

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



**<<Προσδιορισμός βιοφαινολών στο ελαιόλαδο με τη
μέθοδο HPLC>>**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΥΡΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



<<Προσδιορισμός βιοφαινολών στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο HPLC>>

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΥΡΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Εξεταστική Επιτροπή : Καπόλος Ιωάννης (επιβλέπων)

Ζακυνθινός Γεώργιος (μέλος)

Βαρζάκας Θεόδωρος (μέλος)

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία γίνεται λόγος για μία ανάλυση, τον προσδιορισμό των βιοφαινολών με τη μέθοδο High Pressure Liquid Chromatography (Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης) στο ελαιόλαδο, που θα ενσωματωθεί στον υπάρχοντα κανονισμό του ελαιολάδου ώστε να δώσει ένα επιπλέον προστατευτικό μέτρο για τον έλεγχο της νοθείας του. Επίσης αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του ελαιολάδου και η χημική του σύσταση, όπως και τα ποιοτικά κριτήρια αλλά και οι κατηγορίες του σύμφωνα με το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) και εν συντομία οι υπόλοιπες μέθοδοι ελέγχου νοθείας του ελαιολάδου. Τα συμπεράσματα της εργασίας είναι πως υπάρχει ένα κενό που δίνει τη δυνατότητα να νοθευτεί το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με κατώτερα έλαια και αυτή η μέθοδος είναι αναγκαία ώστε να εξασφαλιστεί η ποιότητα του ελαιολάδου.

Λέξεις κλειδιά: Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, HPLC, πολυφαινόλες, έλεγχος νοθείας ελαιολάδου

ABSTRACT

In this thesis refers to one analysis, determination of biophenols in olive oils by HPLC (High pressure liquid chromatography) in olive oil, which is intend to be integrated into the existing olive oil regulation to provide an additional protective measure to control of rigging. Also referred to the characteristics of olive oil and its chemical composition, as well as quality criteria and categories according to the international olive oil council (IOOC) and briefly the remaining olive oil adulteration testing methods. The working conclusions is that there is a gap that allows to adulterate the extra virgin olive oils with lower and this method is necessary to ensure the quality of the oil.

