



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία:

**Φαινολικό Προφίλ και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κρητικών εξαιρετικά
παρθένων ελαιολάδων της εσοδείας 2018**



Γιαπιντζάκη Αφροδίτη Α.Μ. 2109

Εργαστήριο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
Υπεύθυνος Καθηγητής:
Απόστολος Σπύρος

Ηράκλειο, 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Προτού ξεκινήσω με την παρουσίαση της Διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά ορισμένους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Απόστολο Σπύρο τόσο για την ανάθεση αυτής της εργασίας όσο και για την καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ευσταθία Μανωλοπούλου για την προθυμία της και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε, ώστε να με βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση του αντικειμένου της εργασίας μου.

Επιπλέον ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, για το ευχάριστο περιβάλλον και την συνεργασία που είχαμε όλο εκείνο το διάστημα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αγροδιατροφική Σύμπραξη της Περιφέρειας Κρήτης και το Εργαστήριο Οργανοληπτικής Αξιολόγησης Ελαιολάδου της ΕΑΣ Ρεθύμνης για την ευγενική διάθεση των δειγμάτων ελαιολάδου.

Περιεχόμενα

1. Περίληψη	4
Abstract.....	5
2. Εισαγωγή	6
2.1 Ελαιόλαδο.....	6
2.2 Οι πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο.....	11
2.3 Φασματοσκοπία NMR.....	14
3. Σκοπός διπλωματικής εργασίας	17
4. Πειραματικό μέρος	18
4.1 Αντιδραστήρια.....	18
4.2 Παρασκευή διαλύματος CDCl_3 με εσωτερικό πρότυπο (DMT).....	18
4.3 Παρασκευή δείγματος αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης για τον προσδιορισμό της ακριβούς ποσότητας του εσωτερικού προτύπου.....	19
4.4 Απομάκρυνση υγρασίας από τους διαλύτες.....	19
4.5 Δείγματα.....	20
4.6 Προετοιμασία Δειγμάτων.....	21
5. Αποτελέσματα –Συζήτηση αποτελεσμάτων	22
5.1 Ποιοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών που υπάρχουν στο ελαιόλαδο.....	22
5.2 Δομές ταυτοποιημένων ενώσεων.....	25
5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου ενώσεων.....	26
5.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	33
6. Συμπεράσματα	39
7. Βιβλιογραφία	40

1. Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων και ο ποιοτικός χαρακτηρισμός σε δείγματα εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων από την περιοχή της Κρήτης, και η συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, όπως αυτά μετρώνται από ειδικό πάνελ γευσισγνωστών.

Εξετάστηκαν δείγματα ελαιολάδου στα οποία αρχικά απομονώθηκε με εκχύλιση η πολική φάση και προσδιορίστηκαν οι συνολικές πολυφαινόλες με τη χρήση διαλύτη CDCl_3 , που περιείχε εσωτερικό πρότυπο DMT. Η ακριβής ποσότητα DMT προσδιορίστηκε με την χρήση πρότυπου ολεϊκού οξέος. Ο συγκεκριμένος διαλύτης χρησιμοποιήθηκε, καθώς δεν αντιδρά με τις υπό μελέτη φαινολικές ενώσεις και είναι άπολος. Επιπλέον εξετάστηκε η επαναληψιμότητα των εκάστοτε πειραμάτων.

Η ανάλυση και η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μίας διάστασης του πυρήνα ^1H (^1H NMR) στα 500MHz. Μετά την αρχική επεξεργασία των φασμάτων που ελήφθησαν, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των κορυφών μέσω σύγκρισης με πρότυπα φάσματα ^1H NMR, ολοκλήρωσή τους και ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το πρόγραμμα Topspin-Bruker 4.0.7.

Λέξεις κλειδιά: Φασματοσκοπία ^1H NMR, ελαιόλαδο, πολυφαινόλες

1. Abstract

The aim of this thesis is the quantification of phenolic compounds and the qualitative characterization of extra virgin olive oils samples from the area of Crete, and the correlation of the experimental data with the organoleptic characteristics of the olive oil, as measured by expert panels.

The polar phase was initially isolated by extraction and total polyphenols were determined using a CDCl_3 solvent containing an internal standard (DMT). The precise amount of DMT was determined using as standard oleic acid. This solvent was used while it's not reacting with the considered phenolic compounds. In addition, the repeatability of the experiments was examined.

The analysis and quantification was achieved by using one-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) at 500MHz. After initial processing of the obtained spectra, peaks were identified by comparison with standard ^1H NMR spectra. The polyphenols were then integrated and quantified. Spectra were processed using Topspin-Bruker 4.0.7.

Key words: ^1H NMR spectroscopy, olive oil, polyphenols

2. Εισαγωγή

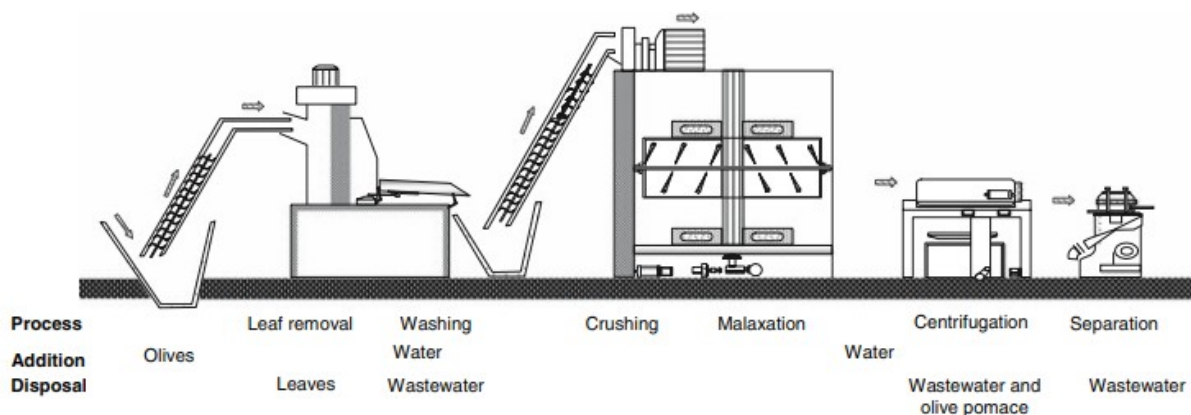
2.1 Ελαιόλαδο

Η ελιά είναι ένα από τα παλαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στον κόσμο. Στο παρελθόν, υπήρξε το σύμβολο της φιλίας και της ειρήνης μεταξύ των εθνών.

Υπάρχουν περισσότερα από 30 είδη ελαιόδεντρων, ενώ σήμερα μετρώνται πάνω από 600 εκατομμύρια παραγωγικές ελιές στον πλανήτη. Το ελαιόλαδο παράγεται σε περιοχές του κόσμου όπου οι κλιματολογικές συνθήκες είναι εξίσου ευνοϊκές με εκείνες που επικρατούν στις μεσογειακές χώρες.

Τα κύρια στάδια επεξεργασίας που απαιτούνται για την παραγωγή ελαιολάδου περιλαμβάνουν: την απομάκρυνση των φύλλων και την έκπλυση των καρπών με νερό, τη μάλαξη της ελαιοζύμης, τη φυγοκέντρηση του ελαίου και τη διήθηση.^[1]

Θεωρείται βρώσιμο εφόσον έχει οξύτητα μικρότερη από 2.0 % εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, χρώμα πρασινοκίτρινο έως κίτρινο, οργανοληπτικές ιδιότητες άμεμπτες ή τουλάχιστον μη δυσάρεστες και το οποίο είναι διαυγές στους 20°C.



Εικόνα 1: Σύγχρονη διαδικασία παραγωγής ελαιολάδου.

Στο ελαιόλαδο περιέχονται κατά κύριο λόγο τριγλυκερίδια (~99%) και δευτερευόντως ελεύθερα λιπαρά οξέα, μόνο- και διγλυκερίδια και μια σειρά λιπιδίων όπως υδρογονάνθρακες, φωσφολιπίδια, στερόλες, αλειφατικές αλκοόλες, τοκοφερόλες και χρωστικές ουσίες. Τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό (C16:0), το παλμιτολεϊκό (C16:1), το στεαρικό (C18: 0), το ελαϊκό (C18: 1), το λινολεϊκό (C18: 2) και το λινολενικό (C18: 3). Η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα μπορεί να διαφέρει από δείγμα σε δείγμα, ανάλογα με τη ζώνη παραγωγής, το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα, την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης. Υπάρχει επίσης πληθώρα φαινολικών και πτητικών ενώσεων, ορισμένες από τις οποίες συμβάλλουν στον μοναδικό χαρακτήρα του ελαιολάδου^[2].

Μελέτες που έχουν γίνει για την ευεργετική δράση του ελαιολάδου έχουν δείξει ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχει παρέχουν προστασία στον οργανισμό από βλάβες που προκύπτουν από την οξείδωση των ελευθέρων ριζών, ενώ ταυτόχρονα μετατρέπουν το ίδιο το ελαιόλαδο σε ένα ανθεκτικό προϊόν προφυλάσσοντας το από την οξείδωση.^{[3],[4]}

Η ποιότητα του ελαιολάδου επηρεάζεται σημαντικά από πληθώρα παραγόντων που είναι δυνατό να επιδρούν ακόμη και κατά το στάδιο ανάπτυξης του καρπού κατά την επαφή του με παράσιτα, μικροοργανισμούς, υγρασία, οξυγόνο, έντονο φως, θερμοκρασία και προσδιορίζεται με την μέτρηση ορισμένων **φυσικοχημικών παραμέτρων** όπως η οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων και η απορρόφηση στο υπεριώδες (K₂₇₀/K₂₃₂/ΔK) καθώς και από τα **οργανοληπτικά** του χαρακτηριστικά (χρώμα, την ορμή, την γεύση, τη διαύγεια).^{[5],[6]}

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου

- Ως Ελεύθερη Οξύτητα στο ελαιόλαδο ορίζεται ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και εκφράζεται σε γραμμάρια ελαιϊκού οξέος ανά 100 γραμμάρια ελαιολάδου. Ένα ειδικό ένζυμο η λιπάση, που βρίσκεται στον καρπό της ελιάς δρα λιπολυτικά στα τριγλυκερίδια και έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (που είναι υπεύθυνα για την οξύτητα στο ελαιόλαδο).
- Τα *υπεροξειδία* είναι χημικές ενώσεις που δημιουργούνται από την επίδραση του οξυγόνου στο ελαιόλαδο.. Η οξείδωση μπορεί να είναι ενζυμική ή χημική. Η ενζυμική οξείδωση οφείλεται στην δράση των ενζύμων που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο. Όταν το ελαιόλαδο διαχωρίζεται από τα απόνερα στο ελαιοτριβείο, αυτά τα ένζυμα που είναι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες απομακρύνονται με τα απόνερα. Με αυτό τον τρόπο το ελαιόλαδο παύει να υπόκειται στην δράση των ενζύμων. Η χημική οξείδωση γίνεται κατά την διάρκεια της συντήρησης του ελαιολάδου μέσω ενός μηχανισμού σχηματισμού ελεύθερων ριζών.
- Η *φασματοφωτομετρική εξέταση* στο υπεριώδες είναι οι απορροφήσεις σε μήκη κύματος 232nm και 270nm, συμβατικά παριστώμενες με K. Ο δείκτης ΔK προκύπτει από τη μαθηματική σχέση υπολογισμού των συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας και αποτελεί βασικό κριτήριο για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της καθαρότητας του ελαιολάδου.
- Η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K_{232} αυξάνεται όταν ο ελαιόκαρπος αποθηκεύεται για πολλές ημέρες μέχρι την έκθλιψη του σε ακατάλληλες συνθήκες. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του δείκτη τόσο καλύτερη είναι η ποιότητα του ελαιολάδου.
- Η τιμή του συντελεστή απορρόφησης K_{270} εξαρτάται από το πόσο φρέσκο

είναι το ελαιόλαδο και κατά πόσο γνήσιο είναι (νοθεία). Παλιά ελαιόλαδα ή μείγματα με παλιά ελαιόλαδα παρουσιάζουν αυξημένες τιμές του K_{270} . Επιπλέον, η έκθεση του ελαιολάδου στην ηλιακή ακτινοβολία ή σε υψηλές θερμοκρασίες επιταχύνουν την πρόοδο της γήρανσης (υψηλή K_{270}). Η απορρόφηση στα 270nm και ο δείκτης ΔΚ, εκτός από κριτήρια ποιότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως κριτήρια γνησιότητας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω το ελαιόλαδο διακρίνεται στις εξής κατηγορίες: ^{[7],[8]}

1. Παρθένα Ελαιόλαδα.

