

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ.**

**« ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ »**

**ΤΑΧΙΝΟΜΗΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ
ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
NMR ΚΑΙ ΤΗ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ
ΕΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ
ΚΑΤΩΤΕΡΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**

Φ Ρ Α Γ Κ Α Κ Η Γ Ε Ω Ρ Γ Ι Α

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΝΤΑΗΣ ΦΩΤΗΣ

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
2002-2004**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	i
Κατάλογος Σχημάτων	iii
Κατάλογος Πινάκων	v
Ευχαριστώ	vii
Abstract	viii
Περίληψη	ix
Πρόλογος.....	x
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Λίπη και έλαια.....	1
1.2 Σύσταση του ελαιολάδου	2
1.3 Trans λιπαρά οξέα.....	5
1.4 Διαδικασίες εξαγωγής και τύποι ελαιόλαδου	6
1.4.1 Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο	6
1.4.2 Πυρηνέλαιο	6
1.4.3 Ραφινάρισμα.....	7
1.4.4 Απομαργαρίνωση (Χειμερινοποίηση).....	8
1.4.5 Υδρογόνωση.....	9
1.5 Παρθένο ελαιόλαδο.....	10
1.5.1 Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο.....	10
1.5.2 Αγνό ελαιόλαδο.....	10
1.5.3 Πυρηνέλαιο	10
1.6 Η νοθεία του έξτρα παρθένου ελαιολάδου	12
1.7 Αναλυτικές μέθοδοι για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας των ελαιολάδων.....	13
1.8 Αναλυτικές μέθοδοι για την ταξινόμηση των ελαιολάδων	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	18
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	18
2.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες.....	18
2.2 Παρασκευή αντιδραστηρίου φωσφιτυλίωσης.....	18
2.3 Δείγματα ελαιολάδων.....	19

2.4	Φάσματα NMR.....	19
2.5	Ποσοτικός προσδιορισμός διγλυκεριδίων, στερολών και ελεύθερων λιπαρών οξέων με τη φασματοσκοπία ^{31}P NMR.....	22
2.6	Ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του ελαιολάδου με τη φασματοσκοπία ^1H NMR.....	24
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	29
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	29
3.1	Προσδιορισμός των συστατικών των ελαιολάδων με τη φασματοσκοπία ^{31}P NMR.....	29
3.2	Προσδιορισμός των συστατικών των ελαιολάδων με τη φασματοσκοπία ^1H NMR	35
3.3	Ταξινόμηση των ελαιολάδων.....	41
3.4	Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA).....	41
3.4.1	Εφαρμογή της Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA) για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων.....	47
3.5	Ανάλυση Συστάδων (Cluster Analysis, C.A.).....	52
3.5.1	Ταξινόμηση των ελαιολάδων με τη μέθοδο της Ανάλυσης Συστάδων	56
3.6	Ανάλυση Διακριτότητας (Discriminant Analysis, D.A.).....	59
3.6.1	Ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων με τη μέθοδο Ανάλυσης Διακριτότητας	65
3.7	Έλεγχος νοθείας έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας.....	77
3.8	Αποστάσεις Mahalanobis.....	90
3.9	Συμπεράσματα	93
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Χημικοί τύποι των κυριότερων λιπαρών οξέων στο παρθένο ελαιόλαδο..	4
Σχήμα 1.2 Διεργασίες διεξαγωγής διαφόρων τύπων ελαιολάδων	11
Σχήμα 2.1 Φάσμα ^1H NMR, δείγματος ελαιολάδου	20
Σχήμα 2.2 Φάσμα ^{31}P NMR, δείγματος ελαιολάδου.....	21
Σχήμα 3.1 Μέσες τιμές της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), των 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs) των ολικών διγλυκεριδίων (TDGs), της οξύτητας και των στερολών των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων	33
Σχήμα 3.2 Μέσες τιμές των ποσοστών του λινολενικού, λινελαϊκού, ελαιικού και των κορεσμένων λιπαρών οξέων για κάθε κατηγορία ελαιολάδου	39
Σχήμα 3.3 Μέση τιμή του αριθμού ιωδίου (IV) για κάθε κατηγορία ελαιολάδου....	39
Σχήμα 3.4 Κατανομή F για μια πιθανότητα α , ν_1 και ν_2 είναι οι βαθμοί ελευθερίας	46
Σχήμα 3.5 Μεταβολή του λόγου D με τη διαφορά TDGs-Οξύτητα	51
Σχήμα 3.6 Ενδεικτικό δενδροδιάγραμμα	53
Σχήμα 3.7 Δενδροδιάγραμμα ταξινόμησης για τα ελαιόλαδα τεσσάρων κατηγοριών με τη στατιστική μέθοδο της Ανάλυσης Συστάδων. V=έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (κόκκινο), R=ραφιναρισμένα ελαιόλαδα (μπλε), L=λαμπάντε ελαιόλαδα (μοβ), P=πυρηγέλαια (φούξια).....	58
Σχήμα 3.8. Ενδεικτικό διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη ταξινόμηση των τριών ομάδων	63
Σχήμα 3.9 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων	68
Σχήμα 3.10 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου D.A. για τη ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων. Στο διάγραμμα φαίνεται η επιτυχής τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set), στις αντίστοιχες κατηγορίες	69
Σχήμα 3.11 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για την ταξινόμηση των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, πυρηγελαιών και έξτρα παρθένων ελαιολάδων.....	72
Σχήμα 3.12 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου D.A. για τη ταξινόμηση των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, πυρηγελαιών και έξτρα	

παρθένων ελαιολάδων. Στο διάγραμμα φαίνεται η επιτυχής τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set), στις αντίστοιχες κατηγορίες	73
Σχήμα 3.13 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για την ταξινόμηση των λαμπάντε ελαιολάδων, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων.....	75
Σχήμα 3.14 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου D.A. για τη ταξινόμηση των λαμπάντε ελαιολάδων, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Στο διάγραμμα φαίνεται η επιτυχής τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set), στις αντίστοιχες κατηγορίες.....	76
Σχήμα 3.15 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη μελέτη νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ραφινρισμένο ελαιόλαδο και πυρηνέλαιο σε ποσοστά 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 35% και 50% κ.β.....	85
Σχήμα 3.16 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη μελέτη νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ελαιόλαδο λαμπάντε σε ποσοστά από 1%, έως 20% κ.β	86
Σχήμα 3.17 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη μελέτη των αγνών ελαιολάδων	89

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Χημική μετατόπιση και ταυτοποίηση των κύριων κορυφών του φάσματος ^1H NMR του ελαιόλαδου	25
Πίνακας 3.1 Περιεκτικότητα (% w/w), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικά διγλυκερίδια (TDGs), λόγου D, στερολών και οξύτητας, 76 δειγμάτων για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων	29
Πίνακας 3.2 Περιεκτικότητα (% w/w) λιπαρών οξέων και αριθμός ιωδίου, 76 δειγμάτων για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων	35
Πίνακας 3.3 Σύνθετος πίνακας ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA)	46
Πίνακας 3.4 Διάταξη των μετρήσεων μιας μεταβλητής δειγμάτων για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων (ομάδες)	47
Πίνακας 3.5 Πίνακας της Ανάλυσης Διακύμανσης, 14 μεταβλητών, για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών των ελαιολάδων	49
Πίνακας 3.6 Ανάλυση Διακριτότητας. Οι τιμές των συντελεστών διάκρισης, οι τιμές του μέτρου Wilks' λ και το όριο ανοχής για κάθε μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων	66
Πίνακας 3.7 Ανάλυση Διακριτότητας. Οι τιμές των συντελεστών διάκρισης, οι τιμές του μέτρου Wilks' λ και το όριο ανοχής για κάθε μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων	70
Πίνακας 3.8 Ανάλυση Διακριτότητας. Οι τιμές των συντελεστών διάκρισης, οι τιμές του μέτρου Wilks' λ και το όριο ανοχής για κάθε μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των ελαιολάδων λαμπάντε, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων	74
Πίνακας 3.9 Περιεκτικότητα (% w/w), 1,2-διγλυκεριδίων(1,2 DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3 DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDGs), λόγου D, στερολών και οξύτητας από τα φάσματα ^{31}P -NMR για τα μείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας και για αγνά εμπορικά ελαιόλαδα	78
Πίνακας 3.10 Περιεκτικότητα (% w/w) λιπαρών οξέων και αριθμός ιωδίου από τα φάσματα ^1H NMR για τα μείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας και για αγνά εμπορικά ελαιόλαδα	81

Πίνακας 3.11 Αποστάσεις Mahalanobis των μειγμάτων του έξτρα παρθένου ελαιολάδου από το κεντροειδές του έξτρα παρθένου ελαιολάδου	90
Πίνακας 3.12 Αποστάσεις Mahalanobis από τα μείγματα του ελαιόλαδου λαμπάντε από το κεντροειδές του έξτρα παρθένου ελαιολάδου	90
Πίνακας 3.13 Αποστάσεις Mahalanobis των αγνών ελαιολάδων και των μειγμάτων έξτρα παρθένων ελαιολάδων - ραφιναρισμένων ελαιολάδων από το κεντροειδές των έξτρα παρθένων ελαιολάδων	91

Ευχαριστώ...

- 📖 Τον καθηγητή κ. Φώτη Νταή, για την ανάθεση της παρούσας διατριβής και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.
- 📖 Το τμήμα Χημείας και ιδιαίτερα την επιτροπή του ΕΠΕΑΕΚ Απομόνωσης και Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα, για την επιλογή και την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο άτομό μου.
- 📖 Την δρ. Σοφία Μητκίδου, για την συμβολή της να γίνει ένα δικό μου όνειρο πραγματικότητα.
- 📖 Τον δρ. Απόστολο Σπύρο, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και τις συμβουλές που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας.
- 📖 Τα παιδιά από το εργαστήριο Στέλλα Χριστοφορίδου, Άγγελο Φιλιππίδη, Βάγια Τσιρώνη και Γεωργία Βίγλη, για τις συμβουλές και την συμπαράσταση.
- 📖 Την οικογένειά μου, που είναι πάντα δίπλα μου σε όλα μου τα βήματα.
- 📖 Τους φίλους μου, που είναι παρών σε όλους του κύκλους της ζωής μου και για την κατανόησή τους εκείνες τις φορές που δεν μπορούσα να είμαι δίπλα τους.

Abstract

High field ^1H NMR (500 MHz) and ^{31}P NMR (202.2 MHz) spectroscopy was applied to the analysis of 76 samples from four grades of olive oils, namely 34 extra virgin olive oils from various regions of Greece, and from four different olive varieties, 13 samples of refined olive oils, 14 samples of lampante olive oils, and 15 samples of crude olive-pomace oil. Classification of the four grades of olive oils was achieved by two multivariate statistical methods applied to eight variables, the latter being determined upon analysis of the respective ^1H NMR and ^{31}P NMR spectra, and selected on the basis of the Fisher F ratios. The Hierarchical clustering (HCA) statistical procedure applied without any a priori hypothesis was able to group three out of four olive oil groups. Subsequent application of Discriminant Analysis to the eight selected variables of oils allowed the grouping of 76 samples according to their quality with only one error. The reliability of the model to classify the oils was assessed by its ability to correctly classify unknown samples. Different artificial mixtures of extra virgin olive-refined olive, extra virgin olive-lampante olive, and extra virgin olive-olive-pomace oils were prepared and analyzed by ^1H NMR and ^{31}P NMR spectroscopy. Subsequent Discriminant Analysis of the data allowed detection of adulteration as low as 1% w/w for crude olive-pomace oils, 3% w/w for refined olive oil, and 3% w/w for lampante olive oil. Further application of the classification/prediction model allowed the estimation of the % concentration of refined olive oil in six commercial pure olive oils purchased from supermarkets.

Keywords: ^1H NMR and ^{31}P NMR spectroscopy, extra virgin olive oil, refined olive oil, lampante olive oil, olive-pomace oil, hierarchical cluster analysis, discriminant analysis, adulteration of olive oil

Περίληψη

Η φασματοσκοπία ^1H και ^{31}P NMR εφαρμόστηκε σε 76 δείγματα τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων, που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο: 34 δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων διαφορετικής γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης, 14 δείγματα ελαιολάδων λαμπάντε, 13 δείγματα ραφιναρισμένων ελαιολάδων και 15 δείγματα πυρηνέλαιων. Η ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή δυο στατιστικών μεθόδων χρησιμοποιώντας οκτώ μεταβλητές, οι οποίες προέκυψαν μετά την ολοκλήρωση των φασμάτων ^1H και ^{31}P NMR. Η επιλογή των μεταβλητών έγινε λαμβάνοντας υπόψη τους λόγους F των μεταβλητών (Fisher test). Συγκεκριμένα, η στατιστική μέθοδος Ανάλυση Συστάδων εφαρμόστηκε χωρίς να υπάρχουν αρχικές υποθέσεις και ταξινόμησε τις τρεις από τις τέσσερις κατηγορίες δειγμάτων. Στη συνέχεια, οι οκτώ μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν και στη στατιστική μέθοδο Ανάλυση Διακριτότητας, όπου ταξινομήθηκαν επιτυχώς οι τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων. Η αξιοπιστία του στατιστικού μοντέλου για την ταξινόμηση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε ταξινομώντας "άγνωστα" δείγματα. Για αυτό το λόγο, παρασκευάστηκαν μείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με τις κατηγορίες των ελαιολάδων κατώτερης ποιότητας, λαμπάντε ελαιόλαδο, ραφιναρισμένα ελαιόλαδα, πυρηνέλαια, τα οποία και αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία ^1H και ^{31}P NMR. Τα μείγματα των ελαιολάδων τοποθετήθηκαν ως "άγνωστα", στα στατιστικά μοντέλα, που καταστρώθηκαν για την ταξινόμηση των ελαιολάδων. Παρατηρήθηκε ότι, με τη στατιστική μέθοδο της Ανάλυσης Διακριτότητας, ανιχνεύεται νοθεία σε ελαιόλαδο λαμπάντε και ραφιναρισμένο ελαιόλαδο, σε ποσοστά κάτω από 3%, ενώ για τα πυρηνέλαια το όριο ανίχνευσης νοθείας είναι γύρω στο 1%. Τέλος, μελετήθηκαν έξι αγνά ελαιόλαδα τα οποία αγοράστηκαν από τοπικά πολυκαταστήματα. Αποδείχθηκε ότι, τα στατιστικά μοντέλα που καταστρώθηκαν είναι σε θέση να προβλέψουν την % περιεκτικότητα του παρθένου ελαιολάδου σε πραγματικά δείγματα.

Λέξεις κλειδιά: ^1H NMR, ^{31}P NMR, έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, ραφιναρισμένο ελαιόλαδο, ελαιόλαδο λαμπάντε, πυρηνέλαιο, ανάλυση συστάδων, ανάλυση διακριτότητας, νοθεία έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ελαιόλαδο θεωρείται από τα αρχαία ακόμα χρόνια ευεργετικό για την υγεία του ανθρώπου. Ο Ιπποκράτης, πατέρας της Ιατρικής, το χρησιμοποιούσε για να επουλώνει τις πληγές. Το ελαιόλαδο όμως, έχει χρησιμοποιηθεί και για τον καλλωπισμό. Οι αθλητές αλείφονταν με ελαιόλαδο πριν αγωνιστούν για να φαίνεται το σώμα τους καλαίσθητο, ενώ το έπαθλο του νικητή ήταν ένα στεφάνι με κλαδί από ελιά. Γενικά, το ελαιόλαδο είναι πολύ διαδεδομένο στους Μεσογειακούς λαούς και ήθη και τα έθιμά τους είναι στενά συνυφασμένα, με τη χρήση του.

Στις μέρες μας η θεραπευτική και θρεπτική αξία του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου έχει αποδειχτεί μέσα από πολλές μελέτες. Έχει αποδειχτεί επιστημονικά ότι, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο που δεσπόζει στη μεσογειακή διατροφή, είναι υπεύθυνο για την καλή υγεία των κατοίκων της. Η υψηλή εμπορική αξία του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου είναι ο σημαντικότερος λόγος όπου γίνεται συχνά στόχος νοθείας με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας.

Η ίδρυση του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων, έθεσε τις προϋποθέσεις για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας των έξτρα παρθένων ελαιόλαδων και το διαχωρισμό τους από ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας. Βασιζόμενοι στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ελαιολάδων, καθώς και την χημική τους σύσταση, δημιουργήθηκαν τα όρια και οι κατηγορίες για το χαρακτηρισμό τους. Ο απώτερος στόχος είναι, η προστασία της υγείας του καταναλωτή και η αποφυγή από διάθεση στην αγορά, κατώτερης ποιότητας προϊόντα.

Στο εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR του Τμήματός μας, έχει αναπτυχθεί μια μοντέρνα τεχνική που στηρίζεται στη φασματοσκοπία ^{31}P και ^1H NMR για τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης των ελαιολάδων. Με τη φασματοσκοπία ^{31}P NMR προσδιορίζονται τα 1,2-διγλυκερίδια, τα 1,3-διγλυκερίδια, τα ολικά διγλυκερίδια, ο λόγος των 1,2-διγλυκεριδίων προς τα ολικά διγλυκερίδια (D), οι στερόλες και η ελεύθερη οξύτητα. Ενώ, με την επεξεργασία των φασμάτων ^1H NMR προσδιορίζονται τα κυριότερα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου, το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C18:1), τα πολυακόρεστα λινελαϊκό οξύ (C18:2) και λινολενικό οξύ (C18:3), καθώς και ο Αριθμός Ιωδίου ο οποίος υποδηλώνει την ακορεστότητα των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου.

Τα συστατικά που προσδιορίστηκαν με τη φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητές στις στατιστικές μεθόδους (χημειομετρία) με τις

οποίες πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία. Η Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA), εφαρμόστηκε προκειμένου να επιλεγούν οι κατάλληλες μεταβλητές (π.χ. 1,2 DGs, λιπαρά οξέα, κ.ά) για το διαχωρισμό των ελαιολάδων. Η Ανάλυση Συστάδων (Cluster Analysis), χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες μεταβλητές που προέκυψαν από την Ανάλυση Διακύμανσης, διαχώρισε μερικώς τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων. Αυτό κυρίως οφείλεται στο γεγονός ότι, αυτή η στατιστική μέθοδος δεν δέχεται αρχικές υποθέσεις, δηλαδή, ποιο δείγμα ανήκει σε ποια ομάδα, για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε μια ανώτερη πολυπαραμετρική στατιστική μέθοδος, η Ανάλυση Διακριτότητας (Discriminant Analysis). Με αυτή τη μέθοδο ταξινομήθηκαν επιτυχώς οι τέσσερις κατηγορίες ελαιολάδων, χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες μεταβλητές που προέκυψαν από την Ανάλυση Διακύμανσης. Παράλληλα, για την επιβεβαίωση της αξιοπιστίας όλων των στατιστικών μοντέλων που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν τεστ εγκυρότητας.

Δεδομένου ότι, τα στατιστικά μοντέλα που προέκυψαν για την μελέτη των ελαιολάδων ήταν έγκυρα, πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ανίχνευση νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με τα ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν δύο σειρές μειγμάτων έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ραφινρισμένα ελαιόλαδα και έξτρα παρθένων ελαιολάδων με πυρηνέλαια σε συγκεντρώσεις από 1%, έως 50% κ.β., καθώς και μείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ελαιόλαδο λαμπάντε από 1% έως και 20% κ.β. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν ένας συνδυασμός της φασματοσκοπίας NMR με τη χημειομετρία βασιζόμενοι στα στατιστικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν από την μελέτη ταξινόμησης των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων. Με τη μεθοδολογία αυτή, βρέθηκε ότι τα στατιστικά μοντέλα, είναι σε θέση να ανιχνεύσουν νοθεία ελαιόλαδου λαμπάντε σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο σε ποσοστά κάτω από 3% w/w, ραφινρισμένου ελαιολάδου σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο σε ποσοστά κάτω από 3% w/w και πυρηνέλαιο σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο σε ποσοστά γύρω στο 1% w/w.

Τέλος, προκειμένου να επαληθευτεί η αξιοπιστία των στατιστικών μοντέλων που προέκυψαν, μελετήθηκε η σύσταση των εμπορικών αγνών ελαιολάδων. Τα αγνά ελαιόλαδα διαθέτονται στο εμπόριο ως μείγμα παρθένου ελαιολάδου με ραφινρισμένο ελαιόλαδο. Από τη μελέτη των αγνών ελαιολάδων διαπιστώθηκε ότι, τα αγνά ελαιόλαδα δεν ταυτίζονται με τα ραφινρισμένα ελαιόλαδα και ότι αυτά, αναμιγνύονται περίπου με 65% παρθένο ελαιόλαδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λίπη και έλαια.

Η παγκόσμια κατανάλωση σε έλαια και λίπη τη δεκαετία του 1970 ήταν 41 εκατομμύρια τόνοι, είκοσι χρόνια αργότερα ο αριθμός αυτός διπλασιάστηκε και συνεχίζει να αυξάνει. Ειδικότερα, στο Δυτικό κόσμο η ημερήσια κατανάλωση σε θερμίδες, που προέρχονται από λιπαρές τροφές, αυξήθηκε κατά δέκα ποσοστιαίες μονάδες. Σε αυτά τα ποσοστά το 57% αντιστοιχεί σε βρώσιμα έλαια και λίπη, το 31% σε κρέας, πουλερικά, ψάρι και το 7% σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Από τα παραπάνω δεδομένα ένα μικρό μόνο μέρος τους περιλαμβάνει την κατανάλωση των απαραίτητων, για τον ανθρώπινο οργανισμό, λιπαρών οξέων.

Γενικά, τα λίπη είναι είτε ζωικής, είτε φυτικής προέλευσης, είναι στερεά στη θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα έλαια, κυρίως φυτικής προέλευσης στη θερμοκρασία δωματίου είναι υγρά. Τα πιο κοινά φυτικά έλαια παράγονται από σπόρους (έλαιο ζαφοράς, ηλιέλαιο, σησαμέλαιο, λινάρι), από κόκκους (φυστικέλαιο, σόγια), από σιτηρά (καλαμποκέλαιο, σιτέλαιο), φρούτα (αβοκάντο, ελιά) και από το ενδοκάρπιο (αμυγδαλέλαιο, καρυδέλαιο, ινδικό καρυδέλαιο, φοινικέλαιο). Τα λίπη και τα έλαια αποτελούνται από μόρια λιπαρών οξέων τα οποία χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τα κορεσμένα, τα μονοακόρεστα και τα πολυακόρεστα. Όλοι οι τύποι λιπών και ελαίων είναι ο συνδυασμός των παραπάνω τριών τύπων λιπαρών οξέων.

Σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτικά έλαια η παραγωγή του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου αντιστοιχεί, σε ένα μικρό ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής της τάξης 2-2,5%. Η οικονομική του, όμως σπουδαιότητα έναντι άλλων φυτικών ελαίων όπως σογιέλαιο, ηλιέλαιο, οφείλεται στα εξαιρετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (άρωμα, γεύση), καθώς επίσης και από την θρεπτική και θεραπευτική του αξία του.¹ Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι, το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο θεωρείται σαν "φυσικός χυμός φρούτου" από τη στιγμή που παράγεται από την κατεργασία της ελιάς μόνο με φυσικούς τρόπους (άλεσμα, πολτοποίηση, φυγοκέντριση, φιλτράρισμα).²

Στα τέλη της δεκαετίας του '90 πραγματοποιήθηκε στη Ρώμη συνέδριο, από επιστημονικά μέλη της Ευρωπαϊκής Κοινότητας και του Συμβουλίου της Παγκόσμιας Έρευνας και αποδείχθηκε ότι, η Μεσογειακή δίαιτα, με κύρια πηγή διατροφής, το

έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, παίζει σημαντικό ρόλο στην καλή υγεία των κατοίκων της. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχτηκε ότι η κατανάλωση έξτρα παρθένου ελαιολάδου μπορεί να αποτρέψει τις καρδιακές παθήσεις, την αθηροσκλήρωση, την αύξηση της πίεσης, το διαβήτη, την παχυσαρκία και ορισμένες μορφές καρκίνου (δέρματος, μαστού, εντέρων).³⁻⁵

Η υψηλή θρεπτική αξία του έξτρα παρθένου ελαιολάδου αποδίδεται στη χημική του σύνθεση, η οποία περιλαμβάνει κυρίως τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και σε μικρότερες ποσότητες τριτερπενικά οξέα, φωσφολιπίδια, ανθοκυάνες, στερόλες, φαινόλες, ανώτερες αλκοόλες και τοκοφερόλες. Ιδιαίτερη σημασία για την αξία του ελαιόλαδου, ως πηγής λιπαρών οξέων αποδίδεται στην παρουσία των μονοϋποκατεστημένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (ελαϊκό οξύ) και των φαινολών, οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική του δράση. Η εμπορική αξία του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεθόδων νοθείας με έλαια χαμηλότερης οικονομικής σημασίας όπως το σπορέλαιο, το ραφίναρισμένο ελαιόλαδο κ.ά.^{6,7}

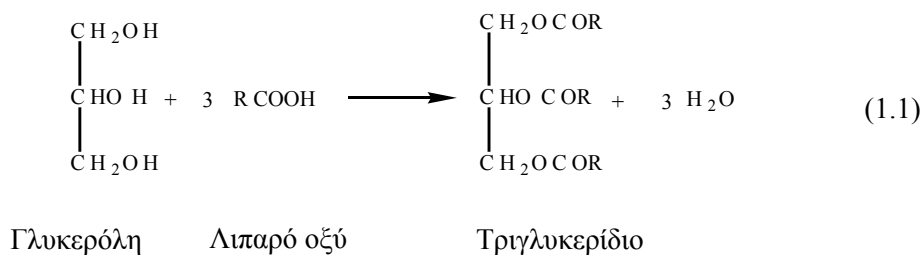
1.2 Σύσταση του ελαιολάδου.

Τα συστατικά του ελαιολάδου κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες :

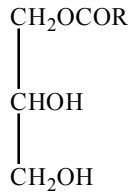
- α) Τα συστατικά του σαπωνοποιημένου τμήματος του λαδιού
- β) Τα συστατικά του μη σαπωνοποιημένου (ασαπωνοποίητου) τμήματος του λαδιού

1.2.1. Τα σαπωνοποιημένα συστατικά του ελαιολάδου αποτελούν, περίπου το 97-99% του βάρους του και είναι σχεδόν κατά αποκλειστικότητα γλυκερίδια (μόνο-, δι- και κυρίως τριγλυκερίδια)

Με την εστεροποίηση της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα, συνήθως μακράς αλυσίδας (κορεσμένων ή ακόρεστων), σχηματίζονται οι αντίστοιχοι εστέρες της γλυκερόλης κατά την αντίδραση 1.1 :



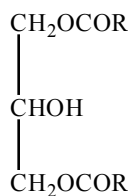
Οι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα ονομάζονται ακυλο γλυκερόλες ή απλά γλυκερίδια. Διακρίνονται σε μονοακυλο γλυκερόλες ή μονογλυκερίδια, διακυλο γλυκερόλες ή διγλυκερίδια και τριακυλογλυκερόλες ή τριγλυκερίδια. Παρακάτω φαίνονται τα μόνο- και διγλυκερίδια.



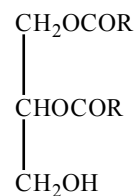
1-μονοακυλο γλυκερόλη



2-μονοακυλο γλυκερόλη



1,3-διακυλο γλυκερόλη

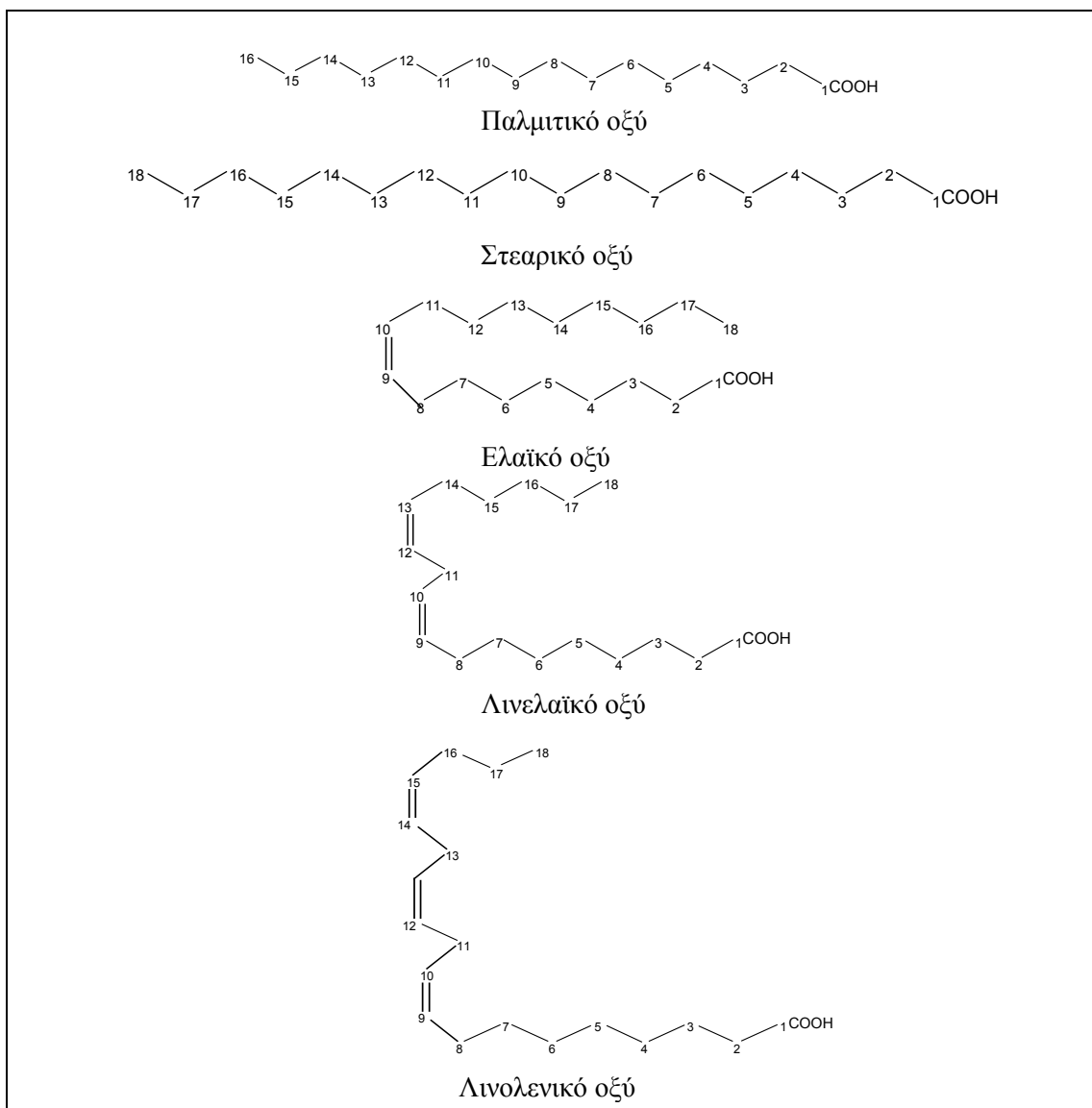


1,2-διακυλο γλυκερόλη

Αν οι ακυλομάδες ανήκουν στο ίδιο λιπαρό οξύ, το τριγλυκερίδιο είναι απλό. Συνηθέστερα όμως τα λιπαρά οξέα είναι διαφορετικά και το τριγλυκερίδιο είναι σύνθετο.⁸ Γενικά το παρθένο ελαιόλαδο αποτελείται από πέντε κύρια λιπαρά οξέα που μπορούν να δώσουν 5^3 πιθανούς συνδυασμούς, δηλαδή 125 διαφορετικά μόρια τριγλυκεριδίων.⁹

Από τους τρεις τύπους γλυκεριδίων σημαντικότερα είναι τα τριγλυκερίδια σε ποσοστό 97-99% στο ελαιόλαδο. Τα διγλυκερίδια περιέχονται σε ποσοστό 1-3%, ενώ τα μονογλυκερίδια <0,3%. Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων του ελαιολάδου συνίσταται από ακόρεστα οξέα. Το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C18:1) περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα (55-83%). Το δεύτερο κατά σειρά (3,5-21%), ακόρεστο λιπαρό οξύ είναι το λινελαϊκό οξύ (C18:2) και το τρίτο κατά σειρά (<0,9%) είναι το λινολενικό οξύ (C18:3). Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα συναντώνται στο ελαιόλαδο σε πολύ μικρές ποσότητες σε ποσοστό μικρότερο του 0,9% όπως το αραχιδονικό οξύ (C20:4) και το παλμιτολεϊκό οξύ (C16:1).

Από τα κορεσμένα οξέα σε μεγαλύτερο ποσοστό συναντάται το παλμιτικό (C16:0) σε ποσοστό 7,5-20% και το στεατικό (C18:0), 0,5-5%. Σε ίχνη συναντώνται το μυριστικό (C14:0), λαουρικό (C12:0) και αραχιδικό (C20:0).¹⁰ Οι χημικοί τύποι των κυριότερων λιπαρών οξέων φαίνονται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1 Χημικοί τύποι των κυριότερων λιπαρών οξέων στο παρθένο ελαιόλαδο.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα εστεροποιούν κατά προτίμηση το δευτεροταγές υδροξύλιο της γλυκερόλης *sn*-2. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα απαντούν μόνο στις θέσεις *sn*-1,3.^{6,11,12}

Γενικά, τα τριγλυκερίδια είναι υπεύθυνα για τις βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ελαίων, δηλαδή για τη συμπεριφορά τους σε σχέση με το ιξώδες, τους οξειδωτικούς παράγοντες, το δείκτη διάθλασης και τον αριθμό σαπωνοποίησης.

Επομένως, η μελέτη της γλυκεριδικής σύστασης των φυτικών ελαίων θεωρείται θεμελιακή για την πιστοποίηση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους.¹³

1.2.2. Το ασαπωνοποίητο μέρος του ελαιολάδου φθάνει μέχρι 1% και περιέχει τα λεγόμενα ήσσονα συστατικά του. Αυτά επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του και κυρίως το άρωμα, τη γεύση και τη σταθερότητα έναντι της οξειδωσης από ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Οι ενώσεις αυτές είναι οι εξής: ¹³ οι τοκοφερόλες, οι οποίες αποτελούν σημαντική πηγή της βιταμίνης E (τοκοφερόλη-α), οι φαινόλες ή φαινολικά οξέα ή πολυφαινόλες, οι οποίες ασκούν αντιοξειδωτική δράση (όπως και οι τοκοφερόλες), οι στερόλες, από τις οποίες σε μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκεται η β-σιτοστερόλη, υδρογονάνθρακες, όπως το σκουαλένιο και το β-καροτένιο, τερπενικές αλκοόλες, οι οποίες συνηγορούν στην απομάκρυνση της χοληστερίνης, φωσφολιπίδια, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων προέρχεται από τον πυρήνα του ελαιοκάρπου, χρωστικές ουσίες, όπως χλωροφύλλη και καροτενοειδή, τα οποία προστατεύουν το ελαιόλαδο από τη φωτο-οξειδωση και τέλος, οι αρωματικές ενώσεις.

1.3 *Trans* λιπαρά οξέα.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που απαντώνται στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο παρουσιάζουν κυρίως *cis* στερεοχημεία στους διπλούς δεσμούς.^{6,7} Ελαιόλαδα, όμως που έχουν υδρογονωθεί, ή έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, εμφανίζουν σε κάποιο ποσοστό *trans* στερεοχημεία στα περιεχόμενα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα συνήθως, απαντώνται σε ραφινρισμένα ελαιόλαδα μαργαρίνες και μαγειρικά λίπη. Τα *trans* λιπαρά οξέα, συμπεριφέρονται διαφορετικά μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Ουσιαστικά, αυτή η αλλαγή της στερεοχημείας τους έχει σαν αποτέλεσμα, μόνο το μισό τμήμα του μορίου να μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένζυμα ή με τις κυτταρικές μεμβράνες, ενώ το υπόλοιπο μισό, αδυνατώντας να τις διαπεράσει καταλαμβάνει το χώρο παρεμποδίζοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία των απαραίτητων για τον οργανισμό, *cis* λιπαρών οξέων.

Τα *trans* λιπαρά οξέα, παραμένουν στερεά στη θερμοκρασία του σώματος, δεν διασκορπίζονται εύκολα ανάμεσα στα κύτταρα και δημιουργούν συσσωματώματα. Γενικά, ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα αποικοδομήσει εύκολα, με συνέπεια να εμφανίζονται σοβαρές επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Εξαιτίας της διαφορετικής στερεοχημείας τους, τα *trans* λιπαρά οξέα, δεν μπορούν να απορροφήσουν πρωτεΐνες πλούσιες σε θείο και οξυγόνο, συστατικά απαραίτητα για

τη σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η παρουσία τους σε μεγάλο ποσοστό στις τροφές, έχει σαν τελικό αποτέλεσμα, την αύξηση της χοληστερόλης στο αίμα, οδηγώντας στην αθηροσκλήρωση, καθώς και την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου.³⁻⁵

1.4 Διαδικασίες εξαγωγής και τύποι ελαιόλαδου.

