 4 °C	13,80%	73,37%	12,83%
T <sub>3</sub>	ΣΠΕ 25 °C	13,52%	73,81%	12,67%
	ΣΠΕ 4 °C	13,32%	73,99%	12,69%
	CONTROL 25 °C	13,45%	73,94%	12,61%
	CONTROL 4 °C	13,37%	73,96%	12,67%

Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκε ένα γράφημα (Σχήμα 10) με τα αποτελέσματα του Πίνακα 16.



**Σχήμα 10: Ποσοστιαία αναλογία κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στα 4 δείγματα σε περίοδο 6 μηνών**

Στο πιο πάνω γράφημα (Σχήμα 10) παρουσιάζεται η αναλογία των κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των δειγμάτων στα 4 χρονικά σημεία. Όπως είναι φανερό, τα δείγματα δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική διαφορά στην πάροδο του χρόνου. Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός ότι δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ δειγμάτων Control και ΣΠΕ, όπως δεν υπάρχει μεταξύ των δυο συνθηκών αποθήκευσης (25 °C και 4 °C).

### 6.5 Αποτελέσματα προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις είναι βιοδραστικά συστατικά που εντοπίζονται σε διάφορα μέρη του ελαιόδεντρου, συμπεριλαμβανομένου του καρπού (ελιά) και αντίστοιχα του ελαιολάδου. Όπως έχει προαναφερθεί, για την ανάλυση αυτή γίνεται στοχευμένη σάρωση, με τη χρήση προτύπων, και ύποπτη σάρωση για τις ενώσεις που δεν υπήρχαν διαθέσιμα πρότυπα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [37]. Για τις ενώσεις που συγκαταλέγονται στη στοχευμένη σάρωση (Πίνακας 7), παρασκευάστηκαν διαφόρων συγκεντρώσεων πρότυπα και από αυτά

σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες. Έτσι η ποσοτικοποίηση έγινε βάσει της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς για την αντίστοιχη ένωση [37].

Όσον αφορά τις «ύποπτες» ενώσεις (Πίνακας 8) πραγματοποιήθηκε ημιποσοτικοποίηση. Δηλαδή, οι ενώσεις αυτές ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση των καμπυλών των πρότυπων ουσιών που είχαν παρόμοια δομή. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 20 ενώσεις, όπου 15 από αυτές βρίσκονταν στη λίστα των στοχευμένων ενώσεων (Πίνακας 7). Από τη λίστα των «ύποπτων» ενώσεων (Πίνακας 8), ταυτοποιήθηκαν 5 ενώσεις, η 1-ακετόξυπινореζινόλη, η 10-υδροξυ-10-μεθυλ-άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή, η 10-υδροξυ-δεκαρβοξυμεθυλ-άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή, η οξική υδροξυτυροσόλη, και η συρινγκαρεζινόλη. Από τις πιο πάνω ενώσεις, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς προτύπων της υδροξυτυροσόλης για την ποσοτικοποίηση της οξικής υδροξυτυροσόλης και της 10-υδροξυ-δεκαρβοξυμεθυλ-άγλυκης ελαιοευρωπαϊνης. Η 10-υδροξυ-10-μεθυλ-άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς προτύπου της ελαιοευρωπαϊνης. Τέλος, για την ποσοτικοποίηση της συρινγκαρεζινόλη αλλά και της 1-ακετόξυπινореζινόλη χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο της πινореζινόλης. Οι παρακάτω καμπύλες επιλέχτηκαν με τα δεδομένα που έχουν εξαχθεί από προηγούμενες έρευνες [37].

Στον πιο κάτω πίνακα (Πίνακας 19) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης και ημιποσοτικοποίησης των φαινολικών ενώσεων που βρέθηκαν στα δειγμάτα στα 4 χρονικά σημεία ( $T_0, T_1, T_2$ , και  $T_3$ ), το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο, καθώς και το άθροισμα των ενώσεων που εντάσσονται στον ισχυρισμό υγείας σε mg/kg [38]. Οι ενώσεις που εντάσσονται στον ισχυρισμό υγείας, εμφανίζονται στον πίνακα με αστερίσκο (\*)

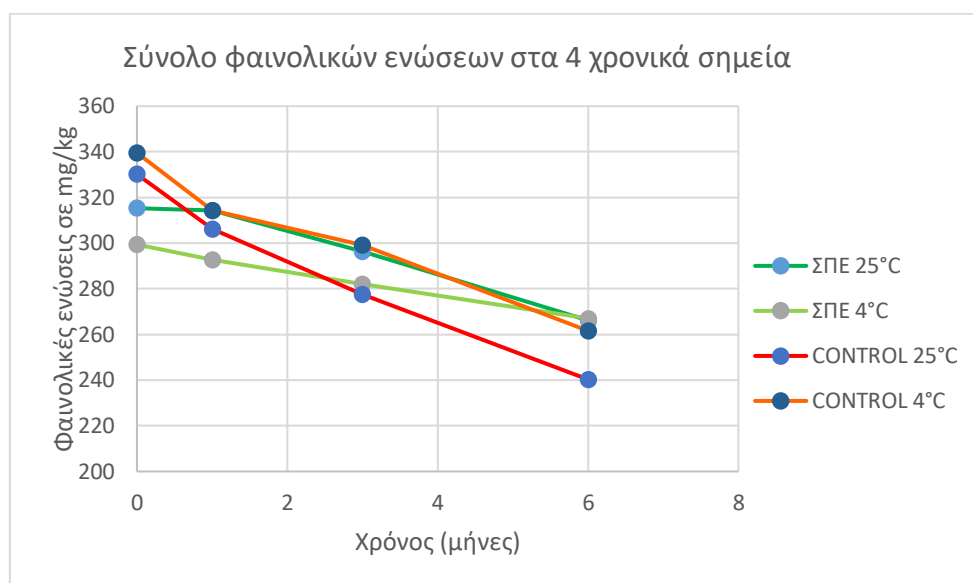
**Πίνακας 19: Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης φαινολικών ενώσεων στα δείγματα**

Φαινολικές Ενώσεις	ΣΠΕ 25 °C				ΣΠΕ 4 °C				CONTROL 25 °C				CONTROL 4 °C			
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
1-ακετόξυππινορεζινόλη	20,8	20,8	19,9	21,0	20,9	20,7	20,3	19,7	20,5	19,1	18,6	15,1	25,2	22,5	22,5	21,0
10-υδρόξυ-10-μεθυλ- άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή *	0,135	δ.α	δ.α	δ.α	0,133	δ.α	δ.α	δ.α	0,142	δ.α	δ.α	δ.α	0,141	δ.α	δ.α	δ.α
10-υδρόξυ-δεκαρβοξυμεθυλ-άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή *	0,442	0,511	4,20	3,81	0,382	0,681	3,63	3,61	0,434	0,881	4,92	4,90	0,350	0,661	3,31	3,56
Απιγενίνη	2,85	2,37	1,51	1,44	2,79	2,82	1,86	1,65	2,79	2,65	1,59	1,21	3,08	2,79	1,78	1,42
Εριοδικτυόλη	3,68	3,64	3,09	2,11	3,66	3,33	3,23	2,92	3,92	4,10	3,87	2,69	3,98	3,39	3,11	2,46
Υδροξυτυροσόλη *	0,442	1,49	3,60	4,33	0,385	0,883	1,882	2,81	0,597	1,46	3,52	4,13	0,542	0,96	2,44	2,47
Οξική υδροξυτυροσόλη *	34,5	29,6	25,9	20,8	31,4	29,3	28,2	28,1	36,2	33,4	17,4	16,7	36,1	35,8	28,7	27,74