Έλαια που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες, σε συνθήκες που δεν συμβάλουν στην αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία πέραν της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης. Τα έλαια αυτά κατατάσσονται και ταξινομούνται αναλυτικά με τις παρακάτω ονομασίες:

- Εξαιρετικά Παρθένο Ελαιόλαδο: ελαιόλαδο που έχει παραχθεί μόνο με φυσικές και μηχανικές διαδικασίες, με τέλειο άρωμα και γεύση, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (οξύτητα), εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν ξεπερνά τα 0,8 g ανά 100 g.
- Παρθένο Ελαιόλαδο: Το ελαιόλαδο η οξύτητα του οποίου δεν ξεπερνά το 2,0% και τα υπόλοιπα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι βάση των προβλεπόμενων για την κατηγορία αυτή.
- Ελαιόλαδο Λαμπάντε: Το ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα είναι μεγαλύτερη του 2,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι βάση των προβλεπόμενων για την κατηγορία αυτή.

2. Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό

παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν ξεπερνά το 0,3 % και τα άλλα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του είναι στην βάση των προβλεπόμενων για την κατηγορία αυτή.

3. Ελαιόλαδο-αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα. Το έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν ξεπερνά το 1,0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι με βάση τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

4. Ακατέργαστο Πυρηνέλαιο. Το έλαιο που παράγεται από τους πυρήνες της ελιάς, μετά από επεξεργασία με διαλύτες ή με φυσικά μέσα ή το έλαιο που αντιστοιχεί με εξαίρεση ορισμένα χαρακτηριστικά, σε ελαιόλαδο λαμπάντε.

5. Εξευγενισμένο Πυρηνέλαιο. Το έλαιο που προκύπτει από τον εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνελαίου, η οξύτητα του οποίου δεν ξεπερνά το 0,3% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι στη βάση των προβλεπόμενων για την κατηγορία αυτή.

6. Πυρηνέλαιο. Το έλαιο που προκύπτει από ανάμειξη εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, η οξύτητα του οποίου δεν ξεπερνά το 1,0%.

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Κατηγορία	Οξύτητα (%) (*)	Δείκτης υπεροξειδίων mEq O ₂ /kg (*)	Κηροί mg/kg (**)	Κορεσμένα λιπαρά οξέα στη θέση 2 του τριγλυκεριδίου (%)	Συγμοσταδίνια mg/kg (†)	Διαφορά ECN42 HPLC και ECN42 θεωρητικός υπολογισμός	K ₂₃₂ (†)	K ₂₃₃ (†)	Δέλτα-K (*)	Οργανοληπτική αξιολόγηση Διάμηση τιμή του ελατιώματος (Md) (†)	Οργανοληπτική αξιολόγηση Διάμηση τιμή του ερωσώδους (Mf) (†)
1. Εμπειρικό παρθένο ελαιόλαδο	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Παρθένο ελαιόλαδο	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 1,5	≤ 0,15	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Ελαιόλαδο λαμπάντε	> 2,0	—	≤ 300 (†)	≤ 1,5	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 (†)	—
4. Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Σύνθετο ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 1,8	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο	—	—	> 350 (†)	≤ 2,2	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Πυρηνέλαιο	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 2,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(†) Άθροισμα ισομερών που θα μπορούσαν να διαχωριστούν (ή όχι) με τριπλή στήλη.
 (‡) Η εάν η διάμηση τιμή ελατιώματος είναι κατώτερη από ή ίση του 2,5 και η διάμηση τιμή του ερωσώδους ισούται με 0.
 (§) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ελαιόλαδα λαμπάντε αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι κατώτερες από ή ίσες με 350 mg/kg ή αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη είναι κατώτερο από ή ίσο του 3,5.
 (¶) Τα έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς που περιλαμβάνεται μεταξύ 300 και 350 mg/kg θεωρούνται ακατέργαστα πυρηνέλαια αν οι ολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι ανώτερες από 350 mg/kg και αν το ποσοστό σε ερυθροδιόλη και ουβαόλη είναι ανώτερο του 3,5.

2.2 Οι πολυφαινόλες στο ελαιόλαδο

Οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο ελαιόλαδο το καθιστούν, έναντι των υπόλοιπων φυτικών ελαίων, ευεργετικό για την υγεία. Πιο συγκεκριμένα οι ενώσεις αυτές αποτελούν σημαντικά συστατικά στην διατροφή καθώς έχει βρεθεί ότι:^{[3],[4],[9],}
[10]

- Προστατεύουν τα λιπίδια του αίματος από οξειδωτικό στρες.
- Έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- Συμβάλλουν στην πρόληψη χρόνιων παθήσεων.
- Αποτελούν αντικαρκινικούς παράγοντες.
- Έχουν αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση.

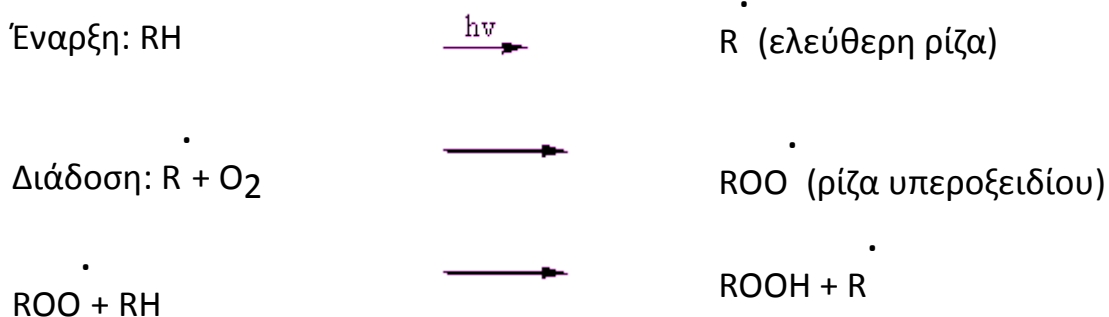
Αποτελούν το 18-37 % της σύστασης του ελαιολάδου (πολικό τμήμα) και διακρίνονται σε πολλές κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή. Κάποιες από αυτές είναι τα φαινολικά οξέα_(γαλλικό, φερουλικό,κουμαρικό, καφεϊκό), οι απλές φαινόλες (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη), τα σεκοϊριδοειδή (ελευρωπαΐνη, λιγκστροσίδιο, και τα παράγωγα τους), τα φλαβονοειδή (απιγενίνη, λουτεολίνη και τα παράγωγα τους) και οι λιγνάνες (πινορεσινόλη,ακετοξυπινορεσινόλη).^[11] Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων διαφέρει από ελαιόλαδο σε ελαιόλαδο και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η ποικιλία του ελαιολάδου, η γεωγραφική προέλευση, η καλλιεργητική πρακτική, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, η τεχνική εξαγωγής του ελαιολάδου, ο χρόνος αποθήκευσης του καρπού πριν την άλεση και οι συνθήκες αποθήκευσης του τελικού προϊόντος.^{[9],[12]}

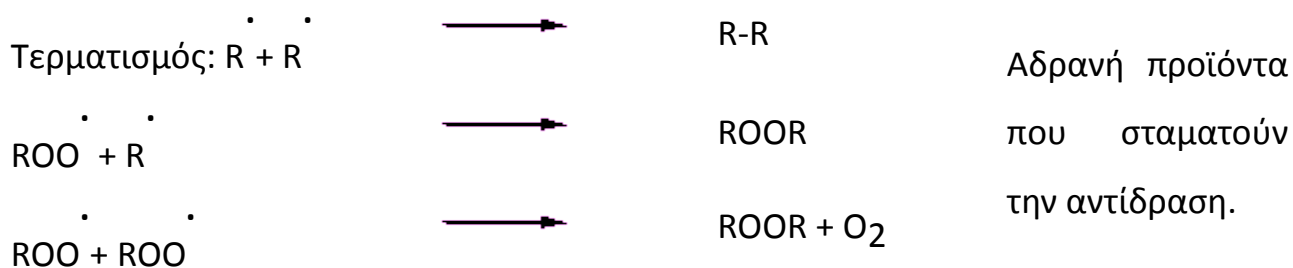
Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών^{[13],[14]}

Η σταθερότητα του ελαιολάδου έναντι της οξείδωσης από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, το λεγόμενο τάγγισμα, οφείλεται στην συνολική ποσότητα των πολυφαινολών. Το οξειδωτικό τάγγισμα επιταχύνεται από παράγοντες όπως φως (βοηθά στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών), θερμότητα (επιταχύνει την αντίδραση), οξυγόνο (απαραίτητο για τη διάδοση της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών), ένζυμα (οδηγούν στον σχηματισμό λιπαρών οξέων). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός υπεροξειδίων, λιπαρών οξέων, αλδευδών και κετονών. Είναι αυτοκαταλυόμενη αντίδραση, αφού για κάθε σχηματιζόμενο υπεροξείδιο δημιουργείται μια νέα ελεύθερη ρίζα σε ένα άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ.

Με συνεχή έκθεση σε οξυγόνο όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου θα μετατραπούν σε υπεροξείδια. Τα προϊόντα αυτά συνήθως έχουν δυσάρεστη οσμή και γεύση. Αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως οι πολυφαινόλες, περιορίζουν την οξείδωση του ελαιολάδου σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες στο μόριο τους. Η δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών οφείλεται στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών του τύπου R[•] και RCOO[•] που δημιουργούνται από την αυτοοξείδωση των λιπαρών ουσιών.