1.4.1 Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.¹⁴

Το πρώτο στάδιο από το οποίο περνά ο ελαιόκαρπος από τη στιγμή που θα φθάσει στο ελαιοτριβείο είναι ο καθαρισμός του από φύλλα, χώματα και πέτρες. Αυτό γίνεται για να μην αποκτήσει το ελαιόλαδο πικρίζουσα γεύση. Το δεύτερο στάδιο είναι το πλύσιμο του ελαιοκάρπου με νερό ώστε να απομακρυνθούν οι ξένες ύλες που μεταφέρει, όπως η σκόνη. Το τρίτο στάδιο είναι η σύνθλιψη και η έκθλιψη του ελαιοκάρπου. Μέσα σε μηχανήματα με οδοντωτούς τροχούς, ή άλλους τρόπους θρυμματίζεται η ελαιοσάρκα και ο πυρήνας. Στη συνέχεια ακολουθεί η μάλαξη του πολτού, το ανακάτεμα της ελιάς, με την παρουσία ζεστού νερού. Η μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας πρέπει να είναι 25 °C. Η θέρμανση της ελαιοζύμης, κατά τη μάλαξη είναι απαραίτητη διότι διευκολύνει την εξαγωγή του ελαιολάδου από τα φυτικά κύτταρα, μειώνοντας το ιξώδες και συντελεί στη συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων σε μεγαλύτερες σταγόνες λαδιού. Ακολουθεί η εξαγωγή του λαδιού με πίεση, φυγοκέντριση ή διύλιση. Έτσι γίνεται ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη. Τελευταίο στάδιο είναι το φιλτράρισμα και ο καθαρισμός του λαδιού. Το ελαιόλαδο περνάει από τον ελαιοδιαχωριστήρα, όπου διαχωρίζεται τελικά το ελαιόλαδο από τα απόνερα και τις ξένες ύλες. Σε όλα τα παραπάνω στάδια εξαγωγής του ελαιολάδου σημειώνεται ότι, πρέπει να αποφεύγεται κατά το δυνατό η επαφή της ελαιοζύμης με τον ατμοσφαιρικό αέρα, διότι υπάρχουν απώλειες στα αρωματικά συστατικά του και αυξάνεται η πιθανότητα έναρξης της οξειδωτικής τάγγισης.

1.4.2 Πυρηνέλαιο.¹³

Το ελαιόλαδο που αποχωρίζεται από την ελαιοζύμη των υδραυλικών πιεστηρίων ή τη λάσπη των φυγοκεντρικών διαχωριστήρων, ονομάζεται πυρηνέλαιο. Τα διάφορα στάδια επεξεργασίας των ελαιοπυρήνων είναι η ξήρανση, η λειοτρίβηση και η εκχύλιση. Πιο αναλυτικά, οι υγροί ελαιοπυρήνες έχουν λιποφοβικές ιδιότητες και θα πρέπει να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο ποσοστό της υγρασίας, ώστε να διευκολυνθεί η απολίπανση η οποία επιτυγχάνεται με την ξήρανση. Στη συνέχεια οι ελαιοπυρήνες λειοτριβούνται, προκειμένου να δημιουργηθεί μεγαλύτερη ενεργή

επιφάνεια για το επόμενο στάδιο της επεξεργασίας της, την εκχύλιση. Αυτό το στάδιο είναι και το πιο σημαντικό καθώς, ο τρόπος διεξαγωγής της και η εκλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι παράγοντες που επηρεάζουν το ποσοστό της απόδοσης σε πυρηνέλαιο, αλλά καθορίζουν την ποιότητά του. Οι πιο συνήθεις διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των ελαιοπυρήνων είναι ο διθειάνθρακας, το τριχλωροαιθυλένιο και η βενζίνη. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των διαλυτών είναι η απολικότητά που εξασφαλίζει τη χημική συγγένεια με τις λιπαρές ουσίες προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερο ποσοστό προϊόντος κατά την εκχύλιση.

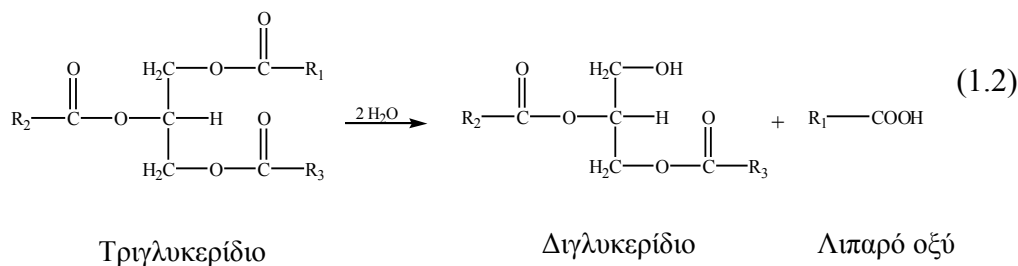
1.4.3 Ραφινάρισμα.¹³

Ο όρος ραφινάρισμα, υποδηλώνει μια σειρά από διεργασίες εξευγενισμού που υπόκεινται τα υποβαθμισμένα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (λαμπάντε), τα πυρηνέλαια και σχεδόν όλα τα σπορέλαια, με σκοπό αυτά να γίνουν βρώσιμα. Το ραφινάρισμα περιλαμβάνει κυρίως τρία στάδια.

1. την απαλλαγή από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα
2. τον αποχρωματισμό και
3. την απόσμηση

Απώτερος σκοπός των παραπάνω διεργασιών είναι να μην προκαλέσουν αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων.

1. Το πρώτο στάδιο του ραφινάρισματος είναι και το πιο σημαντικό, καθώς η απαλλαγή από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα καθορίζει εάν ένα ελαιόλαδο είναι βρώσιμο ή όχι. Γενικά η ελεύθερη οξύτητα είναι το κατεξοχήν κριτήριο της ποιότητας ενός ελαιόλαδου. Η ελεύθερη οξύτητα στο ελαιόλαδο οφείλεται στη δράση του ενζύμου της λιπάσης, κατά την οποία υδρολύονται οι εστερικοί δεσμοί στις θέσεις *sn-1*, *sn-3* του μορίου της γλυκερόλης. Τα προϊόντα από τη δράση του ενζύμου είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και διγλυκερίδια που σχηματίζονται κατά τον ακόλουθο τρόπο.



Η απομάκρυνση των ελεύθερων λιπαρών οξέων μπορεί να γίνει με τους παρακάτω τρόπους.

- Εξουδετέρωση με διάλυμα αλκαλίου, οπότε τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε σάπωνες
- Εστεροποίηση με γλυκερόλη, οπότε τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια.
- Απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση, οπότε τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, παρασύρονται με ρεύμα υδρατμών.
- Εκχύλιση με ορισμένους διαλύτες
- Εκλεκτική προσρόφηση.

Από τις παραπάνω μεθόδους, η εξουδετέρωση με διαλύματα αλκαλίων είναι αυτή που βρίσκει την μεγαλύτερη εφαρμογή, ενώ ως σύνηθες αλκαλικό διάλυμα χρησιμοποιείται το καυστικό νάτριο.

2. Το επόμενο στάδιο του ραφινάρισματος περιλαμβάνει τον αποχρωματισμό, διαδικασία κατά την οποία απομακρύνονται οι φυσικές χρωστικές του ελαιολάδου. Αυτό εξυπηρετεί κυρίως καταναλωτικούς σκοπούς, από τη στιγμή που επιζητείται τα ραφινάρισμα ελαιόλαδα να είναι άχρωμα. Ο αποχρωματισμός επιτυγχάνεται τόσο με χημικά μέσα, όπως θειικό οξύ, θειώδη άλατα, όσο και με φυσικά μέσα, όπως φυσικές γαίες αποχρωματισμού, ενεργός άνθρακας, γη διατόμων και υψηλές θερμοκρασίες.

3. Το τελευταίο στάδιο του ραφινάρισματος είναι η απόσπηση. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνονται τα προϊόντα οξειδωτικής διάσπασης, που προέρχονται, κυρίως από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι ουσίες αυτές είναι πτητικές και ευθύνονται για την δυσάρεστη γεύση του ελαιολάδου καθώς και για την υποβάθμιση της ποιότητάς του, μειώνοντας δραστικά την εμπορική του αξία. Η απόσπηση συνήθως πραγματοποιείται με απόσταξη υπό κενό, όπου συμπυκνώνονται όλες οι πτητικές ουσίες, σε θερμοκρασίες 180-240 °C και σε πίεση 3 mbar.

1.4.4 Απομαργαρίωση (Χειμερινοποίηση).¹³

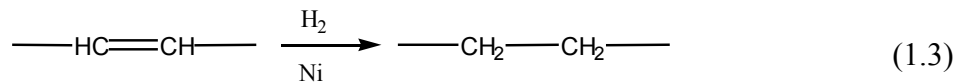
Μια ακόμα διεργασία εξευγενισμού του ελαιόλαδου είναι η χειμερινοποίηση η οποία εφαρμόζεται σε ελαιόλαδα που έχουν αυξημένα ποσοστά τριγλυκεριδίων. Ελαιόλαδα αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν χαμηλό σημείο πήξεως λόγω της αυξημένης ύπαρξης των τριγλυκεριδίων. Τα ελαιόλαδα αυτά, εκτείθονται σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου τα τριγλυκερίδια πήζουν και σχηματίζουν κρυστάλλους, οι οποίοι τέλος απομακρύνονται με φυγοκέντριση ή με διήθηση. Σκοπός αυτής της διεργασίας είναι η αποφυγή του θολώματος του ελαιολάδου κατά την παραμονή, που οφείλεται

στην πήξη των τριγλυκεριδίων και η βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους.

1.4.5 Υδρογόνωση.

Το υποβαθμισμένα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (λαμπάντε) και συχνά τα πυρηνέλαια έπειτα από τον πλήρη εξευγενισμό τους, υπόκεινται σε μερική υδρογόνωση, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μαργαρινών, μαγειρικών λιπών κ.ά. Η υδρογόνωση αποτελεί μια χημική επεξεργασία που αποσκοπεί στην μετατροπή των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου, σε κορεσμένα.¹⁴ Κατά την υδρογόνωση οι διπλοί δεσμοί μειώνονται και παράλληλα ένα μέρος από τους εναπομείναντες διπλούς δεσμούς των λιπαρών οξέων, αναπόφευχτα ισομερίζεται από *cis* σε *trans*. Με τη διεργασία αυτή αυξάνεται το σημείο τήξεως των ελαιολάδων, όπου μεταβάλλεται η φυσική κατάστασή τους από υγρή σε στερεή, και αυξάνεται η αντοχή τους στην οξείδωση.¹⁵ Η φυσική τους κατάσταση προσδιορίζεται από τον αριθμό των ακόρεστων δεσμών ανά τριγλυκερίδιο. Γενικά, στα ελαιόλαδα η ρευστότητα και η ακορεστότητα συμβαδίζουν ενώ παράλληλα, η αντοχή στην οξείδωση και η ακορεστότητα βρίσκονται σε αντίστροφη σχέση.¹³

Ο όρος υδρογόνωση, υποδηλώνει την προσθήκη υδρογόνου στους διπλούς δεσμούς, παρουσία καταλύτη κυρίως ενεργού νικελίου, κατά τη γενική αντίδραση:



Η υδρογόνωση επιζητείται να είναι μερική, διαφορετικά το ελαιόλαδο οδηγείται σε υπερβολική σκλήρυνση κάτι που είναι ανεπιθύμητο. Συνήθως πραγματοποιείται σε στάδια όπου αρχικά υδρογονώνεται ο ένας από τους τρεις διπλούς δεσμούς του λινολενικού οξέος, σε επόμενο στάδιο, ο ένας από τους δύο διπλούς δεσμούς του λινελαϊκού οξέος και τέλος ο μοναδικός διπλός δεσμός του ελαϊκού οξέος. Σκοπός είναι το τελικό προϊόν να έχει ένα συγκεκριμένο βαθμό ακορεστότητας ή αριθμό ιωδίου, ο οποίος και μετριέται κατά τα στάδια της διεργασίας.¹³

Οι διεργασίες στις οποίες υπόκεινται ο καρπός της ελιάς μέχρι το τελικό στάδιο παραγωγής του ελαιολάδου, έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία κατηγοριών ελαιολάδου ανάλογα με την οξύτητα και τον τρόπο επεξεργασίας τους. Το Παγκόσμιο Συμβούλιο Ελαιολάδου⁸ και η Ευρωπαϊκή Ένωση¹⁶ με αποφάσεις που βασίζονται σε

ορισμένα ποιοτικά κριτήρια και χαρακτηριστικά κατατάσσει το ελαιόλαδο στις παρακάτω κατηγορίες.

1.5 Παρθένο ελαιόλαδο.

Αυτό παραλαμβάνεται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικά ή φυσικά μέσα και κατά την παραλαβή του εφαρμόζονται συνθήκες οι οποίες δεν προκαλούν αλλοιώσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του. Το ελαιόλαδο αυτό δεν έχει υποβληθεί σε καμιά επεξεργασία εκτός από πιθανή μετάγγιση, φυγοκέντριση και διήθηση.^{2,6,8}

Το παρθένο ελαιόλαδο περιλαμβάνει τους εξής τύπους :

α) **Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο.** Είναι έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με άμεμπτη γεύση και οσμή και μέγιστη οξύτητα μικρότερη από 0,8 % w/w σε ελαϊκό οξύ.

β) **Εκλεκτό παρθένο ελαιόλαδο.** Είναι παρθένο ελαιόλαδο με άμεμπτη γεύση και οσμή και με μέγιστη οξύτητα μικρότερη από 2,0 % w/w σε ελαϊκό οξύ.

γ) **Παρθένο ελαιόλαδο - Κουράντε.** Είναι το παρθένο ελαιόλαδο με καλή γεύση και οσμή και με οξύτητα 3,3 % w/w σε ελαϊκό οξύ.

δ) **Ελαιόλαδο υποβαθμισμένο (lampante).** Είναι παρθένο ελαιόλαδο με κακή γεύση και οσμή και οξύτητα μεγαλύτερη από 3,3 % w/w σε ελαϊκό οξύ. Η οξύτητα του μπορεί να φθάσει μέχρι 8,0% w/w. Το ελαιόλαδο αυτό χρησιμοποιείται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση και όχι για κατανάλωση.

1.5.1 Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο.

Είναι το ελαιόλαδο το οποίο παραλαμβάνεται από παρθένο ελαιόλαδο με ραφινάρισμα. Κατά το ραφινάρισμα δεν προκαλούνται αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων. Η μέγιστη οξύτητα είναι 0,5 % w/w σε ελαϊκό οξύ.

1.5.2 Αγνό ελαιόλαδο.

Είναι μείγμα παρθένου ελαιολάδου, κατάλληλου για κατανάλωση και ραφιναρισμένου ελαιολάδου. Συνήθως χρησιμοποιούνται προσμίξεις σε διάφορες αναλογίες παρθένου ελαιολάδου και ραφιναρισμένου ελαιολάδου. Η μέγιστη οξύτητα είναι 1,5 % w/w σε ελαϊκό οξύ.

1.5.3 Πυρηνέλαιο.

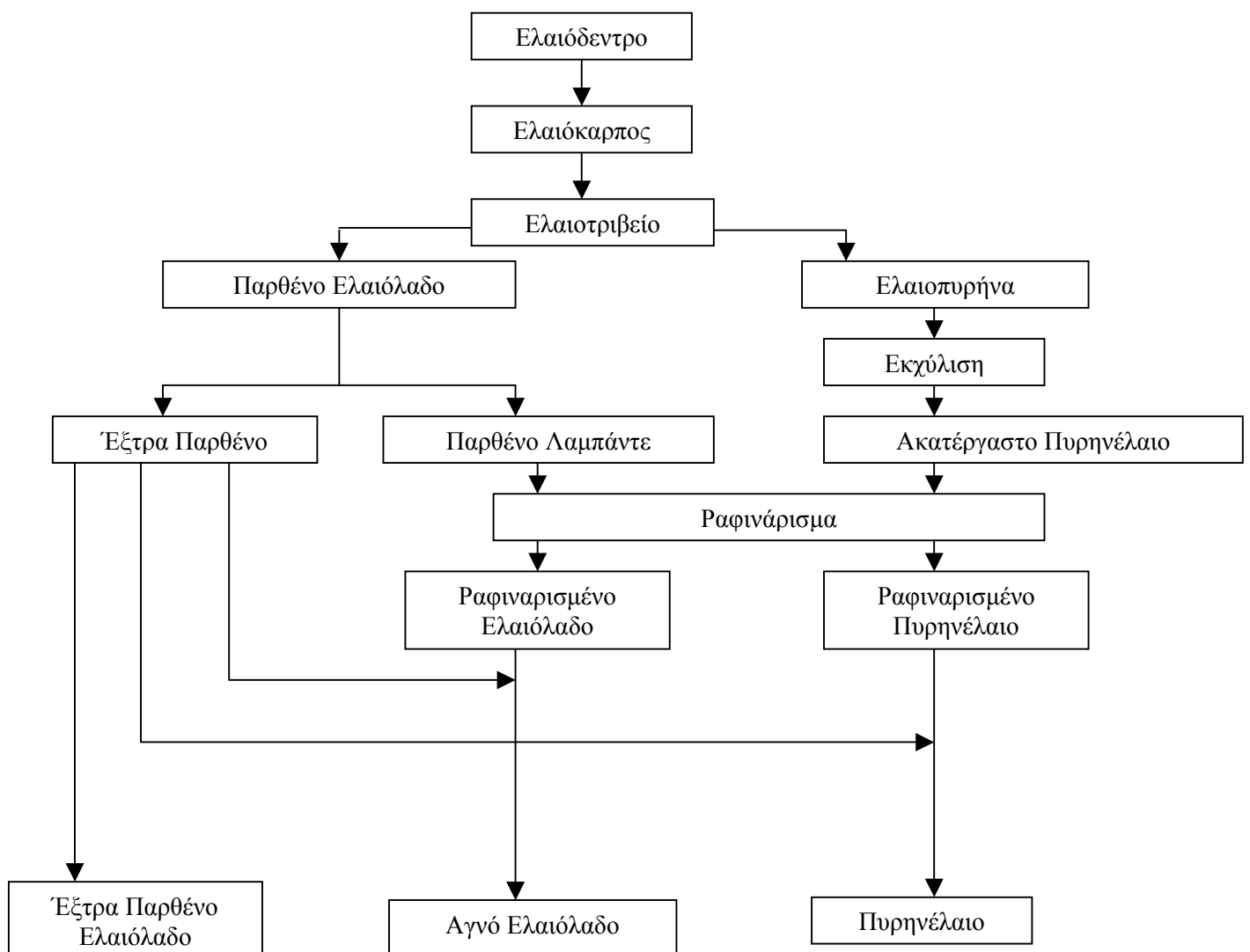
Το πυρηνέλαιο περιλαμβάνει τις ακόλουθες κατηγορίες :

α) **Ακατέργαστο πυρηνέλαιο.** Είναι το πυρηνέλαιο το οποίο δεν έχει υποστεί επεξεργασία και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βρώση, όπως είναι.

β) **Ραφινρισμένο πυρηνέλαιο.** Είναι το πυρηνέλαιο που παραλαμβάνεται από το ακατέργαστο με ραφινάρισμα, χωρίς αλλαγές στην αρχική δομή των γλυκεριδίων. Η μέγιστη οξύτητα είναι 0,5 % w/w σε ελαϊκό οξύ.

γ) **Ραφινρισμένο πυρηνέλαιο και ελαιόλαδο.** Είναι μείγμα ραφινρισμένου πυρηνελαίου και έξτρα παρθένου ελαιολάδου, κατάλληλο για κατανάλωση. Η μέγιστη οξύτητα είναι 1,5 % w/w σε ελαϊκό οξύ.⁸

Με βάση την οξύτητα το ελαιόλαδο, διακρίνεται σε τρώφιμο, όταν η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ είναι έως 3,3 % w/w σε ελαϊκό οξύ και σε βιομηχανικό όταν η οξύτητα είναι μεγαλύτερη από 3,3 % w/w σε ελαϊκό οξύ. Σχηματικά, τα επιμέρους στάδια εξαγωγής του ελαιολάδου, καθώς και οι κατηγορίες ελαιολάδων παρουσιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 1.2 Διεργασίες διεξαγωγής διαφόρων τύπων ελαιολάδων.

1.6 Η νοθεία του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου.

Η νοθεία σε καταναλωτικά αγαθά έχει τις ρίζες της από τα αρχαία χρόνια. Η πρώτη ιστορική καταγραφή νοθείας, έγινε από τον Κάτωνα, όπου αναφέρει τη νόθευση κρασιού. Αν και πολλά καταναλωτικά αγαθά νοθεύονταν, π.χ. το πιπέρι με χαλίκια και κλαδιά, το κρασί και το γάλα με νερό, η νοθεία ως μέσον οικονομικής απάτης αρχίζει να γίνεται αισθητή από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα, όπου παρατηρούνται νοθείες με τοξικές ουσίες, όπως το κίτρινο βούτυρο, το οποίο θεωρείται καρκινογόνο. Η εσκεμμένη νόθευση των καταναλωτικών προϊόντων εμφανίστηκε συστηματικά και αυξήθηκε ραγδαία με την αντίστοιχη ραγδαία εξέλιξη των σύγχρονων βιομηχανιών παραγωγής καταναλωτικών προϊόντων.⁹

Η θεμελίωση της Χημείας Τροφίμων σαν επιστημονικού κλάδου, οδήγησε στην ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών και θεσμοθετημένων ορίων, για την ανίχνευση νοθείας. Ωστόσο είναι γνωστό ότι οι ίδιες τεχνικές και η επιστημονική γνώση χρησιμοποιούνται και από τους εμπόρους προκειμένου η νοθεία που πραγματοποιούν να βρίσκεται κάτω από τα ανιχνεύσιμα όρια. Συνεπώς οι αρχές που ελέγχουν και πιστοποιούν την ποιότητα και την αυθεντικότητα των τροφίμων, επιβάλλεται αναπτύσσουν συνεχώς νέες βελτιωμένες μεθόδους, έτσι ώστε να ανιχνεύεται η νοθεία και παράλληλα να προστατεύονται τα δικαιώματα του καταναλωτή.⁹

Η πιστοποίηση της αυθεντικότητας των φυτικών ελαίων κατά την εμπορική τους διάθεση είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας, τόσο για οικονομικούς λόγους, όσο και για λόγους υγείας των καταναλωτών. Η υψηλότερη οικονομική και θρεπτική αξία του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου σε σχέση με άλλα βρώσιμα έλαια είναι και οι κύριοι λόγοι, που τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα γίνονται συχνά στόχος νοθείας. Το γνωστό τοξικό Ισπανικό σύνδρομο τη δεκαετία του 1980, είχε σαν αποτέλεσμα 20.000 άτομα να νοσήσουν και 400 να βρουν το θάνατο μετά από κατανάλωση ελαίου που είχε υποστεί επεξεργασία με ανιλίνη.¹⁷

Η πιστοποίηση όμως, της αυθεντικότητας του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου περιλαμβάνει πολλές παραμέτρους όπως, (i.) τη νοθεία με σπορέλαια ή/και με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας (π.χ. ραφινρισμένα, εστεροποιημένα ελαιόλαδα), (ii.) το χαρακτηρισμό του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου ανάλογα με την επεξεργασία που έχει υποστεί (μη ραφινρισμένο ή σε φυγοκεντρικού τύπου ελαιοτριβεία) και (iii.) την πιστοποίηση της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης. Με αυτήν την πληθώρα πιθανών παραμέτρων και τη μεγάλη ποικιλία ανάμεσα στα είδη των

βρώσιμων ελαίων είναι κατανοητό το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την πιστοποίηση των ελαίων τα τελευταία 10 χρόνια.¹⁷

1.7 Αναλυτικές μέθοδοι για την πιστοποίηση της αυθεντικότητας των ελαιολάδων.

Η πιστοποίηση της αυθεντικότητας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου και η ανίχνευση νοθείας με έλαια χαμηλότερης οικονομικής αξίας, βασίζεται κυρίως στην ανάλυση της χημικής σύστασης του υπό εξέταση ελαίου και στη συνέχεια σύγκριση των αποτελεσμάτων που αποκτούνται, με τις τιμές που έχουν θεσπιστεί για τη χημική σύσταση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου από την Ευρωπαϊκή Ένωση¹⁶ και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων.⁸ Η ανίχνευση νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, μπορεί και να επιτευχθεί με την άμεση ανάλυση ενός συστατικού του. Οι κλασσικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό είναι η αέριος και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιώντας ανιχνευτή μαζών. Ωστόσο αυτή η διαδικασία μπορεί να δώσει και απατηλά αποτελέσματα δεδομένου ότι, η χημική σύσταση του ελαιολάδου εξαρτάται από μια πληθώρα εξωτερικών και εσωτερικών παραγόντων όπως η ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, οι κλιματολογικές συνθήκες, η σύσταση του εδάφους, οι αγροτικές πρακτικές, η αποθήκευση κ.ά. Επίσης είναι δυνατόν το υλικό νοθείας να έχει περίπου την ίδια σύσταση με το ελαιόλαδο (π.χ. φουντουκέλαιο) και να μην μπορεί να ανιχνευθεί με τις κλασσικές μεθόδους ανάλυσης.

Για παράδειγμα, οι μέθοδοι για την ανίχνευση νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με πυρηνέλαιο που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση¹⁶ βασίζονται κυρίως στον ποσοτικό προσδιορισμό των κηρών και των παραγώγων τους κατά την σαπωνοποίηση, όπου παράγονται αλειφατικές αλκοόλες μακριάς αλυσίδας C₂₂-C₂₈. Ουσιαστικά οι ελεύθερες και οι εστεροποιημένες αλκοόλες βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στους κηρούς των πυρηνελαίων από ότι στο παρθένο ελαιόλαδο, δεδομένου ότι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του ελαιολάδου από το πυρηνέλαιο είναι σε θέση να διαλύσουν και τους κηρούς που συγκεντρώνονται στο εξωκάρπιο του ελαιοκάρπου και δεν αποσπώνται από το λάδι. Παρόλα αυτά κάποια έξτρα παρθένα ελαιόλαδα που εξάγονται σε φυγοκεντρικού τύπου ελαιοτριβεία παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά σε κηρούς από ότι τα αναμενόμενα επίπεδα και μπορεί λανθασμένα να θεωρηθεί ότι έχουν νοθευτεί με

πυρηνέλαια.¹⁸ Ταυτόχρονα το ποσοστό σε κηρούς στα πυρηνέλαια μπορεί να μειωθεί εάν αυτά, υποστούν επεξεργασία παρόμοια της χειμερινοποίησης.^{19,20} Μια ακόμα μέθοδος ανίχνευσης νοθείας πυρηνελαίου σε παρθένο ελαιόλαδο είναι ο προσδιορισμός των αλειφατικών και τριτερπενικών αλκοολών και τριτερπενικών διαλκοολών όπως η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη. Το ποσοστό των τριτερπενικών αλκοολών δεν πρέπει να ξεπερνά το 4,5% των ολικών στερολών, καθώς υψηλότερες τιμές δηλώνουν πιθανή νοθεία με πυρηνέλαια. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από το ποσοστό της σύστασης των ελαίων σε αλκοόλες σε συνδυασμό με το ποσοστό των κηρών δίνουν περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα.¹⁷

Αντίστοιχα, η ανίχνευση νοθείας με ραφιναρισμένα ελαιόλαδα μπορεί να επιτευχθεί με την ανάλυση των στερολών. Ο αποχρωματισμός των ελαίων οδηγεί σε μερική αφυδάτωση των στερολών. Τα προϊόντα της αποσύνθεσης των στερολών είναι χαρακτηριστικά συστατικά των ελαίων που έχουν υποστεί ραφινάρισμα. Για παράδειγμα, το στιγματα-3,5-διένιο σχηματίζεται με αφυδάτωση της β-σιτοστερόλης στα φυτικά έλαια και το 3,5 χολησταδιένιο με αφυδάτωση της χοληστερίνης στα ζωικά λίπη.^{13,17} Μία ακόμα μέθοδος ανίχνευσης νοθείας με ραφιναρισμένα ελαιόλαδα, πραγματοποιείται με τον προσδιορισμό της απορρόφησης του φωτός στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος, με τη φασματομετρία υπεριώδους όπου προσδιορίζονται οι σταθερές K_{232} και $K_{268-270}$.¹³

Με τη φασματοσκοπία ^1H NMR, μπορεί να ανιχνευτεί η αυθεντικότητα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου από τον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων. Για παράδειγμα, περιεκτικότητα σε λινολενικό οξύ μεγαλύτερη από 0,9% υποδηλώνει πιθανή νοθεία με φυτικά έλαια.²¹ Ακόμα, η χρήση των λόγων της σύστασης του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα όπως προσδιορίζεται από τη φασματοσκοπία ^1H NMR μπορεί να διακρίνει το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο από μείγματά του, με φουντουκέλαιο και ηλιέλαιο.²² Η φασματοσκοπία ^{13}C NMR, μπορεί να δώσει πληροφορίες για την κατανομή των λιπαρών οξέων στο μόριο της γλυκερόλης.²³ Η εφαρμογή αυτής της μεθόδου δίνει πληροφορίες για τη νοθεία έξτρα παρθένου ελαιολάδου με συνθετικά εστεροποιημένα ελαιόλαδα.²⁴ Σε αυτά τα ελαιόλαδα εμφανίζεται τυχαία κατανομή των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις τρεις θέσεις του μορίου της γλυκερόλης. Ένα 33,3% κορεσμένων λιπαρών οξέων εστεροποιεί την θέση *sn2* του μορίου της γλυκερόλης. Μελέτες όμως, που έχουν γίνει στα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα αποδεικνύουν ότι στη θέση *sn 2* επικρατούν κυρίως τα

ακόρεστα λιπαρά οξέα σε ποσοστό 1,3%,²⁵ ενώ τα κορεσμένα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται κυρίως τις θέσεις *sn* 1 και *sn* 3 του μορίου της γλυκερόλης.²³

1.8 Αναλυτικές μέθοδοι για την ταξινόμηση των ελαιολάδων.

Οι συνηθέστερες μέθοδοι ανάλυσης των συστατικών των φυτικών ελαιολάδων είναι η αέρια χρωματογραφία και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα κριτήρια για την πιστοποίηση και την αυθεντικότητα των διαφόρων τύπου ελαίων, θεσπίστηκαν με την εφαρμογή αυτών των αναλυτικών μεθόδων. Οι χρωματογραφικές αναλυτικές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα των χαμηλών ορίων ανίχνευσης. Παρουσιάζουν όμως, μια σειρά από μειονεκτήματα: απαιτούν βαθμονόμηση με πρότυπες ουσίες, και απαιτούν προηγούμενη κατεργασία του δείγματος. Για παράδειγμα, η ανάλυση των τριγλυκεριδίων απαιτεί την απομόνωση του μη σαπωνωποιημένου τμήματος, την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και την εστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Αν και με τη μέθοδο αυτή έχουν ταξινομηθεί πολλές κατηγορίες ελαίων και έχουν ληφθεί πληροφορίες για την τριγλυκεριδική σύσταση των ελαιολάδων, πολλά από τα ήσσονα κυρίως συστατικά του δείγματος χάνονται.²⁶

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι παρουσιάζουν τα πλεονεκτήματα της μικρής διάρκειας του πειράματος, δεν είναι καταστροφικές, ενώ με ένα πείραμα είναι να δυνατόν να αποκτηθούν πληροφορίες για όλα σχεδόν τα συστατικά του ελαιολάδου. Ουσιαστικά, με αυτές τις μεθόδους λαμβάνονται πληροφορίες, σε μοριακό επίπεδο.⁹ Παράλληλα, η εφαρμογή της χημειομετρίας στα δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση των συστατικών των ελαίων, μπορεί να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για τη διάκριση ανάμεσα στους διάφορους τύπους των ελαιολάδων καθώς και πληροφορίες για πιθανή νοθεία. Σε αυτόν τομέα, εφαρμόζονται αρκετές πολυπαραμετρικές στατιστικές μέθοδοι, όπως η Ανάλυση Κυρίων Αξόνων, η Ανάλυση Διακριτότητας, η Ανάλυση Συστάδων κ.ά. Θεωρητικά, έπειτα από την εφαρμογή των στατιστικών συναρτήσεων διάκρισης, σε ένα αριθμό αναλυτικών δεδομένων, το στατιστικό μοντέλο που προκύπτει μπορεί επιτυχώς να διακρίνει κατηγορίες ελαιολάδων, αλλά και δείγματα τα οποία διαφέρουν από τα γνήσια, δηλαδή νοθεία.^{27,28}

Η πυρολιτική φασματομετρία μάζας έχει χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, από το φοινικέλαιο και ζωικά λίπη.^{29,30} Μελέτες με τις

φασματοσκοπίες υπερύθρου (FT-IR) και Raman έχουν δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ανίχνευση νοθείας μειγμάτων έξτρα παρθένου ελαιολάδου με πυρηνέλαια³¹ και αραβοσιτέλαια.³² Οι ίδιες τεχνικές σε συνδυασμό με τις στατιστικές αναλύσεις των Κυρίων Αξόνων και της Ανάλυσης Διακριτότητας ανίχνευσαν μείγματα του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου με φυτικά έλαια όπως φουντουκέλαιο³³ και ηλιέλαιο.³⁴ Ακόμα, ο συνδυασμός της φασματοσκοπίας ορατού και υπερύθρου με τις στατιστικές μεθόδους Ανάλυση Συστάδων, και των Ελαχίστων Τετραγώνων, διέκρινε νοθεία έως και $\geq 1\%$ σε μείγματα ηλιέλαιου σε παρθένο ελαιόλαδο.³⁵

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, ολοένα και κερδίζει έδαφος ανάμεσα στις άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές. Με τη φασματοσκοπία NMR έχουν ταυτοποιηθεί όλες οι κύριες άκυλο ομάδες (κορεσμένα ελαϊκό οξύ, λινελαϊκό οξύ λινολενικό οξύ)³⁶, καθώς και διάφορα ισομερή των λιπαρών οξέων με *cis/trans* στερεοχημεία τα οποία προκύπτουν ως παραπροϊόντα κατά την καταλυτική υδρογόνωση των ελαιολάδων για το σχηματισμό μαργαρινών.^{15,37} Με τη φασματοσκοπία ^1H NMR έχουν γίνει μελέτες για τα προϊόντα θερμικής διάσπασης, κυρίως υπεροξειδία και *trans* κορεσμένα λιπαρά οξέα, στα βρώσιμα ελαιόλαδα κατά την παρατεταμένη χρήση τους στο τηγάνισμα.³⁸⁻⁴¹ Ακόμα, η φασματοσκοπία ^1H NMR έχει δώσει πληροφορίες για τα ελάσσονα συστατικά του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου όπως β-σιτοστερόλη, n-αλκένια, πτητικά συστατικά.^{6,11,36} Ο συνδυασμός της ^1H NMR και ^{13}C NMR με τις στατικές αναλύσεις των Κυρίων Αξόνων και την Ανάλυση Συστάδων έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την γεωγραφική ταξινόμηση των παρθένων ελαιολάδων.^{2,22,42} Ακόμα, η μελέτη του μη σαπωνοποιούμενου τμήματος στο ελαιόλαδο με τη φασματοσκοπία ^{13}C NMR και τη στατιστική μέθοδο της Ανάλυσης Διακριτότητας έχει επιτυχώς διαχωρίσει τα παρθένα ελαιόλαδα από ραφινάρισμα ελαιόλαδα, αγνά ελαιόλαδα, και πυρηνέλαια.⁴³ Άλλες τεχνικές της φασματοσκοπίας όπως η SNIF-NMR έχουν χρησιμοποιηθεί με μικρή όμως επιτυχώς για την ταξινόμηση ελαίων και για την ανίχνευση νοθείας έξτρα παρθένου ελαιόλαδου με άλλα ελαιόλαδα.⁴⁴

Στο εργαστήριο μας, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μια νέα μέθοδος που χρησιμοποιεί τη φασματοσκοπία NMR του πυρήνα φωσφόρου-31 (^{31}P NMR) για τον προσδιορισμό ορισμένων ελασσόνων συστατικών του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου (διγλυκερίδια, στερόλες, πολυφαινόλες).^{45,46} Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια,

καρβοξύλια, αλδεϋδικά πρωτόνια) και στην ολοκλήρωση των κορυφών που οφείλονται στα φωσφυτυλιωμένα παράγωγα, στο φάσμα ^{31}P NMR. Η παραπάνω αναλυτική τεχνική εφαρμόστηκε σε ένα μεγάλο αριθμό έξτρα παρθένων ελαιολάδων από διάφορες περιοχές της Ελλάδας καθώς και σε διάφορα εμπορικά παρθένα ελαιόλαδα, ραφιναρισμένα ελαιόλαδα και πυρηνέλαια σε μία προσπάθεια να πιστοποιηθεί η ποιότητα του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου.⁴⁷ Αποδείχτηκε, ότι ο λόγος των 1,2-διγλυκεριδίων προς τα συνολικά διγλυκερίδια [$D = \frac{1,2\text{-διγλυκερίδια}}{1,2\text{-διγλυκερίδια} + 1,3\text{-διγλυκερίδια}}$] είναι ένας σημαντικός δείκτης για την ανίχνευση της ποιότητας των έξτρα παρθένων ελαιολάδων.^{47,48} Επιπλέον, ο ίδιος δείκτης μπορεί να διαχωρίσει έξτρα παρθένα ελαιόλαδα ($D \sim 0,90$) από ραφιναρισμένα ελαιόλαδα και πυρηνέλαια ($D \sim 0,33$). Η εξήγηση έγκειται στο γεγονός ότι τα ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας υφίστανται κατεργασία πριν την εμπορική τους διάθεση με αποτέλεσμα ο ισομερισμός των 1,2-διγλυκεριδίων σε 1,3-διγλυκερίδια να ευνοείται κάτι που εμφανίζει σημαντικά μειωμένη την τιμή του λόγου D ($\sim 0,33$).⁴⁷

Με τη φασματοσκοπία ^{31}P NMR και τις στατιστικές μεθόδους Ανάλυση των Κυρίων Αξόνων και Ανάλυση Διακριτότητας έχουν διακριθεί επιτυχώς 13 κατηγορίες εδώδιμων φυτικών ελαίων συμπεριλαμβανομένου και του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου.²⁷ Επίσης, με την ίδια μεθοδολογία ανιχνεύθηκε νοθεία έξτρα παρθένων ελαιολάδων με φουντουκέλαιο, ηλιέλαιο, αραβοσιτέλαιο και σογιέλαιο σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης.²⁷ Ακόμα, στο εργαστήριο μας έχουν ταξινομηθεί γεωγραφικά και βοτανολογικά ελληνικά έξτρα παρθένα ελαιόλαδα από τις περιοχές της Κρήτης, Πελοποννήσου, Λέσβου και Πηλίου, τριών συνεχόμενων ελαιοκομικών περιόδων προκειμένου να πιστοποιηθεί η περιοχή προέλευσης.⁴⁹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

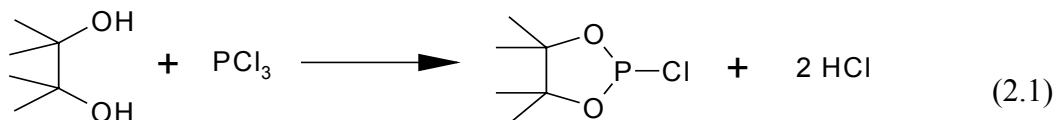
2.1 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες.