	ΣΠΕ 25 °C				ΣΠΕ 4 °C				CONTROL 25 °C				CONTROL 4 °C			
Άγλυκη λινγκοτροσίδη *	13,7	18,2	25,9	29,9	12,1	11,7	15,7	19,9	13,8	13,5	25,9	27,9	14,3	10,6	18,4	19,1
Λουτεολίνη	11,5	9,49	8,94	7,61	11,0	10,4	8,89	8,78	14,3	9,35	8,42	8,11	12,7	11,3	9,84	5,75
Ναριγενίνη	0,477	0,496	0,357	0,235	0,399	0,47	0,308	0,263	0,450	0,565	0,384	0,355	0,506	0,406	0,374	0,103
Ολεασίνη *	49,4	48,6	44,3	38,3	48,6	47,7	47,5	45,1	53,7	47,4	44,8	38,9	52,1	51,4	47,9	44,3
Ολεοκανθάλη *	31,5	30,3	30,2	29,4	29,4	28,1	28,0	27,2	32,8	32,9	30,1	27,9	32,3	29,7	29,2	24,7
Ολεοκανθαλικό οξύ *	1,91	3,97	2,09	2,02	1,77	3,84	1,61	1,49	1,97	3,75	2,46	1,41	1,81	3,52	2,02	1,29
Ολεοκορονάλη *	53,8	51,2	46,1	38,1	49,7	47,7	46,7	40,0	54,7	49,8	40,2	38,5	57,6	48,3	48,2	34,7
Ολεομισιονάλη *	50,9	53,4	43,2	36,6	49,3	48,1	37,8	36,9	52,3	48,4	38,5	27,3	56,9	54,7	43,0	43,7
Άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή *	33,1	33,6	30,6	25,6	31,9	31,2	30,4	23,6	34,9	31,9	30,2	20,1	35,7	32,5	31,7	23,5
Πινορεζινόλη	4,18	4,12	3,58	3,41	3,62	3,53	3,42	3,46	4,83	3,94	3,75	3,53	4,28	3,31	3,94	3,65
Κερκετίνη	0,448	0,156	0,174	0,157	0,404	0,179	0,143	0,130	0,43	0,183	0,176	0,135	0,461	0,205	0,171	0,155

	ΣΠΕ 25 °C				ΣΠΕ 4 °C				CONTROL 25 °C				CONTROL 4 °C			
Συριγγκαρεζινόλη	0,798	0,804	0,742	0,681	0,85	0,762	0,742	0,632	0,859	0,821	0,787	0,778	0,872	0,868	0,717	0,686
Τυροσόλη *	0,746	1,79	2,21	0,831	0,692	1,74	1,72	1,04	0,871	2,01	2,24	0,77	0,727	1,65	1,81	1,81
Σύνολο (mg/kg)	315	314	296	266	299	292	282	267	330	306	277	240	339	314	299	261
Σύνολο ενώσεων ισχυρισμού υγείας (mg/kg) * :	270	272	258	229	255	250	243	229	282	265	240	208	288	269	256	226
<p>Ενώσεις που εντάσσονται στον ισχυρισμό υγείας 434/2012 σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [38] είναι οι: 10-υδροξυ-10-μεθυλ-άγλυκη ελαιευρωπαϊνή, 10-υδροξυ-δεκαρβοξυμεθυλ-άγλυκη ελαιευρωπαϊνή, υδροξυτυροσόλη, οξική υδροξυτυροσόλη, άγλυκη λιγκστροσίδη, ολεασίνη, ολεοκανθάλη, ολεοκανθαλικό οξύ, ολεοκορονάλη, ολεομισιονάλη, άγλυκη ελαιευρωπαϊνή και τυροσόλη.</p> <p>δ.α: Δεν ανιχνεύθηκε</p>																

Για την πιο εύκολη εξαγωγή και κατανόηση των αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκαν γραφικές παραστάσεις, που φανερώνουν την μεταβολή του συνολικού φαινολικού προφιλ (Σχήμα 11).



**Σχήμα 11: Συνολικό φαινολικό προφιλ σε mg/kg στην πάροδο των 6 μηνών**

Από το πιο πάνω γράφημα (Σχήμα 11) είναι φανερή η σταδιακή μείωση των φαινολικών ενώσεων στα δείγματα με το πέρασμα του χρόνου. Οι ενώσεις αυτές είναι εξαιρετικά ευαίσθητες παρουσία οξυγόνου, φωτός κλπ., οπότε το πιο πάνω αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο. Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα δείγματα ΣΠΕ παρουσιάζουν ελαφρώς μικρότερη μείωση των φαινολικών τους ενώσεων. Την μεγαλύτερη μείωση παρουσιάζει το δείγμα CONTROL 25 °C. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκε μείωση σε όλες τις φαινολικές ενώσεις, αλλά στο σύνολο τους. Αντιθέτως, σε κάποιες ενώσεις είχε παρατηρηθεί αύξηση στη συγκέντρωσή τους, όπως π.χ. στην υδροξυτυροσόλη (Πίνακας 19). Σε τέτοιες περιπτώσεις, η λογική εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι αλληλομετατρέπονται με το πέρασμα του χρόνου ή μια στην άλλη.

## 6.6 Αποτελέσματα προσδιορισμού χρωστικών και τοκοφερολών

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των χρωστικών και τοκοφερολών στα δείγματα, με τη βοήθεια υψηλής πίεσης αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδίοδων, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα σε διάφορες συγκεντρώσεις. Για την

ποσοτικοποίηση παρασκευάστηκαν αντίστοιχες καμπύλες για την κάθε ένωση. Στα δείγματα που μελετήθηκαν, ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι χρωστικές λουτεΐνη που ανήκει στα καροτενοειδή στα 450 nm, το σκουαλένιο στα 210 nm, και οι τοκοφερόλες α, β και γ οι οποίες απορροφούν στα 295 nm. Οι τοκοφερόλες β και γ, ποσοτικοποιήθηκαν μαζί αφού έχουν τον ίδιο χρόνο έκλουσης.

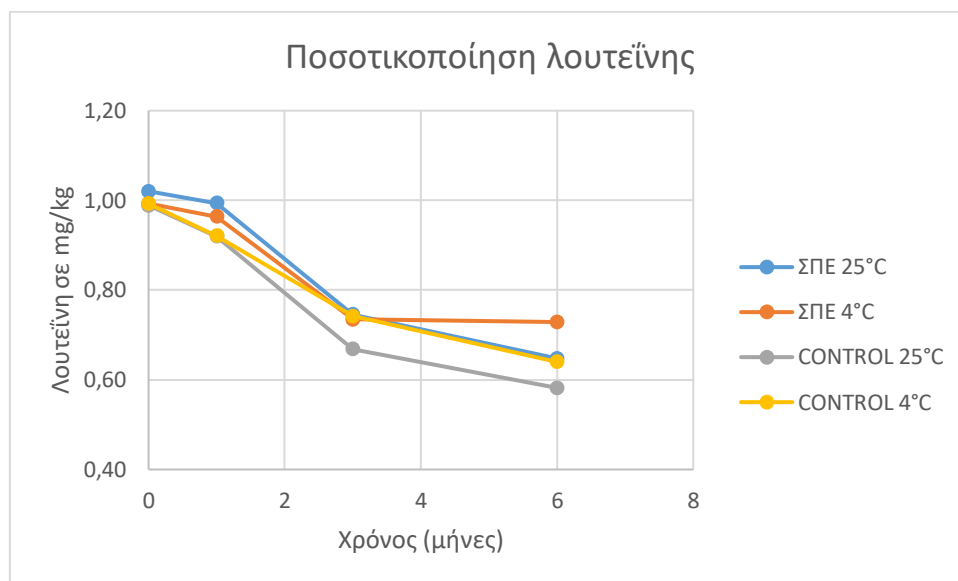
Στον πιο κάτω πίνακα (Πίνακας 20) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης των ενώσεων σε mg/kg, αλλά και ο μέσος όρος χρόνου έκλουσης για την κάθε ένωση.