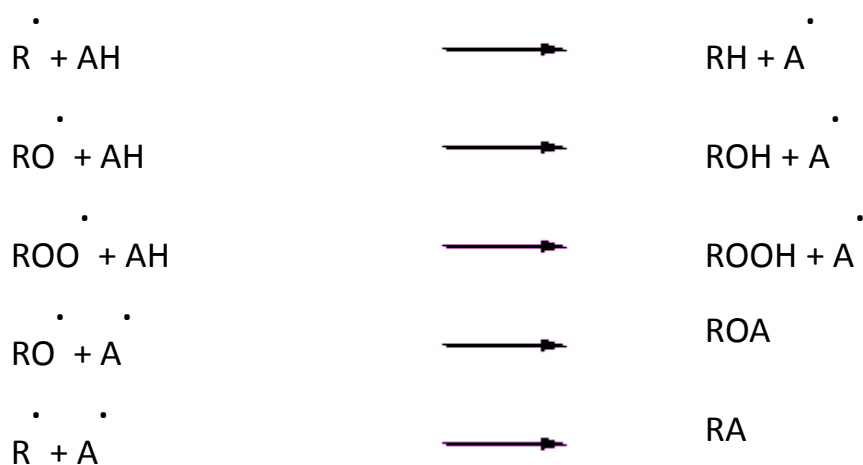
Αυτοοξείδωση λιπών





➤ RH: Μόριο που αυτοοξειδώνεται, π.χ. υδρογονάνθρακας, κορεσμένα λιπαρά οξέα, εστέρας, αλδεΐδες.

Δράση αντιοξειδωτικών



➤ Τα αντιοξειδωτικά AH (φαινολικά) δίνουν άτομα υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες (τις ανάγουν) και τις μετατρέπουν σε αδρανείς ενώσεις. Το φαινολικό υδρογόνο αποσπάται με μεγάλη ευκολία λόγω σταθερότητας εξαιτίας των δομών συντονισμού που προκύπτουν.

2.3 Φασματοσκοπία NMR

Θεωρία NMR ^[15]

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο.

Δεν εμφανίζουν όλοι οι πυρήνες το φαινόμενο NMR. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπιν. Όλα τα ισότοπα που περιέχουν έναν περιττό αριθμό πρωτονίων και/ή νετρονίων έχουν μια εσωτερική μαγνητική ροπή και στροφορμή, δηλαδή ένα μη μηδενικό σπιν και έχουν την ικανότητα να δώσουν σήμα στο NMR. Οι πυρήνες που μελετώνται συνήθως είναι ^1H και ^{13}C . Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για τη διέγερση των πυρήνων βρίσκεται στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων και έχει συχνότητα $3 \times 10^6 - 3 \times 10^8$.

Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών.

Εφαρμογές φασματοσκοπίας NMR

Η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως:

- Στη Χημεία φυσικών προϊόντων ή τη Συνθετική οργανική χημεία καθώς και σε όποιο τομέα της χημείας ασχολείται με τη σύνθεση για να γίνει μελέτη της δομής των ενώσεων
- Στη βιομηχανία τροφίμων για τον έλεγχο της ποιότητας, τον γεωγραφικό χαρακτηρισμό και την ανίχνευση νοθείας.^[16]
- Στη βιοχημεία με τη χρήση πιο πολύπλοκων πειραμάτων (1D-2D) για τη μελέτη της δομής των πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πολυσακχαριτών
- Στη φαρμακευτική για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων μελετώντας τη σχέση δομής-δραστικότητας των ουσιών συνδυαστικά και με τη χρήση της μεταβολομικής.
- Στο τομέα των πολυμερών για το προσδιορισμό της δομής μακρομορίων και τη μελέτη της σύστασης πολυμερικών μιγμάτων
- Στην ιατρική η πιο γνωστή εφαρμογή του NMR είναι η μαγνητική τομογραφία (MRI) για την απεικόνιση του εσωτερικού του ανθρώπινου σώματος. Επίσης χρησιμοποιείται συχνά και για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ κυττάρων, ιστών και άλλων βιολογικών υγρών.

Επιλογή της τεχνικής NMR

- I. Η φασματοσκοπία NMR υπερέχει έναντι άλλων αναλυτικών τεχνικών καθώς δεν είναι καταστρεπτική για το δείγμα.
- II. Η ανάλυση των δειγμάτων μπορεί να γίνει απευθείας ή κάνοντας μια μικρή και εύκολη προεργασία του δείγματος.
- III. Λόγω της μικρής επεξεργασίας του δείγματος αποτελεί μια οικονομική και πιο οικολογική τεχνική (προετοιμασία δείγματος).
- IV. Δεν απαιτεί μεγάλους χρόνους ανάλυσης.
- V. Με τη χρήση ενός μονοδιάστατου φάσματος ^1H NMR μπορούμε να πραγματοποιήσουμε ταυτόχρονα ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων μας καθώς μπορούμε να διακρίνουμε και να ταυτοποιήσουμε ένα πλήθος ενώσεων και αρκεί η ολοκλήρωση μιας απο τις κορυφές της ένωσης που μας ενδιαφέρει για να την ποσοτικοποιήσουμε.

3. Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του φαινολικού προφίλ δειγμάτων ελαιολάδου από το νησί της Κρήτης και η διαπίστωση πιθανής συσχέτισης αυτών με τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων που διατίθενται στο εμπόριο και αναλύθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR.

Τέλος πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των δειγμάτων με βάση το είδος (συμβατικό ή βιολογικό) και το έτος παραγωγής.

4. Πειραματικό μέρος

4.1 Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την επεξεργασία των δειγμάτων και τη λήψη φασμάτων NMR ήταν: κυκλοεξάνιο της εταιρίας Honeywell, ακετονιτρίλιο HPLC grade και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) περιεκτικότητας 99,8% σε δευτέριο της εταιρίας Fluka.

Οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων ^1H NMR και για τη δημιουργία εσωτερικού προτύπου ήταν το ολεϊκό οξύ της εταιρίας Merck και ο τερεφθαλικός διμεθυλεστέρας (DMT) της εταιρίας Fluka.

4.2 Παρασκευή διαλύματος CDCl_3 με εσωτερικό πρότυπο (DMT)

Για την παρασκευή 0,03% w/v διαλύματος ζυγίστηκαν περίπου 0,0032 gr εσωτερικού προτύπου DMT σε ογκομετρική φιάλη των 10ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml CDCl_3 και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων μέχρι να διαλυθεί το στερεό (~10'). Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε μπουκαλάκι που περιείχε ~1gr molecular sieves (MS), σε θερμοκρασία 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή του στην ανάλυση των δειγμάτων.

4.3 Παρασκευή δείγματος αναφοράς γνωστής συγκέντωσης για τον προσδιορισμό της ακριβούς ποσότητας του εσωτερικού προτύπου

Για την παρασκευή του δείγματος αναφοράς προστέθηκαν 20 μl ολεικού οξέος (~0,0179gr), σε erpendorf και 700 μl από το διαλύτη χλωροφορμίου που περιείχε το εσωτερικό πρότυπο. Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος σε υπερήχους για 10 min και τοποθέτηση σε NMR tube διαμέτρου 5mm για τη λήψη του φάσματος.

4.4 Απομάκρυνση υγρασίας από τους διαλύτες

Για το σκοπό αυτό ζυγίστηκαν ~4gr μοριακών κόσκινων (MS) διαμέτρου 3 Å σε vial των 40 ml (~10% w/v διαλύματος) και στη συνέχεια προστέθηκαν 40 ml ακετονιτριλίου. Ο διαλύτης αφήνεται μια μέρα και ακολουθεί αλλαγή των MS με νέα ενεργοποιημένα. Είναι έτοιμος για χρήση μετά την παρέλευση μίας ακόμα ημέρας. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται και για απομάκρυνση υγρασίας από τον διαλύτη CDCl_3 με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται MS διαμέτρου 4 Å.

4.5 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν 32 δείγματα ελαιολάδου εσοδείας 2018

Πίνακας 1: Δείγματα που αναλύθηκαν.

Κωδικός	Βαθμολογία	Ποικιλία	Είδος
ZA2	90,58		Συμβατικό
PM2	82,00		Συμβατικό
MK2	69,57	Κορωνέικη	Συμβατικό
XM1	73,00	Κορωνέικη	Συμβατικό
AT9	77,14	Τσουνάτη με Αγριελιά	Συμβατικό
XT2	90,5	Τσουνάτη	Βιολογικό
AE5	85,25	Κορωνέικη	Συμβατικό
ZN5	76,86	Κορωνέικη	Συμβατικό
TB2	86,92	Κορωνέικη	Συμβατικό
PA9	67,43	Κορωνέικη	Συμβατικό
AN7	83,29	Λιανολιά, Τσουνάτη	Συμβατικό
HN6	79,43	Λιανολιά	Συμβατικό
ZP2	56,86	Αγριελιά	Συμβατικό
XA9	89,33	Τσουνάτη	Βιολογικό
TP3	76,43	Κορωνέικη	Βιολογικό, ΠΟΠ
HE2	87,67		Βιολογικό
KT5	71,29	Κορωνέικη, Τσουνάτη	Βιολογικό
TM5	64,71	Κορωνέικη	Βιολογικό, ΠΟΠ
PT5	81,00	Κορωνέικη	Συμβατικό
XK1	91,25	Κορωνέικη	Συμβατικό, ΠΟΠ
PK6	78,29	Κορωνέικη	Συμβατικό, ΠΟΠ
MP6	90,08	Κορωνέικη	Συμβατικό, ΠΟΠ
NA9	90,75	Κορωνέικη	Βιολογικό
KN8	91,75	Κορωνέικη	Συμβατικό
EK2	84,14	Κορωνέικη	Συμβατικό, ΠΟΠ
BK5	84,14	Κορωνέικη	ΠΟΠ
NX3	60,14	Κορωνέικη, Τσουνάτη	Συμβατικό
TK6	78,86	Κορωνέικη	Συμβατικό

TN8	64,86	Κορωνέικη	Βιολογικό
MI8	66,14	Κορωνέικη	Συμβατικό
ZB5	91,83	Τσουνάτη	Βιολογικό

4.6 Προετοιμασία δειγμάτων

Ζυγίστηκε ~1gr δείγματος ελαιολάδου σε falcon (14 ml). Έπειτα προστέθηκαν 4ml διαλύτη κυκλοεξανίου και το διάλυμα μεταφέρθηκε στους υπερήχους για 10 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5ml διαλύτη ακετονιτριλίου (ACN), και τοποθετήθηκε ξανά σε υπερήχους για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm για διαχωρισμό των δύο φάσεων, και ύστερα συλλογή της πολική φάσης σε νέο falcon. Στο αρχικό δείγμα προστέθηκαν 5ml ακετονιτριλίου και το τοποθετήθηκε σε υπερήχους για 10 min. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm και συλλογή πολικής φάσης μαζί με την αρχική.

Για τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκαν 2ml της πολικής φάσης, έγινε εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό ρότορα και επαναδιάλυση του δείγματος με προσθήκη 700μl διαλύτη $CDCl_3/DMT$. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υπερήχους για 10 min και τέλος μεταφέρθηκε με πιπέτα σε NMR tube διαμέτρου 5mm. Η λήψη του φάσματος έγινε σε φασματοόμετρο Avance-III-500 της εταιρίας Bruker συχνότητας 500MHz για τον πυρήνα πρωτονίου.