Ως διαλύτες NMR χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο CDCl_3 περιεκτικότητας 99,8% σε δευτέριο καθώς και δευτεριωμένη πυριδίνη καθαρότητας 99,5%. Οι παραπάνω διαλύτες αγοράστηκαν από τη Merck. Για την προστασία των διαλυμάτων προτύπων από την υγρασία χρησιμοποιήθηκαν Molecular SievesTM διαμέτρου οπών 0,5 nm και μεγέθους 2 mm οι οποίες αγοράστηκαν, επίσης, από την Merck. Η κυκλοεξανόλη (99%), η πινακόλη, η πυριδίνη, ο τριχλωριούχος φωσφόρος, το εξάνιο και το τρις(ακετυλοακετονικό) χρώμιο (97%) $[\text{Cr}(\text{acac})_3]$ αγοράστηκαν από την Aldrich.

2.2 Παρασκευή αντιδραστηρίου φωσφιτυλίωσης.

Το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλο-διοξαφωσφολάνιο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της βιβλιογραφίας, από την αντίδραση της πινακόλης με τριχλωριούχο φωσφόρο (εξ. 2.1).⁵⁰ Στο εργαστήριο μας έγιναν κάποιες αλλαγές με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Αντί για βενζόλιο χρησιμοποιήσαμε εξάνιο και στη θέση της τριαιθυλαμίνης τοποθετήσαμε πυριδίνη.

Σε δίλιαιμη σφαιρική φιάλη των 250 ml με ψυκτήρα και προσθετικό χοάνη των 100 ml προστέθηκαν 20 ml PCl_3 (0,1 mol=8.7 ml) διαλυμένα σε 180 ml n-εξανίου. Σε μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 23,7 gr πινακόλης, τα οποία διαλύθηκαν σε 32 ml πυριδίνης και 150 ml εξανίου. Η προσθήκη του διαλύματος πινακόλης γίνεται στάγδην, για μία ώρα υπό ανάδευση σε λουτρό πάγου γιατί η αντίδραση είναι εξώθερμη. Το μείγμα αφήνεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου να αντιδράσει και στη συνέχεια διηθήθηκε (με φίλτρο χαρτιού). Ακολουθεί έκπλυση του λευκού ιζήματος ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}\text{-Cl}$) που έχει σχηματιστεί με 100 ml εξάνιο. Το εξάνιο απομακρύνεται με απόσταξη από το διήθημα στους 30 °C και κατόπιν γίνεται απόσταξη του προϊόντος σε αντλία κενού. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν ~45% σε σύγκριση με το 19% της μεθόδου της βιβλιογραφίας.



2.3 Δείγματα ελαιολάδων.

Αναλύθηκαν 34 δείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου όπου προέρχονται από τοπικούς συνεταιρισμούς διαφόρων περιοχών της Ελλάδας. Τα 21 δείγματα των έξτρα παρθένων ελαιολάδων ήταν από την περιοχή της Κρήτης (Πεζιά, Κολυμπάρι, Ηράκλειο, Σητεία) τα 6 από την περιοχή της Λακωνίας, τα 3 από την περιοχή της Μεσσηνίας, 2 δείγματα από την περιοχή του Πηλίου, 1 δείγμα από την περιοχή της Λέσβου και 1 δείγμα από την Ηλεία. Τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα από την Κρήτη, τη Μεσσηνία και την Ηλεία προέρχονται από την ίδια ποικιλία ελαιοκάρπου, την Κορωνέϊκη. Το δείγμα της Λέσβου είναι διαφορετικής ποικιλίας (Κολοβή), ενώ τα δείγματα από τη Λακωνία προέρχονται από την ποικιλία της Αθηνολίας και τα δείγματα από το Πήλιο προέρχονται από μία τοπική ποικιλία. Όλα τα παραπάνω δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως έξτρα παρθένα ελαιόλαδα σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Παγκόσμιου Συμβουλίου Ελαιολάδου.⁸ Επίσης, αναλύθηκαν συνολικά 42 δείγματα ελαιολάδου κατώτερης ποιότητας προερχόμενα από την ευγενική χορηγία της ΜΙΝΕΡΒΑ, 14 δείγματα ελαιολάδου λαμπάντε, 13 δείγματα ραφινρισμένου ελαιολάδου και 15 δείγματα πυρηνελαίου. Τέλος, αναλύθηκαν 6 δείγματα αγνού ελαιολάδου, τα οποία αγοράστηκαν από τοπικά πολυκαταστήματα.

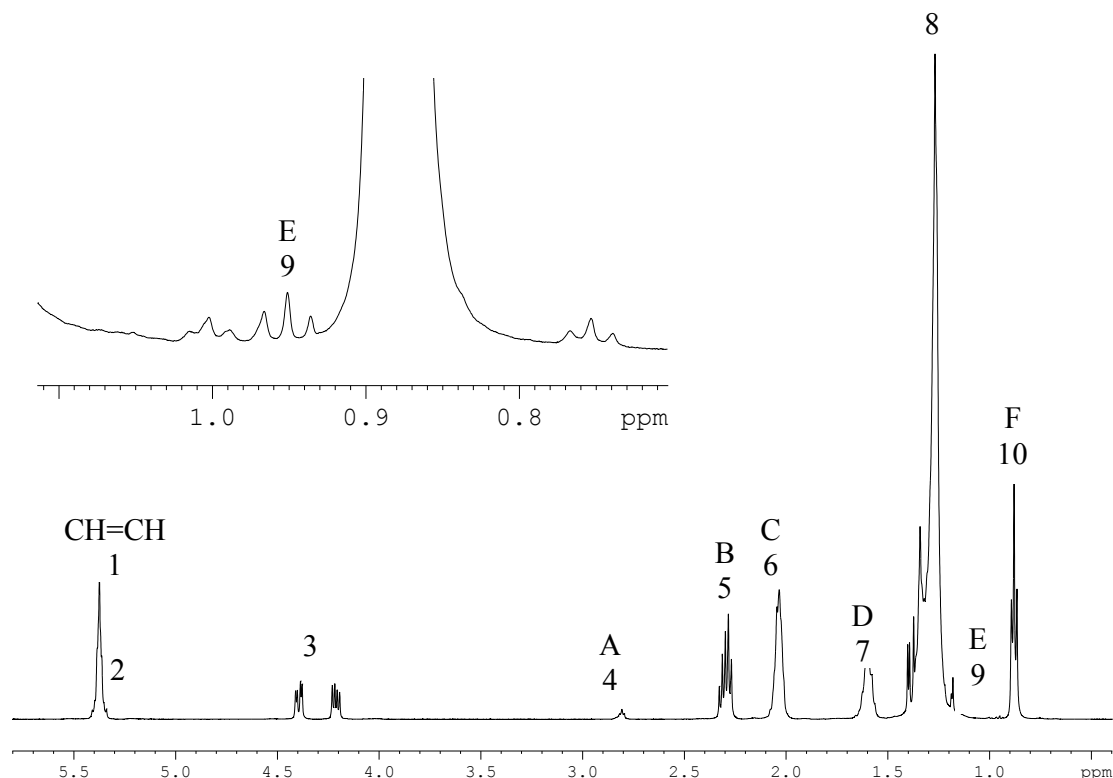
2.4 Φάσματα NMR.

Όλα τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker AMX500 λειτουργικής συχνότητας 500.1 MHz για το πρωτόνιο και 202.2 MHz για τον ³¹P. Η θερμοκρασία στο δοκιμαστή ήταν 30 ± 1 °C και ελέγχθηκε με τη χρήση διαγράμματος βαθμονόμησης με αιθυλενογλυκόλη.

Φάσματα ¹H NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα ¹H NMR ελήφθησαν με 16 k πραγματικά δεδομένα (data points). Για κάθε φάσμα ελήφθησαν 32 FID οι οποίες αποθηκεύθηκαν στη μνήμη του υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 4 ψευδοσαρώσεις (dummy

scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος αναμονής (relaxation delay) πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών ήταν 2 s. Μετά τον μετασχηματισμό Fourier έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος με ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και ακολούθησε διόρθωση φάσης μηδενικής και πρώτης τάξης. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων ^1H NMR αναφέρονται στην κλίμακα δ με πρότυπη ουσία αναφοράς το TMS (δ 0.0). Στο Σχήμα 2.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα πρωτονίου ενός δείγματος ελαιολάδου.



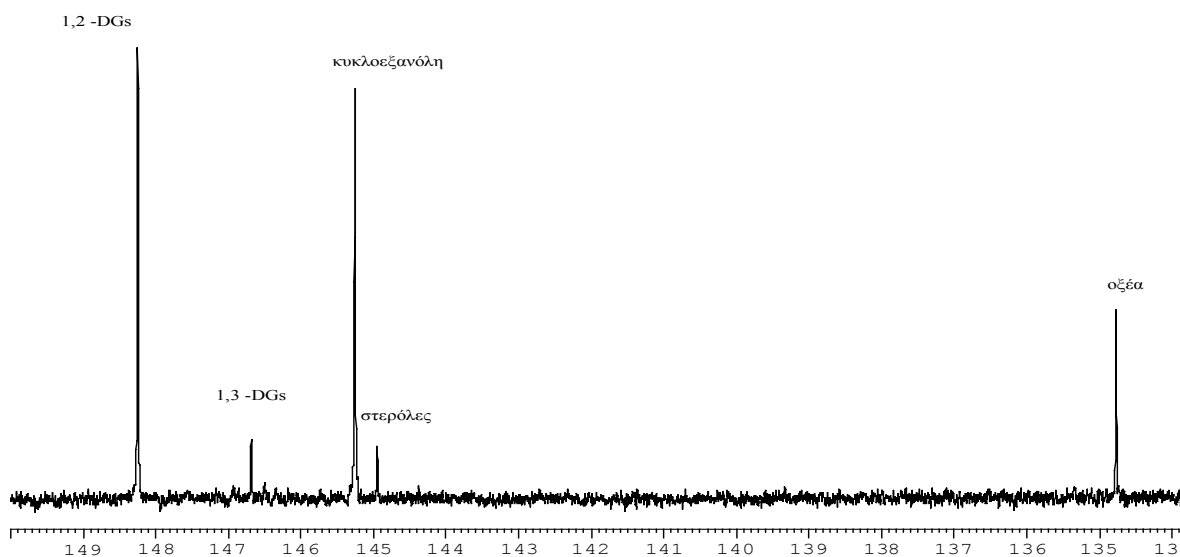
Σχήμα 2.1 : Φάσμα ^1H NMR δείγματος ελαιολάδου.

Οι ακριβείς χημικές μετατοπίσεις και η τατοποίηση των κορυφών στο φάσμα πρωτονίου θα αναφερθούν στη συνέχεια του κεφαλαίου.

Φάσματα ^{31}P NMR

Για τη λήψη ποσοτικών φασμάτων ^{31}P NMR, θα πρέπει να αποκλειστεί η αλληλεπίδραση NOE μεταξύ του πυρήνα του φωσφόρου και γειτονικών πρωτονίων των μορίων, διότι το NOE προκαλεί μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών με αποτέλεσμα να μην είναι ποσοτικά τα αντίστοιχα φάσματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αποσύζευξη αντίστροφης εισόδου (inverse gated

decoupling). Σύμφωνα με αυτή την τεχνική ο αποσυζευκτής πρωτονίων λειτουργεί μόνο κατά την διάρκεια του χρόνου ανάκτησης του σήματος, ενώ παραμένει κλειστός σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος. Για την ελάττωση των χρόνων αποδιέγερσης T_1 των πυρήνων ^{31}P χρησιμοποιήθηκε το παραμαγνητικό αντιδραστήριο $\text{Cr}(\text{acac})_3$, με αποτέλεσμα οι χρόνοι αποδιέγερσης να μην υπερβαίνουν τα 5 sec. Ο χρόνος αναμονής ήταν 30 s ίσος περίπου με $5T_1^{\text{max}}$, όπου T_1^{max} ο μεγαλύτερος χρόνος αποδιέγερσης σπιν-πλέγμα του φωσφόρου. Οι τυπικοί παράμετροι ενός πειράματος ^{31}P NMR για ποσοτικές μετρήσεις ήταν: εύρος παλμού 90° 12.5 μs , φασματικό εύρος 48.41 ppm, χρόνος αναμονής 30 s, αριθμός δεδομένων (data points) 16 k. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκαν 32 FIDs. Πριν από το μετασχηματισμό Fourier, η ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) πολλαπλασιάστηκε με μία εκθετική συνάρτηση με εκθέτη $\text{lb}=1$ Hz και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη μηδενικών 16 k στη μνήμη του υπολογιστή. Πριν από την ολοκλήρωση η γραμμή βάσης του φάσματος διορθώθηκε χρησιμοποιώντας ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και έγινε διόρθωση φάσης. Οι χημικές μετατοπίσεις σε ένα φάσμα ^{31}P NMR έχουν ως αναφορά την κορυφή η οποία οφείλεται στην φωσφιτυλίωση του νερού (υγρασία του δείγματος), η οποία παρουσιάζει μία στενή κορυφή σε δ 132.20. Στο Σχήμα 2.2 παρουσιάζεται το φάσμα ^{31}P NMR ενός δείγματος ελαιολάδου στην περιοχή που απορροφούν τα φωσφιτυλιωμένα διγλυκερίδια, οι στερόλες και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα μονογλυκερίδια δεν εμφανίζονται στο φάσμα γιατί βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση στο δείγμα ($\leq 0,3\%$ w/w).

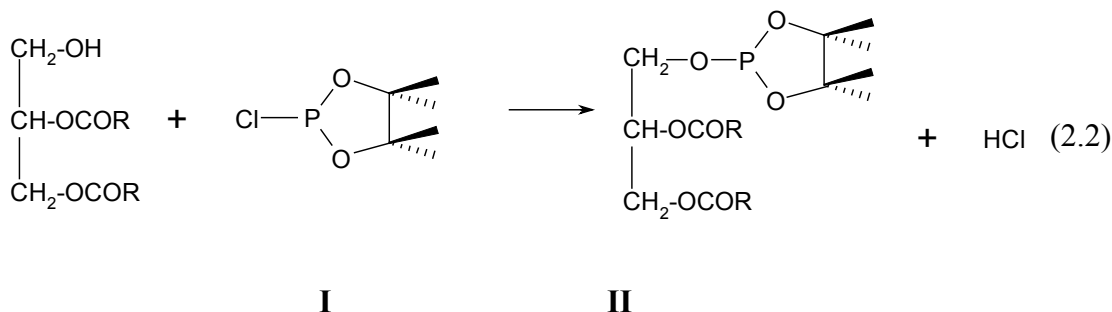


Σχήμα 2.2 : Φάσμα ^{31}P NMR, δείγματος ελαιολάδου.

2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός διγλυκεριδίων, στερολών και ελεύθερων λιπαρών οξέων με τη φασματοσκοπία ^{31}P NMR.

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διγλυκεριδίων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως GC και HPLC. Επίσης για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιήθηκαν η φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR. Τα μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων έχουν τονισθεί σε προηγούμενη δημοσίευση.⁴⁷ Στο εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR έχει αναπτυχθεί μια νέα αναλυτική μέθοδος για την ανίχνευση ησσόνων συστατικών του ελαιολάδου (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, στερόλες, πολυφαινόλες). Η μέθοδος βασίζεται στην *in situ*, φωσφιτυλίωση του ελαιολάδου, με κατάλληλο αντιδραστήριο φωσφόρου και στη συνέχεια ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών γίνεται με τη φασματοσκοπία του πυρήνα ^{31}P NMR.

Ειδικότερα, η νέα τεχνική βασίζεται⁵⁰ στην αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια, αλδεϋδικές ομάδες) με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλο-διοξαφωσφολάνιο (I), σύμφωνα με την αντίδραση (2.2), και τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR του πυρήνα φωσφόρου-31 για την ταυτοποίηση των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων (II). Για τα διγλυκερίδια η αντίδραση φωσφιτυλίωσης είναι:



Η αντίδραση γίνεται σε ήπιες συνθήκες (εντός του σωλήνα NMR σε θερμοκρασία δωματίου), είναι ποσοτική και ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 15 λεπτά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος σε σχέση με ένα εσωτερικό πρότυπο, που στην περίπτωση μας είναι η κυκλοεξανόλη. Η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της αντίδρασης έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε προηγούμενες δημοσιεύσεις.^{27,45,46}

► Παρασκευή πρότυπου διαλύματος

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ζυγίστηκαν 33,75 mg κυκλοεξανόλης (14.47 μM). Σε άλλο φιαλίδιο ζυγίστηκαν 1,5 mg Cr(acac)₃ (0.165 μM), και προστέθηκαν 16 ml ξηρής πυριδίνης και 10 ml CDCl₃ (1.6:1 v/v). Το μείγμα των διαλυτών αναδεύτηκε και προστέθηκε στην ογκομετρική φιάλη. Το πρότυπο διάλυμα προστατεύθηκε από την υγρασία με την προσθήκη 5A μοριακών κόσκινων (molecular sieves).

► Αντίδραση φωσφιτυλίωσης

Ποσότητα 100-150 mg του ελαιολάδου ζυγίστηκε σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5 mm, και στη συνέχεια προστέθηκαν 0.3 ml του πρότυπου διαλύματος. Κατόπιν προστέθηκαν 20 μl αντιδραστήριου 2-χλώρο- 4,4,5,5-τετραμεθυλο- διοξα- φωσφολανίου (I). Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη λήψη των φασμάτων ³¹P και ¹H NMR.

Ποσοτικός προσδιορισμός διγλυκεριδίων

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων κάνουμε τις εξής παραδοχές:

- Θεωρούμε ότι ένα mole διγλυκεριδίων αντιδρά με ένα mole αντιδραστήριου,
- Παραδεχόμαστε ότι το οξύ που εστεροποιεί το μόριο της γλυκερόλης είναι το ελαϊκό οξύ δηλαδή τα διγλυκερίδια είναι 1,2- ή 1,3-διολεϊνη,
- Το ποσοστό των διγλυκεριδίων αναφέρεται σε 100 γραμμάρια ελαιολάδου. Τελικά το ποσοστό των διγλυκεριδίων (1,2-DGs ή/και 1,3-DGs) υπολογίζονται από την σχέση :

$$\text{Διγλυκερίδια \%} = \frac{I_{\text{DG}} \times A \times 10^{-3} M_{\text{διολεϊνη}}}{10 \times M_{\text{ελαιολάδου}}} \quad (2.3)$$

όπου,

I_{διγλυκερίδια} (I_{DG}): Η τιμή του ολοκληρώματος των κορυφών των φωσφιτυλιωμένων διγλυκεριδίων στο φάσμα ³¹P NMR

I_{CH}: Η τιμή του ολοκληρώματος της φωσφιτυλιωμένης πρότυπης ουσίας (κυκλοεξανόλης) στο φάσμα ³¹P NMR.

A: Η ποσότητα του πρότυπου διαλύματος σε mmole.

M_{διολεϊνη}: Μοριακό βάρος διολεϊνης (621)

$M_{\text{ελαιολάδου}}$: Μάζα ελαιολάδου

Προσδιορισμός οξύτητας

Η οξύτητα του ελαιολάδου προσδιορίζεται από τη κορυφή σε δ 134.80 στο φάσμα ^{31}P - NMR, η οποία οφείλεται στη φωσφιτυλίωση των ομάδων $-\text{COOH}$ των ελεύθερων αλειφατικών οξέων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται σύμφωνα με τον επόμενο τύπο, ο οποίος εκφράζει την % οξύτητα σε ελαϊκό οξύ:

$$\text{Οξύτητα} = \frac{\frac{I_{\text{οξέα}}}{I_{\text{CH}}} \times A \times 10^{-3} M_{\text{ελαικού οξέος}}}{10 \times M_{\text{ελαιολάδου}}} \quad (2.4)$$

$I_{\text{οξέα}}$: Η τιμή του ολοκληρώματος της κορυφής σε δ 134.80 στο φάσμα ^{31}P NMR.

$M_{\text{ελαικού οξέος}}$: Μοριακό βάρος ελαϊκού οξέος (282).

Ποσοτικός προσδιορισμός στερολών

Το ποσοστό των συνολικών στερολών υπολογίζεται από την κορυφή σε δ 144.98, σύμφωνα με τη σχέση :

$$\text{Στερόλες \%} = \frac{\frac{I_{\text{στερόλες}}}{I_{\text{CH}}} \times A \times 10^{-3} M_{\beta\text{-σιτοστερόλη}}}{10 \times M_{\text{ελαιολάδου}}} \quad (2.5)$$

όπου,

$I_{\text{στερόλες}}$: Η τιμή του ολοκληρώματος της κορυφής στα 144.98 ppm στο φάσμα ^{31}P NMR

$M_{\beta\text{-σιτοστερόλη}}$: Μοριακό βάρος β -σιτοστερόλης (415)

Για τον υπολογισμό των στερολών χρησιμοποιείται η μοριακή μάζα της β -σιτοστερόλης, προσεγγιστικά, γιατί είναι η κύρια στερόλη στα έλαια.

2.6 Ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του ελαιολάδου με τη φασματοσκοπία ^1H NMR.

Τα συστατικά τα οποία προσδιορίστηκαν με τη φασματοσκοπία ^1H NMR είναι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), το λινολενικό οξύ, το ελαϊκό οξύ και το λινελαϊκό οξύ. Επίσης προσδιορίστηκε ο βαθμός ακορεστότητας (αριθμός ιωδίου).

Προσδιορισμός λιπαρών οξέων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι εστέρες της γλυκερόλης με τα λιπαρά οξέα (γλυκερίδια) αποτελούν τα κύρια συστατικά του ελαιολάδου. Στο ελαιολάδο συναντώνται κυρίως λιπαρά οξέα με 16 και 18 άτομα άνθρακα, τα κορεσμένα λιπαρά

οξέα (SFA, παλμιτικό οξύ, στεαρικό οξύ), το μονοακόρεστο (MUFA, ελαιικό οξύ) και τα πολυακόρεστα (PUFA, λινελαϊκό οξύ, λινολενικό οξύ). Όπως είδαμε στο προηγούμενο κεφάλαιο τα γλυκερίδια των λιπαρών οξέων αποτελούν το 97-99% του βάρους του ελαιολάδου. Κυριαρχούν τα τριγλυκερίδια (απλά και μικτά), ενώ υπάρχουν και 1-3% διγλυκερίδια και $\leq 0.3\%$ μονογλυκερίδια. Το φάσμα ^1H NMR του ελαιολάδου σε διαλύτη πυριδίνη- d_5 /CDCl $_3$ έχει παρουσιαστεί στο Σχήμα 2.1.

Από τα ολοκληρώματα των κορυφών του φάσματος ^1H NMR του ελαιολάδου είναι δυνατόν να υπολογιστεί η επί τοις % σύσταση του σε κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA), λινελαϊκό οξύ και λινολενικό οξύ. Στο φάσμα εμφανίζονται 10 κύριες κορυφές, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες,^{6,36} ενώ οι χημικές τους μετατοπίσεις σε διαλύτη πυριδίνη- d_5 /CDCl $_3$ συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Χημική μετατόπιση και ταυτοποίηση των κύριων κορυφών του φάσματος ^1H NMR του ελαιόλαδου.

Κορυφή	δ (ppm)	Πρωτόνιο	Χημική ένωση
1	5.40	$\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$	Όλα τα ακόρεστα οξέα
2	5.37	$\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OCOR}$	Γλυκερόλη (τριακυλογλυκερόλη)
3	4.42	$\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{OCOR}$	Γλυκερόλη (τριακυλογλυκερόλη)
4 (A)	2.84	$\text{CH}=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}=\text{CH}$	Λινελαϊκό και λινολενικό οξύ
5 (B)	2.32	$\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$	Όλα τα ακύλια
6 (C)	2.06	$\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}=\text{CH}$	Όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα
7 (D)	1.63	$\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2\text{COOH}$	Όλα τα ακύλια
8	1.30	$(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_n$	Όλα τα ακύλια
9(E)	0.98	$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$	Λινολενικό οξύ
10 (F)	0.91	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$	Όλα τα οξέα εκτός του λινολενικού

Οι περισσότερες κορυφές αντιστοιχούν σε μη ισοδύναμες ομάδες πρωτονίων, οι οποίες είναι κοινές για τα περισσότερα λιπαρά οξέα. Επομένως, η συγκέντρωση

των οξέων στο ελαιόλαδο μπορεί να υπολογιστεί μόνο με συνδυασμό των ολοκληρωμάτων ποικίλων κορυφών του φάσματος $^1\text{H NMR}$. Εξάιρεση αποτελεί η κορυφή E σε δ 0,98 ppm η οποία αντιστοιχεί στα μεθυλικά πρωτόνια του λινολενικού οξέος. Άρα η συγκέντρωση για το λινολενικό οξύ δίνεται από τη σχέση:^{6,36}

$$[\text{Λινολενικό}] = \frac{E}{F + E} \quad (2.6)$$

Στην παραπάνω εξίσωση, το F είναι η τιμή του ολοκληρώματος όλων των μεθυλικών πρωτονίων εκτός του λινολενικού (Πίνακας 2.1).

Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων γίνεται από τα ολοκληρώματα των κορυφών στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ (Σχήμα 2.1 και Πίνακας 2.1) με βάση τις παρακάτω εξισώσεις:

Το ελαϊκό, λινελαϊκό και τα συνολικά λιπαρά οξέα (κυρίως παλμιτικό και στεαρικό), (SFA) υπολογίζονται από τις εντάσεις των κορυφών A, C και F, σύμφωνα με τις σχέσεις:

$$[\text{Ελαϊκό}] = \frac{3C}{4(E + F)} - [\text{λινολεϊκό}] - [\text{λινολενικό}] \quad (2.7)$$

$$[\text{SFA}] = \frac{F}{E + F} - [\text{λινελαϊκό}] - [\text{ελαϊκό}] - [\text{λινολενικό}] \quad (2.8)$$

Η ένταση της κορυφής B των CH_2 πρωτονίων όλων των ακυλικών αλυσίδων συνδέεται με τις εντάσεις των κορυφών E και F σύμφωνα με τη σχέση

$$\frac{E + F}{3} = \frac{B}{2} \quad (2.9)$$

Επομένως, αντικαθιστώντας τη σχέση 2.9 στις 2.6 και 2.7 προκύπτουν δύο νέες σχέσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων του λινελαϊκού και του ελαϊκού οξέος.

$$[\text{Λινελαϊκό}] = \frac{3A - 4E}{3B} \quad (2.10)$$

$$[\text{Ελαϊκό}] = \frac{C}{2B} - [\text{λινελαϊκό}] - [\text{λινολενικό}] \quad (2.11)$$

Η ικανότητα των σχέσεων (2.6), (2.7), (2.8), (2.9) και (2.6), (2.9), (2.10), (2.11) για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των λιπαρών οξέων ελέγχεται χωριστά, ανάλογα με την ικανότητα τους να αναπαράγουν το ολοκλήρωμα της κορυφής 1 (Σχήμα 2.1), η οποία στο φάσμα ^1H NMR αντιστοιχεί στα ολεφινικά πρωτόνια όλων των ακόρεστων οξέων. Οι δύο αυτοί τρόποι υπολογισμού έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα. Η επιλογή της σωστής εξίσωσης έγινε με τον έλεγχο της ικανότητάς της να προβλέψει το ολοκλήρωμα των ολεφινικών $-\text{CH}=\text{CH}-$ πρωτονίων, το οποίο θεωρείται ανεξάρτητη μεταβλητή (δεν χρησιμοποιείται στην ανάλυση). Η μέθοδος που επιλέχτηκε προβλέπει με ακρίβεια μικρότερη από $\pm 4\%$ το ολεφινικό ολοκλήρωμα.

Το ολοκλήρωμα της κορυφής 1 (Σχήμα 2.1), το οποίο εξαρτάται από το βαθμό ακορεστότητας του ελαίου, σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων και το ολοκλήρωμα της κορυφής των μεθυλενικών πρωτονίων της τριακυλογλυκερόλης (TG) στο φάσμα (δ 4.20 ppm) σύμφωνα με τη σχέση:

$$[-\text{CH}=\text{CH}-] = \frac{2[\text{ελαϊκό}] + 4[\text{λινελαϊκό}] + 6[\text{λινολενικό}]}{0.5 \times \left(\frac{\text{E} + \text{F}}{3} + \frac{\text{B}}{2} \right)} + \frac{\text{TG}}{2} \quad (2.12)$$

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αλειφατικών οξέων (σχέση 2.7), είναι αρκετά βελτιωμένος σε σχέση με τον προηγούμενο της βιβλιογραφίας.^{6,36} Προκύπτει ότι οι σχέσεις της βιβλιογραφίας οδηγούν σε σφάλμα για δύο λόγους. Πρώτον, η κανονικοποίηση του παράγοντα (E+F) δεν εφαρμόζεται στα A πρωτόνια, και δεύτερον, ο συντελεστής 2/3 είναι απαραίτητος για τα ολοκληρώματα των διαλλυλικών πρωτονίων (κορυφή A στα δ 2.84), τα οποία συγκρίνονται με το ολοκλήρωμα των μεθυλικών πρωτονίων του λινολενικού οξέος (κορυφή E στα δ 0,98).

Προσδιορισμός αριθμού ιωδίου

Αριθμός ιωδίου (Iodine Value, *I.V*) ονομάζεται η ποσότητα του ιωδίου που απαιτείται για τον κορεσμό των διπλών δεσμών 100 γραμμαρίων ελαιολάδου.¹³ Ο αριθμός ιωδίου αποτελεί μέτρο της ακορεστότητας και υποδηλώνει την συνολική ποσότητα των ακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό) που μετέχουν στην εστεροποίηση της γλυκερόλης για τον σχηματισμό των τριγλυκεριδίων και προσδιορίζεται από τους επιμέρους αριθμούς ιωδίου των παραπάνω κυριότερων λιπαρών οξέων. Αναλυτικότερα, 1 mmole του ελαϊκού οξέος με ένα διπλό δεσμό στο

μόριό του, έχει τιμή αριθμού ιωδίου 86, αντίστοιχα 1 mmole λινελαϊκού οξέος, δύο διπλοί δεσμοί στο μόριο του λιπαρού οξέως, έχει τιμή αριθμού ιωδίου 173 και τέλος 1 mmole λινολενικού οξέος, τρεις διπλοί δεσμοί στο μόριο του λιπαρού οξέως, έχει τιμή αριθμού ιωδίου 261. Βάση των παραπάνω ο αριθμός ιωδίου (*I.V.*) υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$I.V = (\text{mmoles ελαϊκού οξέος} \times 86) + (\text{mmoles λινελαϊκού οξέος} \times 173) + (\text{mmoles λινολενικού οξέος} \times 261) \quad (2.13)$$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Προσδιορισμός των συστατικών των ελαιολάδων με τη φασματοσκοπία ^{31}P NMR.

Για αυτό το μέρος της εργασίας μελετήθηκαν 76 δείγματα, 14 δείγματα λαμπάντε ελαιολάδων, 13 δείγματα ραφιναρισμένων ελαιολάδων, 15 δείγματα πυρηνελαίων και 34 δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Τα ολοκληρώματα των κορυφών του φάσματος ^{31}P NMR για κάθε ελαιόλαδο χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 1,2 διγλυκεριδίων (1,2-DGs), των 1,3 διγλυκεριδίων (1,3-DGs), του λόγου D των 1,2 διγλυκεριδίων / ολικά διγλυκερίδια (1,2-DGs / TDGs). Επίσης υπολογίζονται η περιεκτικότητα σε στερόλες και η οξύτητα. Μετά την ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος ^{31}P NMR, πραγματοποιήθηκε η μαθηματική επεξεργασία σύμφωνα με τους τύπους που έχουν περιγραφεί στο πειραματικό μέρος (Παράγραφος 2.5). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Περιεκτικότητα (% w/w), 1,2 διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3 διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικά διγλυκερίδια (TDGs), λόγου D, στερολών και οξύτητας, 76 δειγμάτων για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων.