**Πίνακας 20: Αποτελέσματα χρωστικών και τοκοφερολών στα 4 χρονικά σημεία σε mg/kg**

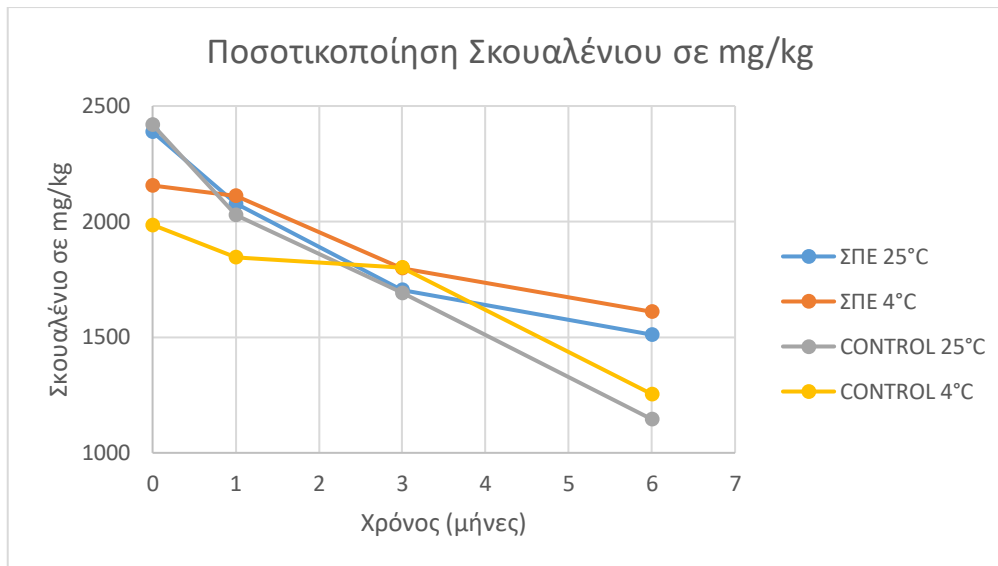
Δείγματα		ΣΠΕ 25 °C				ΣΠΕ 4 °C				CONTROL 25 °C				CONTROL 4 °C			
Ενώσεις	Rt (min)	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Λουτεΐνη (mg/kg)	6,4	1,02	0,994	0,745	0,648	0,993	0,964	0,734	0,729	0,989	0,919	0,668	0,582	0,993	0,921	0,742	0,640
Σκουαλένιο (mg/kg)	15,5	2388	2077	1705	1511	2156	2112	1799	1610	2419	2029	1692	1145	1986	1846	1802	1254
Τοκοφερόλη α (mg/kg)	10,7	243,1	232,4	232,9	210,4	238,0	236,6	230,3	219,2	242,8	235,7	224,2	213,6	242,1	239	227,8	218,8
Τοκοφερόλη β+γ (mg/kg)	9,5	20,62	20,23	19,18	18,84	21,86	21,17	19,3	18,48	21,46	21,16	19,40	17,62	21,45	20,45	19,96	18,87

Τα αποτελέσματα του πιο πάνω πίνακα (Πίνακας 20) απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα (Σχήματα 12-15) που παρασκευάστηκαν για την κάθε ένωση.



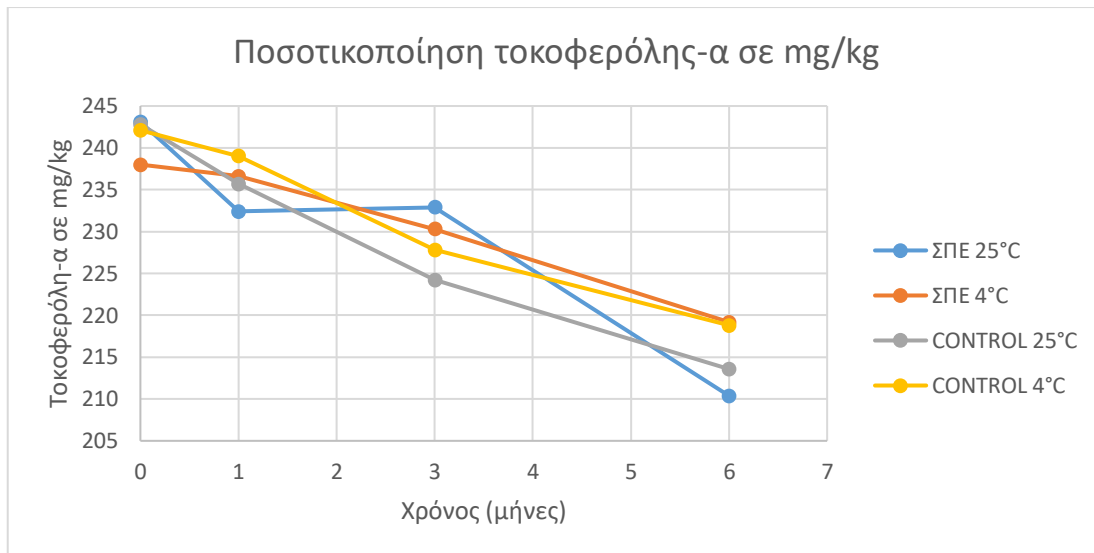
**Σχήμα 12: Αποτελέσματα για Λουτεΐνη σε mg/kg στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα**

Στο πιο πάνω γράφημα (Σχήμα 12), παρατηρείται η μείωση της λουτεΐνης στο πέρασμα των 6 μηνών. Γενικά, αναδεικνύεται η πτωτική τάση της λουτεΐνης με το πέρασμα των 6 μηνών. Τη μεγαλύτερη μείωση παρουσιάζει το CONTROL 25 °C και τη μικρότερη το δείγμα ΣΠΕ 4 °C. Από τα πιο πάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι οι μικρότερες απώλειες παρουσιάστηκαν στα δείγματα ΣΠΕ ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Ταυτόχρονα, τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C έδειξαν μεγαλύτερη διατηρησιμότητα.



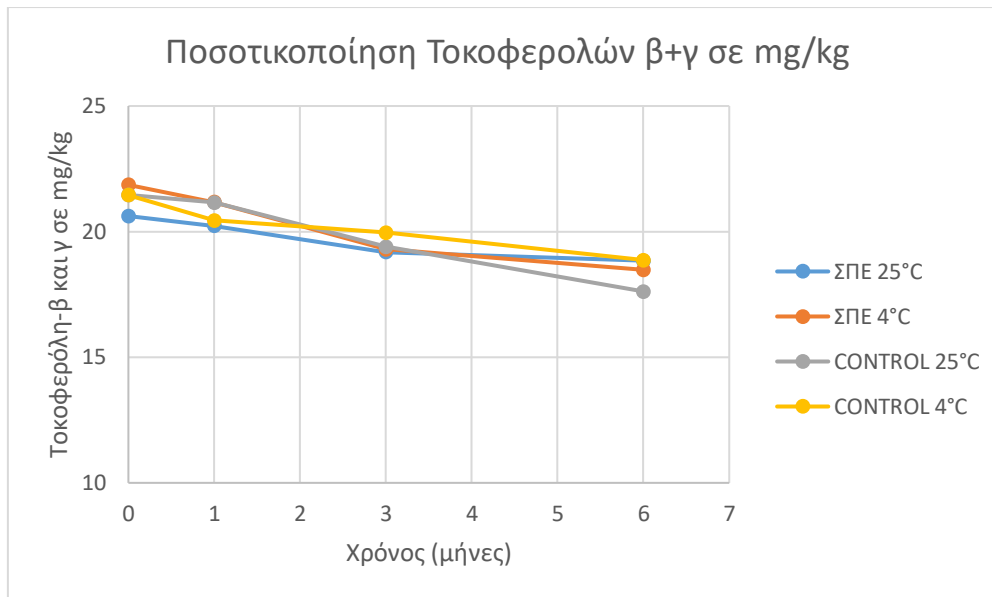
**Σχήμα 13: Αποτελέσματα για Σκουαλένιο σε mg/kg στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα**

Πιο πάνω (Σχήμα 13), απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις σκουαλενίου που ποσοτικοποιήθηκαν στο κάθε δείγμα, στην πάροδο 6 μηνών. Με το πέρασμα του χρόνου, παρουσιάζεται μείωση στην συγκέντρωση της ένωσης αυτής σε όλα τα δείγματα. Παρόλα αυτά, τα δείγματα ΣΠΕ προδίδουν μεγαλύτερη αντοχή στο χρόνο, αφού παρουσιάζουν μικρότερη μείωση του σκουαλενίου, κάτι που φαίνεται καθαρά στο διάγραμμα (Σχήμα 13). Ταυτόχρονα, και σε αυτό το διάγραμμα φανερώνεται πως τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσίασαν μικρότερη μείωση στη συγκέντρωση σκουαλενίου.