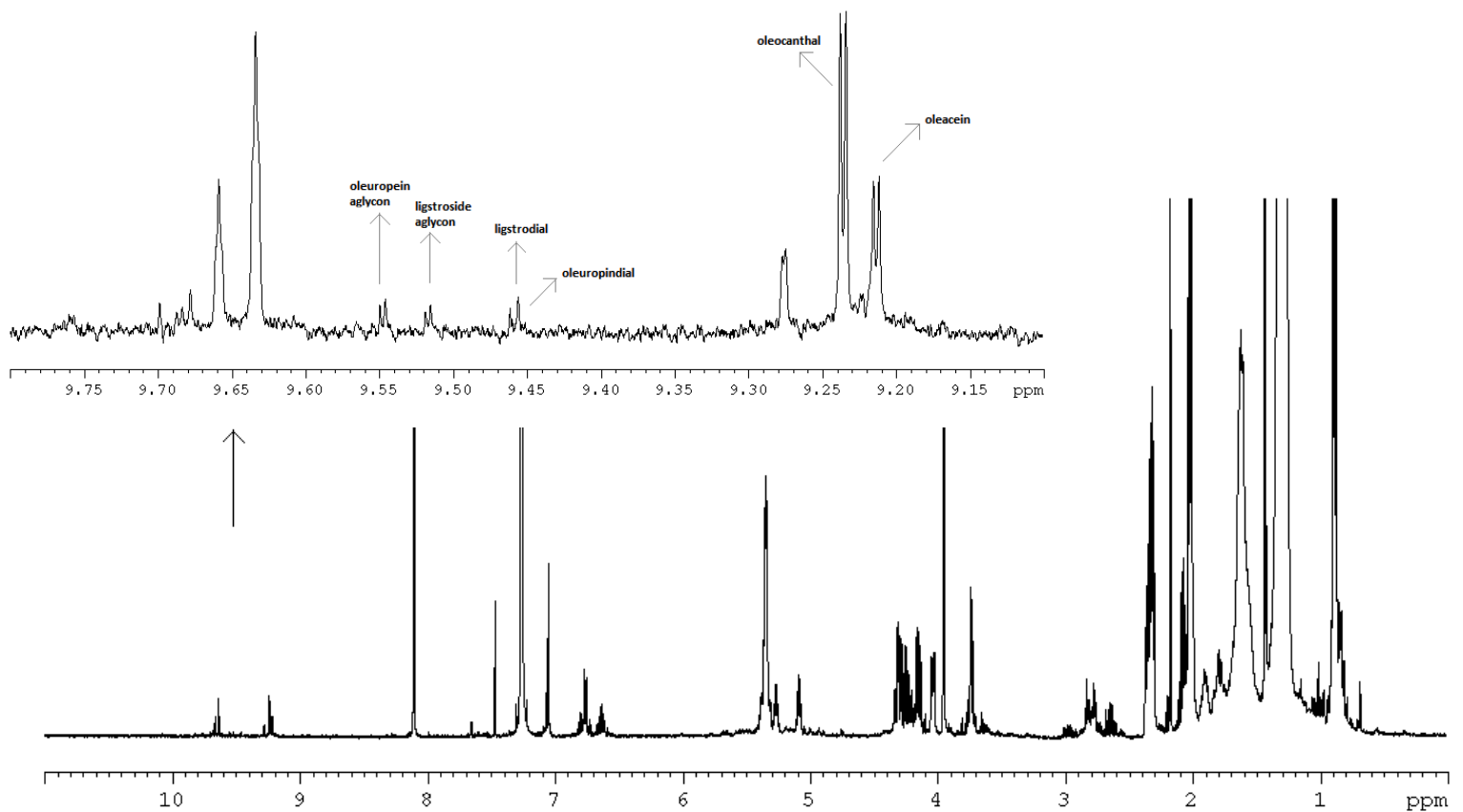
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

5.1 Ποιοτικός προσδιορισμός των ενώσεων που υπάρχουν στο ελαιόλαδο

Στην ενότητα αυτή θα παρουσιαστεί η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των πολυφαινολών που περιέχονται στο πολικό τμήμα του ελαιολάδου. Σε πρώτο στάδιο ελήφθησαν μονοδιάστατα (1D) φάσματα ^1H NMR και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενώσεων σε κάθε δείγμα ελαιολάδου. Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του προγράμματος *statistica*.

Αρχικά θα παρουσιαστεί η ταυτοποίηση ορισμένων οργανικών ενώσεων που υπάρχουν σε δείγματα ελαιολάδου τα οποία προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες και είναι είτε συμβατικά είτε βιολογικά.

Στην εικόνα 2 που ακολουθεί βλέπουμε το φάσμα ^1H NMR του ελαιολάδου. Σε μεγέθυνση δίνεται η αρωματική περιοχή του φάσματος στην οποία εμφανίζονται οι πολυφαινόλες που μελετήθηκαν.



Εικόνα 2: Μονοδιάστατο φάσμα ^1H NMR του ελαιολάδου σε διαλύτη CDCl_3 και σε πεδίο συχνότητας 500MHz.

Όπως φαίνεται, το φάσμα αποτελείται από πλήθος κορυφών τόσο στην αλειφατική όσο και την αρωματική περιοχή, στην οποία βρίσκονται οι φαινολικές ενώσεις που μας ενδιαφέρουν. Οι πολυφαινόλες που συνήθως ανιχνεύονται στο ελαιόλαδο ανήκουν σε τέσσερις κατηγορίες: απλές φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, βανιλίνη κλπ), σεκοϊριδοειδή (ελευρωπαΐνη, λιγκστροσίδιο και παράγωγά τους), λιγνάνες (πινορεσινόλη, ακετοξυπινορεσινόλη) και φλαβονοειδή (απιγενίνη, λουτεολίνη και παράγωγά τους).^{[21][22]} Στην αλειφατική περιοχή ανιχνεύονται κυρίως

τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο -πολυακόρεστα λιπαρά, στερόλες και άλλες άπολες ενώσεις που υπάρχουν στο ελαιόλαδο.^[23]

Στον πίνακα 2 δίνονται τα φασματικά δεδομένα των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν. Οι χημικές μετατοπίσεις δ είναι σε ppm και αναφέρονται ως προς το DMT που βρίσκεται στα 8,10 ppm.

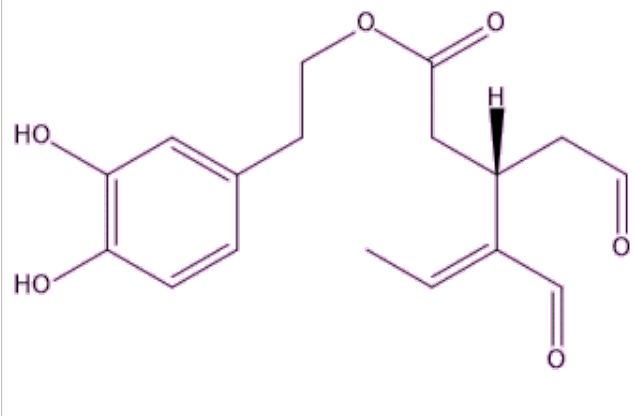
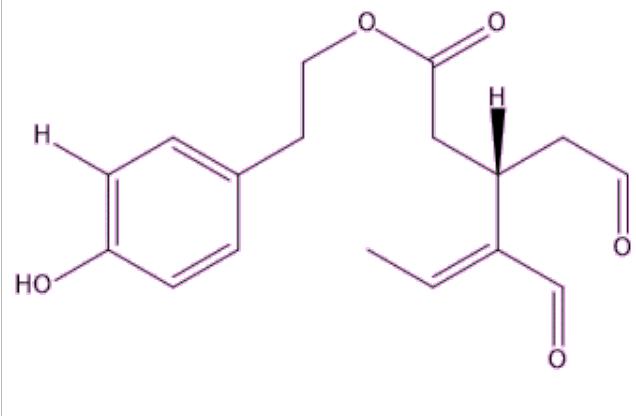
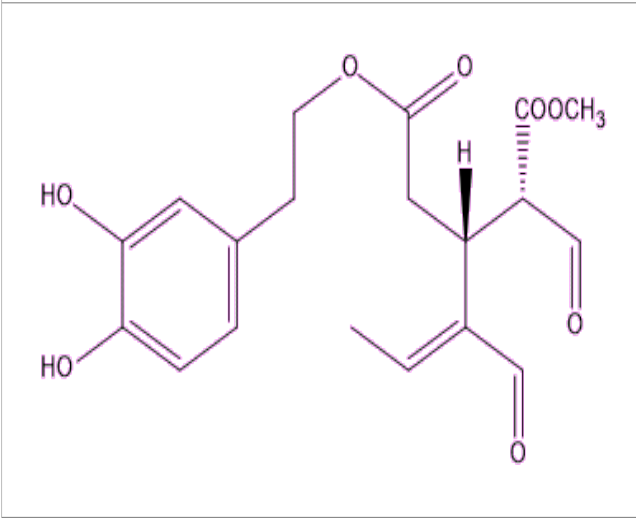
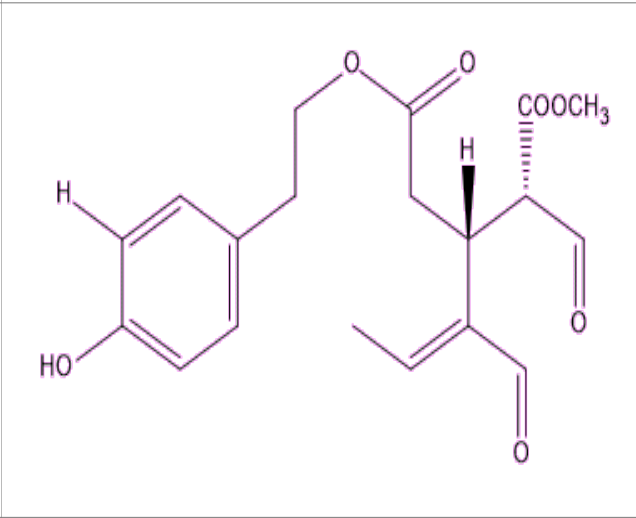
Πίνακας 2: Χημικές μετατοπίσεις ¹H των πολυφαινολών που ταυτοποιήθηκαν στα φάσματα ελαιολάδου σε διαλύτη CDCl₃.