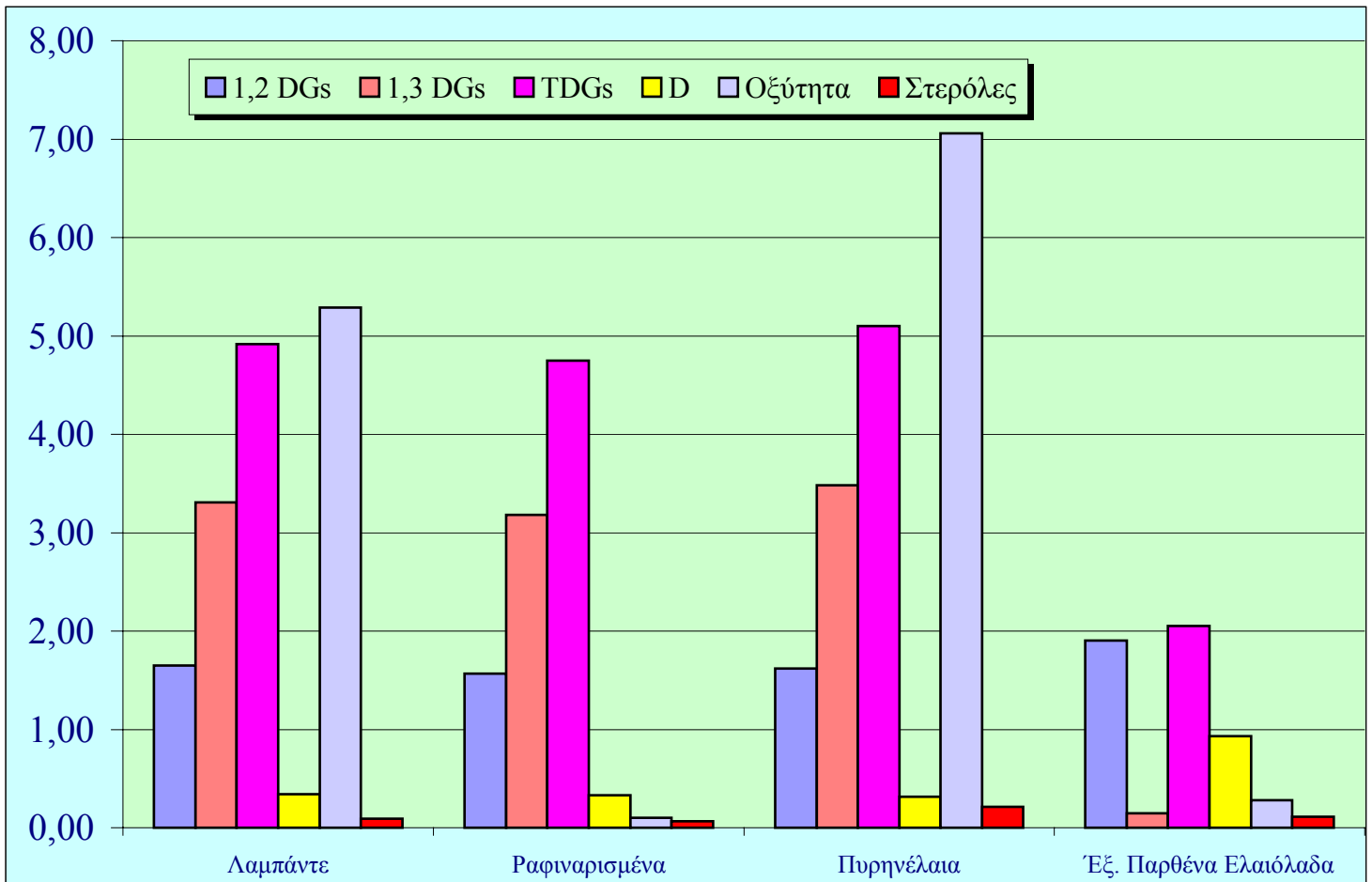
Δείγματα	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
Λαμπάντε						
1	1.35	2.85	4.20	0.32	0.10	2.81
2	1.85	3.08	4.93	0.38	0.10	6.44
3	1.67	4.14	5.20	0.32	0.08	7.33
4	2.08	2.55	4.63	0.45	0.11	5.10
5	2.10	3.19	5.29	0.40	0.11	8.73
6	1.29	1.92	3.21	0.40	0.17	2.96
7	1.11	2.31	3.42	0.32	0.05	0.06
8	1.13	2.10	3.22	0.35	0.11	0.06
9	2.38	4.64	7.01	0.34	0.08	10.17
10	1.77	4.31	6.08	0.29	0.07	7.78

Δείγματα	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
11	1.00	2.23	3.23	0.31	0.10	1.88
12	0.73	1.84	2.56	0.28	0.08	2.29
13	2.41	5.80	8.21	0.29	0.07	10.86
14	2.23	5.38	7.61	0.29	0.09	7.55
Μέση Τιμή	1.65	3.31	4.91	0.34	0.09	5.29
Απόκλιση	0.55	1.32	1.78	0.05	0.03	3.62
Ραφιναρισμένα						
1	1.47	2.95	4.42	0.33	0.07	0.03
2	1.68	3.16	4.84	0.35	0.05	0.03
3	1.55	3.33	4.88	0.32	0.10	0.07
4	1.60	2.83	4.44	0.36	0.06	0.03
5	1.85	3.51	5.37	0.35	0.05	0.02
6	2.14	3.71	5.84	0.37	0.11	0.19
7	2.10	3.71	5.81	0.36	0.09	0.01
8	1.39	2.63	4.02	0.35	0.10	0.02
9	1.60	3.89	5.49	0.29	0.08	0.30
10	1.53	3.50	5.03	0.30	0.07	0.06
11	0.97	2.31	3.28	0.30	0.00	0.14
12	1.48	3.59	5.07	0.29	0.07	0.32
13	0.99	2.23	3.22	0.31	0.07	0.04
Μέση Τιμή	1.57	3.18	4.75	0.33	0.07	0.10
Απόκλιση	0.35	0.55	0.85	0.03	0.03	0.10
Πυρηγέλαια						
1	2.27	4.66	6.93	0.33	0.31	8.36
2	1.66	3.28	4.94	0.34	0.20	6.28
3	2.03	4.09	6.12	0.33	0.23	8.76
4	1.97	4.57	6.54	0.30	0.19	8.64
5	2.32	5.09	7.41	0.31	0.21	12.47
6	1.63	3.50	5.14	0.32	0.21	6.67
7	1.82	3.94	5.76	0.32	0.23	10.55
8	1.52	3.00	4.52	0.34	0.09	7.93

Δείγματα	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
9	1.41	3.47	4.88	0.29	0.11	7.35
10	1.33	2.92	4.25	0.31	0.27	3.59
11	1.08	2.45	3.53	0.31	0.30	5.24
12	1.12	2.44	3.55	0.31	0.22	4.81
13	1.09	2.23	3.32	0.33	0.16	4.30
14	1.30	2.66	3.96	0.33	0.22	5.05
15	1.69	3.93	5.62	0.30	0.26	5.84
Μέση Τιμή	1.62	3.48	5.10	0.32	0.26	7.06
Απόκλιση	0.41	0.88	1.28	0.01	0.06	2.45
Έξτρα Παρθένα Ελαιόλαδα						
1 Σητεία	2.15	0.17	2.32	0.93	0.14	0.33
2 Σητεία	1.58	0.09	1.67	0.95	0.15	0.21
3 Σητεία	1.88	0.15	2.03	0.93	0.09	0.24
4 Σητεία	2.05	0.17	2.22	0.92	0.12	0.35
5 Σητεία	2.04	0.13	2.17	0.94	0.13	0.33
6 Σητεία	1.74	0.15	1.89	0.92	0.09	0.20
7 Σητεία	1.86	0.12	1.98	0.94	0.12	0.25
1 Ηράκλειο	2.49	0.16	2.65	0.94	0.16	0.40
2 Ηράκλειο	1.57	0.15	1.72	0.92	0.09	0.23
3 Ηράκλειο	2.08	0.16	2.24	0.93	0.14	0.24
4 Ηράκλειο	1.70	0.13	1.83	0.93	0.13	0.21
5 Ηράκλειο	1.90	0.14	2.04	0.93	0.15	0.24
6 Ηράκλειο	1.58	0.12	1.70	0.93	0.12	0.38
1 Κολυμπάρι	1.76	0.18	1.94	0.91	0.09	0.39
2 Κολυμπάρι	2.30	0.23	2.53	0.91	0.14	0.30
3 Κολυμπάρι	1.69	0.14	1.83	0.92	0.11	0.26
1 Πεζιά	1.72	0.14	1.86	0.93	0.11	0.32
2 Πεζιά	2.22	0.19	2.41	0.92	0.17	0.41
3 Πεζιά	1.39	0.11	1.50	0.93	0.10	0.18
4 Πεζιά	1.49	0.11	1.60	0.93	0.12	0.18
5 Πεζιά	1.90	0.12	2.02	0.94	0.16	0.22

Δείγματα	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
1 Λακωνία	1.94	0.20	2.14	0.91	0.10	0.21
2 Λακωνία	2.05	0.13	2.18	0.94	0.07	0.24
3 Λακωνία	1.79	0.12	1.91	0.94	0.08	0.16
4 Λακωνία	2.08	0.17	2.25	0.93	0.11	0.20
5 Λακωνία	2.06	0.16	2.22	0.93	0.08	0.22
6 Λακωνία	2.15	0.14	2.29	0.94	0.10	0.21
1 Μεσσηνία	1.74	0.12	1.86	0.94	0.09	0.22
2 Μεσσηνία	1.77	0.18	1.95	0.91	0.08	0.20
3 Μεσσηνία	1.56	0.18	1.74	0.90	0.10	0.24
1 Πήλιο	2.29	0.17	2.46	0.93	0.10	0.63
2 Πήλιο	2.10	0.15	2.25	0.93	0.08	0.46
Λέσβος	1.77	0.16	1.93	0.92	0.10	0.42
Ηλεία	2.37	0.08	2.45	0.97	0.15	0.22
Μέση Τιμή	1.90	0.15	2.05	0.93	0.11	0.28
Απόκλιση	0.27	0.03	0.28	0.01	0.03	0.10

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παριστάνονται γραφικά οι μέσες τιμές των 1,2-διγλυκεριδίων, 1,3-διγλυκεριδίων, των ολικών διγλυκεριδίων, του λόγου D, των στερολών και της οξύτητας από τα οποία εξάγονται χρήσιμα, ποιοτικά συμπεράσματα για τις τέσσερις κατηγορίες ελαιολάδων που εξετάστηκαν.



Σχήμα 3.1 Μέσες τιμές της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), των 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs) των ολικών διγλυκεριδίων (TDGs), της οξύτητας και των στερολών των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων.

Από το Σχήμα 3.1 παρατηρούμε τα εξής:

- Η περιεκτικότητα των 1,2-διγλυκεριδίων εμφανίζεται παρόμοια για τις κατηγορίες των ελαιολάδων λαμπάντε, ραφιναρισμένων και πυρηνελαίων και είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη των έξτρα παρθένων ελαιολάδων.
- Η περιεκτικότητα των 1,3-διγλυκεριδίων είναι, αρκετά μικρότερη για τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες των ελαιολάδων.
- Ο λόγος D για τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα είναι πολύ μεγαλύτερος (~0,93) συγκρινόμενος με τις υπόλοιπες κατηγορίες ελαιολάδων. Οι μικρές τιμές του λόγου D για τα ακατέργαστα λαμπάντε και τα πυρηνέλαια οφείλεται κυρίως στην μεγάλη οξύτητα που εμφανίζουν, κατά την οποία, σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχτεί ότι, ευνοείται η ισομερίωση των 1,2-διγλυκεριδίων σε 1,3-διγλυκερίδια.^{49,50} Επίσης, τα ελαιόλαδα που έχουν ραφιναριστεί ή έχουν υποστεί επεξεργασία, εμφανίζουν μικρές τιμές στο λόγο D εξαιτίας του ραφιναρίσματος που έχουν υποστεί το οποίο επιταχύνει τη χημική ισορροπία της ισομερίωσης των 1,2-διγλυκεριδίων σε 1,3-διγλυκερίδια.
- Μεγάλα ποσοστά οξύτητας εμφανίζουν τα λαμπάντε ελαιόλαδα και τα πυρηνέλαια. Τα ραφιναρισμένα ελαιόλαδα εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά οξύτητας λόγω της επεξεργασία τους, ενώ στα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα η οξύτητα έχει μικρές τιμές (<0.8%) κάτι που συμφωνεί με τη νομοθεσία για το χαρακτηρισμό τους ως έξτρα παρθένα.
- Το στερολικό περιεχόμενο δεν διαφοροποιείται σημαντικά για όλες τις κατηγορίες των ελαιολάδων εκτός από την κατηγορία των πυρηνελαίων, όπου εμφανίζεται ελαφρά αυξημένο. Αυτό οφείλεται κυρίως στην επεξεργασία τους με οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι διαλύουν τις στερόλες που βρίσκονται στο εξωκάρπιο του ελαιοκάρπου.

3.2 Προσδιορισμός των συστατικών των ελαιολάδων με τη φασματοσκοπία ^1H NMR.

Τα 76 δείγματα για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων, αναλύθηκαν και με τη φασματοσκοπία ^1H NMR. Από τις ολοκληρώσεις των κορυφών στο φάσμα ^1H NMR και μετά από μαθηματική επεξεργασία σύμφωνα με τους τύπους που περιγράφονται στο πειραματικό μέρος (Παράγραφος 2.6) παίρνουμε τα εξής αποτελέσματα τα οποία συγκεντρώνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Περιεκτικότητα (% w/w) λιπαρών οξέων και αριθμός ιωδίου, 76 δειγμάτων για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων.

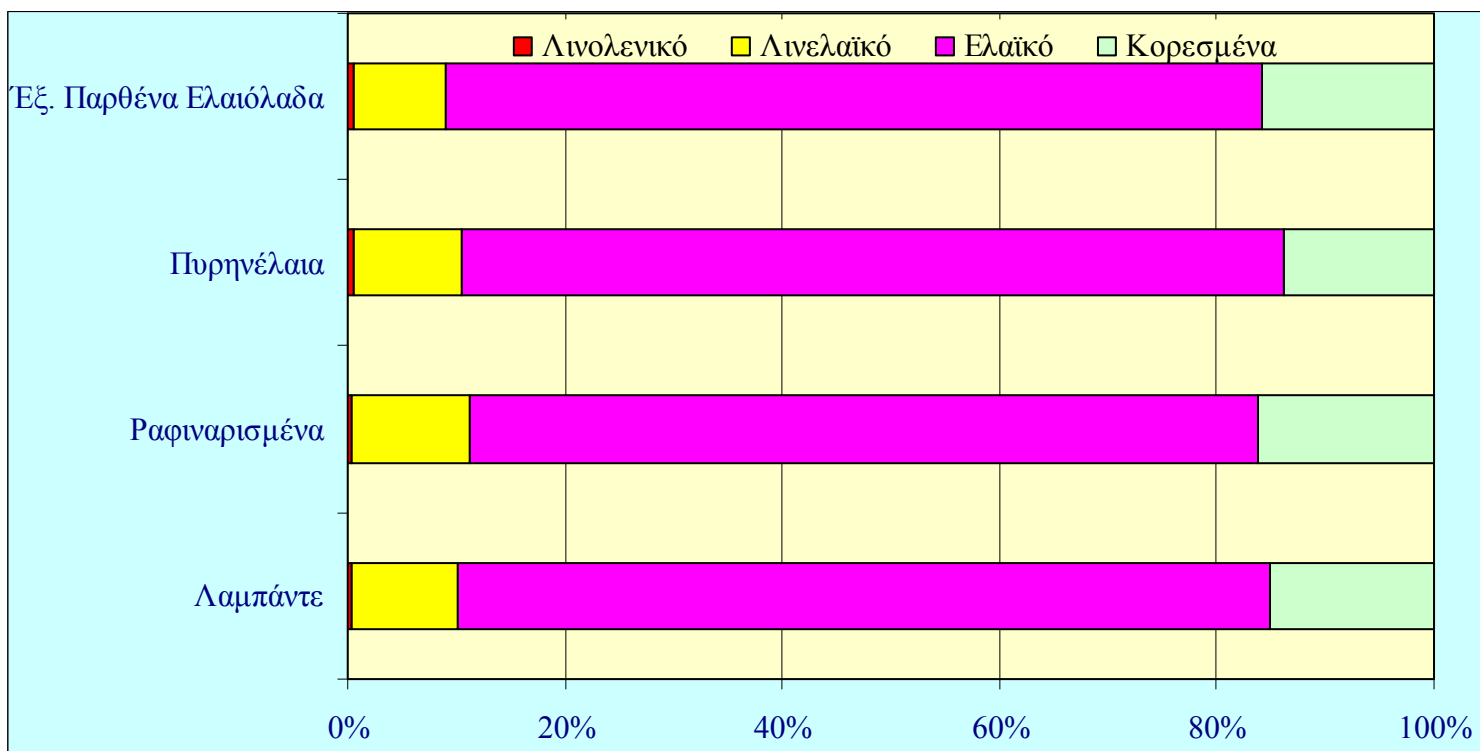
Δείγματα	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
Λαμπάντε					
1	0.39	7.99	76.27	15.34	80.45
2	0.39	6.48	76.86	16.27	78.34
3	0.43	9.50	76.52	13.55	83.36
4	0.60	10.23	75.90	13.27	84.54
5	0.48	11.24	72.96	15.32	83.45
6	0.54	12.33	70.78	16.34	83.62
7	0.69	7.91	78.91	12.49	83.35
8	0.53	8.42	79.16	11.89	84.02
9	0.28	10.47	71.99	17.26	80.76
10	0.27	11.10	71.42	17.20	81.35
11	0.40	9.38	77.49	12.74	83.90
12	0.35	6.26	77.81	15.57	78.67
13	0.31	9.86	69.58	20.25	77.71
14	0.48	13.23	71.84	14.45	84.18
Μέσες Τιμές	0.44	9.60	74.82	15.14	81.98
Απόκλιση	0.12	2.05	3.25	2.28	2.39
Ραφινρισμένα					
1	0.36	11.29	72.01	16.34	82.40
2	0.25	11.52	70.82	17.41	81.49
3	0.36	10.78	72.87	15.99	82.26

Δείγματα	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
4	0.41	9.72	73.80	16.07	81.36
5	0.36	9.48	73.31	16.85	80.40
6	0.30	12.46	70.42	16.83	82.89
7	0.26	12.08	71.56	16.11	83.11
8	0.32	11.92	68.43	19.33	80.31
9	0.33	12.30	74.43	12.95	86.13
10	0.34	10.98	73.80	14.88	83.34
11	0.46	8.23	75.37	15.94	80.25
12	0.51	8.46	74.46	16.57	80.00
13	0.41	11.33	72.98	15.28	83.43
Μέσες Τιμές	0.36	10.81	72.64	16.20	82.11
Απόκλιση	0.07	1.41	1.93	1.46	1.74
Πυρηνέλαια					
1	0.51	11.38	70.07	18.04	81.29
2	0.48	9.03	79.13	11.36	84.93
3	0.40	12.04	72.75	14.80	84.45
4	0.42	11.06	72.89	15.63	82.92
5	0.38	10.59	75.79	13.24	84.49
6	0.51	10.38	77.27	11.84	85.73
7	0.46	10.11	75.66	13.76	83.77
8	0.70	9.18	76.30	13.83	83.31
9	0.46	9.32	78.84	11.39	85.11
10	0.53	8.47	78.46	12.55	83.50
11	0.46	8.85	78.40	12.29	83.93
12	0.49	10.11	74.52	14.88	82.86
13	0.36	7.59	77.71	14.35	80.89
14	0.43	9.04	74.33	16.20	80.69
15	0.36	12.52	72.71	14.40	85.14
Μέσες Τιμές	0.46	9.98	75.65	13.90	83.53
Απόκλιση	0.08	1.38	2.72	1.88	1.58

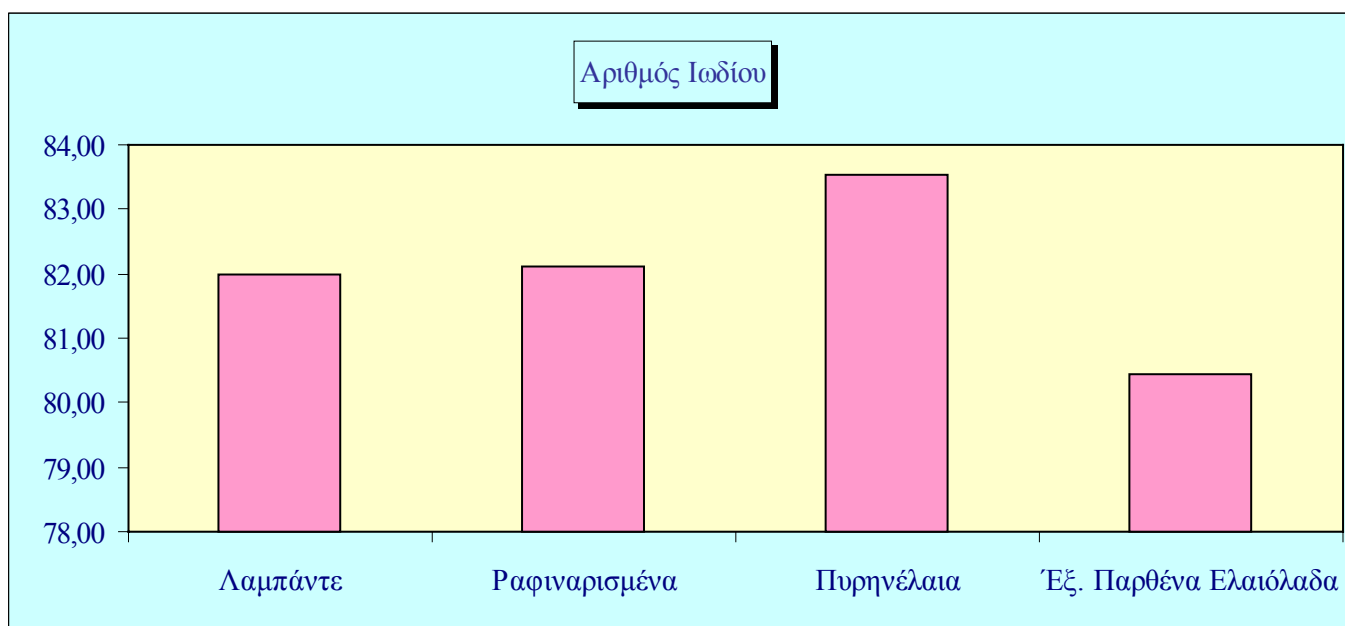
Δείγματα	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
Έξτρα Παρθένα Ελαιόλαδα					
1 Σητεία	0.58	9.27	73.10	17.05	80.41
2 Σητεία	0.53	10.34	72.00	17.13	80.73
3 Σητεία	0.62	10.06	72.98	16.34	81.80
4 Σητεία	0.53	8.74	74.20	16.53	80.33
5 Σητεία	0.32	10.61	72.26	16.81	81.33
6 Σητεία	0.54	8.35	75.08	16.03	80.42
7 Σητεία	0.51	9.90	73.09	16.50	81.30
1 Ηράκλειο	0.35	8.20	76.32	15.13	80.73
2 Ηράκλειο	0.51	9.86	76.09	13.54	83.83
3 Ηράκλειο	0.41	10.70	72.45	16.44	81.88
4 Ηράκλειο	0.57	8.91	74.02	16.50	80.56
5 Ηράκλειο	0.72	10.26	72.31	16.71	81.82
6 Ηράκλειο	0.55	10.21	71.30	17.94	80.42
1 Κολυμπάρι	0.53	7.48	77.54	14.45	81.00
2 Κολυμπάρι	0.28	8.00	75.14	16.58	79.19
3 Κολυμπάρι	0.55	9.05	75.09	15.31	81.65
1 Πεζά	0.55	8.94	75.29	15.22	81.65
2 Πεζά	0.55	9.21	74.55	15.29	81.82
3 Πεζά	0.32	10.01	74.11	15.56	81.90
4 Πεζά	0.60	9.30	75.08	15.02	82.24
5 Πεζά	0.63	10.65	72.63	16.09	82.54
1 Λακωνία	0.28	5.86	77.83	16.03	77.80
2 Λακωνία	0.38	6.50	77.51	15.60	78.91
3 Λακωνία	0.64	5.16	78.90	15.30	78.46
4 Λακωνία	0.48	5.42	78.06	16.04	77.76
5 Λακωνία	0.37	5.08	80.22	14.33	78.75
6 Λακωνία	0.62	5.93	78.09	15.36	79.04
1 Μεσσηνία	0.46	6.24	77.50	15.80	78.65
2 Μεσσηνία	0.52	6.15	77.89	15.44	78.98

Δείγματα	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
3 Μεσσηνία	0.21	8.38	76.15	15.26	80.53
1 Πήλιο	0.61	7.08	79.22	13.09	79.45
2 Πήλιο	0.51	7.16	74.81	17.52	75.98
Λέσβος	0.56	10.14	77.91	11.39	84.78
Ηλεία	0.57	5.78	80.14	13.51	78.81
Μέσες Τιμές	0.50	8.44	75.29	15.76	80.43
Απόκλιση	0.12	1.65	2.26	1.36	1.84

Στα ακόλουθα διαγράμματα παριστάνονται γραφικά οι μέσες τιμές των λιπαρών οξέων και του αριθμού ιωδίου των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων.



Σχήμα 3.2 Μέσες τιμές των ποσοστών του λινολενικού, λινελαϊκού, ελαϊκού και των κορεσμένων λιπαρών οξέων για κάθε κατηγορία ελαιόλαδου.



Σχήμα 3.3 Μέση τιμή του αριθμού ιωδίου (IV) για κάθε κατηγορία ελαιόλαδου.

Από την ανάλυση των φασμάτων ^1H NMR, όπως παρουσιάζεται συνοπτικά στα Σχήματα 3.2 και 3.3 εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Γενικά η σύσταση σε λιπαρά οξέα είναι παρόμοια για όλες τις κατηγορίες των ελαιολάδων. Όσο αφορά τα ελαιόλαδα λαμπάντε, αυτά προέρχονται από υποβαθμισμένα παρθένα ελαιόλαδα οπότε είναι επόμενο να παρουσιάζουν παρόμοια λιπιδική σύσταση. Τα ραφινάρισμα ελαιόλαδα, παρουσιάζουν παρόμοια σύσταση σε λιπαρά οξέα, δεδομένου ότι το ραφινάρισμα στο οποίο υπόκεινται, δεν αλλάζει τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα. Τέλος, τα πυρηνέλαια ουσιαστικά προέρχονται κυρίως από τον πυρήνα (κουκούτσι) του ελαιοκάρπου από όπου εξάγεται το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, καθώς και από υπολείμματα του ελαιοκάρπου μετά την εξαγωγή του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, οπότε είναι αναμενόμενο η σύσταση σε λιπαρά οξέα να μην εμφανίζει σημαντικές διαφορές.
- Το πολυακόρεστο λινολενικό οξύ, εμφανίζει κάπως χαμηλότερη τιμή για την κατηγορία των ραφινάρισμένων ελαιολάδων κάτι που μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι γενικά οι τριπλοί δεσμοί είναι περισσότερο ευαίσθητοι στη θερμική επεξεργασία που υπόκεινται τα ελαιόλαδα κατά το ραφινάρισμα.
- Η σύσταση για τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, το πολυακόρεστο λινελαϊκό οξύ, το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ αλλά και για τα κορεσμένα λιπαρά οξέα εμφανίζεται παρόμοια.
- Ο βαθμός ακορεστότητας, που εκφράζεται με τον Αριθμό Ιωδίου εμφανίζει, εμφανείς διαφορές ιδιαίτερα για τις κατηγορίες των πυρηνελαιών και των έξτρα παρθένων ελαιολάδων.

3.3 Ταξινόμηση των ελαιολάδων.

Από τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις των συστατικών (μεταβλητών) για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων (Πίνακες 3.1, 3.2) βγάζουμε το πρώτο ποιοτικό συμπέρασμα ότι, ορισμένες μεταβλητές έχουν διαχωριστικές ικανότητες και έτσι είναι δυνατή μια πρώτη προσέγγιση της διακριτικής ικανότητας της κάθε μεταβλητής. Για παράδειγμα, ο λόγος D στα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας. Επίσης, η οξύτητα εμφανίζεται να έχει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες των ελαιολάδων. Σκοπός όμως, της παρούσας μελέτης είναι ο διαχωρισμός και των τεσσάρων κατηγοριών των ελαιολάδων σε ένα κοινό διάγραμμα, εκμεταλλευόμενοι πλήρως τη διαχωριστική ικανότητα ενός μεγάλου αριθμού μεταβλητών που προέκυψαν από την ανάλυση.

Αυτό που απαιτείται λοιπόν, είναι ο συνδυασμός όλων των μεταβλητών (συστατικών) που είναι ικανές να διαφοροποιήσουν καλύτερα όλες τις κατηγορίες δειγμάτων (ομάδες). Ουσιαστικά, αναζητείται εκείνο το στατιστικό μοντέλο που θα περιλαμβάνει το πλήθος των μεταβλητών, με τις οποίες θα μπορούμε να διακρίνουμε τις κατηγορίες των ελαιολάδων και να προβλέψουμε την ομάδα στην οποία ανήκει κάθε νέο, άγνωστο δείγμα. Για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων που αναφέρθηκαν και την ανίχνευση νοθείας έξτρα παρθένου ελαιολάδου, γίνεται η χρήση τριών στατιστικών μεθόδων ανάλυσης, της Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA), της Ανάλυσης Συστάδων (Cluster Analysis, C.A.) και της Ανάλυσης Διακριτότητας (Discriminant Analysis, D.A.).

3.4 Ανάλυση Διακύμανσης (ANOVA).

Εισαγωγή

Στις διάφορες επιστήμες, ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες με στόχο να ανακαλυφθούν διαφορές (εάν υπάρχουν) μεταξύ διαφόρων γεγονότων. Κάποια παραδείγματα είναι η σύγκριση της αποτελεσματικότητας ενός νέου φαρμάκου, η σύγκριση της διάρκειας ζωής για n διαφορετικά είδη μπαταριών, η σύγκριση της κατανάλωσης βενζίνης για n διαφορετικούς κινητήρες ή ακόμα εξέταση της επίδρασης της θερμοκρασίας κατά τη μάθηση.

Στις περιπτώσεις αυτές η σύγκριση μπορεί να γίνει με την **ανάλυση της διακύμανσης ή της διασποράς** (analysis of variance, ANOVA), με τον έλεγχο της **στατιστικής σημαντικότητας** (statistical significance) μεταξύ των **μέσων όρων** (means) των μετρήσεων μιας ή περισσότερων μεταβλητών (variables) σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Η Ανάλυση Διακύμανσης βρίσκει εφαρμογή στην εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών των μέσων τιμών σε μια ποικιλία ερευνητικών καταστάσεων και είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται περισσότερο στον έλεγχο υποθέσεων. Ουσιαστικά στηρίζεται στην σύγκριση της **μεταβλητότητας μεταξύ των δειγματικών μέσων** και στη **μεταβλητότητα των τιμών μέσα στο δείγμα**.

Η Ανάλυση Διακύμανσης, είναι μια διαδικασία ελέγχου υποθέσεων που χρησιμοποιείται για να εκτιμήσουμε τις διαφορές μεταξύ δύο ή περισσότερων πληθυσμών. Με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ως βάση, δεδομένα δείγματος, προκειμένου να εξαχθεί ένα συμπέρασμα για τους πληθυσμούς.

Με την Ανάλυση Διακύμανσης, η ολική μεταβολή που υπάρχει σε ένα σύνολο δεδομένων διαχωρίζεται σε διάφορες συνιστώσες. Σε κάθε μία από αυτές τις συνιστώσες υπάρχει ένα συγκεκριμένο είδος (πηγή) μεταβολής. Έτσι λοιπόν στην ανάλυση είναι δυνατό να διερευνηθεί η σπουδαιότητα (συμβολή) κάθε μίας από τις πηγές μεταβολής στην ολική μεταβολή.

Η Ανάλυση Διακύμανσης έχει μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση πειραματικών δεδομένων και χρησιμοποιείται, είτε στην εκτίμηση και τον έλεγχο υποθέσεων που αφορούν πληθυσμιακές διασπορές, είτε στην εκτίμηση και τον έλεγχο υποθέσεων που αφορούν πληθυσμιακούς μέσους όρους.

Το δείγμα αντιπροσωπεύει μια σειρά από πεπερασμένο αριθμό μετρήσεων μιας ανεξάρτητης μεταβλητής από ένα πολύ μεγάλο αριθμό μετρήσεων (θεωρητικά άπειρο), ο οποίος αντιπροσωπεύει τον **πληθυσμό**. Διαφορετικά δείγματα ανήκουν σε διαφορετικές **κατηγορίες** (classes) ή **ομάδες** (groups). Εάν η σύγκριση γίνεται μεταξύ των μέσων όρων δύο διαφορετικών δειγμάτων, τότε η ANOVA θα δώσει τα ίδια αποτελέσματα. Η Ανάλυση Διακύμανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε διαφορετικά δείγματα, (ένα από κάθε πληθυσμό), είτε στο ίδιο δείγμα, εφαρμόζοντας διαφορετικές προσεγγίσεις-πειράματα. Επιπρόσθετα, η Ανάλυση Διακύμανσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων μιας έρευνας στην οποία εμπλέκονται περισσότερες από μία εξαρτημένες μεταβλητές. Για παράδειγμα, ένας εκπαιδευτικός επιθυμεί να συγκρίνει την αποτελεσματικότητα δύο διαφορετικών διδακτικών μεθόδων (πρώτη ανεξάρτητη μεταβλητή), σε τρεις τάξεις διαφορετικών

μεγεθών (δεύτερη ανεξάρτητη μεταβλητή). Η εξαρτημένη μεταβλητή εδώ είναι ο βαθμός κάθε μαθητή σε ένα σταθμισμένο τεστ. Η Ανάλυση Διακύμανσης πραγματοποιείται με το στατιστικό t-test, για περισσότερους από δύο πληθυσμούς, όπου βρίσκει εφαρμογή για τις περιπτώσεις:

α) t-test για ανεξάρτητα δείγματα, όταν η σύγκριση γίνεται μεταξύ δύο ανεξάρτητων δειγμάτων με βάση μια τουλάχιστον εξαρτημένη μεταβλητή. Για παράδειγμα, η σύγκριση δύο αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε διαφορετικά δείγματα ή η σύγκριση της απόδοσης των αγοριών και κοριτσιών σε μια τάξη με βάση τις βαθμολογίες τους

β) t-test για εξαρτημένα δείγματα, όταν η σύγκριση γίνεται μεταξύ δύο ανεξάρτητων μεταβλητών σε όμοια δείγματα. Για παράδειγμα, η σύγκριση δύο αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε δείγματα της ίδιας ομάδας, ή η σύγκριση των βαθμολογιών των αγοριών με βάση τις βαθμολογίες του πρώτου και δευτέρου εξαμήνου.

Στην πρώτη περίπτωση, η σύγκριση των μέσων όρων γίνεται **μεταξύ των δύο ομάδων** (between-groups variability), ενώ στη δεύτερη περίπτωση η σύγκριση γίνεται **μέσα στις ομάδες** (within-group variability).

Η ANOVA αποκτά αξία όταν η σύγκριση γίνεται μεταξύ πολλών ομάδων με βάση μια ή περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές. Για παράδειγμα, η σύγκριση ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων ελαιολάδων διαφορετικών κατηγοριών (ομάδες) με βάση τις μετρήσεις της περιεκτικότητας (%) των ελαιολάδων σε διγλυκερίδια (ανεξάρτητη μεταβλητή).

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθεί η Ανάλυση Διακύμανσης με σκοπό να βρει τις μεταβλητές εκείνες που διαφοροποιούν τα ελαιόλαδα των τεσσάρων κατηγοριών. Βασικές προϋποθέσεις για την ANOVA είναι i) οι πληθυσμοί από όπου επιλέγονται τα ανεξάρτητα μεταξύ τους δείγματα, να ακολουθούν κανονική κατανομή και ii) οι πληθυσμοί αυτοί, να έχουν όλοι την ίδια κατανομή σ^2 . Η κατανομή των μετρήσεων (δειγμάτων) ελέγχεται είτε με ιστογράμματα, είτε με διαγράμματα πιθανότητας. Πάντως, η ANOVA είναι ανεκτική σε μικρές αποκλίσεις από την κανονική κατανομή, η οποία συνήθως παρατηρείται στην ανάλυση μικρού αριθμού δειγμάτων. Έτσι:

1. Υπολογίζεται η διακύμανση, s_b^2 , των μετρήσεων μιας μεταβλητής από ομάδα σε ομάδα, μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων, (between-groups), λαμβάνοντας υπόψη

την απόκλιση του μέσου όρου των μετρήσεων των δειγμάτων κάθε ομάδας από το γενικό μέσο όρο. Ο υπολογισμός γίνεται με βάση την εξίσωση

$$s_b^2 = n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 / (h-1) \quad (3.1)$$

Για τον υπολογισμό της διακύμανσης μεταξύ των ομάδων, θεωρούμε ότι όλα τα δείγματα έχουν επιλεγεί από ένα πληθυσμό. Οι βαθμοί ελευθερίας των μετρήσεων μεταξύ των ομάδων είναι $(h-1)$.

2. Υπολογίζεται η διακύμανση, s_w^2 , των μετρήσεων μιας μεταβλητής μέσα σε κάθε ομάδα, μεταβλητότητα μέσα σε κάθε δείγμα, (within-group). Ο υπολογισμός γίνεται με την εξίσωση

$$s_w^2 = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / h(n-1) \quad (3.2)$$

Το άθροισμα για τις τιμές του j και η διαίρεση με $(n-1)$ δίνει τη διακύμανση για κάθε ομάδα. Το άθροισμα για τις τιμές του i και η διαίρεση με h δίνει το μέσο όρο των διακυμάνσεων όλων των ομάδων. Το γινόμενο $h(n-1)$ εκφράζει τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας των μετρήσεων μέσα στις ομάδες.

Και στους δύο υπολογισμούς τα αθροίσματα των τετραγώνων των αποκλίσεων στις εξισώσεις 3.1 και 3.2 περιγράφουν τη διακύμανση της μεταβλητής μεταξύ των ομάδων (between-groups variability) και μέσα σε κάθε ομάδα (within-group variability). Είναι γνωστά ως **σφάλμα της διακύμανσης** (error of variance) και συμβολίζεται με SS (sum of squares).

$$\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad \text{και} \quad \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$$

3. Η **στατιστική σημαντικότητα** των αποτελεσμάτων ελέγχεται με το **Fisher F-τεστ**, το οποίο συγκρίνει τις διακυμάνσεις μέσα στις ομάδες και μεταξύ των ομάδων.

$$F = s_b^2 / s_w^2 \quad (3.3)$$

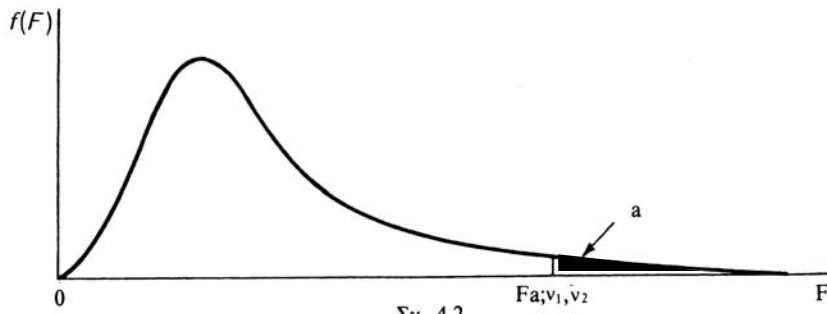
Ας σημειωθεί ότι οι δύο διακυμάνσεις s_b^2 και s_w^2 αποτελούν τους εκτιμητές της διακύμανσης σ_0^2 στην περίπτωση που όλα τα δείγματα είχαν ληφθεί από ένα μοναδικό πληθυσμό. Οι διακυμάνσεις s_b^2 και s_w^2 ονομάζονται στη γλώσσα της στατιστικής Mean Square Effect (MSeffect) και Mean Square Error (MSerror), αντίστοιχα.