**Σχήμα 14: Αποτελέσματα για Τοκοφερόλη-α σε mg/kg στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα**

Στο Σχήμα 14 απεικονίζονται τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης της τοκοφερόλης-α στο κάθε δείγμα, για τα 4 χρονικά σημεία. Όπως φαίνεται, οι τιμές συμφωνούν με τις προβλέψεις της βιβλιογραφίας, στην οποία οι συνήθεις συγκεντρώσεις βρίσκονταν στα 100-300 mg/kg [1]. Από το Σχήμα 14 παρατηρείται η μείωση της συγκέντρωσης της τοκοφερόλης-α σε όλα τα δείγματα με το πέρασμα των 6 μηνών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως τα δείγματα διαχωρίζονται βάσει θερμοκρασίας σε αυτό το διάγραμμα (Σχήμα 14). Είναι ξεκάθαρο, πως τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C φανερώνουν μεγαλύτερες τιμές μετά το πέρασμα των 6 μηνών, από τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 25 °C.



**Σχήμα 15: Αποτελέσματα Τοκοφερολών-β και γ σε mg/k στα 4 χρονικά σημεία για τα 4 δείγματα**

Στο πιο πάνω γράφημα (Σχήμα 15) παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των τοκοφερολών β και γ, για το κάθε δείγμα στις 4 χρονικές στιγμές. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία [1], οι συγκεντρώσεις των δύο αυτών τοκοφερολών είναι σημαντικά μικρότερες από την τοκοφερόλη-α. Σε αυτή την περίπτωση, παρατηρείται μείωση σε όλα τα δείγματα με το πέρασμα του χρόνου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σχεδόν όλες οι μεταβολές είναι μικρές, ενώ οι καμπύλες όλων των δειγμάτων έχουν πολύ παρόμοια πορεία. Τονίζεται ότι το δείγμα CONTROL 25 °C παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση, ενώ τα υπόλοιπα τρία (3) δείγματα έχουν κοντινότερες τιμές μεταξύ τους.

### **6.7 Αποτελέσματα προσδιορισμού 1,2- και 1,3 διγλυκεριδίων**

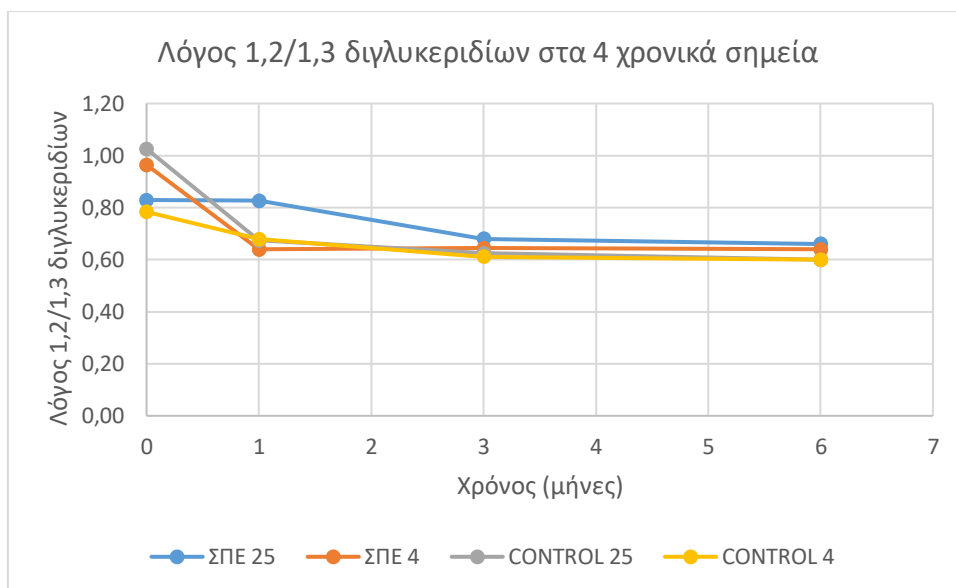
Σε αυτή την πειραματική πορεία προσδιορίστηκαν τα διγλυκερίδια διπαλμιτίνη, διστεαρίνη και C34 που αποτελείται από παλμιτίνη και στεαρίνη. Τα πιο πάνω διαχωρίζονται σε 1,2- και 1,3-διγλυκερίδια, και η μεταβολή της αναλογίας τους αποτελεί ένδειξη για την ηλικία του δείγματος, όπως άλλωστε έχει προαναφερθεί [4]. Τα διγλυκερίδια αυτά ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια προτύπων, αλλά και με τη χρήση δείγματος αναφοράς που λήφθηκαν από τον COI.

Πιο κάτω (Πίνακας 21), παρουσιάζεται η ποσοστιαία αναλογία των συνολικών 1,2 και 1,3 διγλυκεριδίων, καθώς και ο λόγος τους 1,2/1,3.

**Πίνακας 21: Ποσοστιαία αναλογία 1,2-DG και 1,3-DG στην πάροδο 6 μηνών για το κάθε δείγμα**

<b>Δείγματα</b>	<b>Χρονικά σημεία</b>	<b>1,2-DG %</b>	<b>1,3-DG</b>	<b><math>\frac{1,2 DG}{1,3 DG}</math></b>
ΣΠΕ 25 °C	T <sub>0</sub>	45,33	54,67	0,83
	T <sub>1</sub>	45,24	54,76	0,83
	T <sub>2</sub>	40,47	59,53	0,68
	T <sub>3</sub>	39,79	60,21	0,66
ΣΠΕ 4 °C	T <sub>0</sub>	49,09	50,91	0,96
	T <sub>1</sub>	39,02	60,98	0,64
	T <sub>2</sub>	39,18	60,82	0,64
	T <sub>3</sub>	38,95	61,05	0,64
CONTROL 25 °C	T <sub>0</sub>	50,64	49,36	1,03
	T <sub>1</sub>	40,25	59,75	0,67
	T <sub>2</sub>	38,45	61,55	0,62
	T <sub>3</sub>	37,09	62,91	0,60
CONTROL 4 °C	T <sub>0</sub>	43,93	56,07	0,78
	T <sub>1</sub>	40,45	59,55	0,68
	T <sub>2</sub>	37,94	62,06	0,61
	T <sub>3</sub>	37,63	62,37	0,60

Ακολουθεί γράφημα (Σχημα 16) στο οποίο παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου 1,2-DG/1,3-DG στα 4 χρονικά σημεία.



**Σχήμα 16: Λόγος 1,2/1,3 διγλυκερίδια στην πάροδο 6 μηνών για κάθε δείγμα**

Είναι ξεκάθαρο από το σχήμα 16 ότι με την πάροδο του χρόνου ο λόγος 1,2/1,3 διγλυκεριδίων μειώνεται. Αυτό σημαίνει ότι το ποσοστό των 1,3-διγλυκεριδίων αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό είναι κάτι που είναι γνωστό στη βιβλιογραφία [4], εφόσον με την πάροδο του χρόνου τα 1,2 διγλυκερίδια μετατρέπονται στην σταθερότερη μορφή 1,3-διγλυκερίδια. Συνεπάγεται πως ο πιο πάνω λόγος ήταν αναμενόμενο να μειωθεί με την πάροδο του χρόνου σε όλα τα δείγματα. Έτσι, παρατηρείται μια παρόμοια πορεία όλων των δειγμάτων ανεξαρτήτως διήθησης (πατέντα) ή θερμοκρασίας αποθήκευσης.