Key words: Extra virgin olive oil, HPLC, polyphenols, olive oil rigging checking

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ | 8 |
| Πίνακες | 8 |
| ΠΡΟΛΟΓΟΣ | 9 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 11 |
| 1.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου | 11 |
| 1.1.1 Σύσταση ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα | 12 |
| 1.1.2 Φωσφολιπίδια του ελαιολάδου | 13 |
| 1.1.3 Ασαπwnοποίητο κλάσμα..... | 14 |
| 1.1.4 Βασικότερες τάξεις ασαπwnοποίητων συστατικών του ελαιολάδου | 16 |
| 1.1.5 Υδρογονάνθρακες..... | 16 |
| 1.1.6 Τριτερπενικά οξέα | 17 |
| 1.1.7 Καροτενοειδή | 18 |
| 1.1.8 Χρωστικές..... | 18 |
| 1.1.9 Βιταμίνες | 19 |
| 1.1.10 Τοκοφερόλες | 19 |
| 1.1.11 Στερόλες | 21 |
| 1.1.11.1 Κοινές στερόλες (απομεθυλοστερόλες)..... | 21 |
| 1.1.11.2 4α-Μεθυλοστερόλες | 22 |
| 1.1.11.3 Τριτερπενικές διαλκοόλες..... | 22 |
| 1.1.11.4 4,4- ιμεθυλοστερόλες (τριτερπενικές αλκοόλες) | 23 |
| 1.1.12 Πολυφαινόλες..... | 23 |
| 2 Κριτήρια ποιότητας και κατηγορίες ελαιολάδου | 25 |
| 2.1 Οξύτητα | 25 |
| 2.2 Οξειδωση | 25 |
| 2.2.1 Αριθμός υπεροξειδίων | 26 |
| 2.2.2 Απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα..... | 26 |
| 2.3 Χρώμα..... | 27 |
| 2.4 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά..... | 27 |
| 2.5 Κατηγορίες ελαιολάδου και πυρηνελαίου καθορισμένες από το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) και την Ευρωπαϊκή ένωση (Ε.Ε) | 28 |
| 2.5.1 Παρθένο ελαιόλαδο..... | 28 |
| 2.5.2 Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο | 28 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.5.3 | Παρθένο ελαιόλαδο..... | 29 |
| 2.5.4 | Ελαιόλαδο λαμπάντε..... | 29 |
| 2.5.5 | Ραφινρισμένο ελαιόλαδο..... | 29 |
| 2.5.6 | Ελαιόλαδο ή γνήσιο ελαιόλαδο ή αγνό ή κουπέ..... | 29 |
| 2.5.7 | Ακατέργαστο πυρηνέλαιο | 30 |
| 2.5.8 | Ραφινρισμένο πυρηνέλαιο | 30 |
| 2.5.9 | Πυρηνέλαιο | 30 |
| 3 | Έλεγχοι νοθείας στο ελαιόλαδο | 33 |
| 3.1 | Πυρηνέλαιο..... | 33 |
| 3.2 | Ορυκτέλαιο | 34 |
| 3.3 | Ιχθυέλαια | 34 |
| 3.4 | Προσμίξεις με έλαια ξένων χωρών | 34 |
| 3.5 | Έλεγχος Νοθείας Ελαιολάδου | 34 |
| 3.5.1 | Δοκιμή Carocci – Buzzi | 35 |
| 3.5.2 | Δείκτης Bellier – Marcille..... | 35 |
| 3.5.3 | Δοκιμή ανίχνευσης τσαγιελαίου | 36 |
| 3.5.4 | Ανίχνευση σπορελαίων με τη δοκιμή Bellier | 36 |
| 3.5.5 | Δείκτης Vizern-Gullot | 36 |
| 3.5.6 | Αντίδραση πολυβρωμιδίων..... | 37 |
| 3.5.7 | Προσδιορισμός στερολών..... | 37 |
| 3.5.8 | Προσδιορισμός σκουαλενίου | 37 |
| 3.5.9 | Προσδιορισμός των κορεσμένων λιπαρών οξέων στη 2-θέση του μορίου των τριγλυκεριδίων | 38 |
| 3.5.10 | Προσδιορισμός κηρών..... | 38 |
| 3.5.11 | Προσδιορισμός ερυθροδιόλης | 39 |
| 3.5.12 | Ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων για την εξακρίβωση της γνησιότητας του ελαιολάδου..... | 39 |
| 3.5.13 | Προσδιορισμός των trans-ακόρεστων ή των trans ισομερών των ακόρεστων λιπαρών οξέων για την εξακρίβωση της γνησιότητας του ελαιολάδου. | |
| | 40 | |
| 3.6 | Προσδιορισμός βιοφαινολών με τη μέθοδο HPLC στο ελαιόλαδο..... | 40 |
| 3.6.1 | Σκοπός | 40 |
| 3.6.2 | Αρχή της μεθόδου..... | 40 |
| 3.6.3 | ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ | 41 |