Η σύγκριση των δύο διακυμάνσεων (ή των δύο μέσων όρων) στηρίζεται στην αλήθεια ή όχι μιας υπόθεσης, η οποία ονομάζεται αρχική ή **μηδενική υπόθεση** (null hypothesis) και συμβολίζεται με H_0 . Υποθέτουμε αρχικά ότι οι διακυμάνσεις s_b^2 και s_w^2 συμπίπτουν με τη διακύμανση σ_0^2 .

Εάν η μηδενική υπόθεση είναι αληθινή, τότε $\sigma_0^2 = s_b^2 = s_w^2$ και $F = 1$. Επομένως, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των μετρήσεων (π. χ. των 1,2-DGs) μεταξύ των ομάδων (κατηγοριών των ελαιολάδων) και η ανεξάρτητη μεταβλητή (1,2-DGs) δεν διαφοροποιεί τα δείγματα. Αν όμως τα δείγματα των ελαιολάδων διαφοροποιούνται (δηλαδή δεν ισχύει η αρχική υπόθεση), τότε η διακύμανση μεταξύ των ομάδων s_b^2 θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από τη διακύμανση μέσα στα δείγματα s_w^2 , δηλαδή

$$F = s_b^2 / s_w^2 > 1. \quad (3.4)$$

4. Εκτιμάται η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, δηλαδή πόσο σημαντικές είναι οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό συγκρίνεται ο λόγος F που υπολογίστηκε με κάποια θεωρητική τιμή $F_{h-1, n-h}(\alpha)$ που βρίσκεται από πίνακες F -κατανομής, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο λόγος των δύο διακυμάνσεων ακολουθεί την F -κατανομή. Στο συμβολισμό $F_{h-1, n-h}(\alpha)$, $h-1$ και $n-h$ είναι οι βαθμοί ελευθερίας των μετρήσεων μέσα και μεταξύ των δειγμάτων, αντίστοιχα. Το α στο συμβολισμό της F , ονομάζεται **στάθμη σημαντικότητας** (significance level) του τεστ. Το α εκφράζει την πιθανότητα του σφάλματος τύπου I, δηλαδή το σφάλμα να απορρίψουμε την μηδενική υπόθεση H_0 , ενώ είναι σωστή. Η πιθανότητα α για το σφάλμα τύπου I, λαμβάνει τιμές από 0.001 έως και 0.05. Το διάγραμμα στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζει την F -κατανομή για μια τιμή της α . Το γραμμοσκιασμένο τμήμα της καμπύλης εξαρτάται από την τιμή της στάθμης σημαντικότητας και ονομάζεται απορριπτική περιοχή της αρχικής υπόθεσης στη F -κατανομή. Δηλαδή ορίζουμε σαν απορριπτική περιοχή της αρχικής υπόθεσης το κομμάτι του δειγματοχώρου το οποίο έχει τιμές $F > F_{h-1, n-h}(\alpha)$. Τα χαρακτηριστικά της ανάλυσης της διακύμανσης παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.3.



Σχ. 4.2

Σχήμα 3.4 Κατανομή F για μια πιθανότητα α , ν_1 και ν_2 είναι οι βαθμοί ελευθερίας.

Ο Πίνακας 3.3 περιέχει ορισμένους τύπους, οι οποίοι διευκολύνουν τους υπολογισμούς της Ανάλυσης Διακύμανσης, ιδιαίτερα στην περίπτωση που ο αριθμός των μετρήσεων διαφέρει από ομάδα σε ομάδα.

Πίνακας.3.3 Σύνθετος πίνακας Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA).

Πηγή μεταβολής	Άθροισμα τετραγώνων (SS)	Βαθμοί ελευθερίας	Μέση Μεταβολή	F-τεστ
Μεταξύ των δειγμάτων (Παράγοντας)	$SS_b = \sum_i \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T_{..}^2}{n}$	$h - 1$	$s_b^2 = MS_{effect} = \frac{SS_b}{h - 1}$	$F = \frac{s_b^2}{s_w^2}$
Μέσα στο δείγμα (Σφάλμα)	$SS_w = \sum_i \sum_j x_{ij}^2 - \sum_i \frac{T_i^2}{n_i}$	$n - h$	$s_w^2 = MS_{error} = \frac{SS_w}{n - h}$	
Ολική	$SS_b + SS_w = \sum_i \sum_j x_{ij}^2 - \frac{T_{..}^2}{n}$	$n - 1$		

Όπου, $T_i = \sum_j^{n_i} x_{ij}$ και $T_{..} = \sum_i \sum_j x_{ij}$

Ένα ακόμα κριτήριο αφορά τη σταθερότητα της διακύμανσης, η οποία ελέγχεται με ένα διάγραμμα των διακυμάνσεων ως προς τους μέσους όρους των μετρήσεων των διαφόρων ομάδων. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των διακυμάνσεων και των μέσων όρων (π.χ. αύξηση της διακύμανσης με το μέσο όρο), τότε βγαίνει το συμπέρασμα ότι το σφάλμα της διακύμανσης είναι σταθερό.

3.4.1 Εφαρμογή της Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA) για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων.

Αναφορικά με τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων που εξετάστηκαν, στην παρούσα εργασία, για την εφαρμογή της ANOVA, ελήφθη ένας ικανός αριθμός n αντιπροσωπευτικών δειγμάτων ελαιολάδων για h κατηγορίες (ομάδες). Στα ελαιόλαδα κάθε ομάδας μετρήθηκαν οι ανεξάρτητες μεταβλητές π.χ. 1,3-DGs, υπολογίστηκε ο λόγος $D = 1,2\text{-DGs/DGs}$, το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) και ο αριθμός Ιωδίου (IV). Για κάθε μεταβλητή σε κάθε ομάδα i έγιναν j μετρήσεις, x_{ij} . Το πείραμα, για $h = 4$ κατηγορίες ελαιολάδων, απεικονίζεται στον Πίνακα 3.4. Ο Πίνακας περιέχει και τους μέσους όρους των μετρήσεων για κάθε ομάδα και το μέσο όρο όλων των επί μέρους μέσων όρων των ομάδων. Το ζήτημα που τίθεται είναι ποια ή ποιες από τις μεταβλητές, 1,3-DGs, D, (SFA) και (IV) μπορεί να διαφοροποιήσει τα ελαιόλαδα κατά κατηγορία. Αυτό γίνεται εφικτό, με τη στατιστική μέθοδο ANOVA.

Πίνακας 3.4 Διάταξη των μετρήσεων μιας μεταβλητής δειγμάτων για τις τέσσερις κατηγορίες των ελαιολάδων (ομάδες).

Ομάδες	Μετρήσεις δειγμάτων	Μέσοι όροι
Λαμπάντε	$x_{11} \ x_{12} \dots \ x_{1n}$	\bar{x}_1
Ραφιναρισμένα	$x_{21} \ x_{22} \dots \ x_{2n}$	\bar{x}_2
Πυρηγέλαια	$x_{31} \ x_{32} \dots \ x_{3n}$	\bar{x}_3
Έξτρα Παρθένα Ελαιόλαδα	$x_{41} \ x_{42} \dots \ x_{4n}$	\bar{x}_4
Γενικός μέσος όρος		\bar{x}

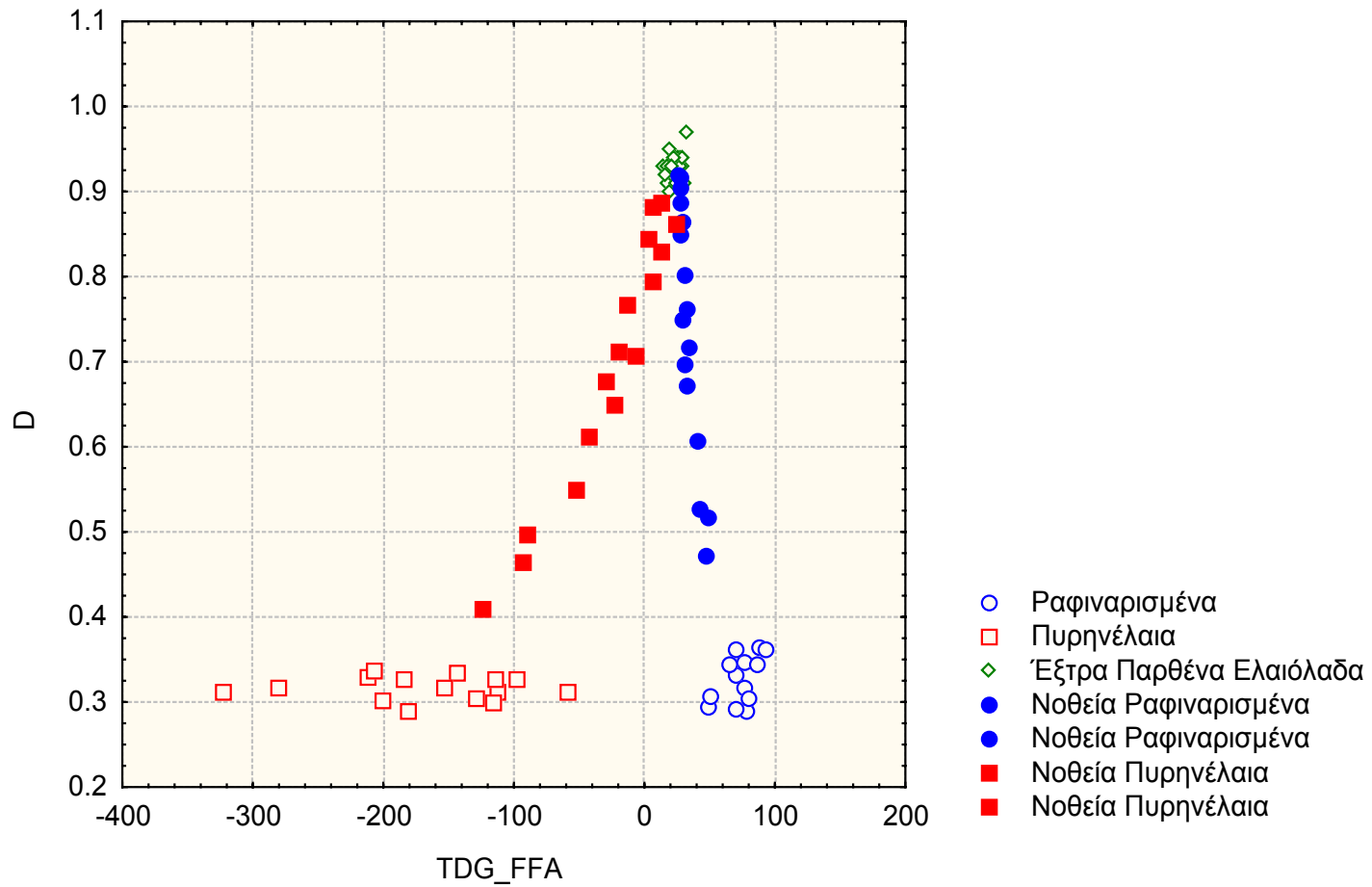
Με εφαρμογή της ANOVA εξετάζεται, η διακύμανση των τιμών των μεταβλητών ανάλογα με τον τύπο των ελαιολάδων, καθώς και ο έλεγχος της **μηδενικής υπόθεσης**, δηλαδή τη μη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους μέσους όρους των μετρήσεων μεταξύ των ομάδων. Ο λόγος **Fisher F**, της διακύμανσης μεταξύ των ομάδων προς τη διακύμανση εντός των ομάδων (εξίσωση 3.4), έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα για την επιλογή μεταβλητών των οποίων η τιμή F είναι μεγαλύτερη του 1 όταν $\alpha = 0.005$. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.5, οι 14 μεταβλητές χαρακτηρίζονται από $F > 1$. Επίσης οι 12 από το σύνολο των μεταβλητών έχουν α πολύ μικρότερο του 0.005 άρα είναι στατιστικά σημαντικές. Οι πειραματικές τιμές κάθε μεταβλητής είναι $F(3,72)$, με βαθμούς ελευθερίας 3 και 72, συγκρίνονται και με τις τιμές κριτηρίου που παίρνουμε από στατιστικούς πίνακες, όπου για τιμή $\alpha < 0.005$ βρίσκεται ότι $F_{\text{critical}} = 4.729$.⁵² Παρατηρούμε ότι, οι μεταβλητές που έχουν τιμή $F > F_{\text{critical}}$ εμφανίζουν ταυτόχρονα τιμή $\alpha \ll 0.005$. Επομένως, προκύπτει ότι οι στατιστικές τιμές του F είναι σημαντικές για $\alpha = 0.005$, άρα η μηδενική υπόθεση, ότι δηλαδή δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ μεταβλητών, απορρίπτεται.

Πίνακας 3.5 Πίνακας της Ανάλυσης Διακύμανσης, 14 μεταβλητών, για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών των ελαιολάδων.

Ανάλυση Διακύμανσης Analysis of Variance								
Μεταβλητές	Αθροίσματα τετραγώνων SS	df Effect	Μέσα Τετράγωνα MS	SS Σφάλμα	df Error	MS Σφάλμα	F(3,72)	α
1,2 DGs	1.661	3.000	0.554	10.094	72.000	0.140	3.949	0.011501
1,3 DGs	191.082	3.000	63.694	37.099	72.000	0.515	123.615	0.000000
Ολικά Διγλυκερίδια TDG	156.293	3.000	52.098	75.334	72.000	1.046	49.792	0.000000
Λόγος D	6.794	3.000	2.265	0.050	72.000	0.001	3232.374	0.000000
Στερόλες	0.173	3.000	0.058	0.095	72.000	0.001	43.943	0.000000
Οξύτητα	662.953	3.000	220.984	254.598	72.000	3.536	62.494	0.000000
Λινολενικό (LN)	0.189	3.000	0.063	0.838	72.000	0.012	5.408	0.002063
Λινελαϊκό (LO)	70.372	3.000	23.457	214.226	72.000	2.975	7.884	0.000128
Ελαϊκό (OL)	89.781	3.000	29.927	493.173	72.000	6.850	4.369	0.006971
Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα SFA	43.363	3.000	14.454	201.231	72.000	2.795	5.172	0.002713
Αριθμός Ιωδίου IV	106.068	3.000	35.356	254.090	72.000	3.529	10.019	0.000013
Log(Οξύτητα)	40.809	3.000	13.603	10.719	72.000	0.149	91.375	0.000000
TDG - Οξύτητα	606115.919	3.000	202038.640	211746.605	72.000	2940.925	68.699	0.000000
LN/LO	85.455	3.000	28.485	222.619	72.000	3.092	9.213	0.000031

Οι τιμές των μεταβλητών που έχουν $\alpha < 0.005$ φαίνονται με έντονη γραφή (bold) στον παραπάνω Πίνακα. Οι ίδιες μεταβλητές, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, έχουν τιμές F μεγαλύτερες του $F_{critical}$ και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις επόμενες στατιστικές μεθόδους (C.A., D.A.) για την ταξινόμηση των ελαιολάδων. Στον Πίνακα 3.5 εκτός από τις μεταβλητές που λαμβάνουμε απ' ευθείας από τα φάσματα ^{31}P και ^1H NMR, εμφανίζονται και οι μεταβλητές λογάριθμος της οξύτητας, η διαφορά των ολικών διγλυκεριδίων και της οξύτητας, καθώς και ο λόγος των συγκεντρώσεων των λιπαρών οξέων Λινολενικό/Λινελαϊκό.

Ο έλεγχος της κατανομής των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ιστογράμματα όπου και παρατηρήθηκε ότι, όλα τα δείγματα των μεταβλητών παρουσιάζουν αρκετά ικανοποιητική κατανομή, εκτός από την οξύτητα, η οποία παρουσιάζει ισχυρή κύρτωση (1,787). Οι στατιστικές μέθοδοι, όμως, είναι ασφαλέστερες στα συμπεράσματά τους, όταν τα δείγματα των μεταβλητών παρουσιάζουν κανονική κατανομή. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε το λογάριθμο της οξύτητας, ο οποίος παρουσιάζει κανονική κατανομή στα δείγματα που μελετούνται. Στο επόμενο διάγραμμα (Σχήμα 3.5) παρουσιάζεται η μεταβολή του λόγου D με τη διαφορά TDGs-Οξύτητα. Παρατηρούμε ότι, αυτή η παράμετρος διαφοροποιεί τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα από τα ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας. Όπως, φαίνεται στο Σχήμα, θα συζητηθεί και παρακάτω, τα μείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ραφινρισμένα ελαιόλαδα και πυρηνέλαια, δηλαδή τα νοθευμένα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα ανιχνεύονται στο διάγραμμα. Παρόλο που χρειάζεται περισσότερη θεωρητική και πειραματική διερεύνηση, φαίνεται ξεκάθαρα ότι η παράμετρος TDGs-Οξύτητα είναι χρήσιμη για την ταξινόμηση των ελαιολάδων και για την ανίχνευση νοθείας. Τέλος, η μεταβλητή Λινολενικό οξύ /Λινελαϊκό οξύ, χρησιμοποιήθηκε βασιζόμενοι σε παλαιότερες μελέτες νοθείας, όπου η χρήση αυτής της μεταβλητής έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για το διαχωρισμό των έξτρα παρθένων ελαιολάδων με άλλες κατηγορίες ελαιολάδων.²²



Σχήμα 3.5 Μεταβολή του λόγου D με τη διαφορά TDGs-Οξύτητα.

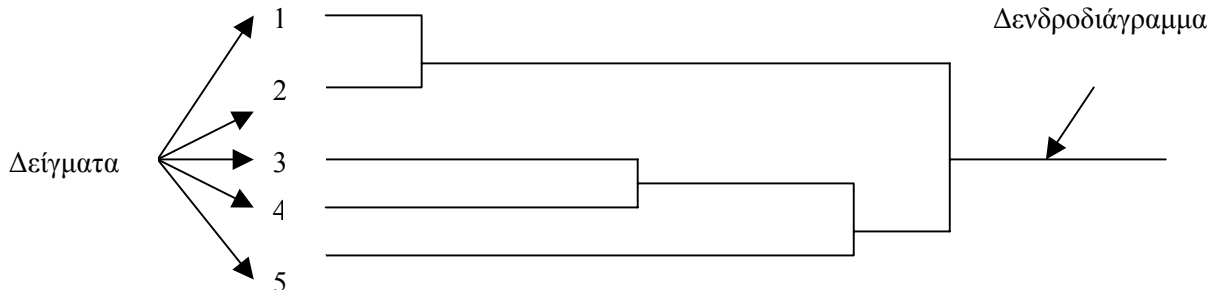
3.5 Ανάλυση Συστάδων (Cluster Analysis, C.A.).

Η Ανάλυση Συστάδων (C.A.), έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για στην συστηματική επιστημονική έρευνα. Με τη βοήθεια των κατάλληλων αλγορίθμων, μπορεί να γίνει συναρμογή των πειραματικών τιμών σε ομάδες, αποκλείοντας έτσι την πιθανότητα σφάλματος. Ουσιαστικά, δημιουργούνται μια σειρά από αλληλοσυνδεόμενες υποθέσεις, όπου εισάγουν στατιστικά μοντέλα ικανά για να ομαδοποιήσουν τις πειραματικές τιμές. Ειδικότερα, με αυτήν τη στατιστική διαδικασία διαμορφώνονται ομάδες ή συστάδες που έχουν κοινά χαρακτηριστικά. Στη βιολογία, η C.A. χρησιμοποιείται στην ταξινόμηση ζώων και φυτών. Στην ιατρική, η C.A. βρίσκει εφαρμογή στην εξακρίβωση ασθενειών. Στις κοινωνικές επιστήμες, η διαδικασία είναι δημοφιλής στην κατανόηση και ανακάλυψη ομογενών ομάδων.

Η Ανάλυση Συστάδων, ταξινομεί τα αντικείμενα ή δείγματα (cases) σε ομάδες ή κατηγορίες (groups), χωρίς να υπάρχει η εκ των προτέρων (a priori) ταξινόμησή τους. Συνεπώς, η ιδιότητα μέλους της ομάδας (group membership) στην C.A. είναι άγνωστη, δηλαδή, η στατιστική μέθοδος δε γνωρίζει σε ποια κατηγορία ελαιολάδου ανήκει το δείγμα. Επίσης, στην C.A. δεν είναι γνωστή η ταυτότητα των ομάδων (unsupervised method of analysis), δηλαδή, πόσες κατηγορίες ελαιολάδων υπάρχουν. Ο στόχος της C.A. είναι η ταξινόμηση ομογενών ομάδων ή ομάδων που έχουν την ίδια ταυτότητα, κατά συστάδες.

Η επιλογή των μεταβλητών είναι αποφασιστική στην C.A. γιατί αυτές καθορίζουν τις συστάδες. Οι έννοιες της **απόστασης** (distance) και της **ομοιότητας** (similarity) είναι βασικές στην στατιστική διαδικασία. Η απόσταση καθορίζει το πόσο μακριά είναι ομογενή δείγματα, ενώ η ομοιότητα καθορίζει την εγγύτητα ομογενών δειγμάτων. Συνήθως στη C.A. τα δείγματα τοποθετούνται κατά συστάδες με βάση την εγγύτητά τους. Η επεξεργασία των μετρήσεων είναι απαραίτητη στην περίπτωση που έχουμε μετρήσεις σε διαφορετική αριθμητική κλίμακα (π.χ. μία σειρά μετρήσεων της τάξης του 0.1 και μία άλλη σειρά μετρήσεων της τάξης του 100). Σε αυτή την περίπτωση προχωρούμε σε αυτοκλιμάκωση (autoscaling) των μετρήσεων (κανονικοποίηση των μετρήσεων, ώστε να έχουν μοναδιαία διακύμανση). Αυτή η διαδικασία, η οποία ονομάζεται **z-score**, προσδίδει σε όλες τις μεταβλητές την ίδια βαρύτητα στους υπολογισμούς. Έτσι, η δημιουργία συστάδων απαιτεί εξαρχής την κανονικοποίηση των μετρήσεων.

Η Ανάλυση Συστάδων όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, συνδυάζει δείγματα με τη μικρότερη απόσταση ή την μεγαλύτερη ομοιότητα. Το αποτέλεσμα είναι ένα δενδροδιάγραμμα όπου όλα τα δείγματα είναι μέλη μιας συστάδας. Ένα παράδειγμα δενδροδιαγράμματος παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα.3.6 Ενδεικτικό δενδροδιάγραμμα.

Παρατηρούμε ότι οι συστάδες συνδέονται κατά τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να δημιουργηθεί τελικά μία και μόνη συστάδα

Υπολογισμός Απόστασης (Distance Measures)

Η μέθοδος Joining ή Tree Clustering χρησιμοποιεί τις ομοιότητες ή τις αποστάσεις μεταξύ των αντικειμένων όταν δημιουργεί τις συστάδες. Ο πιο κοινός τρόπος υπολογισμού αποστάσεων μεταξύ αντικειμένων σε πολλές διαστάσεις είναι η ευκλείδεια απόσταση.

α) Ευκλείδεια Απόσταση (Euclidean distance)

Καλείται η γεωμετρική απόσταση στον πολυδιάστατο χώρο. Υπολογίζεται ως :

$$\text{Distance}(x, y) = \left\{ \sum_i (x_i - y_i)^2 \right\}^{1/2} \quad (3.5)$$

Σύμφωνα με την ευκλείδεια απόσταση, όσο μικρότερη είναι η απόσταση, τόσο περισσότερο όμοια είναι τα δείγματα. Τα x_i και y_i εκφράζουν τις συντεταγμένες των μεταβλητών.

β) Τετράγωνο Ευκλείδειας Απόστασης (Squared Euclidean distance)

Με το τετράγωνο της ευκλείδειας απόστασης δίνεται προοδευτικά μεγαλύτερη βαρύτητα σε αντικείμενα που είναι απομακρυσμένα. Η απόσταση αυτή υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Distance}(x, y) = \sum_i (x_i - y_i)^2 \quad (3.6)$$

γ) Απόσταση Manhattan (City – block, Manhattan distance)

Η απόσταση αυτή είναι η μέση διαφορά δειγμάτων στον πολυδιάστατο χώρο. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με την ευκλείδεια απόσταση. Η απόσταση Manhattan δίνεται από τη σχέση :

$$\text{Distance (x, y)} = \sum_i |x_i - y_i| \quad (3.7)$$

δ) Απόσταση Chebychev (Chebychev distance)

Η απόσταση Chebychev υπολογίζει την απόλυτη μέγιστη διαφορά μεταξύ των συντεταγμένων των μεταβλητών. Η απόσταση αυτή υπολογίζεται ως :

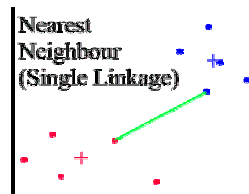
$$\text{Distance (x,y)} = \text{Maximum}|x_i - y_i| \quad (3.8)$$

Κανόνες Ένωσης – Σύνδεσης (Amalgamation or Linkage Rules)

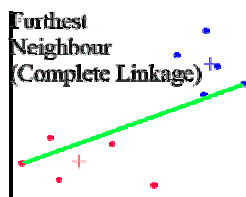
Πρέπει να υπάρχουν κάποιοι κανόνες καθορισμού για το πότε δύο συστάδες είναι όμοιες ώστε να μπορούν να συνδυαστούν. Κάποιοι από τους κανόνες σύνδεσης είναι οι εξής:

α) Απλή Σύνδεση πλησιέστερων σημείων (Single Linkage)

Η απόσταση μεταξύ δύο συστάδων καθορίζεται από την απόσταση των δύο πλησιέστερων αντικειμένων σε διαφορετικές συστάδες.

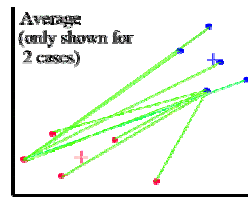
**β) Σύνδεση πλέον απομακρυσμένων σημείων (Complete Linkage)**

Η απόσταση μεταξύ των συστάδων καθορίζεται από τη μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ οποιονδήποτε αντικειμένων στις διαφορετικές συστάδες.



γ) Μη κανονικοποιημένη μέση απόσταση (Unweighted pair – group average)

Σε αυτή την περίπτωση, η απόσταση μεταξύ δύο συστάδων υπολογίζεται ως η μέση απόσταση μεταξύ όλων των ζευγών αντικειμένων στις δύο διαφορετικές συστάδες.



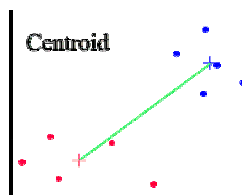
Ο κόκκινος και μπλε σταυρός δηλώνουν τα κέντρα των δύο cluster.

δ) Κανονικοποιημένη μέση απόσταση (Weighted pair – group average)

Αυτή η μέθοδος είναι περίπου η ίδια με την προηγούμενη. Η μοναδική διαφορά έγκειται στον τρόπο υπολογισμού του μεγέθους της κάθε συστάδας.

ε) Μη κανονικοποιημένο κεντροειδές (Unweighted pair – group centroid)

Είναι το μέσο σημείο στον πολυδιάστατο χώρο. Στην ουσία είναι το κέντρο βάρους της συστάδας. Η απόσταση μεταξύ δύο συστάδων καθορίζεται ως η διαφορά μεταξύ δύο κεντροειδών.



Ο κόκκινος και ο μπλε σταυρός δηλώνουν τα κέντρα των δύο cluster.

στ) Η διάμεσος του κανονικοποιημένου κεντροειδούς (Weighted pair – group centroid, median)

Η μέθοδος είναι παρόμοια με την προηγούμενη, με τη διαφορά ότι στους υπολογισμούς λαμβάνονται υπό όψιν διαφορές στα μεγέθη των συστάδων.

ζ) Μέθοδος Ward's (Ward's method)

Η μέθοδος αυτή είναι διαφορετική από όλες τις προηγούμενες. Χρησιμοποιεί μία προσεγγιστική ανάλυση της διακύμανσης για την αξιολόγηση της απόστασης μεταξύ των συστάδων. Γίνεται προσπάθεια ελαχιστοποίησης του αθροίσματος τετραγώνων (Sum of Squares, SS), δύο οποιονδήποτε (υποθετικών) συστάδων που μπορεί να δημιουργηθούν σε κάθε βήμα της διαδικασίας. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο δημιουργούνται συστάδες μικρού μεγέθους.

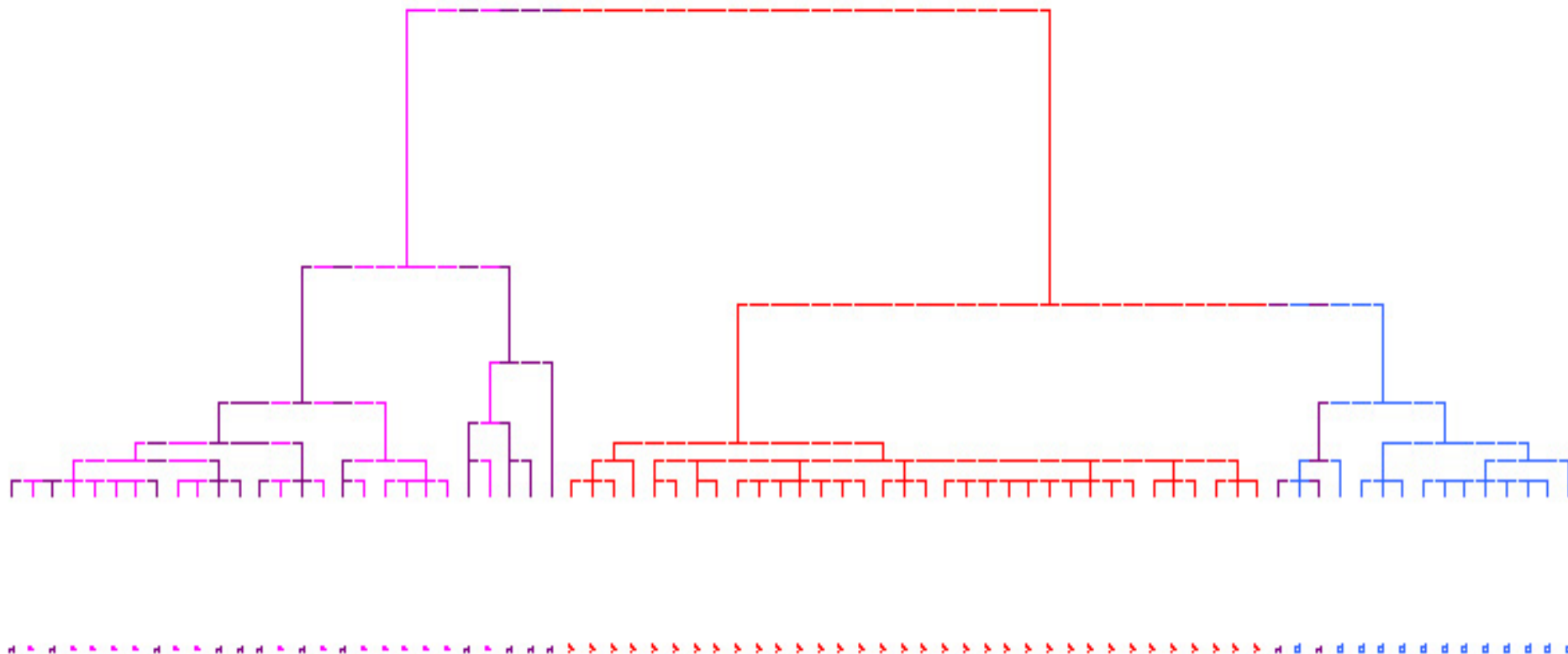
3.5.1 Ταξινόμηση των ελαιολάδων με τη μέθοδο της Ανάλυσης Συστάδων.

Η μέθοδος της Ανάλυσης Συστάδων χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των τεσσάρων κατηγοριών των ελαιολάδων. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενος, το είδος των ομάδων δεν είναι γνωστό από πριν. Η μέθοδος προσπαθεί να ταξινομήσει τα δείγματα που έχουν παρόμοιες ιδιότητες. Επομένως, τα δείγματα διαφοροποιούνται με βάση τις πειραματικές τιμές των μεταβλητών τους. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την σύνδεση των επιμέρους συστάδων είναι τα εξής:

1. Ξεκινάμε με n συστάδες, κάθε μια περιέχει ένα δείγμα και οι αρχικές συστάδες αριθμούνται από ένα έως n .
2. Αναζητούμε να βρούμε το ζεύγος εκείνο των συστάδων που έχει παρόμοιες ιδιότητες ή έχει τη μικρότερη απόσταση από τα υπόλοιπα. Έστω ότι δύο τέτοιες συστάδες είναι η i και η j , οι οποίες συνδέονται βάση της ομοιότητάς τους, S_{ij} , η οποία είναι συμμετρική ($S_{ij} = S_{ji}$) και μη αρνητική.
3. Μειώνουμε τον αριθμό των συστάδων κατά μία κάθε φορά που συνδέουμε ένα ζεύγος συστάδων όπως αναφέρθηκε παραπάνω.
4. Τα δύο παραπάνω βήματα 2, 3 πραγματοποιούνται $n-1$ φορές μέχρι όλα τα δείγματα να δημιουργήσουν μία κοινή συστάδα, δενδροδιάγραμμα.

Για τη δημιουργία ενός δενδροδιαγράμματος υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι υπολογισμού της απόστασης μεταξύ των δειγμάτων, καθώς και διαφορετικοί τρόποι σύνδεσης των συστάδων που δημιουργούνται, όπως αναφέρθηκαν και προηγούμενος. Για τη συγκεκριμένη μελέτη, ο υπολογισμός των αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων στην περίπτωση των ελαιολάδων έγινε με τη χρήση της Ευκλείδειας απόστασης, ως κανόνας σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε η μη κανονικοποιημένη μέση απόσταση τέλος, έγινε η χρήση της αυτοκλιμάκωσης των τιμών προκειμένου όλες οι μεταβλητές να έχουν την ίδια βαρύτητα στους υπολογισμούς. Το δενδροδιάγραμμα που κατασκευάστηκε για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών των ελαιολάδων φαίνεται στο Σχήμα 3.6. Για τη μέθοδο της Ανάλυσης Συστάδων χρησιμοποιήθηκαν οι στατιστικά σημαντικότερες μεταβλητές: τα 1,3DGs, τα ολικά διγλυκερίδια (TDGs), ο λόγος D, οι στερόλες, το Λινελαϊκό οξύ (LO), ο Αριθμός Ιωδίου (IV), ο Log(Οξύτητα), η διαφορά TDGs – (Οξύτητα) και ο λόγος των λιπαρών οξέων Λινολενικό/Λινελαϊκό (LN/LO). Οι συγκεκριμένες μεταβλητές προέκυψαν από τη στατιστική μέθοδο Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA), (Πίνακας 3.5) Στο

δενδροδιάγραμμα παρατηρούμε ότι ομαδοποιούνται σε χωριστές συστάδες τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (V), τα ραφιναρισμένα ελαιόλαδα (R), τα πυρηνέλαια (P) ενώ τα λαμπάντε ελαιόλαδα (L) δεν αποτελούν μια ξεχωριστή συστάδα, αλλά διασπείρονται μεταξύ των πυρηνελαίων (P) και των ραφιναρισμένων ελαιολάδων (R). Συμπεραίνουμε, ότι η στατιστική μέθοδος C.A. δεν μπορεί να διαφοροποιήσει πλήρως όλες τις κατηγορίες των ελαιολάδων και για αυτό το λόγο προχωρήσαμε σε μια ανώτερη στατιστική μέθοδο, την Ανάλυση Διακριτότητας Discriminant Analysis, (D.A.).



Σχήμα 3.7 Δενδροδιάγραμμα ταξινόμησης για τα ελαιόλαδα τεσσάρων κατηγοριών με τη στατιστική μέθοδο της Ανάλυσης Συστάδων. V=έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (κόκκινο), R=ραφιναρισμένα ελαιόλαδα (μπλε), L=λαμπάντε ελαιόλαδα (μωβ), P=πυρηγέλαια (φούξια).

3.6 Ανάλυση Διακριτότητας (Discriminant Analysis, D.A.).

Η Ανάλυση Διακριτότητας D.A. είναι μια ισχυρή πολυπαραμετρική στατιστική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τη διάκριση ή διαφοροποίηση ή ταξινόμηση αντικειμένων σε κατηγορίες ή ομάδες με βάση ορισμένες ανεξάρτητες μεταβλητές. Η D.A. συνδυάζει τις διαθέσιμες μεταβλητές κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να μεγιστοποιούνται οι υπάρχουσες διαφορές μεταξύ των ομάδων. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με την Ανάλυση Συστάδων, ο αριθμός και το είδος των ομάδων θα πρέπει να είναι γνωστός πριν την εφαρμογή της D.A.