### 6.8 Αποτελέσματα Οργανοληπτικού ελέγχου του ελαιολάδου

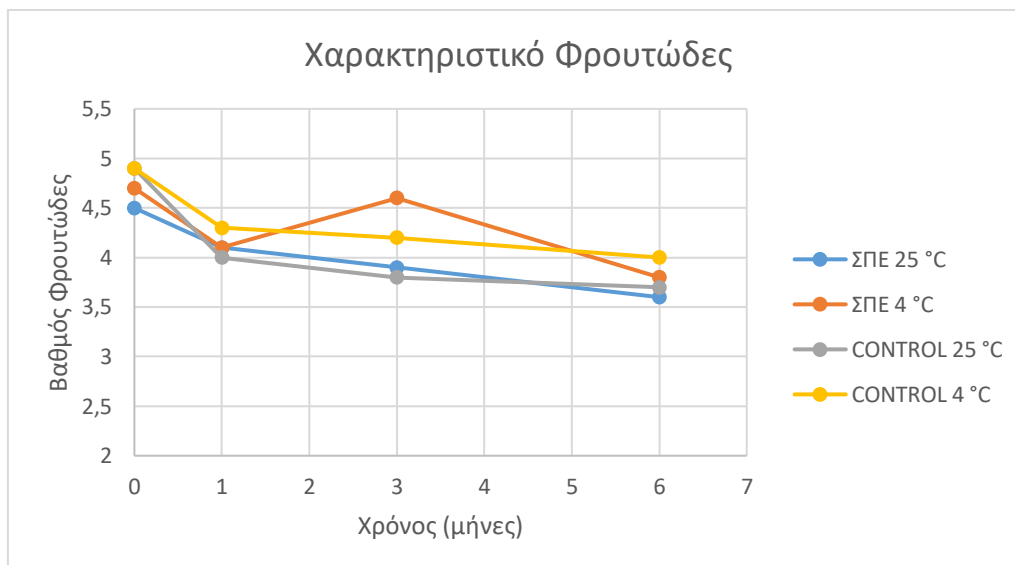
Ο οργανοληπτικός έλεγχος αποτελεί καθοριστική ιδιότητα για την κατηγοριοποίηση του ελαιολάδου. Τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα, πρέπει να περιέχουν το χαρακτηριστικό «φρουτώδες» και ταυτόχρονα να μην παρουσιάζουν καμία αρνητική ιδιότητα [5]. Ο οργανοληπτικός έλεγχος σε αυτή την εργασία έγινε από το εξωτερικό εργαστήριο ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ στη Μυτιλήνη. Στα δείγματα ανιχνεύθηκαν τρία θετικά χαρακτηριστικά: Φρουτώδες, Πικάντικο, και Πικρό, ενώ δεν ανιχνεύθηκε κανένα ελάττωμα. Στον πιο κάτω πίνακα (Πίνακας 22), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για το κάθε δείγμα, στα 4 χρονικά σημεία.

Πίνακας 22: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος στα 4 χρονικά σημεία

Δείγμα	Χρόνικό σημείο	Φρουτώδες	Πικρό	Πικάντικο	Ελάττωμα
ΣΠΕ 25 °C	T <sub>0</sub>	4,5	3,1	2,8	0
	T <sub>1</sub>	4,1	2,1	2,3	0
	T <sub>2</sub>	3,9	2,0	2,6	0
	T <sub>3</sub>	3,6	1,8	1,9	0
ΣΠΕ 4 °C	T <sub>0</sub>	4,7	2,3	3,0	0
	T <sub>1</sub>	4,1	2,7	2,6	0
	T <sub>2</sub>	4,6	2,7	3,5	0
	T <sub>3</sub>	3,8	1,4	2,2	0
CONTROL 25 °C	T <sub>0</sub>	4,9	2,3	3,1	0
	T <sub>1</sub>	4	1,9	2,2	0
	T <sub>2</sub>	3,8	1,9	2,1	0
	T <sub>3</sub>	3,7	0,9	1,1	0
CONTROL 4 °C	T <sub>0</sub>	4,9	1,7	2,3	0
	T <sub>1</sub>	4,3	2,1	2,4	0
	T <sub>2</sub>	4,2	2,5	3,1	0
	T <sub>3</sub>	4,0	1,6	2,6	0



Παρακάτω, σχεδιάστηκε γραφική παράσταση (Σχήμα 17) για την τιμή του θετικού χαρακτηριστικού «φρουτώδες» για το κάθε δείγμα, εφόσον είναι το χαρακτηριστικό που πρέπει να υπάρχει για να μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ένα ελαιόλαδο ως εξαιρετικά παρθένο.



**Σχήμα 17: Βαθμός χαρακτηριστικού "φρουτώδες" για κάθε δείγμα στα 4 χρονικά σημεία**

Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα, παρουσιάζεται η πτωτική τάση του χαρακτηριστικού φρουτώδες σε σχεδόν όλα τα δείγματα. Είναι επίσης φανερό, ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C παρουσιάζουν μικρότερες μεταβολές, από ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 25 °C. Με την εμφάνιση ελαττώματος, δηλαδή αρνητικής ιδιότητας κατά τον ορανοληπτικό έλεγχο του ελαιολάδου, το ελαιόλαδο αυτόματα δεν μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως εξαιρετικά παρθένο. Ελάττωμα όμως δεν εμφανίστηκε σε κανένα από τα δείγματα στην περίοδο των 6 μηνών.

Ακολουθούν αραχνοδιαγράμματα (Σχήμα 18-19) στα οποία φανερώνονται τα χαρακτηριστικά όλων των δειγμάτων στον χρόνο μηδέν ( $T_0$ ) και στους έξι μήνες ( $T_3$ ).



**Σχήμα 18: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων για τον χρόνο T<sub>0</sub>**



**Σχήμα 19: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων για τον χρόνο T<sub>3</sub>**

Από τα πιο πάνω σχήματα (Σχήματα 18-19) παρουσιάζεται η μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στην πάροδο έξι μηνών και για τα τέσσερα (4) δείγματα. Ξεκάθαρα, φαίνεται ότι από όλα τα δείγματα το Control 25 °C υπαίσκει την μεγαλύτερη μείωση στο σύνολο των χαρακτηριστικών του, σε σχέση με τη θέση του στο χρόνο μηδέν (T<sub>0</sub>). Επίσης παρουσιάζεται ότι το δείγμα Control 4 °C υπαίσκει τις μικρότερες μεταβολές όσον αφορά το σύνολο των χαρακτηριστικών του. Η εικόνα αυτή συμφωνεί με την εικόνα του Σχήματος 17, καταλήγοντας στο γεγονός ότι σημαντικό ρόλο έπαιξε η θερμοκρασία

αποθήκευσης για όλα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, αφού τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C είχαν τις μικρότερες μεταβολές.

### **6.9 Συνολικά Αποτελέσματα**

Συνοψίζοντας, σε αυτή την εργασία, έλαβαν μέρος 8 πειραματικές διαδικασίες για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων στην πάροδο έξι μηνών. Ο στόχος ήταν η απεικόνιση των χαρακτηριστικών του ελαιολάδου που εξετάζονται, σε τέσσερις χρονικές στιγμές, όταν αυτό αποθηκεύεται σε διαφορετικές συνθήκες. Λόγω της πληθώρας αποτελεσμάτων, είναι αναγκαίο να γίνει μια κατηγοριοποίηση τους. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 23), εμφανίζονται οι μετρήσεις που είναι σε θέση βάσει του κανονισμού 2568/91 να κατατάξουν τα δείγματα στην αντίστοιχη κατηγορία ελαιολάδου.