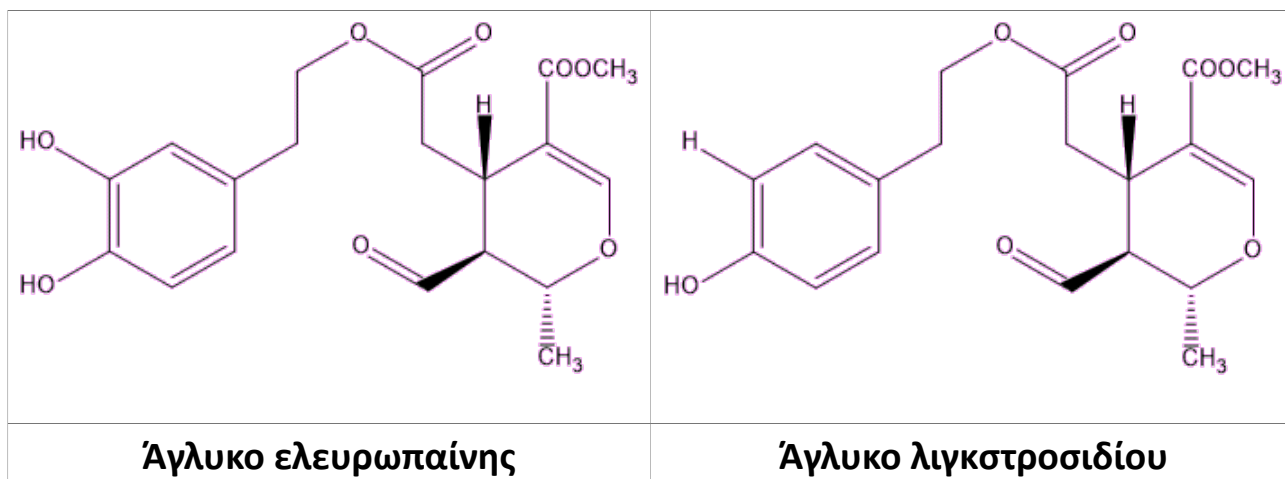
Ένωση	Πολλαπλότητα κορυφής	Χημική μετατόπιση ¹ H ppm
Ελευρωπαιδιάλη	s	9,452
Ολεασίνη	d	9,213
Ολεοκανθάλη	d	9,235
Λιγκστροσιδιάλη	d	9,458
Άγλυκο λιγκστροσιδίου	d	9,516
Άγλυκο ελευρωπαίνης	d	9,547

5.2 Δομές ταυτοποιημένων ενώσεων

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο πολικό τμήμα του ελαιολάδου.^[11]

Πίνακας 3: Δομές των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν στο πολικό κλάσμα του ελαιολάδου.

	
Ολεασίνη	Ολεοκανθάλη
	
Ελευρωπαιδιάλη	Λιγκτροσιδιάλη



5.3 Ποσοτική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν στο ελαιόλαδο

Αφού ολοκληρώθηκε η ποιοτική ανάλυση των φασμάτων NMR των ελαιολάδων και γνωρίζοντας τις χαρακτηριστικές κορυφές των ενώσεων που μας ενδιέφεραν, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση τους για να μελετηθεί η ποσοτική σύσταση των δειγμάτων ελαιολάδου και οι πιθανές διαφορές αναφορικά με την ποικιλία της ελιάς, το είδος του λαδιού (συμβατικό/βιολογικό) και το έτος εσοδείας. Η ποσοτικοποίηση έγινε με ολοκλήρωση συγκεκριμένων κορυφών για κάθε ένωση. Στη συνέχεια ακολούθησε κανονικοποίηση ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε κορυφή. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο τερεφθαλικός διμεθυλεστέρας DMT (δ 8.10). Είχε γνωστή ποσότητα σε κάθε δείγμα και χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς κατά την ολοκλήρωση των υπόλοιπων κορυφών ώστε να βρεθεί η τιμή της ποσότητας τους.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές εκχυλίσεις και μετρήσεις σε κάθε κωδικό δείγματος. Στο πίνακα 4 παρατίθενται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων (mg/kg) των ενώσεων που βρέθηκαν σε κάθε κωδικό ελαιολάδου. Η συνολική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πολυφαινόλες παρατίθεται στον πίνακα 5 μαζί και με τη βαθμολογία του κάθε δείγματος η οποία προκύπτει από τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις των φαινολικών ενώσεων (mg/kg) που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα ελαιολάδων όπως προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση τους με τη χρήση προτύπου DMT.

Δείγματα	Άγλυκο ελευρωπαϊνης	Ολεασίνη	Ελευρωπαιδιάλη	Άγλυκο του λιγκτροσι δίου	Ολεοκανθάλη	Λιγκτροσιδι άλη
ZA2	1,99	2,88	0,00	1,14	9,30	0,00
PM2	4,04	4,17	0,38	3,68	12,13	2,25
MK2	0,00	0,58	0,00	0,00	4,04	0,00
XM1	6,82	17,90	0,00	4,42	30,32	3,95
AT9	0,00	0,00	0,00	0,00	3,26	0,00
XT2	7,19	21,09	2,65	6,49	50,33	10,42
ZN5	13,78	3,63	2,63	8,02	28,09	9,85
TB2	8,51	22,51	3,67	4,03	35,62	4,01
PA9	8,52	8,61	3,36	5,90	26,76	9,40
AN7	2,51	7,00	0,00	0,00	11,52	0,00
HN6	0,00	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00
ZP2	0,00	0,00	0,00	0,00	18,67	0,00
XA9	6,97	11,42	1,48	6,02	31,95	7,88
TP3	8,63	5,51	0,00	4,14	30,68	0,00
HE2	19,61	31,84	2,16	6,14	33,13	2,93
KT5	0,00	13,61	0,00	0,00	26,80	0,00

TM5	5,58	10,80	0,00	3,98	30,13	0,00
PT5	13,35	11,80	2,83	5,40	34,28	5,42
XK1	13,73	42,31	3,02	8,02	80,57	13,47
PK6	0,00	2,02	0,00	0,00	18,01	0,00
MP6	11,55	26,06	3,78	6,43	41,13	9,65
NA9	14,55	51,57	0,95	10,31	91,40	9,91
KN8	13,88	14,88	4,12	6,66	13,74	6,76
EK2	8,80	25,18	0,00	0,00	17,94	0,00
BK5	7,96	15,58	0,00	4,71	31,88	0,00
NX3	0,00	6,71	0,00	0,00	20,66	0,00
TK6	10,30	11,16	0,00	5,59	19,79	0,00
TN8	11,92	13,24	2,61	8,05	25,94	7,14
MI8	9,52	8,72	0,00	5,64	32,22	0,00
ZB5	0,00	36,65	0,00	0,00	17,84	0,00
KT6	43,39	37,83	2,05	25,92	57,19	7,26
MN8	22,28	15,66	2,41	25,16	57,15	10,36
XB1	41,15	15,85	5,90	17,93	33,60	12,58
TE2	34,35	39,91	6,93	22,07	56,80	6,23
TZ2	44,05	40,01	3,27	25,39	52,46	7,61
AE5	45,30	41,14	6,30	26,11	53,94	20,27

Πίνακας 5: Βαθμολογία δειγμάτων και συνολική περιεκτικότητα (mg/Kg) σε πολυφαινόλες.

Δείγμα	Βαθμολογία	Ολικές φαινόλες
ZA2	90,58	15,30
PM2	82,00	26,65
MK2	69,57	4,62
XM1	73,00	63,41
AT9	77,14	3,26
XT2	90,5	98,16
ZN5	76,86	66,00
TB2	86,92	78,35
PA9	67,43	62,55
AN7	83,29	21,03
HN6	79,43	2,53
ZP2	56,86	18,67
XA9	89,33	65,72
TP3	76,43	48,96
HE2	87,67	95,81
KT5	71,29	40,41
TM5	64,71	50,49
PT5	81,00	73,07
XK1	91,25	161,12
PK6	78,29	20,03
MP6	90,08	98,60
NA9	90,75	178,69
KN8	91,75	60,04
EK2	84,14	51,92
BK5	84,14	60,13

NX3	60,14	27,37
TK6	78,86	46,84
TN8	64,86	68,90
MI8	66,14	56,11
ZB5	91,83	54,49
KT6	62,43	173,65
MN8	72,57	133,03
XB1	73,57	127,02
TE2	63,71	166,28
TZ2	90,42	172,79
AE5	85,25	193,07

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι τιμές **D1 (ολεασίνη + ολεοκανθάλη)** και **D2 (ολεασίνη / ολεοκανθάλη)** για τα δείγματα ελαιολάδου που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας 6: Τιμές D1 (ολεασίνη + ολεοκανθάλη) και D2 (ολεασίνη / ολεοκανθάλη) για κάθε δείγμα ελαιολάδου.

Δείγμα	Ποικιλία	D1	D2
MK2	Κορωνέικη	12,18	0,31
XM1	Κορωνέικη	48,22	0,59
AT9	Τσουνάτη με Αγριελιά	3,26	0,00
XT2	Τσουνάτη	71,42	0,42
ZN5	Κορωνέικη	31,72	0,13
TB2	Κορωνέικη	58,13	0,63
PA9	Κορωνέικη	35,37	0,32
AN7	Λιανολιά, Τσουνάτη	18,52	0,61

HN6	Λιανολιά	2,53	0,00
ZP2	Αγριελιά	18,67	0,00
XA9	Τσουνάτη	43,37	0,36
TP3	Κορωνέικη	36,19	0,18
KT5	Κορωνέικη, Τσουνάτη	40,41	0,51
TM5	Κορωνέικη	40,93	0,36
PT5	Κορωνέικη	46,08	0,34
XK1	Κορωνέικη	122,88	0,53
PK6	Κορωνέικη	20,03	0,11
MP6	Κορωνέικη	67,19	0,63
NA9	Κορωνέικη	142,96	0,56
KN8	Κορωνέικη	28,62	1,08
EK2	Κορωνέικη	43,12	1,40
BK5	Κορωνέικη	47,46	0,49
NX3	Κορωνέικη, Τσουνάτη	27,37	0,32
TK6	Κορωνέικη	30,95	0,56
TN8	Κορωνέικη	39,18	0,51
MI8	Κορωνέικη	40,94	0,27
ZB5	Τσουνάτη	54,49	2,05
MK2	Κορωνέικη	4,62	0,14
XM1	Κορωνέικη	48,22	0,59
AT9	Τσουνάτη με Αγριελιά	3,26	0,00