► Το μοντέλο της Ανάλυσης Διακριτότητας

Επιθυμούμε να διαπιστώσουμε ποιες μεταβλητές ή πιο σωστά ποιος είναι ο καλύτερος συνδυασμός των μεταβλητών που διαφοροποιεί ή ταξινομεί τα ελαιόλαδα ανάλογα σε ποια κατηγορία ανήκουν. Για το λόγο αυτό, συγκεντρώνουμε πολυάριθμες μετρήσεις για μια σειρά μεταβλητών, οι οποίες αναφέρονται κυρίως στη χημική σύσταση των ελαιολάδων (π.χ. συγκεντρώσεις διγλυκεριδίων, ελαϊκού οξέος, λινελαϊκού οξέος, κ.λ.π.), για ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων για κάθε κατηγορία. Η D.A. καλείται να προσδιορίσει ποιος συνδυασμός μεταβλητών είναι ο καλύτερος για να διαπιστωθεί ότι ένα ελαιόλαδο ανήκει σε μια από τις τέσσερις κατηγορίες.

Η αρχή λειτουργίας της D.A. βασίζεται στην κατάστρωση των **συναρτήσεων διάκρισης** (discriminant functions), R , οι οποίες ονομάζονται και **κανονικές ρίζες** (canonical roots). Το σύνολο των συναρτήσεων R_i για τις διάφορες ομάδες i ($i=1,2,3,\dots$) αποτελεί **το μοντέλο** της ανάλυσης D.A. Στην πραγματικότητα, οι συναρτήσεις R_i είναι εξαρτημένες μεταβλητές και σχηματίζονται με γραμμικό συνδυασμό των ανεξάρτητων μεταβλητών (χημική σύσταση ελαίων), x_m ($m=1,2,3,\dots$), οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη διάκριση των κατηγοριών ή ομάδων (περιοχές προέλευσης).

$$R_i = c_i + b_{i1}x_1 + b_{i2}x_2 + \dots + b_{im}x_m \quad (3.9)$$

Οι συντελεστές b_{im} των μεταβλητών m για τις ομάδες i ονομάζονται **συντελεστές διάκρισης** (discriminant coefficients) και c είναι μια σταθερά. Οι συντελεστές διάκρισης μεγιστοποιούν την απόσταση μεταξύ των μέσων όρων των μεταβλητών R . Μπορεί να είναι κανονικοποιημένοι ή μη κανονικοποιημένοι. Στην πρώτη περίπτωση, το μέγεθός τους αντανακλά τη σπουδαιότητα ή το βαθμό συμμετοχής κάθε μεταβλητής στη διάκριση των ομάδων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση των δειγμάτων σε ομάδες. Επίσης, η

κανονικοποίηση των συντελεστών διάκρισης έχει το πλεονέκτημα ότι οποιαδήποτε διαφορά στην τάξη μεγέθους των μεταβλητών εξαλείφεται. Τα γινόμενα των μη κανονικοποιημένων συντελεστών διάκρισης με τις αντίστοιχες μεταβλητές x_i ονομάζονται **πλεονεκτήματα** ή **επιτυχίες** ή **μέτρα διάκρισης** (scores).

Πολλές φορές η μεταβλητή R ονομάζεται και **μεταβλητή ομάδας** (grouping variable), ή **μεταβλητή κριτηρίου** (criterion variable), ενώ οι ανεξάρτητες μεταβλητές x_i ονομάζονται και **προάγγελοι** (predictors). Ο αριθμός των εξαρτημένων μεταβλητών R εξαρτάται από τον αριθμό των μεταβλητών ή των αριθμό των ομάδων και είναι το λιγότερο ίσος με $(p-1)$ ή $(g-1)$, όπου p και g είναι ο αριθμός των μεταβλητών ή των ομάδων, αντίστοιχα.

► Προϋποθέσεις για την επιτυχή εφαρμογή της Ανάλυσης Διακριτότητας

Υπάρχουν μια σειρά από κριτήρια ή διαγνωστικά τεστ, τα οποία έχουν μικρή ή μεγάλη βαρύτητα στην επιτυχή εφαρμογή της D.A. και φυσικά στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Θα αναφέρουμε τα πιο σημαντικά από αυτά:

1 Οι μετρήσεις κάθε μεταβλητής για όλα τα δείγματα πρέπει να εμφανίζουν **κανονική κατανομή** (normal distribution). Μπορεί κανείς εύκολα να διαπιστώσει με ιστογράμματα εάν οι μεταβλητές παρουσιάζουν κανονική κατανομή. Πάντως, ως σημειωθεί ότι αποκλίσεις από την κανονική κατανομή δεν είναι αποφασιστικές για την αξιοπιστία των στατιστικών αποτελεσμάτων.

2 Ο **πίνακας διακύμανσης/συν-διακύμανσης** (variance/covariance) των μεταβλητών όλων των ομάδων θα πρέπει να είναι **ομοιογενής**. Αυτό σημαίνει ότι οι διακυμάνσεις (τα τετράγωνα των τυπικών αποκλίσεων) και οι συν-διακυμάνσεις των μεταβλητών μεταξύ των διαφόρων ομάδων πρέπει να είναι ταυτόσημες. Υπάρχουν αρκετά διαγνωστικά τεστ για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διακυμάνσεων/συνδιακυμάνσεων, συνήθως όμως χρησιμοποιείται το λεγόμενο τεστ **Box M**, όπου στηρίζεται στο γνωστό τεστ **Fisher F**, το οποίο εξετάζει αν ισχύει ή όχι η μηδενική υπόθεση για τις διακυμάνσεις και συν-διακυμάνσεις. Αυτό το τεστ είναι ευαίσθητο στην ύπαρξη ή όχι κανονικής κατανομής των μεταβλητών. Πάντως, η D.A. είναι αρκετά εύρωστη ώστε να μην επηρεάζεται σημαντικά από την απουσία ομοιογένειας της διακύμανσης και συν-διακύμανσης των μεταβλητών.

3 Μία σημαντική απειλή για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της D.A. είναι η **ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των μέσων όρων των μεταβλητών των διαφόρων ομάδων και των διακυμάνσεων**. Αυτό μπορεί να συμβεί όταν κάποια ομάδα περιέχει

μια ή περισσότερες αφύσικες μετρήσεις (outliers) κάποιας μεταβλητής. Ένας ασφαλής τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος είναι ο διαρκής έλεγχος των μέσων τιμών και των διακυμάνσεων των μεταβλητών για πιθανή συσχέτιση.

4 Μια άλλη προϋπόθεση για την επιτυχή εφαρμογή της D.A. είναι η παντελής **απουσία συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών**. Εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ μεταβλητών (π.χ. μια μεταβλητή είναι το άθροισμα δύο άλλων μεταβλητών) ή μιας μεταβλητής με μια συνάρτηση διάκρισης, τότε η αναστροφή του πίνακα διακυμάνσεων/συνδιακυμάνσεων, η οποία απαιτείται κατά τους υπολογισμούς της D.A., δεν θα είναι δυνατή. Στην περίπτωση αυτή λέγεται ότι ο πίνακας διακυμάνσεων/συνδιακυμάνσεων είναι σε κακή κατάσταση (ill conditioned).

Για να αποφύγουμε μια τέτοια δυσάρεστη κατάσταση, η οποία δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην εγκυρότητα της ανάλυσης, είμαστε υποχρεωμένοι να ελέγχουμε τακτικά την λεγόμενη **τιμή ανοχής ή ανεκτικότητας** (tolerance value) για κάθε μεταβλητή. Γενικά, όταν μια μεταβλητή πλεονάζει, τότε η τιμή ανοχής για αυτήν τη μεταβλητή πλησιάζει το μηδέν.

► **Σημαντικότητα των συναρτήσεων διάκρισης**

Μετά την κατάστρωση των διαφόρων συναρτήσεων διάκρισης είμαστε υποχρεωμένοι να διαπιστώσουμε ποια ή ποιες από αυτές είναι σημαντικές και οδηγούν στην καλύτερη διάκριση των δειγμάτων κατά κατηγορίες, ή αλλιώς ποια ή ποιες από αυτές ταξινομούν καλύτερα τα δείγματα κατά κατηγορίες. Ουσιαστικά αναζητούμε τον αριθμό των ριζών που είναι στατιστικά σημαντικές για τη διάκριση μεταξύ των ομάδων. Μόνον αυτές οι ρίζες που είναι στατιστικά σημαντικές χρησιμοποιούνται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, ενώ οι στατιστικά μη σημαντικές ρίζες πρέπει να απορριφθούν.

Το πρώτο κριτήριο για τη σημαντικότητα των συναρτήσεων διάκρισης είναι οι **ιδιοτιμές**, (eigenvalues). Αυτές αντανακλούν το μέγεθος της διακύμανσης ή διασποράς των μεταβλητών σε κάθε συνάρτηση R . Όσο μεγαλύτερη είναι η ιδιοτιμή μιας συνάρτησης R , τόσο μεγαλύτερη είναι η διακύμανση των μεταβλητών και επομένως τόσο σημαντικότερη είναι η συγκεκριμένη συνάρτηση διάκρισης.

Ένα δεύτερο κριτήριο είναι το λεγόμενο **μέτρο Wilk's lambda** (Wilk's λ), το οποίο παίρνει τιμές από 0 έως 1. Όσο μικρότερη είναι η τιμή αυτού του μέτρου, η οποία καθορίζεται σε ένα επίπεδο σημαντικότητας, τόσο σημαντικότερη είναι η αντίστοιχη συνάρτηση R στη διάκριση των ομάδων. Για Wilk's $\lambda = 0$ η συνάρτηση

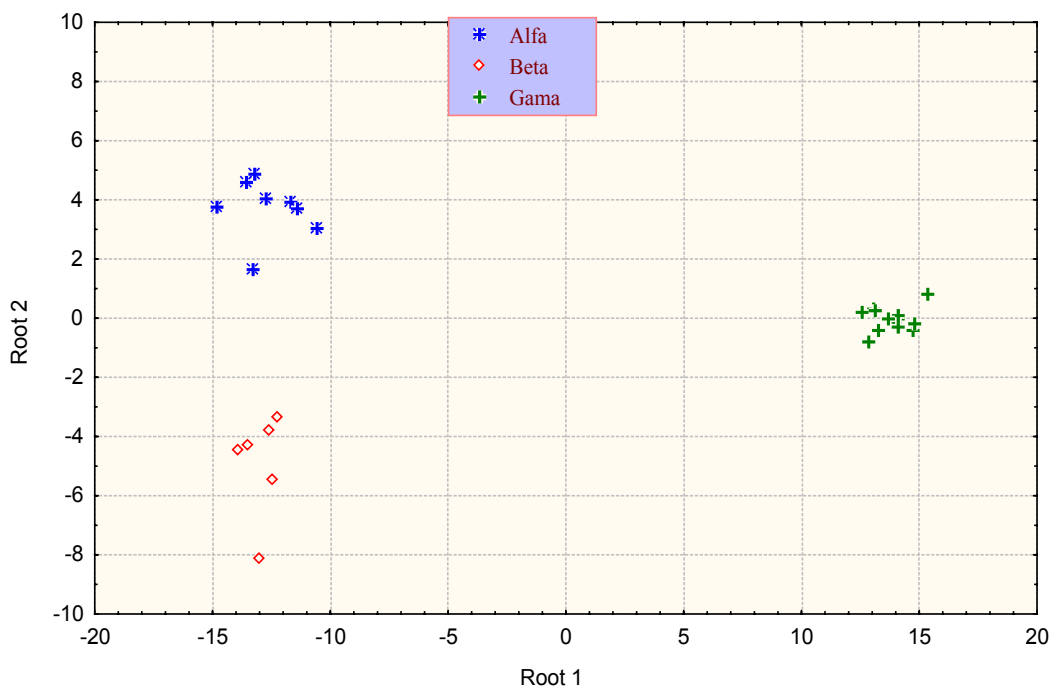
είναι μοναδικά η πιο σημαντική, ενώ για Wilk's $\lambda = 1$, η συνάρτηση απορρίπτεται ως καθολικά ασήμαντη.

Το Wilk's λ χρησιμοποιείται ακόμα για τον έλεγχο της διακριτικής ικανότητας κάθε μεταβλητής x_i στη συνάρτηση R . Όσο μικρότερη είναι η τιμή του Wilk's λ για μια ανεξάρτητη μεταβλητή, τόσο περισσότερο αυτή η μεταβλητή συμμετέχει στη συνάρτηση R και είναι σημαντική στη διάκριση των ομάδων.

Ένας τρίτος τρόπος ελέγχου της σημαντικότητας μιας ρίζας είναι ο λεγόμενος **δομικός πίνακας** (structure matrix), ο οποίος παρουσιάζει τη συσχέτιση κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής στο μοντέλο D.A. με κάθε συνάρτηση διάκρισης. Τα στοιχεία του δομικού πίνακα, τα οποία ονομάζονται **δομικοί συντελεστές συσχέτισης** όπου, μεγάλες θετικές τιμές των δομικών συντελεστών για μια ορισμένη συνάρτηση δείχνουν μεγάλη συσχέτιση των ανεξάρτητων μεταβλητών με τη συγκεκριμένη συνάρτηση, η οποία θεωρείται η πιο σημαντική. Αντίθετα, αρνητικές τιμές των δομικών συντελεστών σημαίνουν μικρή συσχέτιση των μεταβλητών με τη συνάρτηση. Γενικά ισχύει ότι, ο προσδιορισμός για τη σημαντικότητα μιας συνάρτησης γίνεται με την εφαρμογή των δομικών συντελεστών. Ο έλεγχος, όμως, για τη σημαντικότητα ή το βαθμό συμμετοχής κάθε μεταβλητής στη διαφοροποίηση των ομάδων, γίνεται με την εφαρμογή των κανονικοποιημένων συντελεστών.

Ενδεικτικό Διάγραμμα Διάκρισης

Έχοντας καταστρώσει το σείτ των συναρτήσεων R και αφού έχουμε προσδιορίσει τη σημαντικότητά τους, μπορούμε να απεικονίσουμε γραφικά την διακριτική τους ικανότητα σχεδιάζοντας διαγράμματα με τα μέτρα διάκρισης (scores) κάθε συνάρτησης. Το επόμενο διάγραμμα των δύο πρώτων σημαντικών συναρτήσεων διάκρισης, Root 1 και Root 2, που προκύπτουν από την ανάλυση D.A. δείχνει τη διάκριση μεταξύ τριών ομάδων. Στο παράδειγμα, (Σχήμα 3.8) η Root 1 διακρίνει ικανοποιητικά τις ομάδες Beta και Gama, ενώ στη Root 2 παρατηρείται μια ικανοποιητική διάκριση και για τις τρεις κατηγορίες που μελετούνται



Σχήμα 3.8 Ενδεικτικό διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη ταξινόμηση των τριών ομάδων.

► Εγκυρότητα ή εξακρίβωση (validation) του μοντέλου ταξινόμησης

Μια άλλη αποστολή της D.A. είναι η εξακρίβωση της **εγκυρότητας** (validation) της ταξινόμησης. Με αυτή τη διεργασία υποδηλώνεται η προβλεψιμότητα ή η ακρίβεια με την οποία γίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων στις ομάδες. Μετά το πέρας της εξαγωγής του μοντέλου D.A. και την κατάστρωση των συναρτήσεων διάκρισης, μπορούμε να προβλέψουμε πόσο σωστά τοποθετείται ή ανήκει ένα δείγμα σε μια ορισμένη ομάδα.

Υπάρχουν δύο τρόποι για να δοκιμασθεί η εγκυρότητα της ταξινόμησης. Κατά τον πρώτο τρόπο, χρησιμοποιούμε τα ίδια δεδομένα για την εξαγωγή του μοντέλου και των συναρτήσεων D.A. (οι οποίες διαφοροποιούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τις ομάδες) και για την εξακρίβωση της εγκυρότητας της πρόβλεψης. Κατά τον δεύτερο τρόπο τα δεδομένα (μετρήσεις μεταβλητών στα δείγματα) για την εξαγωγή του μοντέλου D.A. δεν χρησιμοποιούνται για την εγκυρότητα της πρόβλεψης, η οποία βασίζεται σε νέα δεδομένα. Στην πραγματικότητα, το πλήθος των μετρήσεων χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: Τα **προπαρασκευαστικό σετ** (training set) των δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του μοντέλου και των

συναρτήσεων D.A. και το **δοκιμαστικό σετ** (test set) για την εξακρίβωση της εγκυρότητας του μοντέλου. Το προπαρασκευαστικό τεστ αποτελείται από τα δύο τρίτα του πλήθους των δειγμάτων περίπου, ενώ το δοκιμαστικό σετ αποτελείται από το υπόλοιπο ένα τρίτο, τα δείγματα του οποίου θεωρούνται άγνωστα και επιζητείται η τοποθέτησή τους στις διάφορες ομάδες. Ο δεύτερος τρόπος πρόβλεψης (post hoc prediction) είναι πιο αξιόπιστος από τον πρώτο (a priori prediction). Πολλές φορές ο δεύτερος τρόπος ταξινόμησης ονομάζεται και σταυροειδής εγκυρότητα ή εξακρίβωση της D.A. (cross-validation).

Η εξακρίβωση της εγκυρότητας της ταξινόμησης γίνεται με τις **συναρτήσεις ταξινόμησης**, S_i , οι οποίες δεν πρέπει να συγχέονται με τις συναρτήσεις διάκρισης. Αυτές χρησιμοποιούνται για να εξακριβώσουμε σε ποια ομάδα είναι πιθανόν να ανήκει ένα άγνωστο δείγμα (στο δοκιμαστικό σετ) και είναι της μορφής

$$S_i = c_i + w_{i1}x_1 + w_{i2}x_2 + \dots + w_{im}x_m \quad (3.10)$$

Στην εξίσωση (3.10), ο δείκτης i υποδηλώνει την ομάδα, οι δείκτες 1, 2, ..., m υποδηλώνουν τον αριθμό των μεταβλητών, c_i είναι μια σταθερά για την ομάδα i , ο συντελεστής w_{ij} αντανακλά τη συμμετοχή της μεταβλητής j στην ομάδα i , x_j είναι η τιμή της μεταβλητής j . Τα γινόμενα $w_{ij}x_j$ ονομάζονται **μέτρα ταξινόμησης** (scores). Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις συναρτήσεις ταξινόμησης του προπαρασκευαστικού σετ για να υπολογίσουμε απ' ευθείας τα μέτρα ταξινόμησης των αγνώστων δειγμάτων του δοκιμαστικού σετ.

► Ταξινόμηση των δειγμάτων

Έχοντας υπολογίσει τα μέτρα ταξινόμησης των συναρτήσεων ταξινόμησης είναι πλέον εύκολο να ταξινομήσουμε τα άγνωστα δείγματα. Γενικά, ένα δείγμα ταξινομείται σε εκείνη την ομάδα για την οποία παρουσιάζει το μεγαλύτερο μέτρο ταξινόμησης. Αλλά κριτήρια επιτυχούς ταξινόμησης είναι οι αποστάσεις Mahalanobis και οι εκ των προτέρων (a priori) και εκ των υστέρων (posterior) πιθανότητες ταξινόμησης.

Η **απόσταση Mahalanobis** ορίζεται ως η απόσταση ενός δείγματος από το κεντροειδές (centroid) ενός πολυδιάστατου χώρου, ο οποίος έχει ορισθεί από τις ανεξάρτητες μεταβλητές μιας ομάδας. Το κεντροειδές είναι στην πραγματικότητα ένα σημείο, το οποίο αντιπροσωπεύει τους μέσους όρους όλων των ανεξάρτητων μεταβλητών της ομάδας. Όταν η απόσταση Mahalanobis ενός αγνώστου δείγματος από το δοκιμαστικό σετ είναι μικρότερη από την αντίστοιχη μεγαλύτερη απόσταση

των δειγμάτων του προπαρασκευαστικού σετ, τότε το δείγμα αυτό θεωρείται ότι έχει ταξινομηθεί στη σωστή ομάδα. Με βάση τις αποστάσεις Mahalanobis, μπορούμε να υπολογίσουμε την **εκ των υστέρων πιθανότητα** (posterior probability) ενός δείγματος να ανήκει σε μια συγκεκριμένη ομάδα. Τα περισσότερα στατιστικά πακέτα υπολογίζουν αυτές τις πιθανότητες για όλα τα δείγματα.

Ο υπολογισμός της **εκ των προτέρων πιθανότητας** (a priori probability) ένα δείγμα να ανήκει σε μια ομάδα είναι χρήσιμη, όταν γνωρίζουμε εκ των προτέρων ότι υπάρχουν περισσότερα δείγματα σε μια ομάδα από κάθε άλλη ομάδα. Αυτό σημαίνει ότι η εκ των προτέρων πιθανότητα ένα δείγμα να ανήκει στη συγκεκριμένη ομάδα είναι μεγαλύτερη. Η πιθανότητα ότι ένα δείγμα (γνωστό ή άγνωστο) ταξινομείται σωστά σε μία ομάδα ορίζεται γραφικά από μία **έλλειψη**, η οποία ορίζει μια περιοχή ή ένα **διάστημα αξιοπιστίας** (π.χ. 95%) της ταξινόμησης ή της πρόβλεψης. Οι συντεταγμένες της έλλειψης υπολογίζονται από την εξίσωση

$$((n-p)*n)/(p*(n-1)*(n+1))*(X-X_m) S^{-1} (X-X_m) \sim F(\alpha, p, n-p) \quad (3.11)$$

όπου, n είναι ο αριθμός των δειγμάτων, p είναι ο αριθμός των ανεξάρτητων μεταβλητών, X είναι οι συντεταγμένες των μεταβλητών, X_m είναι οι συντεταγμένες των μέσων όρων των μεταβλητών, S^{-1} είναι το αντίστροφο του πίνακα της διακύμανσης/συν-διακύμανσης για τις μεταβλητές, $F(\alpha, p, n-p)$, η τιμή του Fischer F για δεδομένες τιμές των p , και $n-p$ και της στάθμης σημαντικότητας α . Ας σημειωθεί ότι στην περίπτωση λίγων δειγμάτων το διάστημα αξιοπιστίας μπορεί να γίνει πολύ μεγάλο.

3.6.1 Ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων με τη μέθοδο Ανάλυσης Διακριτότητας.

Με τη μέθοδο της Ανάλυσης Διακριτότητας αναζητούνται οι κανονικές συναρτήσεις (roots) των μεταβλητών με τη μέγιστη διακριτική ικανότητα, δηλαδή, αυτές που διαχωρίζουν καλύτερα τα ελαιόλαδα ανάλογα σε ποια κατηγορία ανήκουν. Για την ανάλυση D.A. των ελαιολάδων, τεσσάρων κατηγοριών, (76 δείγματα) χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές: 1,3-DGs, ολικά διγλυκερίδια (TDGs), ο λόγος D, οι στερόλες, το λινελαϊκό οξύ (LO), βαθμός ιωδίου (IV), ο Log(Οξύτητα), η διαφορά TDGs-οξύτητα, καθώς και ο λόγος των λιπαρών οξέων Λινολελικό/Λινελαϊκό (LN/OL). Οι συγκεκριμένες μεταβλητές προέκυψαν από τη στατιστική μέθοδο Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA), (Πίνακας 3.5). Τα ελαιόλαδα ταξινομήθηκαν με

βάση τις συναρτήσεις διάκρισης, οι οποίες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (Root 1 και Root 2). Ο Πίνακας 3.6 περιέχει τους συντελεστές διάκρισης των μεταβλητών για τις Root 1 και Root 2, το μέτρο Wilks' λ και το όριο ανοχής. Τα Root 1 και Root 2 εκφράζουν τους μη κανονικοποιημένους συντελεστές διάκρισης. Για το μέτρο Wilks' λ υπενθυμίζεται ότι, όσο μικρότερη είναι η τιμή του, για μια ανεξάρτητη μεταβλητή, τόσο περισσότερο αυτή η μεταβλητή συμμετέχει στη συνάρτηση R και είναι σημαντική στη διάκριση των ομάδων. Τέλος, όσο αναφορά το όριο ανοχής εξ' ορισμού, αν μία μεταβλητή έχει τιμή που τείνει προς το μηδέν, τότε η συγκεκριμένη μεταβλητή κρίνεται πλεονάζουσα, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99%, σε σχέση με τις άλλες μεταβλητές που υπάρχουν στο μοντέλο.

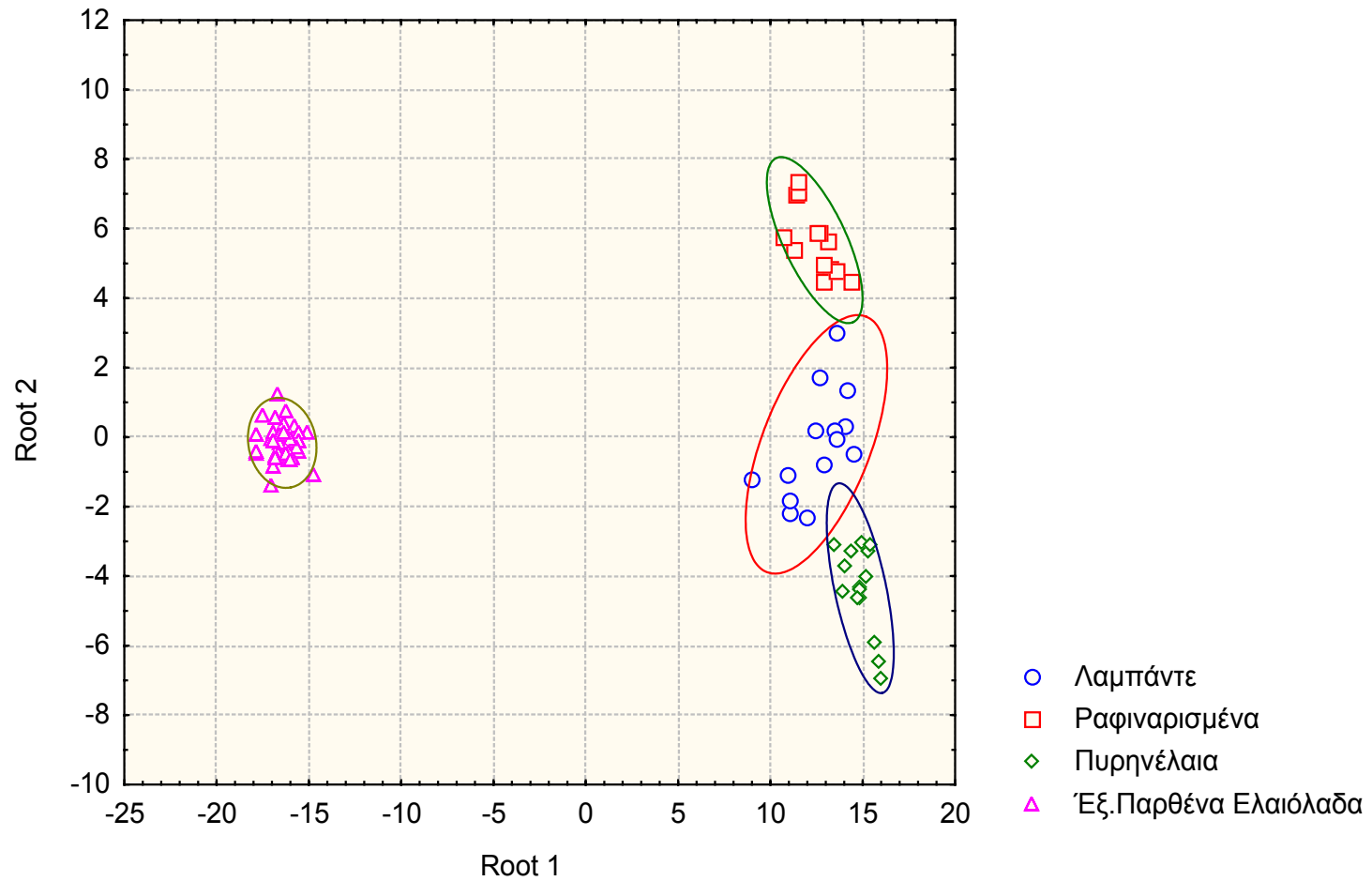
Πίνακας 3.6 Ανάλυση Διακριτότητας. Οι τιμές των συντελεστών διάκρισης, οι τιμές του μέτρου Wilks' λ και το όριο ανοχής για κάθε μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε στη ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων.

Μεταβλητές	Root 1	Root 2	Wilks' Λάμδα	Όριο Ανοχής
1,3 DGs	-4.4650	-0.8230	0.0003	0.0281
Ολικά Διγλυκερίδια TDG	2.6970	1.1025	0.0003	0.0327
Λόγος D	-58.9640	-3.3418	0.0035	0.3823
Στερόλες	7.0145	-22.2284	0.0006	0.6516
Λινελαϊκό (LO)	0.2191	0.4530	0.0003	0.2339
Αριθμός Ιωδίου IV	0.0568	-0.2662	0.0003	0.4540
Log(Οξύτητα)	-0.8326	-0.9406	0.0003	0.4956
TDG-Οξύτητα	-0.0114	0.0175	0.0004	0.2825
LN/LO	0.2184	-0.0527	0.0003	0.4737
Σταθερά c	24.6800	20.3634		
Ιδιοτιμή	231.8405	9.7620		

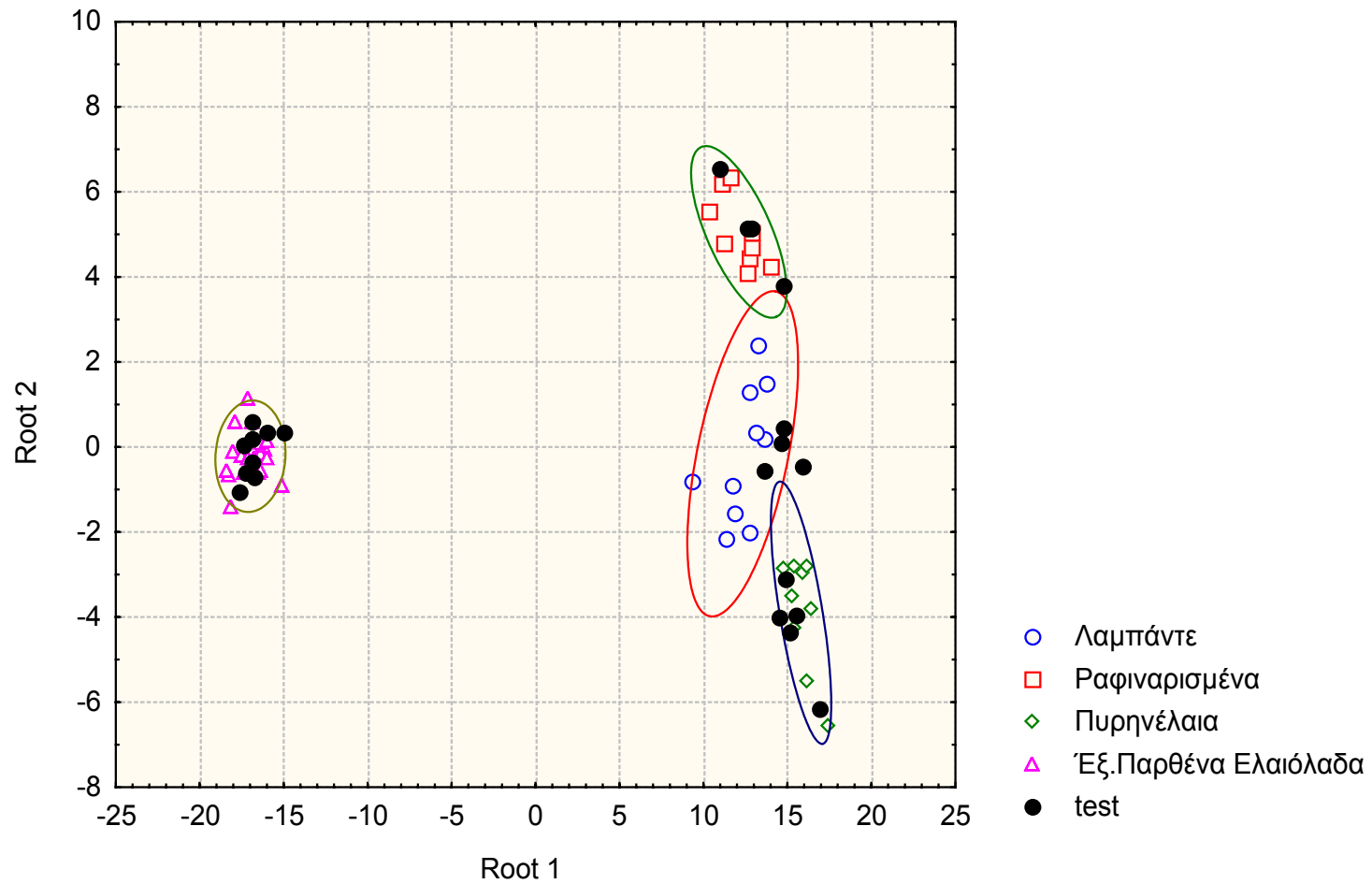
Από τον παραπάνω Πίνακα παρατηρείται ότι, όλες οι μεταβλητές έχουν μικρές τιμές για το Wilks' λ κάτι που υποδηλώνει ότι και οι εννέα μεταβλητές που επιλέχθηκαν έχουν πολύ καλή ικανότητα διάκρισης. Αντίστοιχα, παρατηρούμε ότι το όριο ανοχής για τις μεταβλητές είναι μεγαλύτερο από το μηδέν, εκφράζοντας έτσι ότι όλες οι παραπάνω μεταβλητές είναι απαραίτητες για τη κατάστρωση των συναρτήσεων διάκρισης. Ακόμα, στον Πίνακα 3.6 εμφανίζονται και οι ιδιοτιμές των συναρτήσεων Root 1 και Root 2. Η μεγαλύτερη ιδιοτιμή για την Root 1 δείχνει ότι αυτή έχει εμφανώς μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα σε σχέση με τη Root 2. Στο διάγραμμα (Σχήμα 3.9) που έχει ως άξονες τις δύο συναρτήσεις διάκρισης (Root 1 και

Root 2) απεικονίζεται η ταξινόμηση των ελαιολάδων. Διαπιστώνεται ότι τα ελαιολάδα διαχωρίζονται αρκετά καλά. Οι ελλείψεις στο διάγραμμα εκφράζουν την 95% πιθανότητα ένα δείγμα να βρίσκεται στην αντίστοιχη κατηγορία μέσα στο χώρο που ορίζει η έλλειψη.

Στη συνέχεια ελέγχεται η αξιοπιστία (validation) του μοντέλου διάκρισης. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων χωρίστηκε τυχαία σε δύο σετ. Το πρώτο σετ (το λεγόμενο training set), αποτελείται από περίπου τα 2/3 του συνόλου των δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των συναρτήσεων διάκρισης. Τα υπόλοιπα δείγματα (το λεγόμενο test set) χρησιμοποιήθηκαν ως "άγνωστα" για τον έλεγχο της εγκυρότητας της διακριτικής ανάλυσης διάκρισης. Όπως και προηγουμένως, τα ελαιολάδα του προπαρασκευαστικού σετ ταξινομήθηκαν ως προς τη κατηγορία στην οποία ανήκουν με βάση τις δύο πρώτες συναρτήσεις διάκρισης. Κατόπιν, με βάση το ίδιο στατιστικό μοντέλο έγινε η τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set). Παρατηρήθηκε 100% επιτυχής χαρακτηρισμός των αγνωστων δειγμάτων στις σωστές ομάδες στις οποίες ανήκουν για τις κατηγορίες των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, των ραφιναρισμένων ελαιολάδων και των πυρηνελαίων. Τα ελαιολάδα λαμπάντε, παρουσιάζουν 92% επιτυχή χαρακτηρισμό των αγνωστων δειγμάτων, έχοντας ένα άγνωστο δείγμα έξω από την έλλειψη που ορίζει την ομάδα τους. Τα παραπάνω φαίνονται στο Σχήμα 3.10. Δηλαδή το μοντέλο D.A. τοποθετεί τα άγνωστα δείγματα στη σωστή κατηγορία. Το σύστημα είναι έγκυρο και περιέχει τις κατάλληλες πληροφορίες για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων της παρούσας μελέτης. Ας σημειωθεί ότι, η επικύρωση του μοντέλου έγινε τρεις φορές, λαμβάνοντας κάθε φορά διαφορετικό αριθμό δειγμάτων για το training set και το test set από το σύνολο των δειγμάτων.



Σχήμα 3.9 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων.