**Πίνακας 23: Αποτελέσματα για την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων βάσει του κανονισμού ΕΟΚ 2568/91.**

Δείγμα	ΣΠΕ 25 °C				ΣΠΕ 4 °C				CONTROL 25 °C				CONTROL 4 °C			
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
Χαρακτηριστικό/ Χρονικό σημείο																
Οξύτητα	0,79%	0,80%	0,81%	0,81%	0,79%	0,79%	0,79%	0,79%	0,80%	0,81%	0,83%	0,84%	0,82%	0,79%	0,81%	0,81%
K268	0,111	0,112	0,112	0,122	0,105	0,110	0,109	0,113	0,112	0,112	0,122	0,124	0,113	0,118	0,119	0,116
K232	1,52	1,62	1,75	1,79	1,52	1,57	1,62	1,77	1,54	1,59	1,75	1,79	1,54	1,52	1,66	1,76
ΔΚ	0,002	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
Δείκτης Υπεροξειδίων μεq O <sub>2</sub> /kg	8,0	8,0	8,2	8,8	8,0	8,0	8,2	8,1	8,0	8,1	7,9	8,7	8,0	8,0	7,9	8,4
Φρουτώδες (οργανοληπτική αξιολόγηση)	4,5	4,1	3,9	3,6	4,7	4,1	4,6	3,8	4,9	4	3,8	3,7	4,9	4,3	4,2	4,0
Ελατώματα (οργανοληπτική αξιολόγηση)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Από τα πιο πάνω (Πίνακας 23), και γνωρίζοντας τα όρια που θέτει ο κανονισμός ΕΟΚ 2568/91 [6], που παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 1, είμαστε σε θέση να κατηγοριοποιήσουμε τα δείγματα. Όπως γίνεται φανερό, καμία από τις παραμέτρους δεν υπερβαίνει τα όρια του κανονισμού 2568/91. Εφόσον η οξύτητα των δειγμάτων είναι ίση με 0,8% ως προς ελαϊκό οξύ, τότε το δείγμα αυτόματα εντάσσεται στην κατηγορία εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου. Όσον αφορά τις σταθερές  $K_{232}$ ,  $K_{268}$  και  $\Delta K$ , οι τιμές τους επίσης εντάσσονται στις τιμές που αντιστοιχούν στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Το ίδιο ισχύει με τον αριθμό υπεροξειδίων, εφόσον το ανώτερο όριο είναι 20 meq  $O_2/kg$ . Επιπλέον, καθοριστικό είναι το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν ελαττώματα στον οργανοληπτικό έλεγχο ( $D_f=0$ ), ενώ ταυτόχρονα, ο βαθμός για το χαρακτηριστικό «Φρουτώδεις» ήταν μεγαλύτερος του 0 ( $D_F \geq 0$ ).



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7**

### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η σταθερότητα του ελαιολάδου στην χρονική πάροδο 6 μηνών, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 25 °C και στους 4 °C. Πραγματοποιήθηκαν 8 αναλύσεις στα 4 χρονικά σημεία ελέγχου που έλαβαν μέρος στο χρόνο παραλαβής (T<sub>0</sub>), στον πρώτο μήνα (T<sub>1</sub>), στον τρίτο μήνα (T<sub>2</sub>) και στον έκτο μήνα (T<sub>3</sub>). Μέσω αυτών των πειραματικών διεργασιών ταυτοποιήθηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν και ημιποσοτικοποιήθηκαν συνολικά 48 ενώσεις που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Προσδιορίστηκε η ελεύθερη οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων, και η φασματοφωτομετρική απορρόφηση των δειγμάτων, που αποτελούν αναλύσεις ρουτίνας. Επιπλέον με τη βοήθεια του εξωτερικού εργαστηρίου ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ, έγινε δυνατός ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν φαινολικές ενώσεις, χρωστικές ενώσεις και τοκοφερόλες, αλλά και τα 1,2- και 1,3-διγλυκερίδια που υπήρχαν στο ελαιόλαδο. Με όλα αυτά τα δεδομένα έγινε δυνατή η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στην αντίστοιχη κατηγορία παρθένου ελαιολάδου βάσει του κώδικα τροφίμων και ποτών [5], αλλά και του κανονισμού ΕΟΚ αριθμού 2568/91 [6]. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά του ελαιολάδου που προκλήθηκαν κατά την αποθήκευση των δειγμάτων για έξι μήνες σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Όσον αφορά την οξύτητα του δείγματος, παρατηρήθηκε ότι η οξύτητα παραμένει σταθερή στο διάστημα έξι (6) μηνών για όλα τα δείγματα, παραμένοντας ίση με 0,8%. Έτσι το δείγμα όσο αφορά την οξύτητα εντάσσεται στην κατηγορία εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων.

Ο αριθμός υπεροξειδίων, αν και ευαίσθητος παράγοντας που παρουσιάζει έντονες μεταβολές σε μη ενδεικνυόμενους τρόπον αποθήκευσης, παρέμεινε επίσης εντός ορίων της πιο πάνω κατηγορίας για όλα τα δείγματα. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού υπεροξειδίων στα δείγματα, και κυρίως σε αυτά που αποθηκεύτηκαν στους 25 °C. Συνεπώς για αυτό τον παράγοντα προτιμάται η αποθήκευση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ανεξαρτήτου αρχικού δείγματος (ΣΠΕ ή CONTROL).

Κατά την φασματοφωτομετρική εξέταση του δείγματος, παρουσιάστηκαν επίσης μεταβολές, όχι όμως ικανές για να αλλάξουν την κατηγοριοποίηση του δείγματος, σε χαμηλότερης ποιότητας κατηγορίας. Σε αυτή την ανάλυση, παρατηρήθηκε αύξηση της σταθεράς  $K_{232}$  σε όλα τα δείγματα, με πιο έντονη αύξηση να φανερώνεται στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 25 °C. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε επίσης αύξηση στις τιμές της σταθεράς  $K_{268}$ . Και σε αυτή την περίπτωση τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C έχουν χαμηλότερες τιμές της σταθεράς  $K_{268}$ . Τέλος, η ΔΚ δεν παρουσίασε κάποια διαφορά στις τιμές της.

Όσον αφορά τα FAMES, καταλήξαμε στο γεγονός πως δεν παρουσιάζονται μεταβολές στους 6 μήνες ζωής ενός εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου.

Στον φαινολικό προσδιορισμό παρατηρήθηκε μείωση της συνολικής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα τέσσερα (4) χρονικά σημεία, κάτι αναμενόμενο εφόσον οι φαινολικές ενώσεις είναι πολύ ευαίσθητες. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκε μείωση σε όλες τις ενώσεις, αλλά στη συνολική συγκέντρωση. Ενώσεις όπως η υδρόξυτυροσόλη παρουσίασαν αύξηση της συγκέντρωσης τους με το πέρασμα του χρόνου. Το γεγονός αυτό είναι λογικό, εφόσον οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να αλληλομετατραπούν ή να υδρολυθούν σε άλλες φαινολικές ενώσεις, παραδείγματος χάριν η ελαιουρωπαΐνη. Το δείγμα με τη χαμηλότερη διατηρησιμότητα σε αυτή την ανάλυση ήταν το CONTROL 25 °C.

Συνεχίζοντας με τον προσδιορισμό χρωστικών ενώσεων και τοκοφερολών, παρουσιάστηκε μείωση και στις 5 ενώσεις οι οποίες είχαν αρχικά ανιχνευθεί στα δείγματα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη λουτεΐνη και το σκουαλένιο, τα δείγματα ΣΠΕ παρουσίασαν τις μικρότερες μειώσεις. Επίσης, η θερμοκρασία αποθήκευσης έπαιξε ρόλο, αφού τα δείγματα στους 4 °C είχαν μικρότερες μεταβολές από τα αντίστοιχα στους 25 °C. Όσον αφορά τις τοκοφερόλες, κατά τον προσδιορισμό της τοκοφερόλης-α τα δείγματα διαχωρίστηκαν βάσει θερμοκρασίας, εφόσον ανεξαρτήτως διήθησης, τα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί στους 4 °C παρουσίασαν μικρότερες μειώσεις στη συγκέντρωσή τους. Οι τοκοφερόλες-β και -γ που προσδιορίστηκαν μαζί εφόσον συνεκλούνται παρουσίασαν μια γενική μείωση, χωρίς κάποιο διαχωρισμό



ανάμεσα στα δείγματα. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις, το σκουαλένιο είχε συγκεντρώσεις 2500-1100ppm στα δείγματα. Στις τοκοφερόλες, όπως ήταν αναμενόμενο παρουσιάστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην τοκοφερόλη -α της τάξεως των 200ppm, ενώ οι τοκοφερόλες-β και -γ είχαν συγκεντρώσεις στα 20ppm. Τέλος, η λουτεΐνη παρουσίασε συγκεντρώσεις 0,5-1ppm.