| | | |
|---------|------------------------------------|----|
| 3.6.4 | ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ..... | 41 |
| 3.6.5 | Διαδικασία | 43 |
| 3.6.5.1 | Η προετοιμασία των δειγμάτων | 43 |
| 3.6.5.2 | Ανάλυση στο HPLC | 43 |
| 3.6.6 | Έκφραση των αποτελεσμάτων | 45 |
| | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 49 |
| | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 50 |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 HPLC χρωματογράφημα που καταγράφονται στα 280 nm το προφίλ των βιοφαινολών σε ένα έξτρα παρθένο ελαιόλαδο όπου : 1 υδροξυτυροσόλη, 2 τυροσόλη, 3 βανιλικό οξύ, 4 καφεϊνικό οξύ, 5 συριγγικό οξύ (εσωτερικό πρότυπο), 6 βανιλίνη, 7 παρα-κουμαρικό οξύ, 8 άλας υδροξυτυροσόλης, 9 φερουλικό οξύ, 10 όρθο-κουμαρικό οξύ, 11;11a αποκαρβοξυμεθυλομένη ελευρωπαΐνη άγλυκη, οξειδωμένη μορφή διαλδεΰδη, 12 αποκαρβοξυμεθυλομένη ελευρωπαΐνη άγλυκη, διαλδεΰδική μορφή, 13 ελευρωπαΐνη, 14 ελευρωπαΐνη άγλυκη, διαλδεΰδική μορφή, 15 άλας τυροσόλης, 16;16a αποκαρβοξυμεθυλομένη λιγστροσιδίνη άγλυκη, οξειδωμένη μορφή διαλδεΰδη, 17 αποκαρβοξυμεθυλομένη λιγστροσιδίνη άγλυκη, διαλδεΰδική μορφή, 18 πευκορητινόλη, 1 ακετοξυ-πευκορητινόλη, 19 κινναμωμικού οξέος, 20 λιγστροσιδίνη άγλυκη, διαλδεΰδική μορφή, 21;21a;21b ελευρωπαΐνη άγλυκη, οξειδωμένη αλδεΰδη και υδροξυλική μορφή, 22 λουτεολίνη, 23 ελευρωπαΐνη άγλυκη, αλδεΰδη και υδροξυλική μορφή, 24;24a;24b λιγστροσιδίνη άγλυκη, οξειδωμένη αλδεΰδη και υδροξυλική μορφή, 23 απιγενίνη, 26 μεθυλ-λουτεολίνη, 27 λιγστροσιδίνη άγλυκη, αλδεΰδη και υδροξυλική μορφή. 44

Πίνακες

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1 Διακύμανση της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα. | 13 |
| Πίνακας 2 Σύσταση του κλάσματος των ασαπωνοποιήτων συστατικών του παρθένου ελαιολάδου και του πυρηνελαίου (%). | 14 |
| Πίνακας 3 Περιεκτικότητα του παρθένου και του εξευγενισμένου ελαιολάδου σε μη γλυκεριδικά συστατικά. | 15 |
| Πίνακας 4 Περιεκτικότητα διαφόρων λιπαρών υλών σε σκουαλένιο | 16 |
| Πίνακας 5 Επιτρεπόμενα όρια διαφόρων χαρακτηριστικών σε διαφορετικές κατηγορίες ελαιολάδων. | 31 |
| Πίνακας 6 Η βαθμιαία έκλουση | 42 |
| Πίνακας 7 Ταυτοποίηση των κορυφών βιοφαινόλης. Μέγιστη απορρόφηση (max ABS UV) αξίες και σχετικοί χρόνοι κατακράτησης (RRT) * | 46 |