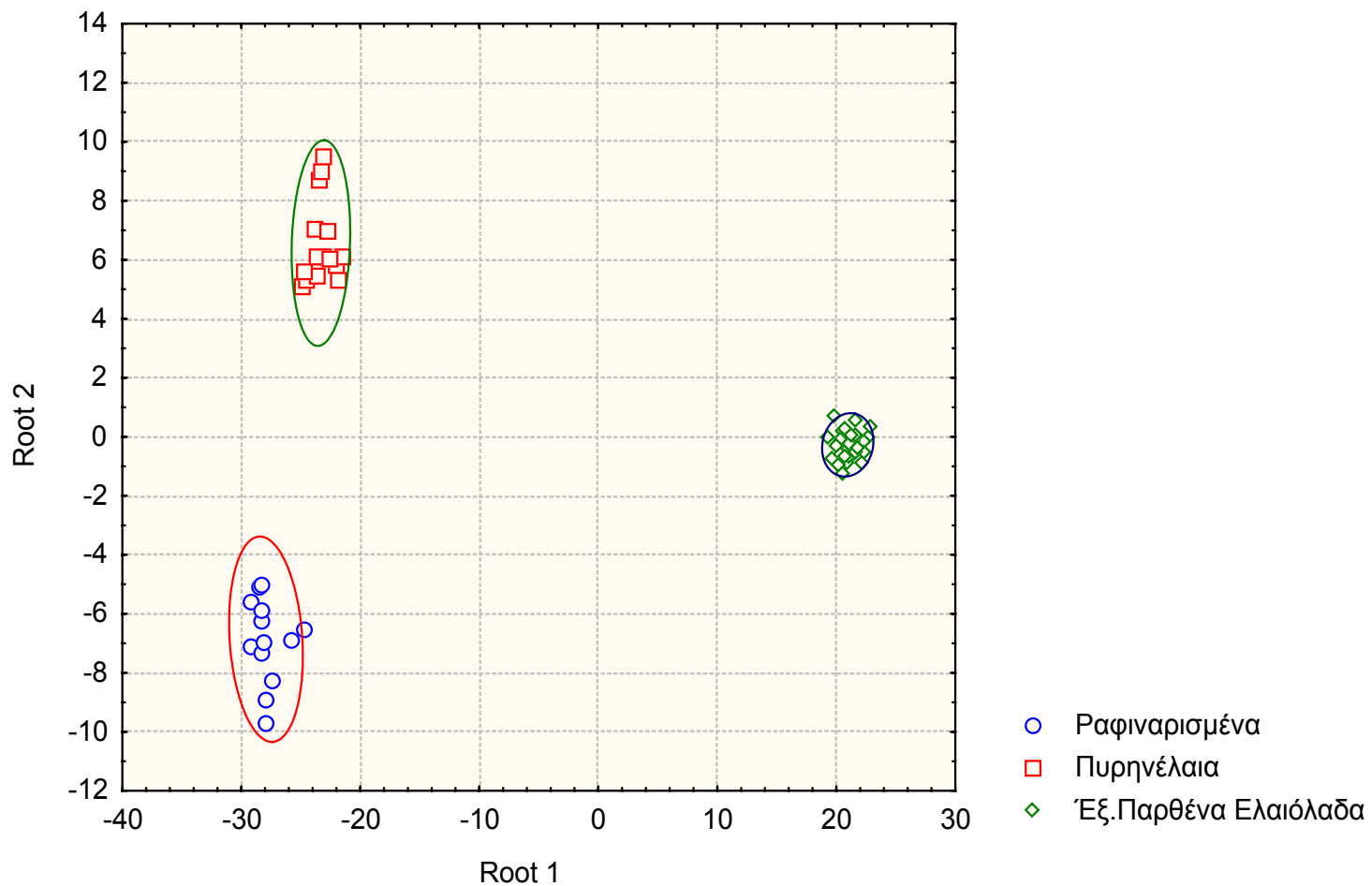
Σχήμα 3.10 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου D.A. για την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων. Στο διάγραμμα φαίνεται η επιτυχής τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set), στις αντίστοιχες κατηγορίες.

Από το στατιστικό δείγμα εξαιρούνται τα ελαιόλαδα λαμπάντε και η ανάλυση D.A. εφαρμόζεται σε τρεις κατηγορίες ελαιολάδων, ραφιναρισμένα ελαιόλαδα, πυρηνέλαια και έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (62 δείγματα). Στο διάγραμμα 3.9 τα ελαιόλαδα λαμπάντε τοποθετούνται μεταξύ των ραφιναρισμένων ελαιολάδων και των πυρηνελαιών, ενδεχομένως γιατί αυτές οι ομάδες παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά (π.χ. οξύτητα, διγλυκερίδια). Αυτό, στο διάγραμμα διάκρισης εμφανίζεται σαν μια τάση για επικάλυψη, κυρίως ανάμεσα στις ελλείψεις των ελαιολάδων λαμπάντε και των πυρηνελαιών, κάτι που περιορίζει τα όρια ανίχνευσης νοθείας, όπως θα δούμε παρακάτω. Για αυτόν τον λόγο, κρίνεται προτιμότερο να γίνει η διάκριση των ελαιολάδων για τις τρεις κατηγορίες. Για την κατάστρωση των συναρτήσεων διάκρισης χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές: 1,3-DGs, ολικά διγλυκερίδια (TDGs), ο λόγος D, οι στερόλες, το λινελαϊκό οξύ (LO), βαθμός ιωδίου (IV), ο Log(Οξύτητα), η διαφορά TDGs-οξύτητα, καθώς και ο λόγος των λιπαρών οξέων Λινολεϊκό/Λινελαϊκό (LN/OL). Οι συγκεκριμένες μεταβλητές προέκυψαν από τη στατιστική μέθοδο Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA), (Πίνακας 3.5). Τα ελαιόλαδα ταξινομήθηκαν με βάση τις συναρτήσεις διάκρισης, οι οποίες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (Root 1 και Root 2). Ο Πίνακας 3.7 περιέχει τους συντελεστές διάκρισης των μεταβλητών για τις Root 1 και Root 2, το μέτρο Wilks' λ και το όριο ανοχής.

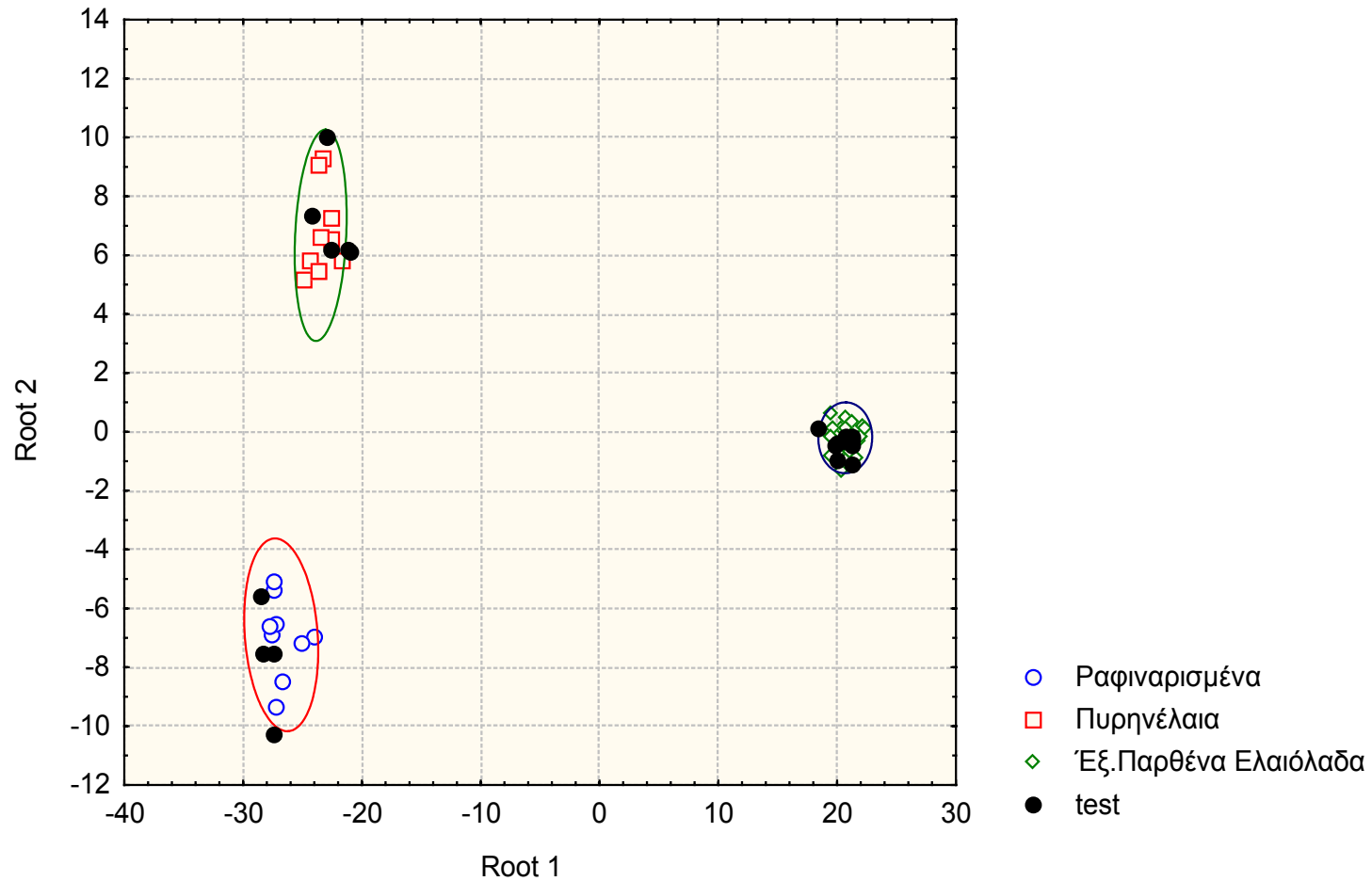
Πίνακας 3.7 Ανάλυση Διακριτότητας. Οι τιμές των συντελεστών διάκρισης, οι τιμές του μέτρου Wilks' λ και το όριο ανοχής για κάθε μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, πυρηνελαιών και έξτρα παρθένων ελαιολάδων.

Μεταβλητές	Root 1	Root 2	Wilks' λ	Όριο Ανοχής
1,3 DGs	3.3199	0.0747	0.0001	0.0461
Ολικά Διγλυκερίδια TDG	-2.5354	-0.8134	0.0001	0.0465
Λόγος D	83.8323	0.7996	0.0014	0.4404
Στερόλες	0.3360	20.3450	0.0001	0.6369
LO	-0.4491	-0.3457	0.0001	0.2249
Αριθμός Ιωδίου IV	0.1707	0.0935	0.0001	0.4444
Log(Οξύτητα)	2.5726	2.2105	0.0001	0.6251
TDG - Οξύτητα	0.0009	-0.0242	0.0001	0.5802
LN/LO	-0.2762	-0.0659	0.0001	0.4560
Σταθερά c	-59.0507	-4.0685		
Ιδιοτιμή	563.1130	21.3802		

Όπως και προηγουμένως, Πίνακας 3.7 μας δίνει τις πληροφορίες για την ικανότητα των μεταβλητών να λάβουν μέρος στις συναρτήσεις διάκρισης Root 1 και Root 2, καθώς και την διακριτική ικανότητα των ίδιων των συναρτήσεων. Στο Σχήμα 3.11 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των τριών κατηγοριών ελαιολάδων, όπου παρατηρούμε ότι η διάκρισή είναι πάρα πολύ καλή. Αντίστοιχα, στο Σχήμα 3.12 εμφανίζεται ο έλεγχος εγκυρότητας του στατιστικού μοντέλου, όπου και παρατηρείται 100% επιτυχής χαρακτηρισμός των τριών κατηγοριών.



Σχήμα 3.11 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για την ταξινόμηση των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων.



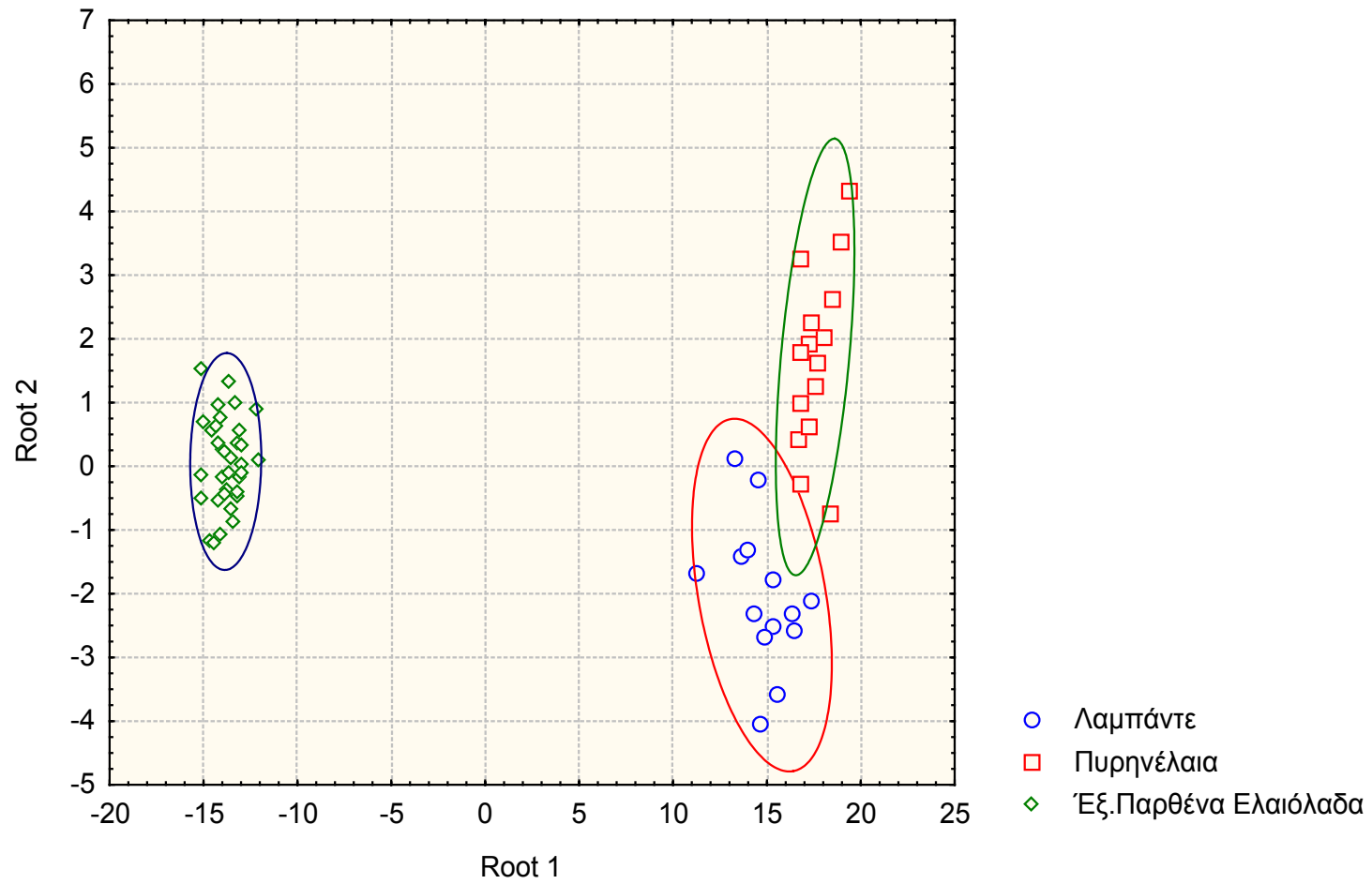
Σχήμα 3.12 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου D.A. για τη ταξινόμηση των ραφινρισμένων ελαιολάδων, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Στο διάγραμμα φαίνεται η επιτυχής τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set), στις αντίστοιχες κατηγορίες.

Στη συνέχεια μελετάται η ικανότητα του στατιστικού μοντέλου να διακρίνει τα ελαιόλαδα λαμπάντε, με τα πυρηνέλαια, και τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα. Για την ανάλυση D.A. των ελαιολάδων, τριών κατηγοριών, (63 δείγματα) χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές: 1,3-DGs, ολικά διγλυκερίδια (TDGs), ο λόγος D, οι στερόλες, βαθμός ιωδίου (IV), ο Log(Οξύτητα), και η διαφορά TDGs-Οξύτητα. Οι συγκεκριμένες μεταβλητές προέκυψαν από τη στατιστική μέθοδο Ανάλυσης Διακύμανσης (ANOVA), (Πίνακας 3.5). Τα ελαιόλαδα ταξινομήθηκαν με βάση τις συναρτήσεις διάκρισης, οι οποίες παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (Root 1 και Root 2). Ο Πίνακας 3.8 περιέχει τους συντελεστές διάκρισης των μεταβλητών για τις Root 1 και Root 2, το μέτρο Wilks' λ και το όριο ανοχής.

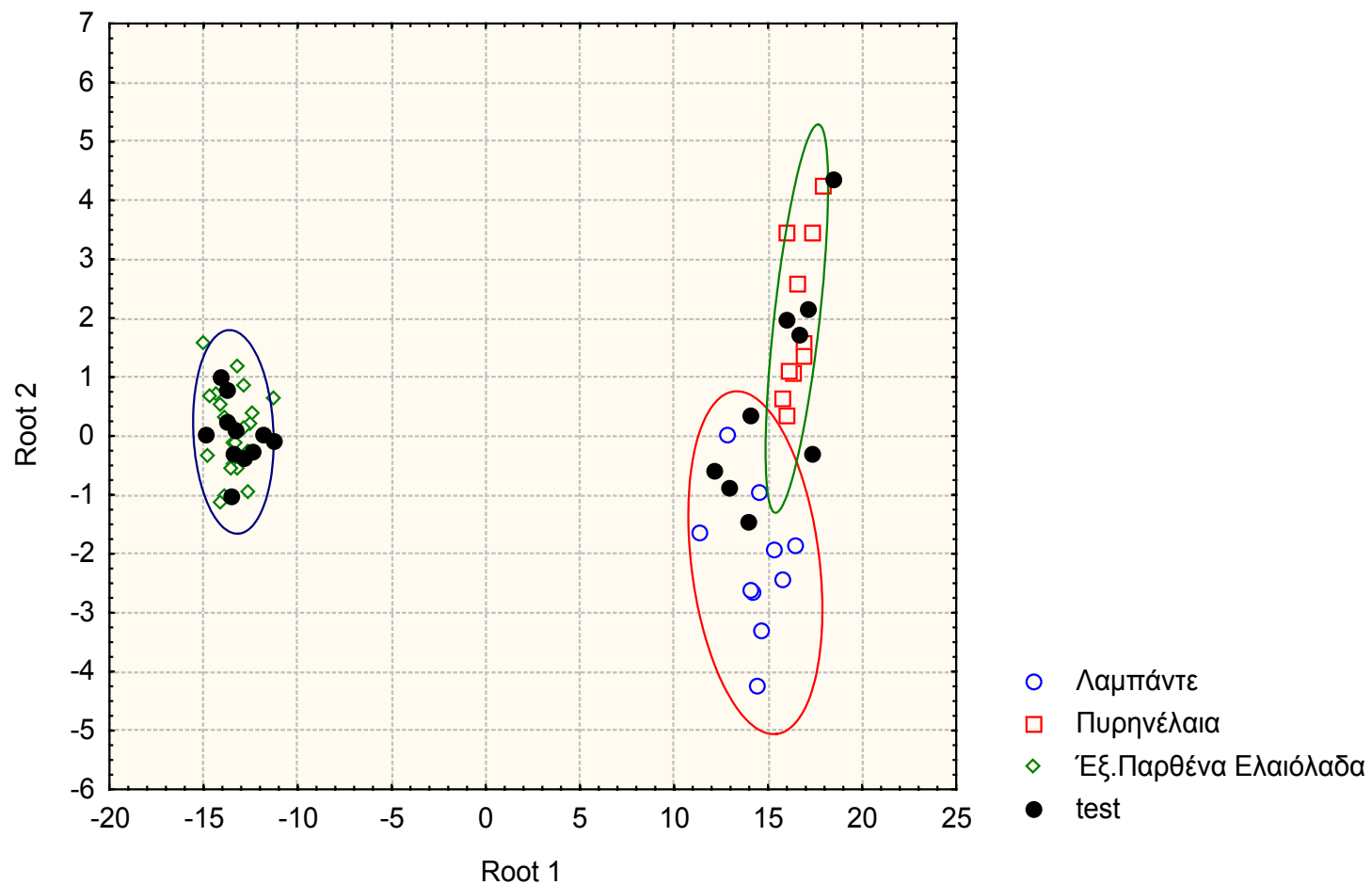
Πίνακας 3.8 Ανάλυση Διακριτότητας. Οι τιμές των συντελεστών διάκρισης, οι τιμές του μέτρου Wilks' λ και το όριο ανοχής για κάθε μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των ελαιολάδων λαμπάντε, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων.

Μεταβλητές	Root 1	Root 2	Wilks' Λάμδα	Όριο Ανοχής
1,3 DGs	-4.0725	0.6205	0.0022	0.0304
Ολικά Διγλυκερίδια TDG	2.1146	-1.0916	0.0020	0.0369
Λόγος D	-57.2837	3.5588	0.0222	0.4146
Στερόλες	8.0077	26.0671	0.0035	0.7851
Αριθμός Ιωδίου(IV)	0.1446	-0.0060	0.0017	0.8545
Log(Οξύτητα)	-0.4220	-0.6335	0.0016	0.3556
TDG-Οξύτητα	-0.0148	-0.0178	0.0021	0.1773
Σταθερά c	23.2203	-3.5211		
Ιδιοτιμή	236.0060	1.6926		

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο Πίνακας 3.8 μας δίνει τις πληροφορίες για την ικανότητα των μεταβλητών να λάβουν μέρος στις συναρτήσεις διάκρισης Root 1 και Root 2, καθώς και την διακριτική ικανότητα των ίδιων των συναρτήσεων. Στο Σχήμα 3.13 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των τριών κατηγοριών ελαιολάδων, όπου παρατηρούμε ότι η διάκρισή τους είναι καλή. Αντίστοιχα, στο Σχήμα 3.14 εμφανίζεται ο έλεγχος εγκυρότητας του στατιστικού μοντέλου, όπου και παρατηρείται σχεδόν 100% επιτυχής χαρακτηρισμός των τριών κατηγοριών.



Σχήμα 3.13 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για την ταξινόμηση των λαμπάντε ελαιολάδων, πυρηνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων.



Σχήμα 3.14 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 του μοντέλου D.A. για τη ταξινόμηση των λαμπάντε ελαιολάδων, πυργνελαίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Στο διάγραμμα φαίνεται η επιτυχής τοποθέτηση των "αγνώστων" δειγμάτων (test set), στις αντίστοιχες κατηγορίες.

3.7 Έλεγχος νοθείας έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας.

Η στατιστική ανάλυση D.A. εφαρμόστηκε για την ανάλυση μειγμάτων ελαίων με παρθένο ελαιόλαδο, σε μία προσπάθεια ανίχνευσης του χαμηλότερου δυνατού ορίου νοθείας στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν δύο σειρές μείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ραφινρισμένα ελαιόλαδα και έξτρα παρθένων ελαιολάδων με πυρηνέλαια σε συγκεντρώσεις 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 35%, και 50% κ.β. Τα παραπάνω μείγματα παρασκευάστηκαν από δύο διαφορετικά δείγματα ραφινρισμένων ελαιολάδων, δύο διαφορετικά δείγματα πυρηνελαιίων και τέσσερα διαφορετικά δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων, διαφορετικής γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης με στόχο την ευρύτερη αντιπροσωπευτικότητα των δειγμάτων κατά τον έλεγχο νοθείας. Συνολικά αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία NMR 34 δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων, 13 δείγματα ραφινρισμένων ελαιολάδων και 15 δείγματα πυρηνελαιίων. Ακόμα, αναλύθηκαν και μείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ελαιόλαδο λαμπάντε από 1% έως και 20% κ.β. σε μία προσπάθεια ανίχνευσης νοθείας και με αυτήν την κατηγορία του ελαιολάδου. Το στατιστικό μοντέλο για αυτή την ανάλυση αποτελείται από 34 δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων, 14 δείγματα ελαιολάδων λαμπάντε και 15 δείγματα πυρηνελαιίων. Τέλος, προκειμένου να επαληθευτεί η αξιοπιστία του στατιστικού μοντέλου για την ανίχνευση νοθείας αναλύθηκαν 6 εμπορικά αγνά ελαιόλαδα, (μείγμα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ραφινρισμένο ελαιόλαδο).

Οι πίνακες με τις πειραματικές τιμές από τα φάσματα ^{31}P NMR και ^1H NMR για τα μείγματα των ελαιολάδων καθώς και για τα αγνά ελαιόλαδα παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 3.9 Περιεκτικότητα (% w/w), 1,2-διγλυκεριδίων(1,2 DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3 DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDGs), λόγου D, στερολών και οξύτητας από τα φάσματα ³¹P NMR για τα μείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας και για αγνά εμπορικά ελαιόλαδα.

Ποσοστό	1,2 - DGs	1,3 - DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
Μείγματα Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου με Ραφινρισμένο Ελαιόλαδο						
1% Ραφινέλαιο 2 + 99% Λακωνία 6	1.85	0.16	2.01	0.92	0.09	0.21
3% Ραφινέλαιο 2 + 97% Λακωνία 6	1.81	0.23	2.03	0.89	0.11	0.18
5% Ραφινέλαιο 2 + 95% Λακωνία 6	1.76	0.31	2.07	0.85	0.09	0.16
10% Ραφινέλαιο 2 + 90% Λακωνία 6	1.61	0.54	2.14	0.75	0.08	0.15
15% Ραφινέλαιο 2 + 85% Λακωνία 6	1.57	0.68	2.25	0.70	0.07	0.15
20% Ραφινέλαιο 2 + 80% Λακωνία 6	1.54	0.75	2.29	0.67	0.08	0.14
35% Ραφινέλαιο 2 + 65% Λακωνία 6	1.52	1.36	2.88	0.53	0.08	0.11
50% Ραφινέλαιο 2 + 50% Λακωνία 6	1.49	1.67	3.16	0.47	0.08	0.10
1% Ραφινέλαιο 4 + 99% Λακωνία 3	1.87	0.17	2.04	0.92	0.06	0.15
3% Ραφινέλαιο 4 + 97% Λακωνία 3	1.82	0.19	2.01	0.90	0.08	0.14
5% Ραφινέλαιο 4 + 95% Λακωνία 3	1.79	0.28	2.08	0.86	0.06	0.13
10% Ραφινέλαιο 4 + 90% Λακωνία 3	1.77	0.43	2.21	0.80	0.12	0.13
15% Ραφινέλαιο 4 + 85% Λακωνία 3	1.73	0.54	2.27	0.76	0.05	0.12
20% Ραφινέλαιο 4 + 80% Λακωνία 3	1.69	0.67	2.36	0.72	0.07	0.11

Ποσοστό	1,2 - DGs	1,3 – DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
35% Ραφινέλαιο 4 + 65% Λακωνία 3	1.65	1.07	2.71	0.61	0.06	0.10
50% Ραφινέλαιο 4 + 50% Λακωνία 3	1.62	1.51	3.14	0.52	0.08	0.07
Μείγματα Έζτρα Παρθένου Ελαιολάδου με Πυρηνέλαιο						
1% Πυρηνέλαιο 8+ 99% Ηράκλειο 6	1.54	0.19	1.73	0.89	0.12	0.42
3% Πυρηνέλαιο 8+ 97% Ηράκλειο 6	1.51	0.20	1.72	0.88	0.14	0.60
5% Πυρηνέλαιο 8+ 95% Ηράκλειο 6	1.50	0.27	1.77	0.85	0.14	0.74
10% Πυρηνέλαιο 8+ 90% Ηράκλειο	1.48	0.45	1.93	0.77	0.14	1.27
15% Πυρηνέλαιο 8+ 85% Ηράκλειο 6	1.40	0.56	1.97	0.71	0.11	1.46
20% Πυρηνέλαιο 8+ 80% Ηράκλειο 6	1.34	0.64	1.98	0.68	0.13	1.76
35% Πυρηνέλαιο 8+ 65% Ηράκλειο	1.29	1.06	2.35	0.55	0.12	2.57
50% Πυρηνέλαιο 8+ 50% Ηράκλειο 6	1.27	1.47	2.74	0.46	0.12	3.88
1% Πυρηνέλαιο 5+ 99% Μεσσηνία 1	1.78	0.28	2.07	0.86	0.08	0.28
3% Πυρηνέλαιο 5+ 97% Μεσσηνία 1	1.71	0.35	2.06	0.83	0.10	0.57
5% Πυρηνέλαιο 5+ 95% Μεσσηνία 1	1.67	0.43	2.11	0.79	0.09	0.77
10% Πυρηνέλαιο 5+ 90% Μεσσηνία 1	1.65	0.69	2.34	0.71	0.09	1.28
15% Πυρηνέλαιο 5+ 85% Μεσσηνία 1	1.64	0.89	2.53	0.65	0.11	1.81

Ποσοστό	1,2 - DGs	1,3 – DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
20% Πυρηνέλαιο 5+ 80% Μεσσηνία 1	1.59	1.01	2.60	0.61	0.12	2.40
35% Πυρηνέλαιο 5+ 65% Μεσσηνία 1	1.56	1.58	3.14	0.50	0.08	3.99
50% Πυρηνέλαιο 5+ 50% Μεσσηνία 1	1.55	2.24	3.79	0.41	0.11	5.21
Μείγματα Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου με Ελαιόλαδο Λαμπάντε						
1% Λαμπάντε 6 + 99% Ηράκλειο 6	1.47	0.14	1.62	0.91	0.12	0.37
3% Λαμπάντε 6 + 97% Ηράκλειο 6	1.41	0.19	1.61	0.88	0.14	0.42
5% Λαμπάντε 6 + 95% Ηράκλειο 6	1.40	0.23	1.63	0.86	0.11	0.52
10% Λαμπάντε 6 + 90% Ηράκλειο 6	1.35	0.34	1.69	0.80	0.11	0.60
15% Λαμπάντε 6 + 85% Ηράκλειο 6	1.33	0.47	1.80	0.74	0.09	0.73
20% Λαμπάντε 6 + 80% Ηράκλειο 6	1.29	0.60	1.88	0.68	0.12	0.90

Δείγμα	1,2 DGs	1,3DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
Αγνά ελαιόλαδα						
1	1.71	1.72	3.43	0.50	0.07	0.53
2	1.41	3.28	4.69	0.30	0.07	0.68
3	1.20	1.88	3.08	0.39	0.06	0.56
4	1.63	3.08	4.71	0.35	0.05	0.22
5	0.92	0.84	1.76	0.52	0.07	0.19
6	1.43	2.24	3.67	0.39	0.06	0.30

Στον επόμενο πίνακα εμφανίζεται η περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων και του αριθμού Ιωδίου από την επεξεργασία των φασμάτων ^1H NMR.

Πίνακας 3.10 Περιεκτικότητα (% w/w) λιπαρών οξέων και αριθμός ιωδίου από τα φάσματα ¹H NMR για τα μείγματα έζτρα παρθένων ελαιολάδων με ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας και για αγνά εμπορικά ελαιόλαδα.

Ποσοστά	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
Μείγματα Έζτρα Παρθένου Ελαιολάδου με Ραφινρισμένο Ελαιόλαδο					
1% Ραφινέλαιο 2+ 99% Λακωνία 6	0.35	7.06	76.17	16.42	78.63
3% Ραφινέλαιο 2+ 97% Λακωνία 6	0.34	7.77	74.80	17.10	78.64
5% Ραφινέλαιο 2+ 95% Λακωνία 6	0.32	7.47	75.61	16.61	78.78
10% Ραφινέλαιο 2+ 90% Λακωνία 6	0.34	7.29	76.10	16.27	78.94
15% Ραφινέλαιο 2+ 85% Λακωνία 6	0.28	7.98	75.08	16.66	79.11
20% Ραφινέλαιο 2+ 80% Λακωνία 6	0.30	8.71	73.78	17.22	79.28
35% Ραφινέλαιο 2+ 65% Λακωνία 6	0.34	8.67	74.06	16.94	79.56
50% Ραφινέλαιο 2+ 50% Λακωνία 6	0.24	9.60	72.95	17.21	79.97
1% Ραφινέλαιο 4+ 99% Λακωνία 3	0.22	4.70	80.53	14.56	77.95
3% Ραφινέλαιο 4+ 97% Λακωνία 3	0.39	4.89	81.52	13.19	79.61
5% Ραφινέλαιο 4+ 95% Λακωνία 3	0.31	5.41	79.81	14.46	78.82
10% Ραφινέλαιο 4+ 90% Ηράκλειο	0.38	5.64	79.37	14.62	79.00
15% Ραφινέλαιο 4+ 85% Λακωνία 3	0.37	5.66	83.46	10.51	82.54
20% Ραφινέλαιο 4+ 80% Λακωνία 3	0.37	6.66	82.54	10.43	83.47

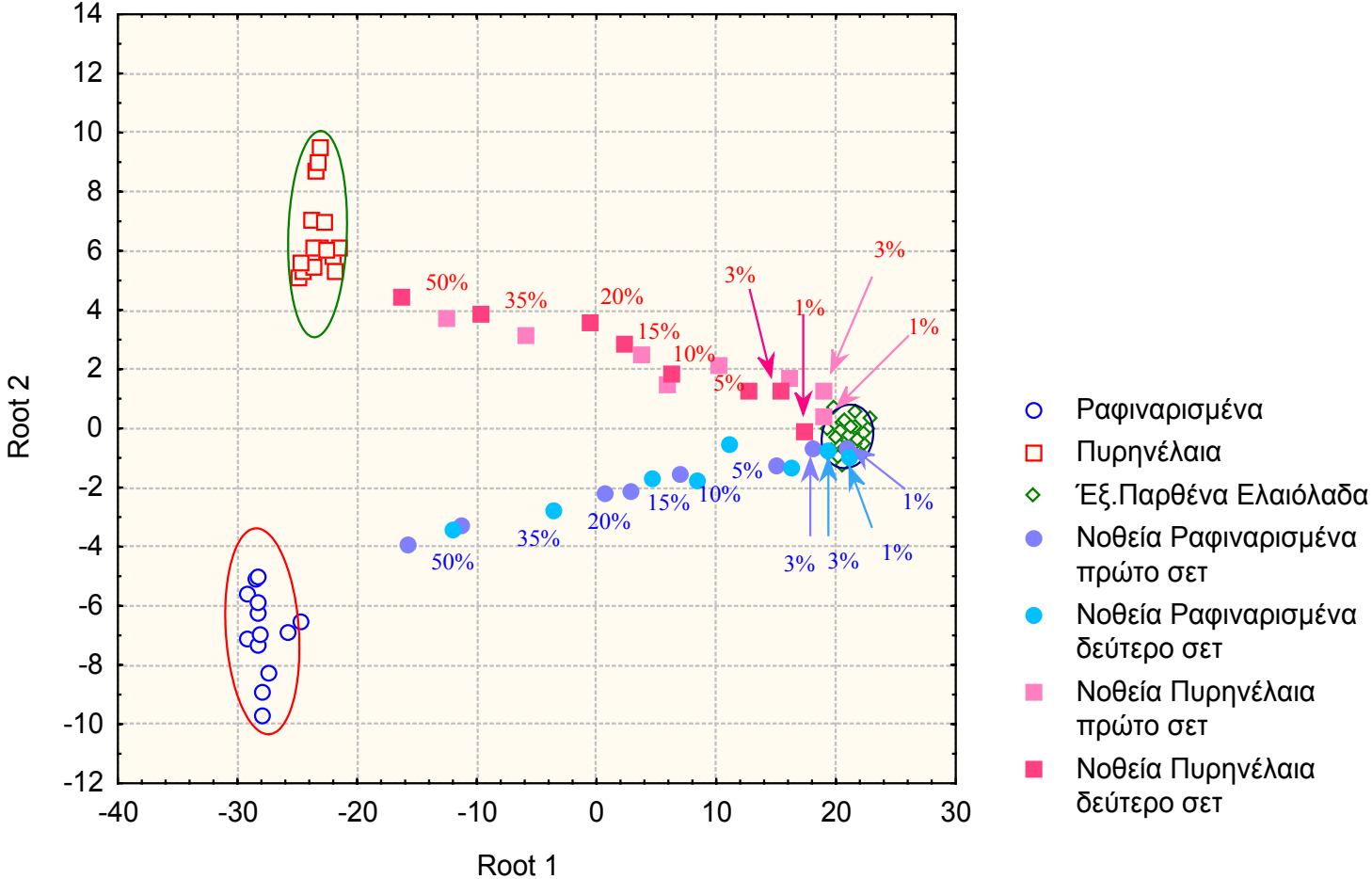
Ποσοστά	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαιικό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
35% Ραφινέλαιο 4+ 65% Λακωνία 3	0.11	7.98	80.90	11.01	83.65
50% Ραφινέλαιο 4+ 50% Λακωνία 3	0.23	7.00	76.64	16.13	78.61
Μείγματα Έξτρα Παρθένου Ελαιολάδου με Πυρηνέλαιο					
1% Πυρηνέλαιο 8+ 99% Ηράκλειο 6	0.45	9.65	72.82	17.08	80.50
3% Πυρηνέλαιο 8+ 97% Ηράκλειο 6	0.35	10.28	71.98	17.40	80.59
5% Πυρηνέλαιο 8+ 95% Ηράκλειο 6	0.47	9.49	73.15	16.90	80.54
10% Πυρηνέλαιο 8+ 90% Ηράκλειο 6	0.37	10.52	71.14	17.97	80.35
15% Πυρηνέλαιο 8+ 85% Ηράκλειο 6	0.40	10.66	70.72	18.22	80.31
20% Πυρηνέλαιο 8+ 80% Ηράκλειο	0.34	10.79	71.66	17.20	81.19
35% Πυρηνέλαιο 8+ 65% Ηράκλειο 6	0.33	10.11	72.94	16.61	81.09
50% Πυρηνέλαιο 8+ 50% Ηράκλειο 6	0.38	11.09	71.38	17.16	81.55
1% Πυρηνέλαιο 5+ 99% Μεσσηνία 1	0.29	5.41	79.83	14.48	78.75
3% Πυρηνέλαιο 5+ 97% Μεσσηνία 1	0.45	5.59	83.78	10.17	82.90
5% Πυρηνέλαιο 5+ 95% Μεσσηνία 1	0.32	6.12	78.90	14.65	79.29
10% Πυρηνέλαιο 5+ 90% Μεσσηνία 1	0.39	6.32	81.02	12.27	81.62
15% Πυρηνέλαιο 5+ 85% Μεσσηνία 1	0.38	6.76	82.16	10.71	83.34