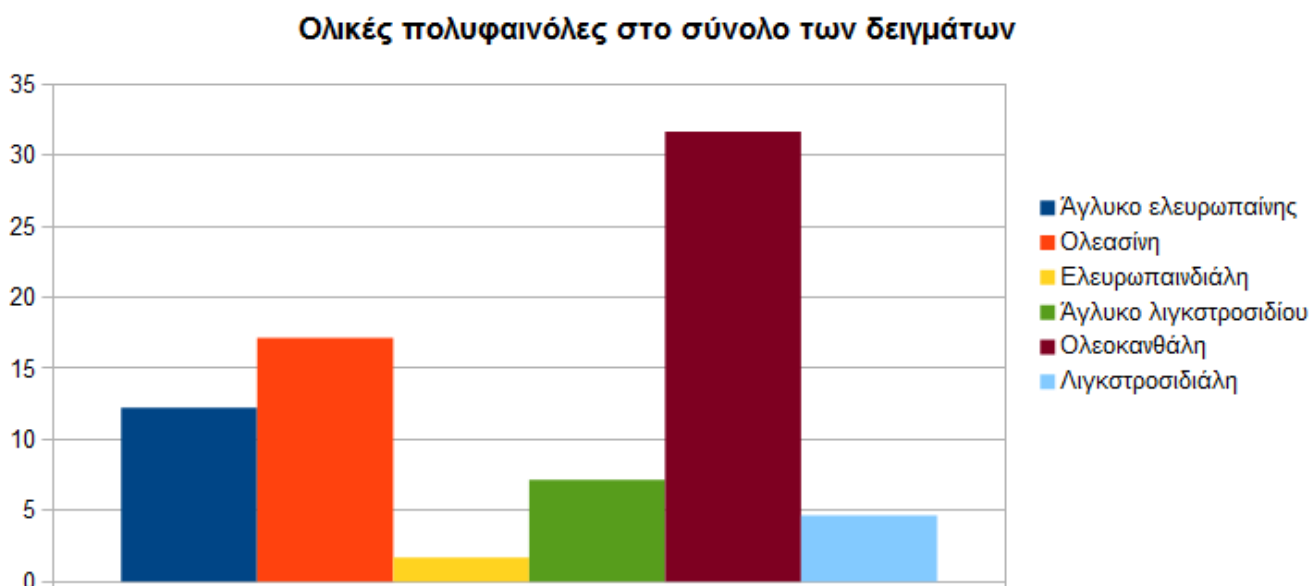
Συγκρίνοντας τον δείκτη D1 για το κάθε δείγμα με τον συνολικό αριθμό πολυφαινολών του πίνακα 5 βλέπουμε πως οι τιμές είναι αρκετά κοντά κάτι το οποίο υποδεικνύει την μεγάλη συνεισφορά των ενώσεων ολεασίνη και ολεοκανθάλη στις ολικές πολυφαινόλες των ελαιολάδων. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία όπου σε δείγματα ελληνικών ελαιολάδων οι πολυφαινόλες που περιέχονται σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την τιμή του D1, αποκαλύπτοντας τον ρόλο των ενώσεων αυτών ως κυρίαρχο παράγοντα.^[26]

Μια άλλη παρατήρηση στον πίνακα 6 αφορά την αναλογία ολεασίνης προς ολεοκανθάλη (δείκτης D2). Η αναλογία αυτή έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, πιθανώς για γενετικούς λόγους, ενώ είναι ανεξάρτητη από την διαδικασία παραγωγής του ελαίου.^[26] Παρά τη μεταβλητότητα του D1, που οφείλεται σε διαφορές στον χρόνο συγκομιδής ή στην διαδικασία παραγωγής, η μέση τιμή του D2 για την Κορωνέικη ποικιλία ανέρχεται στο 0,5 ενώ για τις υπόλοιπες ποικιλίες οι τιμές είναι πιο χαμηλές. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία και με βιβλιογραφικά αποτελέσματα για τον δείκτη D2.

5.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Μετά την ολοκλήρωση της ποσοτικοποίησης των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου ακολούθησε η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού Statistica. Σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν η εύρεση πιθανών συσχετίσεων ή διαφορών μεταξύ των δειγμάτων συγκριτικά με το είδος του ελαιολάδου (συμβατικό/βιολογικό) καθώς και το έτος εσοδείας(2018-2019). Αρχικά όπως παρατηρούμε από την εικόνα 3 η ολεοκανθάλη βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκεντρώση σε σχέση με τις υπόλοιπες πολυφαινόλες με μέσο όρο σε όλα τα δείγματα συνολικά 31,72 mg/Kg και ακολουθεί η ολεασίνη με μέσο όρο 17,16 mg/Kg. Γενικά αξιοσημείωτα είναι τα χαμηλά ποσοστά των πολυφαινολών στα δείγματα που μελετήθηκαν συγκριτικά με βιβλιογραφικά αποτελέσματα για ελληνικά ελαιόλαδα της ίδιας ποικιλίας.^[26] Συγκεκριμένα ο μέσος όρος σε ολικές πολυφαινόλες των παραπάνω δειγμάτων ανέρχεται στα 77,98 mg/Kg. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να οφείλεται σε πιθανή αλλοίωση του ελαιολάδου λόγω της ανάλυσης τους μετά το πέρας ενός και δύο χρόνων από την αποθήκευσή τους.^{[9],[12]}

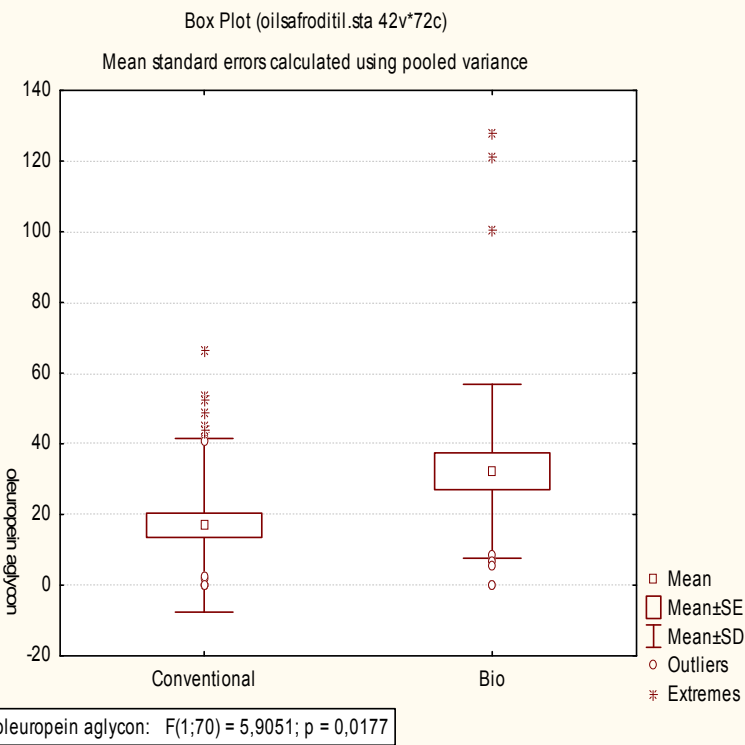
Διάγραμμα 1: Μέσος όρος κάθε ένωσης στο σύνολο των δειγμάτων.



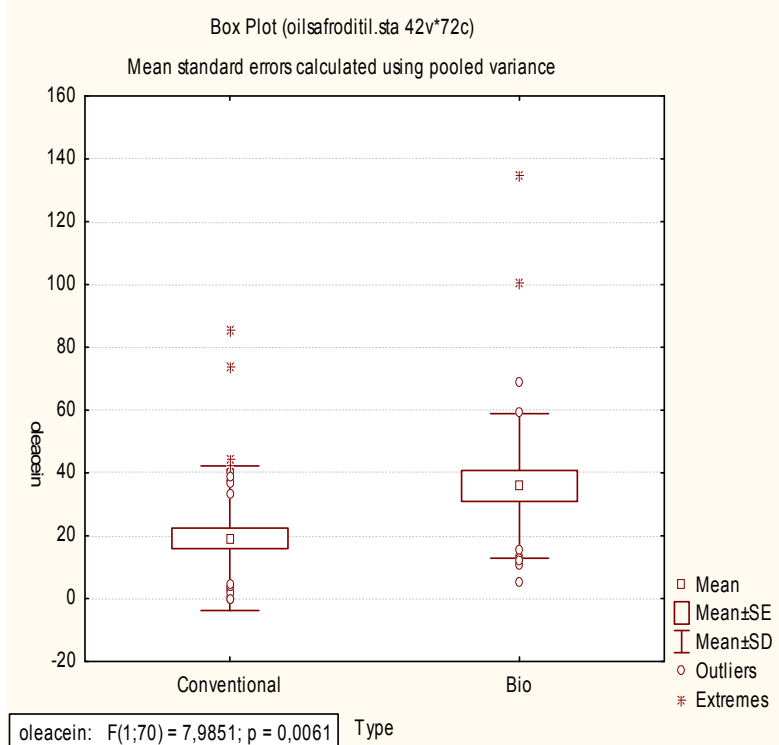
Παρακάτω παρατίθεται η βασική στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος statistica.

Στα διαγράμματα 2 έως 7 παρουσιάζονται, ξεχωριστά, οι πολυφαινόλες που μελετήθηκαν ως προς τον τύπο των ελαιολάδων (συμβατικό ή βιολογικό). Στο διάγραμμα 8 έχουμε λάβει υπ' όψιν τις συνολικές πολυφαινόλες που βρέθηκαν σε δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων για το έτος 2018 και πάλι ως προς παράμετρο που αφορά στον τύπο του ελαιολάδου. Παρατηρούμε ότι στα βιολογικά ελαιόλαδα όλες οι ενώσεις, επομένως και οι ολικές πολυφαινολικές, συναντώνται σε λίγο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα συμβατικά. Μια βασική διαφορά μεταξύ των δύο αναπτυσσόμενων συστημάτων είναι η διαχείριση της γονιμότητας του εδάφους, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη θρεπτική σύνθεση των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων των δευτερογενών μεταβολιτών.^[28]

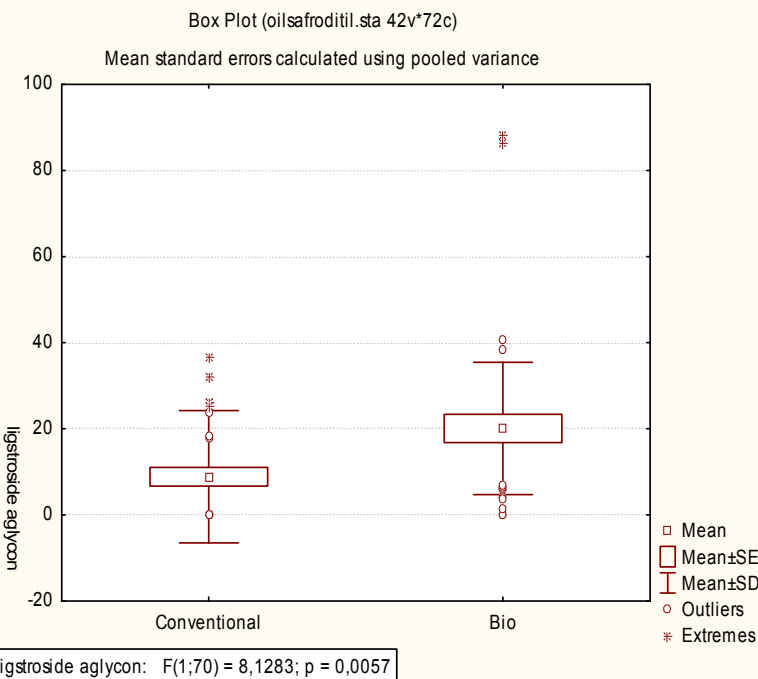
Επίσης, αξίζει να σημειωθεί και ο παράγοντας p που προκύπτει από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με πίνακα ANOVA. Για να είναι στατιστικά αποδεκτός πρέπει $p < 0,05$. Στα διαγράμματα 2-7 έχουμε αποδεκτή διαφορά, με τον αριθμό p να είναι μικρότερος του 0,05 και έτσι οι αλληλεπιδράσεις των μεταβλητών να είναι στατιστικά σημαντικές.