Κατά τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων 1,2- και 1,3- στα δείγματα παρατηρήθηκε ότι ο λόγος 1,2 προς 1,3-διγλυκεριδίων μειώνεται με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό ήταν κάτι αναμενόμενο, εφόσον αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι με το πέρασμα του χρόνου τα 1,2-διγλυκερίδια ισομερίζονται στα πιο σταθερά 1,3-διγλυκερίδια [4]. Έτσι, παρατηρείται μια παρόμοια πορεία όλων των δειγμάτων ανεξαρτήτως διήθησης (πατέντα) ή θερμοκρασίας αποθήκευσης.

Τέλος, κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο των δειγμάτων παρατηρήθηκε μια μείωση στα χαρακτηριστικά φρουτώδες και πικρό. Ταυτόχρονα, δεν παρουσιάστηκε κανένα ελάττωμα σε όλα τα δείγματα στην περίοδο των έξι μηνών. Το γεγονός ότι τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4 °C είχαν υψηλότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, δείχνει ότι η διατηρησιμότητα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία.

Από τα πιο πάνω καταλήγουμε στο γεγονός ότι κύριος παράγοντας για τις μεταβολές στα χαρακτηριστικά του ελαιολάδου που προσδιορίστηκαν είναι η θερμοκρασία αποθήκευσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα δείγματα διαχωρίζονται βάσει αυτής, προδίδοντας μεγαλύτερη διατηρησιμότητα στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C. Επιπλέον, τα δείγματα που υπέστησαν διήθηση με καταχωρημένη μέθοδο (πατέντα) παρουσίασαν μεγαλύτερη σταθερότητα. Το δείγμα με τη χειρότερη διατηρησιμότητα ήταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το CONTROL 25 °C.

Καταλήγοντας, η παρούσα έρευνα διάρκειας 6 μηνών που κλείνει με τα πιο πάνω συμπεράσματα, μπορεί να δώσει έναυσμα για περαιτέρω μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου. Με τη συνέχεια της έρευνας αυτής για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα ήταν δυνατή η περαιτέρω παρατήρηση

των μεταβολών που συμβαίνουν κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου με το πέρασμα του χρόνου σε πολλά επίπεδα.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 24: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Beam splitter	Διαμοιραστής δέσμης
Blanks	Λευκά δείγματα
Calibrant	Διάλυμα βαθμονόμησης
Collision cell	Κυψελίδα συγκρούσεων
Confidence level	στάθμη εμπιστοσύνης
Control	Δείγμα μη διηθημένο με την καταχωρισμένη μέθοδο (πατέντα)
External calibration	Εξωτερική βαθμονόμηση
Fatty acid methyl esters	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
Free Fatty Acids	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
Gas chromatography with flame ionization detector	Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας
High performance liquid chromatography with diode array detector	Υψηλής πίεσης υγροχρωματογραφία με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων
Internal calibration	Εσωτερική βαθμονόμηση
Lampante	Μειονεκτικό παρθένο ελαιόλαδο
Liquid-bonded-phase	Υγρή-συνδεδεμένη-φάση
Mass spectrometry	Φασματομετρία μάζας

Mobile phase	Κινητή φάση
Olea Europea	Ελαία Ευρωπαϊκή
One-way ANOVA	στατιστικός έλεγχος με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα
Peak score	Λόγος εμβαδόν προς ένταση κορυφής
Quadrupole	Τετράπολο
Quality control samples	Δείγματα ελέγχου ποιότητας
Reversed Phase Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης
Sample splitter	Διαμοιραστής δείγματος
Splittles injection	Ένεση χωρίς διαμοιρασμό
Stationary phase	Στατική φάση
Suspect Screening	Σάρωση «ύποπτων» ενώσεων
Target list	Λίστα στοχευμένων ενώσεων
Target Screening	Σάρωση Στοχευμένων ενώσεων
Temperature programming	Προγραμματισμός θερμοκρασίας
Time of flight	Αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης
Ultra-high performance liquid chromatography	Υγροχρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής πίεσης

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 25: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

<b>Ακρωνύμια</b>	<b>Ανάπτυξη ακρωνύμιων</b>
bbCID	Broadband Collision Induced Dissociation
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoro-acetamide trimethylchlorosilane
COI	International Olive Council
EFSA	European Food Safety Authority
ESI	Electrospray ionization
FAMES	Fatty Acid Methyl Esters
FFA	Free Fatty Acids
GC-FID	Gas Chromatography with Flame Ionization Detector
HPLC-DAD/PDA	High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector
QC	Quality control samples
QSRR	Μοντέλου πρόβλεψης χρόνου
RP-UHPLC-QTOF-MS/MS	Ultra-High Performance Reversed Phase Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry
SPE	Solid phase extraction
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΣΠΕ	Σταθερό Παραγόμενο Ελαιόλαδο



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] D. Boskou, *Olive Oil, Chemistry and Technology.*, vol. 2, pp. 41-63, 2006.
- [2] R. W. Owen *et al.*, "Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants," *Lancet Oncol.*, vol. 1, no. 2, pp. 107–112, Oct. 2000.
- [3] H. Kelebek, S. Kesen, and S. Selli, "Comparative study of bioactive constituents in Turkish olive oils by LC-ESI/MS/MS," *Int. J. Food Prop.*, pp. 2231-2245, 2015.
- [4] Χ. Προεστός, "Ελαιόλαδο Ισχυρισμοί Υγείας και Ποιοτικά Χαρακτηριστικά," in *Σημειώσεις Μαθήματος Ανάλυσης Τροφίμων*, 2018.
- [5] "Άρθρο 71: Εδώδιμα λίπη και έλαια," in *Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων Κοινής χρήσης*, αρ. 23, Γενικό Χημείο Κράτους, 2017.
- [6] European Commission, "COMMISSION REGULATION (EEC) No 2568/91," *Off. J. Eur. Communities*, 1991.
- [7] J. M. Lou-Bonafonte, C. Arnal, M. A. Navarro, and J. Osada, "Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development," *Molecular Nutrition and Food Research.*, pp. 1043-1057, 2012.
- [8] R. Mailer, "Chemistry and quality of olive oil," *Prime facts*, 2006.
- [9] A. Quintero-Flórez, L. Sinausia Nieva, A. Sánchez-Ortíz, G. Beltrán, and J. S. Perona, "The Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oil from Different Cultivars Is Determinant for Foam Cell Formation by Macrophages," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 6731-6738, 2015.
- [10] H. D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, *Food chemistry.*, pp. 920-921, 2009.
- [11] Γ. Ζαμπετακής, Π. Μαρκάκη, and Χ. Προεστός, *Χημεία Τροφίμων.*, Σταμούλης, pp. 35-67 2014.
- [12] N. Frega, F. Bocci, and G. Lercker, "High-resolution gas-chromatographic determination of diacylglycerols in common vegetable oils," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 70, pp. 175-177, 1993.