Ποσοστά	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
20% Πυρηνέλαιο5+ 80% Μεσσηνία 1	0.30	6.67	78.52	14.52	79.84
35% Πυρηνέλαιο5+ 65% Μεσσηνία 1	0.46	6.97	79.42	13.15	81.56
50% Πυρηνέλαιο5+ 50% Μεσσηνία 1	0.40	8.50	76.18	14.91	81.28
Μείγματα Έζτρα Παρθένου Ελαιολάδου με Ελαιόλαδο Λαμπάντε					
1% Λαμπάντε 6 + 99% Ηράκλειο 6	0.46	9.08	73.37	17.09	80.01
3% Λαμπάντε 6 + 97% Ηράκλειο 6	0.39	9.35	71.29	18.97	78.50
5% Λαμπάντε 6 + 95% Ηράκλειο 6	0.40	9.37	71.78	18.45	78.99
10% Λαμπάντε 6 + 90% Ηράκλειο 6	0.43	9.31	73.41	16.84	80.37
15% Λαμπάντε 6 + 85% Ηράκλειο 6	0.40	9.72	72.65	17.23	80.33
20% Λαμπάντε 6 + 80% Ηράκλειο 6	0.35	8.52	73.62	17.52	78.96

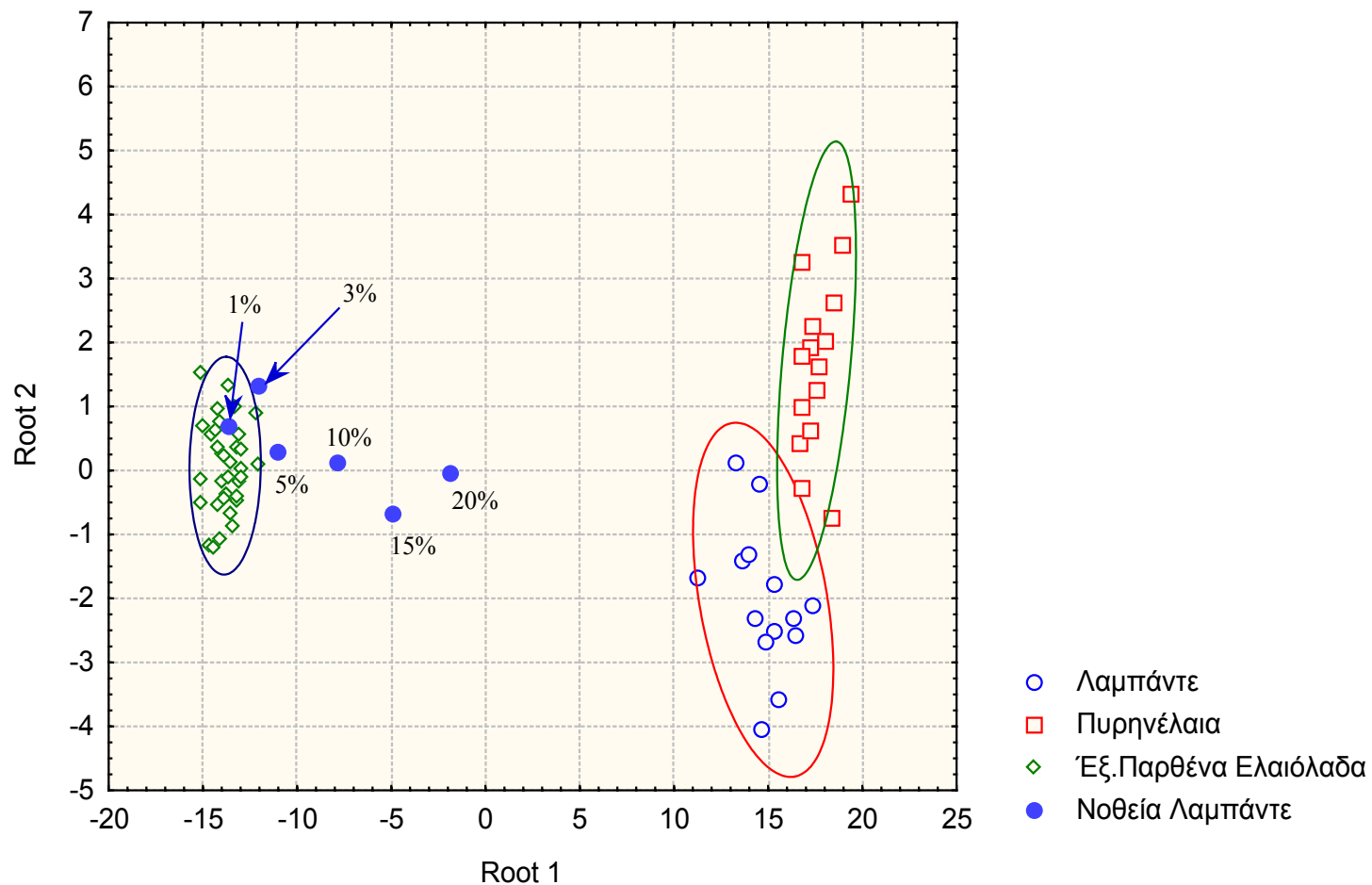
Δείγμα	Λινολενικό οξύ	Λινελαϊκό οξύ	Ελαϊκό οξύ	Κορεσμένα λιπαρά οξέα	Αριθμός Ιωδίου
Αγνά Ελαιόλαδα					
1	0.26	8.05	75.08	16.61	79.17
2	0.19	7.57	77.17	15.06	79.96
3	0.25	9.36	75.33	15.06	81.63
4	0.30	7.97	75.30	16.43	79.33
5	0.32	6.29	77.15	16.24	78.06
6	0.30	7.46	75.52	16.71	78.65

Για τον έλεγχο της νοθείας με ραφιναρισμένα ελαιόλαδα και πυρηνέλαια χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μοντέλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η διάκριση των τριών κατηγοριών, ραφιναρισμένων ελαιολάδων, πυρηνελαιίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων (Σχήμα 3.11). με τις συναρτήσεις ταξινόμησης αυτού του μοντέλου τοποθετήθηκαν τα μείγματα των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ως άγνωστα, στο διάγραμμα. Το αποτέλεσμα φαίνεται στο διάγραμμα 3.15.

Ακόμα, για τον έλεγχο της νοθείας με ελαιόλαδα λαμπάντε χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μοντέλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η διάκριση των τριών κατηγοριών, λαμπάντε ελαιολάδων, πυρηνελαιίων και έξτρα παρθένων ελαιολάδων (Σχήμα 3.13). Με τις συναρτήσεις ταξινόμησης αυτού του μοντέλου τοποθετήθηκαν τα μείγματα των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ως άγνωστα, στο διάγραμμα. Το αποτέλεσμα φαίνεται στο διάγραμμα 3.16.



Σχήμα 3.15 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη μελέτη νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ραφιναρισμένο ελαιόλαδο και πυρηγέλαιο σε ποσοστά 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 35% και 50% κ.β.



Σχήμα 3.16 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη μελέτη νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου με ελαιόλαδο λαμπάντε σε ποσοστά από 1%, έως 20% κ.β.

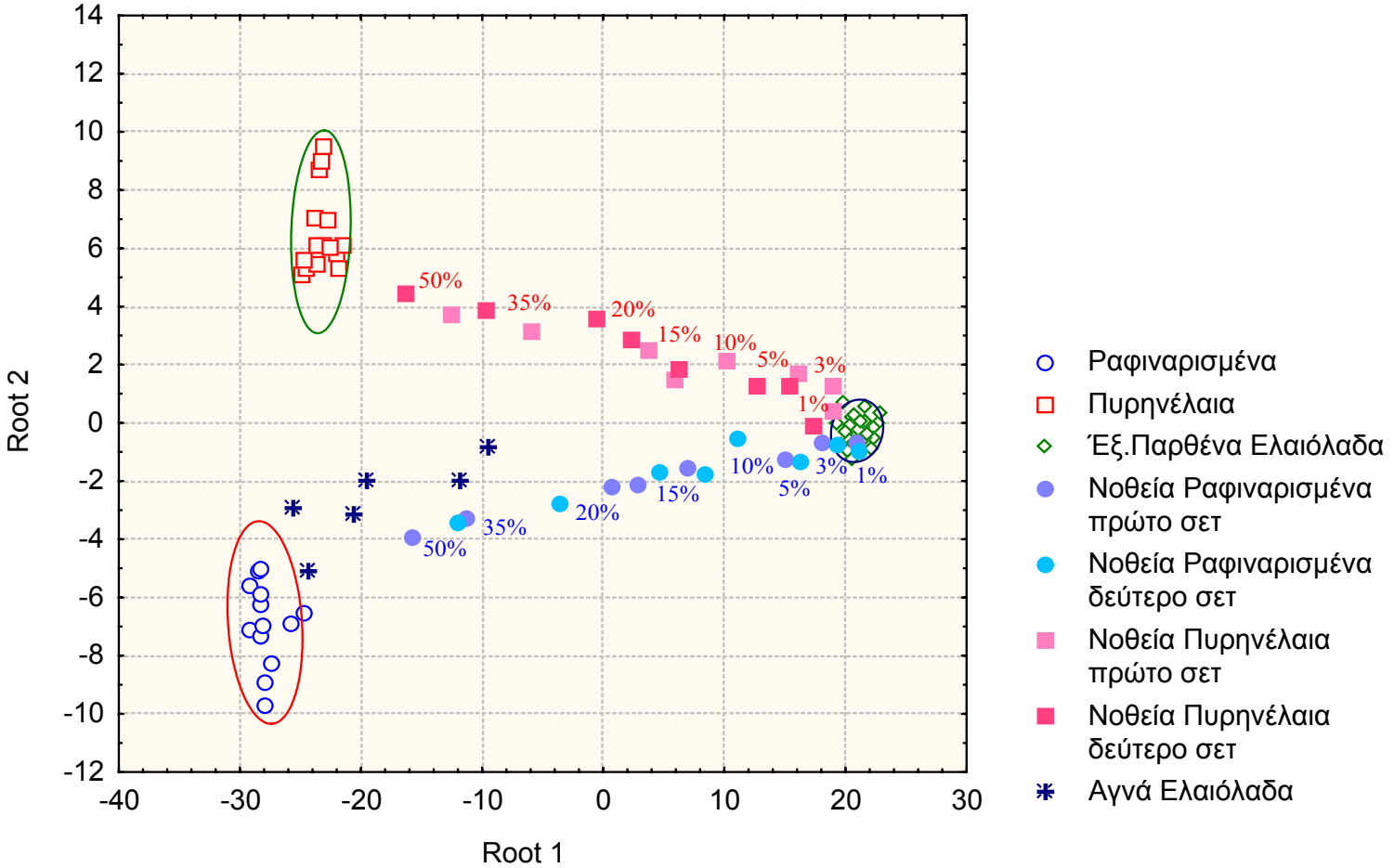
Στο διάγραμμα 3.15, τα γεμάτα σύμβολα αντιστοιχούν στο πρώτο και δεύτερο σετ των μειγμάτων των ελαιολάδων και βρίσκονται στην περιοχή ανάμεσα στα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα και το αντίστοιχο ελαιόλαδο κατώτερης ποιότητας με το οποίο έχει γίνει η νοθεία, ενώ οι θέση τους εξαρτάται από το ποσοστό νοθείας. Όσο μικρότερη είναι η νοθεία τόσο τα μείγματα πλησιάζουν την έλλειψη των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ενώ αυτά, απομακρύνονται για μεγαλύτερα ποσοστά νοθείας. Παρατηρούμε ότι τα σύμβολα για τα μείγματα βρίσκονται σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της έλλειψης, με εξαίρεση το μείγμα 1% για το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο - ραφινρισμένο ελαιόλαδο, ενώ το μείγμα 3% για το ένα σετ έξτρα παρθένο ελαιόλαδο - ραφινρισμένο ελαιόλαδο βρίσκεται στις παρυφές της έλλειψης. Επίσης, τις παρυφές της έλλειψης βρίσκεται και το μείγμα 1% για το ένα σετ έξτρα παρθένου ελαιολάδου-πυρηνελαίου. Επομένως, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα διάκρισης είναι δυνατόν να ανιχνευθεί νοθεία σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο με ραφινρισμένο ελαιόλαδο και πυρηνέλαιο μέχρι και 3% w/w.

Η ίδια μεθοδολογία ακολουθείται και για την ανίχνευση νοθείας με ελαιόλαδα λαμπάντε όπου παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.16. Τα γεμάτα σύμβολα στο διάγραμμα 3.16 αντιστοιχούν στα μείγματα των ελαιολάδων λαμπάντε με έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και βρίσκονται στην περιοχή ανάμεσα στα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα και τα ελαιόλαδα λαμπάντε με τα οποία έχει γίνει η νοθεία, ενώ οι θέση τους εξαρτάται από το ποσοστό νοθείας. Από το παραπάνω διάγραμμα διαχωριστικής ανάλυσης για τη μελέτη νοθείας, παρατηρούμε ότι τα σύμβολα για τα μείγματα βρίσκονται σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της έλλειψης, με εξαίρεση το μείγμα 1% έξτρα παρθένου ελαιολάδου-ελαιολάδου λαμπάντε. Επομένως, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα διάκρισης είναι δυνατόν να ανιχνευθεί νοθεία με ελαιόλαδο λαμπάντε μέχρι και 3% w/w, εφόσον τα σημεία που αντιστοιχούν σε αυτήν την περιεκτικότητα βρίσκονται εκτός της καμπύλης με όριο εμπιστοσύνης 95% του έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα εμπορικά αγνά ελαιόλαδα είναι μείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ραφινρισμένα ελαιόλαδα. Συνεπώς, για τον έλεγχο των αγνών ελαιολάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό μοντέλο με το οποίο πραγματοποιήθηκε η διάκριση των τριών κατηγοριών, έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ραφινρισμένων ελαιολάδων και πυρηνελαίων (Σχήμα 3.11), σε συνδυασμό με τα μείγματα των νοθειών που πραγματοποιήθηκαν για τα έξτρα

παρθένα ελαιόλαδα - ραφιναρισμένα ελαιόλαδα και τα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα - πυρηνέλαια. Το διάγραμμα διάκρισης καταστρώθηκε χρησιμοποιώντας τις συναρτήσεις ταξινόμησης αυτού του μοντέλου και τόσο, τα μείγματα των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, όσο και τα αγνά ελαιόλαδα τοποθετήθηκαν ως άγνωστα, στο διάγραμμα. Το αποτέλεσμα φαίνεται στο διάγραμμα 3.17.

Τα αστεροειδή σύμβολα στο διάγραμμα 3.17, αντιστοιχούν αγνά ελαιόλαδα, όπου το ποσοστό των μειγμάτων δεν είναι απόλυτα γνωστό. Από το διάγραμμα διαχωριστικής ανάλυσης, παρατηρούμε ότι τα σύμβολα για τα μείγματα των αγνών ελαιολάδων διαχωρίζονται εμφανώς από την έλλειψη των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ενώ παράλληλα παρατηρείται ότι αυτά δεν ταυτίζονται με τα δείγματα των ραφιναρισμένων ελαιολάδων όπως και αναμένεται. Ακόμα, παρατηρούμε ότι τα αγνά ελαιόλαδα τοποθετούνται στο διάγραμμα διάκρισης παράλληλα με την νοητή ευθεία που δημιουργούν τα μείγματα από τις νοθείες έξτρα παρθένα ελαιόλαδα – ραφιναρισμένα ελαιόλαδα (γεμάτα σύμβολα). Πιο αναλυτικά, δύο δείγματα αγνών ελαιολάδων τοποθετούνται σε θέσεις μεταξύ 35% και 50%, νοθείας έξτρα παρθένο ελαιόλαδο – ραφιναρισμένο ελαιόλαδο, ενώ όλα τα υπόλοιπα δείγματα των αγνών ελαιολάδων εμφανίζονται να έχουν ραφιναρισμένο ελαιόλαδα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50%. Αυτό, αφενός επιβεβαιώνει ότι τα αγνά ελαιόλαδα είναι μείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων και ραφιναρισμένων ελαιολάδων και αφετέρου, αποδεικνύει ότι το στατιστικό μοντέλο που δημιουργήθηκε είναι ικανό να διακρίνει τη νοθεία των έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ραφιναρισμένα ελαιόλαδα.



Σχήμα 3.17 Διάγραμμα των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2 για τη μελέτη των αγών ελαιολάδων.

3.8 Αποστάσεις Mahalanobis.

Ένας ακόμα τρόπος για τη μελέτη της καταλληλότητας της μεθόδου για την ανίχνευση νοθείας, είναι η απόσταση Mahalanobis, η οποία μετρά την απόσταση ανάμεσα σε κάθε σημείο (δείγμα) στο διάγραμμα διάκρισης από το κεντροειδές μιας ομάδας. Οι αποστάσεις Mahalanobis που υπολογίστηκαν, για το πρώτο σετ μειγμάτων έξτρα παρθένων ελαιολάδων (Σχήμα 3.15) συνοψίζονται στον Πίνακα 3.11 και συγκρίνονται με τη μέγιστη απόσταση Mahalanobis των έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Εκτός από ένα έξτρα παρθένο ελαιόλαδο που βρίσκεται στις παρυφές της έλλειψης με απόσταση Mahalanobis 15,3 όλα τα υπόλοιπα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα (33 δείγματα), βρίσκονται εντός της έλλειψης των έξτρα παρθένων ελαιολάδων με μέγιστη απόσταση Mahalanobis 13,3. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων στον Πίνακα 3.11 με τη μέγιστη τιμή 13,3 συμπεραίνουμε ότι το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης νοθείας για τα ραφιναρισμένα ελαιόλαδα είναι μικρότερο του 3% w/w, ενώ για τα πυρηνέλαια είναι περίπου 1% w/w.

Πίνακας 3.11 Αποστάσεις Mahalanobis των μειγμάτων του έξτρα παρθένου ελαιολάδου από το κεντροειδές του έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

	Ποσοστό	1%	3%	5%	10%	15%	20%	35%	50%
Ραφιναρισμένα									
	Σετ 1	4.6	14.0	41.7	203.2	338.5	426.1	1063.9	1376.3
	Σετ 2	12.5	18.7	32.7	106.8	182.1	289.2	645.9	1120.3
Πυρηνέλαια									
	Σετ 1	9.2	14.4	32.0	133.9	247.3	322.5	750.9	1172.6
	Σετ 2	23.8	49.4	79.0	232.6	375.9	493.3	969.6	1431.8

Οι αποστάσεις Mahalanobis για τα νοθευμένα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα με ελαιόλαδα λαμπάντε (Σχήμα 3.16) συνοψίζονται στον Πίνακα 3.12 και συγκρίνονται με την μέγιστη απόσταση Mahalanobis της ομάδας των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, η οποία είναι 7,3.

Πίνακας 3.12 Αποστάσεις Mahalanobis από τα μείγματα του ελαιόλαδου λαμπάντε από το κεντροειδές του έξτρα παρθένου ελαιολάδου.

Ποσοστό μειγμάτων	1%	3%	5%	10%	15%	20%
Ελαιολάδου Λαμπάντε 6	3.8	10.5	12.4	38.4	83.1	145.8

Συγκρίνοντας τις τιμές του Πίνακα 3.12 και τη μέγιστη τιμή 7,3 για την απόσταση Mahalanobis των έξτρα παρθένων ελαιολάδων, παρατηρούμε ότι, η

παραπάνω μεθοδολογία και οι μεταβλητές, οι οποίες έχουν επιλεγεί για την κατάστρωση των συναρτήσεων διάκρισης Root 1 και Root 2, είναι ικανές να ανιχνεύσουν τη νοθεία των ελαιολάδων λαμπάντε σε ποσοστό μικρότερο του 3%.

Οι αποστάσεις Mahalanobis που υπολογίστηκαν για τα αγνά ελαιόλαδα (Σχήμα 3.17), συγκρίνονται τόσο με αυτές που προκύπτουν για τα μείγματα των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, όσο και με τη μέγιστη απόσταση Mahalanobis που υπολογίστηκε για τα ραφιναρισμένα ελαιόλαδα προκειμένου να διαπιστωθεί προσεγγιστικά έστω, το ποσοστό μείγματος του ραφιναρισμένου ελαιολάδου στο παρθένο ελαιόλαδο. Σημείο αναφοράς θεωρείται η μέγιστη απόσταση Mahalanobis των έξτρα παρθένων ελαιολάδων από το κεντροειδές της ομάδας όπου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι 13,3. Αντίστοιχα, η μέγιστη απόσταση Mahalanobis του κεντροειδούς της ομάδας των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, είναι 2566,3 και υπολογίζεται ως προς το κεντροειδές της ομάδας των έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Ο Πίνακας 3.12 εμφανίζει τις αποστάσεις Mahalanobis των αγνών ελαιολάδων από το κεντροειδές των έξτρα παρθένων ελαιολάδων καθώς και το μέσο όρο των αποστάσεων Mahalanobis για τα δύο σετ νοθειών των μειγμάτων 35% και 50% έξτρα παρθένο ελαιόλαδο - ραφιναρισμένο ελαιόλαδο.

Πίνακας 3.13 Αποστάσεις Mahalanobis των αγνών ελαιολάδων και των μειγμάτων έξτρα παρθένων ελαιολάδων - ραφιναρισμένων ελαιολάδων από το κεντροειδές των έξτρα παρθένων ελαιολάδων.

Αγνά Ελαιόλαδα	Αποστάσεις Mahalanobis
1	1099.9
2	2205.7
3	1662.6
4	2089.5
5	946.6
6	1748.3

Μέσος όρος των ποσοστών νοθείας 35% και 50% έξτρα παρθένο ελαιόλαδο-ραφιναρισμένο ελαιόλαδο	Αποστάσεις Mahalanobis
35% Ραφινέλαιο 2+4	854.9
50% Ραφινέλαιο 2+4	1248.3

Συγκρίνοντας τις αποστάσεις Mahalanobis των αγνών ελαιολάδων με τους μέσους όρους των μειγμάτων έξτρα παρθένο ελαιόλαδο - ραφιναρισμένο ελαιόλαδο, παρατηρούμε ότι, οι τιμές τους, αντιστοιχούν σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 35% μείγματος ραφιναρισμένο ελαιόλαδο σε παρθένο ελαιόλαδο. Από τις αποστάσεις Mahalanobis, φαίνεται καθαρά ότι το αγνά ελαιόλαδα 5 και 1 περιέχουν περίπου 35%

και 50% ραφιναρισμένο ελαιόλαδο σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα δείγματα των αγνών ελαιολάδων χαρακτηρίζονται από αποστάσεις Mahalanobis μεγαλύτερες από 50% μείγμα έξτρα παρθένο ελαιόλαδο - ραφιναρισμένο ελαιόλαδο. Παράλληλα, διαπιστώνεται ότι, οι αποστάσεις Mahalanobis των αγνών ελαιολάδων δεν υπερβαίνουν τη μέγιστη απόσταση Mahalanobis των ραφιναρισμένων ελαιολάδων, κάτι που σημαίνει ότι τα αγνά ελαιόλαδα δεν ανήκουν στην ομάδα των ραφιναρισμένων ελαιολάδων. Ουσιαστικά από τη μελέτη των αγνών ελαιολάδων καταλήγουμε στο συμπέρασμα, ότι τα αγνά ελαιόλαδα περιέχουν ~ 65% παρθένο ελαιόλαδο.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για την ανίχνευση νοθείας και για τέσσερις κατηγορίες ελαιολάδων, έξτρα παρθένα ελαιόλαδα, λαμπάντε ελαιόλαδα, ραφιναρισμένα ελαιόλαδα, πυρηνέλαια. Τα ποσοστά όμως νοθείας που μπορούν να ανιχνευτούν με τον παρών στατιστικό μοντέλο για αυτές τις κατηγορίες, είναι ελαφρώς πιο υψηλά συγκρινόμενα με αυτά που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Αναφέρουμε ότι, η ανίχνευση νοθείας για τα ραφιναρισμένα και πυρηνέλαια ελαιόλαδα βρέθηκε ~5% ενώ για τα λαμπάντε ~10%. Όσο αφορά τα αγνά ελαιόλαδα, παρατηρήθηκαν τα ίδια αποτελέσματα.

3.9 Συμπεράσματα.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των συστατικών ελαιολάδων τεσσάρων κατηγοριών, έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ελαιολάδων λαμπάντε, ραφιναρισμένων ελαιολάδων και πυρηνελαίων, με τη χρήση φασματοσκοπίας ^{31}P και ^1H NMR. Τα διγλυκερίδια, η οξύτητα και οι στερόλες προσδιορίστηκαν με την φασματοσκοπία ^{31}P NMR με μία νέα μεθοδολογία η οποία έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας. Η κατανομή των λιπαρών οξέων και ο αριθμός ιωδίου προσδιορίστηκαν με τη φασματοσκοπία ^1H NMR. Από τα φάσματα ^{31}P NMR και ^1H NMR εξάγονται χρήσιμες πληροφορίες για τη σύσταση των κατηγοριών των ελαιολάδων που εξετάστηκαν.

Στη συνέχεια, τα συστατικά των ελαιολάδων χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητές για την στατιστική ανάλυση με προοπτική, αρχικά, την ταξινόμηση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων, έξτρα παρθένων ελαιολάδων, ελαιολάδων λαμπάντε, ραφιναρισμένων ελαιολάδων και πυρηνελαίων. Ο συνδυασμός της χημειομετρίας με τη φασματοσκοπία NMR οδήγησε επιτυχώς στη διάκριση των τεσσάρων κατηγοριών ελαιολάδων που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο. Στη συνέχεια, με εφαρμογή της στατιστικής ανάλυσης διάκρισης, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση νοθείας με μείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου με τα ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας, λαμπάντε, ραφιναρισμένα και πυρηνέλαια σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Πιο αναλυτικά, ανιχνεύθηκε νοθεία για τα ελαιόλαδα λαμπάντε και τα ραφιναρισμένα ελαιόλαδα σε ποσοστά κάτω του 3%, ενώ για τα πυρηνέλαια σε ποσοστά γύρω στο 1%.

Τέλος, προκειμένου να γίνει ποσοτική εκτίμηση της παρουσίας του παρθένου ελαιολάδου σε πραγματικά δείγματα, εξετάστηκαν έξι εμπορικά αγνά ελαιόλαδα, άγνωστου ποσοστού μείγματος παρθένου ελαιολάδου με ραφιναρισμένο ελαιόλαδο. Κάνοντας χρήση του στατιστικού μοντέλου για τον έλεγχο νοθείας των ραφιναρισμένων ελαιολάδων διαπιστώθηκε η παρουσία του παρθένου ελαιολάδου στα αγνά ελαιόλαδα σε ποσοστά περίπου 65%. Η μελέτη των αγνών ελαιολάδων απέδειξε ότι το στατιστικό μοντέλο που εφαρμόστηκε είναι σε θέση να ανιχνεύσει προσεγγιστικά, το άγνωστο ποσοστό του ραφιναρισμένου ελαιολάδου στο παρθένο ελαιόλαδο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sanchez, J.; Harwood, L., J. Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104, 564-573.
2. Sacchi, R.; Mannina, L.; Fiordiponti, P.; Barone, P.; Paolillo, L.; Patumi, M.; Segre, A. Characterization of Italian extra virgin olive oils using ^1H NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 3947-3951.
3. Owen, R.W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants; *Lancet Oncology.* **2000**, 1, 107-112.
4. Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Identification of lignans as major components in phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chem.* **2000**, 976-988.
5. Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, 38, 647-659.
6. Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. ^1H and ^{13}C NMR of Virgin Olive Oil. An Overview. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35, \$133-\$145.
7. Vlahov, G. Application of NMR to the study of olive oils. Review. *Progr. Nucl. Magn. Reson.* **1999**, 35, 341-357.
8. International Olive Oil Council; coi/t.15/nc no. 2/rev. 10, 8 November **2001**, Madrid (Spain).
9. Ulberth, F.; Buchgraber, M. Authenticity of fats and oils. *Eur. J. Sci. Technol.* **2000**, 102, 687-694.
10. Vlahov, G.; Improved quantitative ^{13}C nuclear magnetic resonance criteria for determination of grades of virgin olive oils. The normal ranges for diglycerides in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, 73, 1201-1203.
11. Mannina, L.; Dugo, G.; Salvo, F.; Cicero, L.; Ansanelli, G.; Calcagni, C.; Segre, A. Study of the Cultivar-Composition Relationship in Sicilian Olive Oils by GC, NMR, and Statistical Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 120-127.
12. Psomiadou, E.; Tsimidou, M. Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 716-721

13. Μπαλατσούρα, Γ.Δ. Σύγχρονη Ελατοκομία, Το Ελαιόλαδο., Τόμος Δεύτερος, Εκδόσεις Αφοί Φραγκούδη Ο.Ε., Αθήνα. **1997**
14. Κυριτσάκη, Α. Το Ελαιόλαδο. Αγροτικές Συνεταιριστικές Εκδόσεις Α.Ε., Θεσσαλονίκη, **1988**.
15. Karabulut, I.; Kayahan, M.; Yaprak, S. Determination of changes in some physical and chemical properties of soybean oil during hydrogenation. *Food Chemistry*. **2003**, 81, 453-456.
16. European Communities. Regulation 2568/91. *Off. J. Eur. Communities*. **1991**, L 248.
17. Aparicio, R.; Aparicio-Ruiz, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. Review. *Journal of Chromatography A*. **2000**, 881, 93-104.
18. Angerosa, F.; Camera, L.; Cumitini, S.; Gleixner, G.; Reniero F. Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3044-3048.
19. Cucurachi, A. Acetone purification of husk oils. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1971**, 48, 623-625.
20. Favini, G.; Fedeli, E.; Jacini, G. Physical dewaxing of oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. **1971**, 48, 626-630.
21. Mannina, L.; Patumi, M.; Fiordiponti, P.; Emanuele, M.C.; Segre, A. L. Olive and hazelnut oils: a study by high-field ^1H NMR and gas chromatography. *Ital. Food Sci.* **1999**, 2, 139-149.
22. Fauhl, C.; Reniero, F.; Guillou, C. ^1H NMR as a tool for the analysis of mixtures of virgin olive oil with oils of different botanical origin. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 436-443.
23. Mavromoustakos, T.; Zervou, M.; Theodoropoulou, E.; Panagiotopoulos, D.; Bonas, G.; Day, M.; Helmis, A. ^{13}C NMR Analysis of the Triacylglycerol Composition of Greek Virgin Olive Oils. *Magn. Reson. Chem.* **1997**, 35, 53-57.
24. Scahi, R.; Addeo, F.; Giudicianni, I.; Paolillo, L. *Ital. J. Food Sci.*, **1992**, 4, 117-122.
25. Pallotta, U.. *Ital. J. Food Sci.* **1994**, 3, 259-263.
26. Zamora, R.; Gomez, G.; Dobargane, M., C.; Hidalgo, J., F. Oil fractionation as a preliminary step in the characterization of vegetable oils by high-resolution ^{13}C NMR spectroscopy. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2002**, 79, 261-266.

27. Vigli, G.; Filippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of edible oils by employing ^{31}P and ^1H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5715-5722.
28. Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A., C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Cuvelier, L. Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. *J. Agir. Food Chem.* **2002**, *50*, 1751-1764.
29. Goodacre, R.; Kell, D.; Bianchi, G. Rapid assessment of the adulteration of virgin olive oils by other seed oils using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *63*, 297-307.
30. Anklam, E.; Basani, M., R.; Eiberger, T.; Kriebel, S.; Lipp M.; Matissek, R. Characterization of cocoa butters and other vegetable fats by pyrolysis-mass spectrometry.; Fresenius. *J. Anal. Chem.* **1997**, *357*, 981-984.
31. Yang, H.; Irudayaraj, J. Comparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared and Fourier Transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2001**, *78*, 889-895.
32. Wesley, I., J.; Barnes, R., J.; McGill, A., E., J. Measurement of adulteration of olive oils by near-IR spectroscopy. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1995**, *72*, 289-292.
33. Consuelo, L., E.; Bianchi, G.; Goodacre, R. Rapid quantitative assessment of the adulteration of virgin olive oils with hazelnut oils using Raman spectroscopy and chemometrics. *J. Agir. Food. Chem.* **2003**, *51*, 6145-6150.
34. Tay, A.; Sing, R., K.; Krishnan S., S.; Gore, J., P. Authentication of olive oil adulteration with vegetable oils using Fourier-Transform Infrared spectroscopy.; *A.P.*, **2002**, 99-103.
35. Downey, G.; McIntyre, P.; Davies, N., A. Detecting and quantifying oil adulteration in extra virgin olive oils from the eastern Mediterranean by Visible and Near-Infrared spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 5520-5525.
36. Sacchi, R.; Fontanazza, M., G.; Barone, P.; Fiordiponti P.; Mannina, L.; E.,; Rossi, A.; Serge, L., A high-field ^1H Nuclear Magnetic Resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1996**, *73*, 747-758.

37. Lie Ken Jie M., S., F.; Lam, C., C.; Pasha, M., K.; Stefenov, K., L.; Marekov, I. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy analysis of the triacylglycerol composition of some margarines. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1996**, 73, 1011-1017.
38. Gardner, H., W.; Weisleder D. Hydro peroxides from oxidation of Linoleic and Linolenic acids by soybean lipoxygenase: Proof of the *trans*-11 double bond. *Lipids*. **1972**, 7, 191-193.
39. Henry W., S., C.; Levett, G. Autoxidation of methyl Linoleate. Separation and analysis of isomeric mixtures of methyl Linoleate hydro peroxides and methyl hydroxylinoleates. *Lipids*. **1977**, 12, 99-104.
40. Neff, W., E.; Frankel, E, N.; Miyashita, K. Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. I. Trilinoleoylglycerol. *Lipids*. **1990**, 25, 33-39.
41. Claxson, A., W., D.; Hawkes, G., E.; Richardson, D., P.; Naughton, D., P.; Haywood, R., M.; Chander, C., L.; Atherton, M.; Lynch, E., J.; Grootveld, M., C. Generation of lipid per oxidation products in culinary oils and fats during episodes of thermal stressing: a high-field ^1H NMR study. *FEBS Letters*. **1994**, 355, 81-90.
42. Mannina, L.; Patumi, M.; Proietti, N.; Bassi, D.; Serge, A., L. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ^1H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 2687-2696.
43. Zamora, R.; Navarro, J., L.; Hidalgo, F., J. Identification and classification of olive oils by high-resolution ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1994**, 71, 361-364.
44. Royer, A.; Naulet, N.; Mabbon, F.; Lees, M.; Martin, G., J. Stable isotope characterization of olive oils. II. Deuterium distribution in fatty acids studied by nuclear magnetic resonance. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1999**, 76, 365-373.
45. Spyros, A.; Dais, P. Application of ^{31}P NMR spectroscopy in food analysis. 1. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, 48, 802-805.
46. Christophoridou, S.; Spyros, A.; Dais, P.; ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy of polyphenol-containing olive oil model compounds. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. **2001**, 170, 139-157.
47. Fronimaki, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Dais, P. Determination of the diglyceride content in Greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing ^{31}P NMR spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, 50, 2207-2213.

48. Spyros, A.; Filipiddis, A.; Dais, P. Kinetics of diglyceride formation and isomerization in virgin olive oils by employing ^{31}P NMR spectroscopy. Formulation of a quantitative measure to assess olive oil storage history. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 157-164.
49. Φιλιππίδης, Α.: «Γεωγραφική και βοτανική ταξινόμηση Ελληνικών παρθένων ελαιολάδων με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας NMR και τη χημειομετρία.», Διατριβή Μ.Δ.Ε., Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2003.
50. Zwierzak A. Cyclic organophosphorus compounds. I. Synthesis and infrared spectral studies of cyclic hydrogen phosphites and thiophosphites. *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 2501-2512
51. Perez-Camino, M., C.; Moreda, W.; Cert, A. Effects of olive fruit quality and storage practices on the diacycerol content of virgin olive oils. *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, *49*, 669-704.
52. Καραγεώργος, Λ., Δ. "Στατιστική, Περιγραφική & Επαγωγική, Μια διδακτική προσέγγιση.", 2001, Εκδόσεις Σαββάλας.