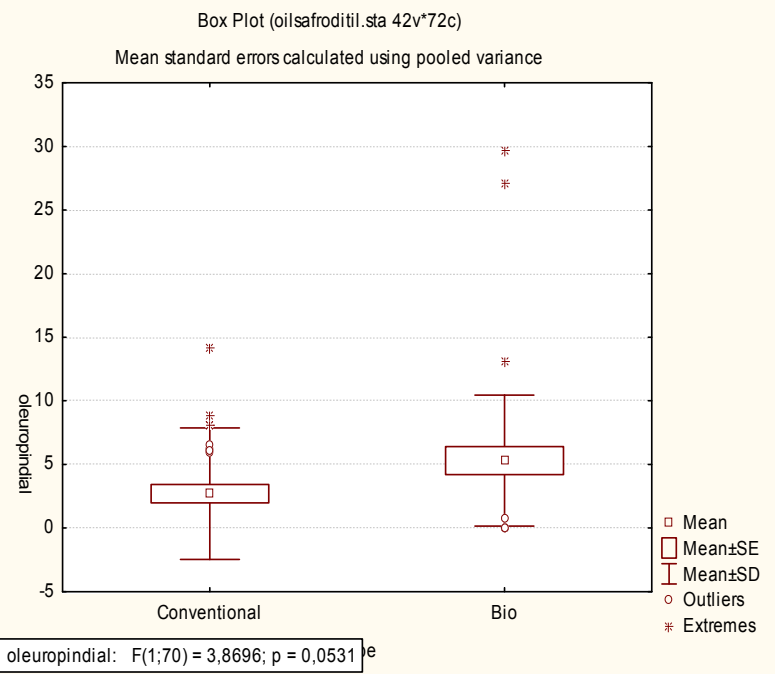
Διάγραμμα 2: Στατιστική ανάλυση για το άγλυκο ελευρωπαίνης.



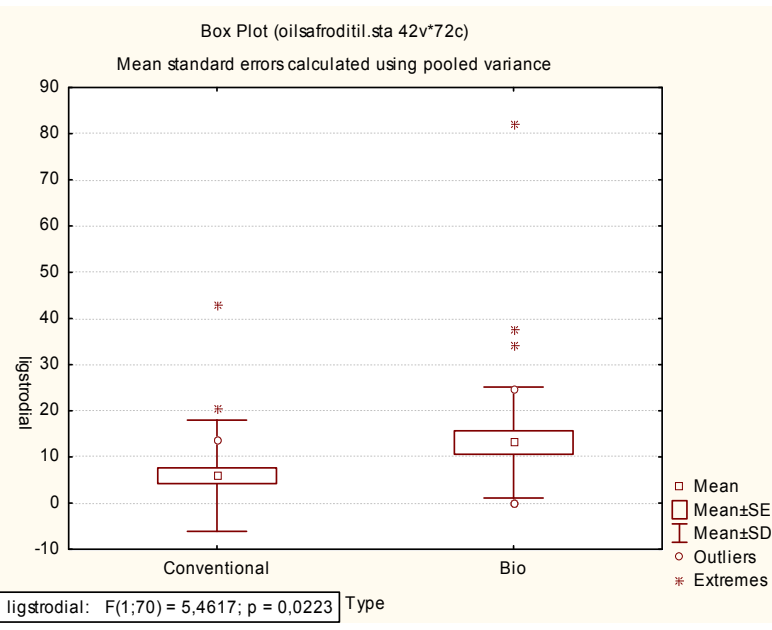
Διάγραμμα 3: Στατιστική ανάλυση για την ολεασίνη.



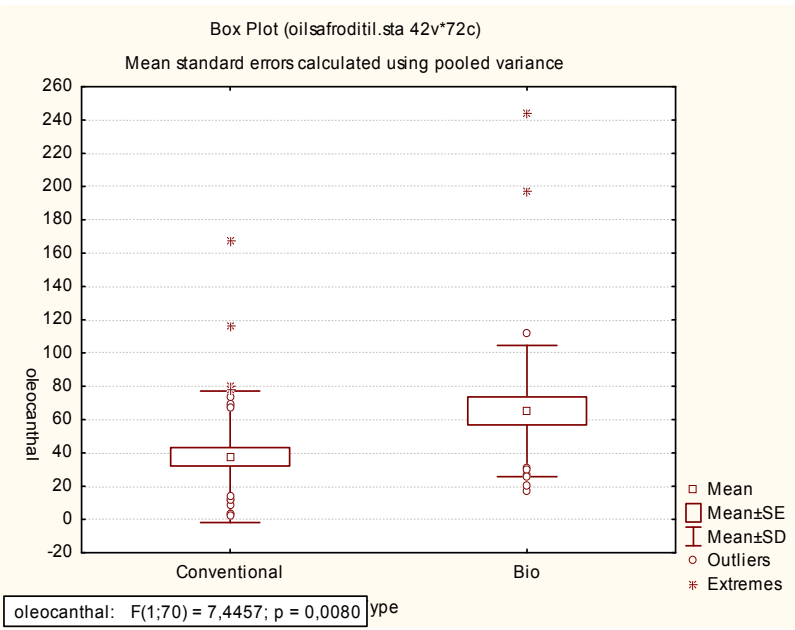
Διάγραμμα 4: Στατιστική ανάλυση για το άγλυκο λιγκτροσιδίου.



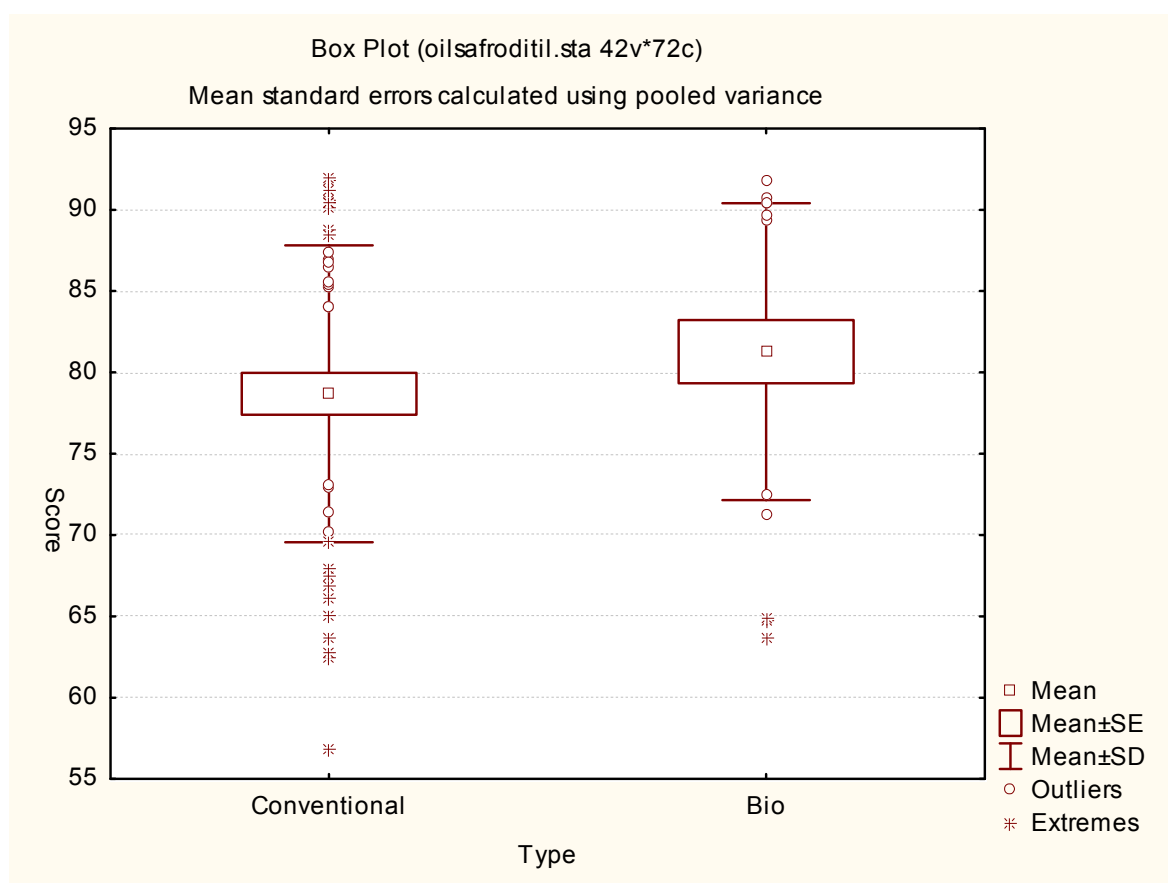
Διάγραμμα 5: Στατιστική ανάλυση για την ελευρωπινδιάλη.



Διάγραμμα 6: Στατιστική ανάλυση για την λιγκτροσιδιάλη.



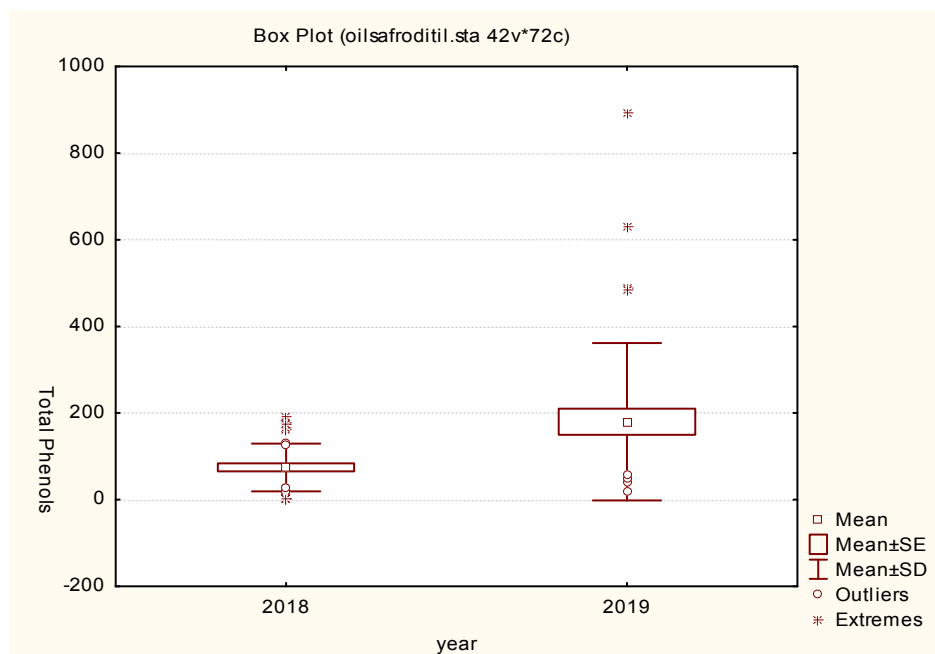
Διάγραμμα 7: Στατιστική ανάλυση για την ολεοκανθάλη.