- [13] V. Kiosseoglou and P. Kouzounas, "The role of diglycerides, monoglycerides and free fatty acids in olive oil minor surface-active lipid interaction with proteins at oil-water interfaces," *J. Dispers. Sci. Technol.*, pp. 527-539, 1993.
- [14] C. Gertz and H. J. Fiebig, "Isomeric diacylglycerols - Determination of 1,2- and 1,3-diacylglycerols in virgin olive oil," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 108, no. 12, pp. 1066–1069, 2006.
- [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," *Nutr. Res. Rev.*, pp. 98-112, 2005.
- [16] R. W. Owen, R. Haubner, G. Würtele, W. E. Hull, B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, "Olives and olive oil in cancer prevention," *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 4, pp. 319-326, 2004.
- [17] S. H. Omar, "Oleuropein in olive and its pharmacological effects," *Sci. Pharm.*, vol. 78, no. 2, pp. 133–154, 2010.
- [18] Τσιμισίδου Μ, "Πολυφαινόλες και οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιολάδου," *Ελιά Ελαιόλαδο*, αρ. 3, pp. 53–57, 1998.
- [19] E. Antonini *et al.*, "Phenolic compounds and quality parameters of family farming versus protected designation of origin (PDO) extra-virgin olive oils," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 43, pp. 75–81, 2015.
- [20] S. Şahin, M. Bilgin, and M. U. Dramur, "Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods," *Sep. Sci. Technol.*, vol. 46, pp. 1829–1837, 2011.
- [21] N. Kalogeropoulos and M. Tsimidou, "Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils," *Antioxidants*, vol. 2, pp. 387-413, 2014.
- [22] H. L. Newmark, "Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 193-203, 1999.
- [23] D. Grigoriadou, A. Androulaki, E. Psomiadou, and M. Z. Tsimidou, "Solid

- phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil,” *Food Chem.*, vol. 105, pp. 675-680, 2007.
- [24] R. Ambra, F. Natella, S. Lucchetti, V. Forte, and G. Pastore, “ $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -carotene, lutein, squalene and secoiridoids in seven monocultivar Italian extra-virgin olive oils,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 5, pp. 538-545, 2017.
- [25] E. Psomiadou and M. Tsimidou, “Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 46, pp. 5132-5138, 1998.
- [26] E. Psomiadou and M. Tsimidou, “Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 4, pp. 722–727, 2002.
- [27] B. Gandul Rojas, L. Gallardo Guerrero, J. Garrido Fernández, and M. I. Mínguez Mosquera, “Control de pigmentos clorofilicos y carotenoides por HPLC en el aceite de oliva virgen,” *Grasas y Aceites*, pp. 56-60, 2010.
- [28] E. Psomiadou and M. Tsimidou, “Pigments in Greek virgin olive oils: Occurrence and levels,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 7, pp. 640–647, 2001.
- [29] X. Li and S. C. Wang, “Shelf Life of Extra Virgin Olive Oil and Its Prediction Models,” *J. Food Qual.*, vol. 12, pp. 1-15, 2018.
- [30] International Olive Council, “Best practice guidelines for the storage of olive oils and olive-pomace oils for human consumption,” 2019. [Online]. Available: <http://www.internationaloliveoil.org>.
- [31] E. Pagliarini, B. Zanoni, and G. Giovanelli, “Predictive study on tuscan extra virgin olive oil stability under several commercial conditions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 4, pp. 1345-1351, 2000.
- [32] F. David, P. Sandra, and A. K. Vickers, “Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters,” *Food Anal. Appl. Palo Alto, CA Agil. Technol.*, 2005.

- [33] ISO, "ISO 29822:2009. Vegetable fats and oils-Isomeric diacylglycerols-Determination of relative amounts of 1,2- and 1,3-diacylglycerols," vol. 29822, 2009.
- [34] Γ. Ζαμπετάκης, Π. Μαρκάκη, and Χ. Προεστός, *Χημεία Τροφίμων*. Αθ Σταμούλης, pp. 78-85, 2014.
- [35] International Olive Council, "Sensory analysis of olive oil," vol. 15, no. 20, 2018.
- [36] European Council, "Regulation (EU) No 1308/2013 of 17 December 2013," *Off. Journal Eur. Union*, 2013.
- [37] N. P. Kalogiouri, "Development of High Resolution Mass Spectrometric Methods for the investigation of food authenticity," National and Kapodistrian University of Athens, 2018.
- [38] European Commission, "Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012," *Off. J. Eur. Union*, 2012.
- [39] N. P. Kalogiouri, R. Aalizadeh, and N. S. Thomaidis, "Investigating the organic and conventional production type of olive oil with target and suspect screening by LC-QTOF-MS, a novel semi-quantification method using chemical similarity and advanced chemometrics," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 23, pp. 5413-5426, 2017.
- [40] E. Mariotti and M. Mascini, "Determination of extra virgin olive oil acidity by FIA-titration," *Food Chem.*, vol. 73, pp. 235-238, 2001.
- [41] F. A. Iñón, J. M. Garrigues, S. Garrigues, A. Molina-Díaz, and M. De La Guardia, "Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares-attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy," *Anal. Chim. Acta*, vol. 489, pp. 59-75, 2003.
- [42] M. R. Balesteros, M. F. M. Ribeiro, T. V. S. J. L., F. C. Polachini, Y. Messaddeq, and M. A. L. de Oliveira, "Determination of olive oil acidity by CE," *Electrophoresis*, vol. 28, pp. 3731-3736, 2007.
- [43] T. Gutfinger, "Polyphenols in olive oils," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 58,

- pp. 966-968, 1981.
- [44] N. S. Thomaidis and C. A. Georgiou, "Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil iodine value," *Anal. Chim. Acta*, vol. 405, pp. 239-245, 2000.
- [45] I. Kosma *et al.*, "Characterization and Classification of Extra Virgin Olive Oil from Five Less Well-Known Greek Olive Cultivars," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 93, pp. 837-848, 2016.
- [46] D. Grigoriadou and M. Z. Tsimidou, "Quality control and storage studies of virgin olive oil: Exploiting UV spectrophotometry potential," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, pp. 61-69, 2006.
- [47] J. Gamazo-Vázquez, M. S. García-Falcón, and J. Simal-Gándara, "Control of contamination of olive oil by sunflower seed oil in bottling plants by GC-MS of fatty acid methyl esters," *Food Control*, vol. 14, pp. 463-467, 2003.
- [48] R. Mateos, M. M. Domínguez, J. L. Espartero, and A. Cert, "Antioxidant Effect of Phenolic Compounds,  $\alpha$ -Tocopherol, and Other Minor Components in Virgin Olive Oil," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 24, pp. 7170-7175, 2003.
- [49] M. I. Alarcón Flores, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, and J. L. Martínez Vidal, "Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Food Chem.*, vol. 4, pp. 2465-2472, 2012.
- [50] D. Alkan, F. Tokatli, and B. Ozen, "Phenolic characterization and geographical classification of commercial extra virgin olive oils produced in Turkey," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 89, pp. 262-268, 2012.
- [51] P. Andrewes, J. L. H. C. Busch, T. De Joode, A. Groenewegen, and H. Alexandre, "Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 5, pp. 1415-1420, 2003.
- [52] A. Bakhouché, J. Lozano-Sánchez, R. Beltrán-Debón, J. Joven, A.

- Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, “Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia,” *Food Res. Int.*, vol. 50, pp. 401-408, 2013.
- [53] M. Becerra-Herrera, M. Sánchez-Astudillo, R. Beltrán, and A. Sayago, “Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 57, pp. 49-57, 2014.
- [54] S. Vichi, N. Cortés-Francisco, and J. Caixach, “Insight into virgin olive oil secoiridoids characterization by high-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements,” *J. Chromatogr. A*, pp. 48-59, 2013.
- [55] T. Gomes, “Oligopolymer, diglyceride and oxidized triglyceride contents as measures of olive oil quality,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 69, no. 12, pp. 1219–1223, 1992.
- [56] F. Caponio, M. T. Bilancia, A. Pasqualone, E. Sikorska, and T. Gomes, “Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 221, no. 1–2, pp. 92–98, 2005.
- [57] D. Skoog, F. Holler, and S. Crouch, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed. Κωσταράκη, pp. 944-959, 2007.
- [58] Ν. Θωμαΐδης, *Φασματομετρία Μαζών*. Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015.
- [59] Ν. Θωμαΐδης, *Σημειώσεις μαθήματος: Ενόργανη Ανάλυση II*. Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.
- [60] R. L. P. Lianda, L. D. O. Sant’ana, A. Echevarria, and R. N. Castro, “Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts,” *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012.
- [61] Hitachi High-Technologies Global, “Principle and Feature of Various Detection Methods.” [Online]. Available: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>.

[Accessed: 10-Apr-2019].

- [62] A. Kyriakopoulos, "Stable olive oil produced after filtration with 100% Cellular membrane," 1008334, 2014.