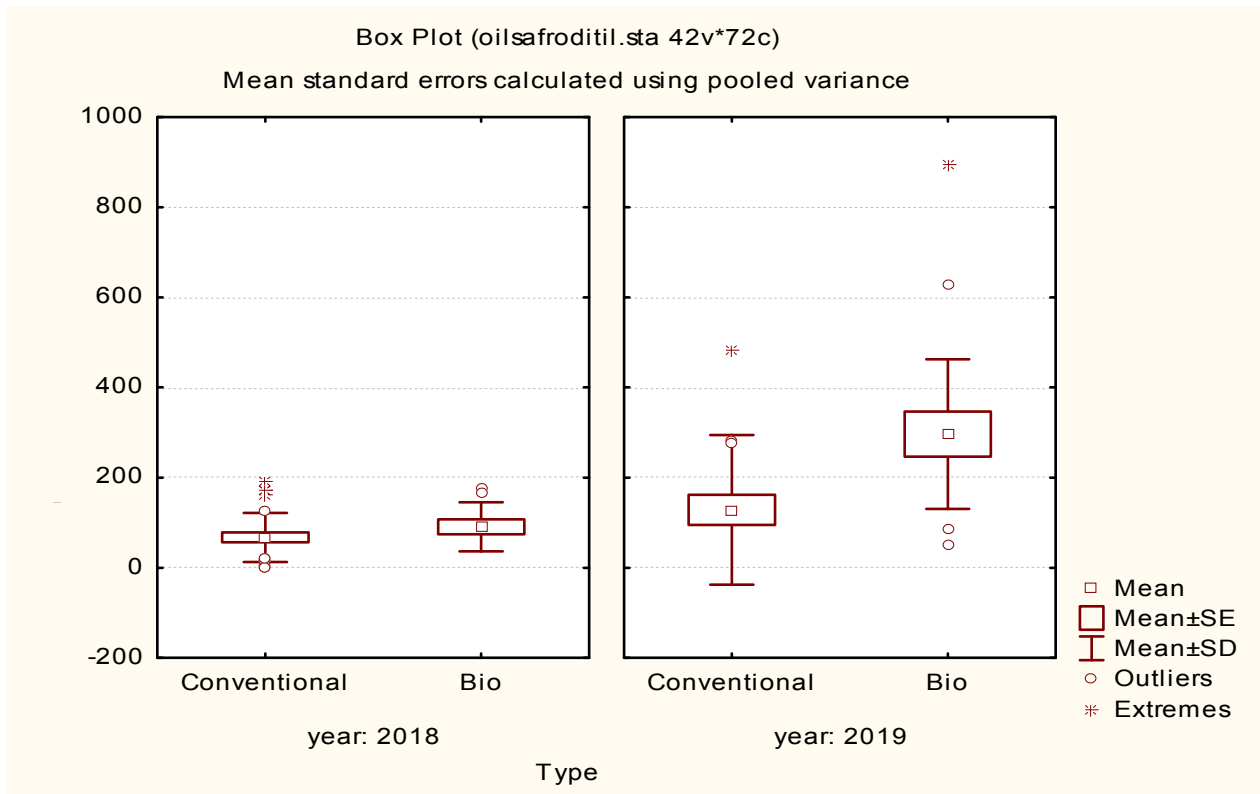
Διάγραμμα 8: Ολικές πολυφαινόλες βάσει του τύπου του ελαιολάδου.

Στα παρακάτω διαγράμματα, 9 και 10, παρουσιάζει η σύγκριση των συνολικών πολυφαινολών που βρέθηκαν για δείγματα των έξτρα παρθένων ελαιολάδων της εσοδείας 2018 και 2019. Όπως φαίνεται υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο χρόνων καθώς οι πολυφαινόλες που περιέχονται σε δείγματα του 2018 είναι σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα δείγματα του έτους 2019. Αυτό εξηγείται από το γεγονός πως από το έτος 2018 έχουν παρέλθει 2 χρόνια και είναι αναμενόμενο να υπάρχει μεγαλύτερη αλλοίωση των δειγμάτων συγκριτικά με αυτά του 2019.

Στο διάγραμμα 10 δίνεται η σύγκριση των συνολικών πολυφαινολών και για τα δυο έτη σε σχέση τη παράμετρο που αφορά στον τύπου του ελαιολάδου. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι τόσο στα συμβατικά όσο και στα βιολογικά ελαιόλαδα το ποσοστό σε πολυφαινόλες είναι μεγαλύτερο στην εσοδεία του 2019. Επίσης, όπως και στο έτος 2018 έτσι και στο έτος 2019 η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες είναι υψηλότερη για τα βιολογικά ελαιόλαδα.



Διάγραμμα 9: Ολικές πολυφαινόλες συναρτήσεως του έτους παραγωγής των ελαιολάδων.



Διάγραμμα 10: Ολικές πολυφαινόλες συναρτήσει του τύπου ελαιολάδου ανά έτος παραγωγής.

6.Συμπεράσματα

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι η φασματοσκοπία NMR είναι μια αξιόπιστη και γρήγορη τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη της σύστασης δειγμάτων ελαιολάδου. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκε πως δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών που περιέχονται στο λάδι με τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Επομένως η βαθμολογία του κάθε ελαιόλαδου, η οποία έχει προκύψει από ένα σύνολο παραμέτρων όπως η υφή, η γεύση, το άρωμα και το χρώμα, δεν αποτελεί δείκτη της ποσότητας των πολυφαινολών που περιέχονται. Επιπλέον από τις χαμηλές τιμές των πολυφαινολών στο σύνολο των δειγμάτων για το έτος 2018 καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι είναι πιθανό να έχει υπάρξει αλλοίωση των δειγμάτων κατά την αποθήκευση τους για μεγάλο διάστημα και προτείνεται η άμεση ανάλυση των ελαιολάδων από την παραγωγή τους για πιο ασφαλή συμπεράσματα.. Τέλος όσον αφορά τη συγκέντρωση των πολυφαινολών αναφορικά με τον τύπο του ελαιολάδου, είδαμε ότι στα βιολογικά λάδια η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα συμβατικά κάτι που θέλει ίσως περαιτέρω μελέτη.

7. Βιβλιογραφία

1. Kapellakis I.E, Tsagarakis K.P,. Crowther J.C, Olive oil history, production and by-product management, *Journal of Environmental Science and Biotechnology* 2008, 7,1–26.
2. Blekas G, Tsimidou M, Boskou D, Olive Oil Composition, *Journal of Chemistry and Technology* 2006,2, 41-72.
3. Klikarová J, Rotondo A, Cacciola F, Česlová L, Dugo P, Mondello Land Rigano F, The Phenolic Fraction of Italian Extra Virgin Olive Oils: Elucidation Through Combined Liquid Chromatography and NMR Approaches, *Journal of Food Analytical Methods* 2019,12, 1759–1770.
4. Ben Mansour A, Gargouri B, Melliou E, Magiatis P and Bouaziz M',, Oil quality parameters and quantitative measurement of major secoiridoid derivatives in Neb Jmel olive oil from various Tunisian origins using qNMR, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2016, 96, 4432-4439.
5. Guzmán E, Baeten V, Pierna J.A.F, García-Mesa J.A, Evaluation of the overall quality of olive oil using fluorescence spectroscopy,*Journal of Food Chemistry* 2015, 173, 927-934.

6. Psomiadou E, Karakostas K.X, Blekas G, Tsimidou M.Z and Boskou D, Proposed parameters for monitoring quality of virgin olive oil, *European Journal of Lipid Science and Technology* 2003,105, 403-409.
7. The 101 of olive oil designations and definitions, Australian Olive Association, Retrieved March 15, 2015.
8. United States Standards for Grades of Olive Oil and Olive-Pomace Oil, United States Department of Agriculture, October 25, 2010.
9. Angelis A, Antoniadis L, Stathopoulos P, Halabalaki M, Skaltsounis LA, Oleocanthalic and Oleaceinic acids: New compounds from Extra Virgin Olive Oil (EVOO), *Journal of Phytochemistry Letters* 2018,190-194.
10. Karkoula E, Skantzari A, Melliou E, and Magiatis P, Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2014 62, 600-607.
11. Diamantakos P, Killday K, Gimisis T, Melliou E, Oleokoronol and oleomissional: new major phenolic ingredients of extra virgin olive oil, *Journal of Olivae* 2015, 122, 22-32.
12. Mansouri F, Moumen AB, Belhaj K, Richard G, Fauconnier ML, Sindic M, Caid HS and Elamrani A, Effect of crop season on the quality and composition of

extra virgin olive oils from Greek and Spanish varieties grown in the Oriental region of Morocco, *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2018, 30, 549-562.

13.Kalogeropoulos N and Tsimidou M.Z, Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils, *Journal of Antioxidants* **2014**, 3, 387-413.

14.Bendary E, Francis R.R, Ali H.M.G, Sarwat M.I and Hady S.El, Antioxidant and structure activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds, *Journal of Annals of Agricultural Sciences* 2013, 58, 173-181.

15.Spyros A, NMR Spectroscopy, in *Handbook of Food Analysis*, 2016.

16.Marcone M.F, Wang S, Albabish W, Nie S, Somnarain D and Hill A, Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology, *Journal of Food Research International* 2013, 51, 729-747.

17.Mailer R, Chemistry and quality of olive oil, *Journal of Primefact* 2006,227,1-4.

18.Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G, Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade, *Journal of Molecules* 2007, 12, 1679-719.

19. Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF, Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure, *Journal of Inflammopharmacology* 2009, 17, 76-84.
20. Hatzakis E, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review, *Journal of Food Science and Food Safety* 2019, 18, 189-220.
21. Christophoridou S, Dais P, Tseng L.H and Spraul M, Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPENMR), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 4667-4679.
22. Μανωλοπούλου Ε, Μεταβολομική ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων και βιολογικών υγρών με τη φασματοσκοπία NMR, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 2017.
23. Holland M.V, Guillou C, Alonso-Salces R.M, Quality Assessment of Olive Oil by ¹H-NMR Fingerprinting, February, 2012.
24. Christophoridou S, Dais P, Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Analytica Chimica Acta* 2009, 633, 283-292.

25. Ruiz-Aracama A, Goicoechea E, Guillén M D, Direct study of minor extra-virgin olive oil components without any sample modification. ^1H NMR multisuppression experiment: A powerful tool Food Technology, *Journal of Food Chemistry*. 2017, 228, 301-314..
26. Karkoula E, Skantzari A, Melliou E, and Magiatis P, Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative ^1H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2012, 60, 11696-11703.
27. Nikoua T, Liakib V, Stathopouloa P, Skliroub AD, Tsakirib EN, Jakschitzc T, Bonn G, Trougakos IP, Halabalakia M and Skaltsounisa LA, Comparison survey of EVOO polyphenols and exploration of healthy aging promoting properties of oleocanthal and oleacein, *Journal of Food and Chemical toxicology* 2019, 125, 403-412.
28. López-Yerena A, Lozano-Castellón J, Olmo-Cunillera A, Tresserra-Rimbau A, Quifer-Rada P, Jiménez B, Pérez M and Vallverdú-Queralt A, Effects of Organic and Conventional Growing Systems on the Phenolic Profile of Extra-Virgin Olive Oil, *Molecules* 2019, 24, 1986.
29. Reddy G.N.M and Caldarelli S, Maximum-quantum (MaxQ) NMR for the speciation of mixtures of phenolic molecules, *Journal of Chemical Communications*, 2011, 14, 4297-4299.