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ελαιόλαδο είναι ο φυσικός χυμός που παράγεται από τον ελαιόκαρπο με φυσικές μεθόδους (σύνθλιψη, πίεση, φυγοκέντριση, μέθοδος σινολέα), χωρίς την προσθήκη χημικών και καμιάς περαιτέρω κατεργασίας, και μπορεί να καταναλωθεί αμέσως, όπως όλοι οι φυσικοί χυμοί. Έχει πικρή ή πικάντικη ή γλυκιά γεύση (γλυκιά ονομάζεται όταν υπάρχουν σε μικρό βαθμό ή καθόλου η πικρή και/ή πικάντικη γεύση), φρουτώδες άρωμα και μεγάλη διατροφική αξία. Το ελαιόλαδο παραγόταν στις ακτές της Μεσογείου για διάφορες χρήσεις από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. Οι χρήσεις του ήταν φαρμακευτικές, θρησκευτικές, καλλυντικές και διατροφικές. (Κυριτσάκης, 2007). Το φυτό της ελιάς, *Olea europaea*, και ιδιαίτερα η ποικιλία Κορωνέικη (*var mastoides*), είναι η βασική πηγή ελαιοποιήσιμων ελιών στην Ελλάδα, και κυρίως στην Κρήτη και τη Μεσσηνία. Το ελαιόλαδο που προέρχεται από αυτή την ποικιλία θεωρείται το καλύτερο ποιοτικά ελαιόλαδο στην Ελλάδα, ενώ έχει αρχίσει η καλλιέργειά του και σε άλλες μακρινές χώρες όπως οι Η.Π.Α., η Χιλή και η Αυστραλία. Πλεονέκτημα αυτής της ποικιλίας είναι η ανθεκτικότητά της σε διάφορες κλιματολογικές συνθήκες, όπως υγρασία, υψηλές θερμοκρασίες, ξηρασία, ψύχος, έντονοι άνεμοι ενώ αναπτύσσεται σε διάφορα υψόμετρα, από παραθαλάσσιες, μέχρι ορεινές περιοχές. Άλλο πλεονέκτημα αυτής της ποικιλίας είναι η μεγάλη απόδοση του καρπού της σε έλαιο, που μπορεί να φτάσει το 27% w/w. Τα δέντρα αυτής της ποικιλίας ανθοφορούν από Απρίλιο μέχρι Μάιο, ενώ οι καρποί φτάνουν στο μέγιστο βάρος τους αργά το φθινόπωρο ή αρχές χειμώνα, ανάλογα με την καλλιεργητική περιοχή και το κλίμα, οπότε και είναι ώριμοι οι καρποί, έτοιμοι για συλλογή και ελαιοποίηση. Φυσικά κάθε περιοχή (Κρήτη, Μεσσηνία, Λακωνία, Θάσος-Μυτιλήνη, Ιόνια Νησιά) διεκδικεί την καταγωγή του καλύτερου και νοστιμότερου ελαιολάδου. Για πολλούς το ελαιόλαδο που προέρχεται από τη Μεσσηνία θεωρείται το καλύτερο ελληνικό ελαιόλαδο. Πολλά στοιχεία ωστόσο πρέπει να συντρέχουν για να είναι ένα ελαιόλαδο ποιοτικό. Για αυτό το λόγο δεν είναι εύκολο να θεωρηθεί ότι μια περιοχή έχει καλό ελαιόλαδο, ενώ άλλη δεν έχει. Παρόλα αυτά το μεσσηνιακό ελαιόλαδο συγκεντρώνει αρκετά από αυτά τα στοιχεία.

Κύριος σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι να γίνει αναφορά στη μέθοδο προσδιορισμού βιοφαινολών του ελαιόλαδου με τη μέθοδο HPLC, επειδή υπάρχει κενό στον κανονισμό του ελαιόλαδου και αυτή η μέθοδος μπορεί να το κλείσει, επίσης θα γίνει μια σύντομη ανασκόπηση των υπολοίπων αναλύσεων του κανονισμού του ελαιόλαδου όπως και θα γίνει αναφορά των χαρακτηριστικών του ελαιόλαδου καθώς και των ποιοτικών κριτηρίων αλλά και των κατηγοριών του ελαιόλαδου.

Στο κεφάλαιο 1 γίνεται αναλυτική αναφορά της χημικής σύστασης του ελαιόλαδου, στο κεφάλαιο 2 αναφέρονται τα κριτήρια της ποιότητας αλλά και οι κατηγορίες του ελαιόλαδου, στο κεφάλαιο 3 αναφέρονται οι μέθοδοι ελέγχου νοθείας του ελαιόλαδου καθώς και ο προσδιορισμός των βιοφαινολών με τη μέθοδο HPLC στο ελαιόλαδο, τέλος αναφέρονται τα συμπεράσματα της εργασίας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, όπως και κάθε λιπαρή ύλη, είναι κυρίως ένα μίγμα τριγλυκεριδίων. Τα τριγλυκερίδια ονομάζονται και ουδέτερα λίπη. Είναι οργανικές χημικές ενώσεις, των οποίων το μόριό τους αποτελείται από ένα μόριο γλυκερόλης, ενωμένο με τρία μόρια ανώτερων λιπαρών οξέων. Από αυτήν ακριβώς τη σύνθεση λαμβάνουν και το χαρακτηριστικό τους όνομα τριγλυκερίδια. Στη σύνθεση των διαφόρων τριγλυκεριδίων χρησιμοποιούνται περίπου 50 διαφορετικά λιπαρά οξέα. Επειδή στο κάθε μόριο τριγλυκεριδίου είναι δυνατό να περιέχονται τρία μόρια του ίδιου λιπαρού οξέος, είτε και δύο ή τρία μόρια διαφορετικών λιπαρών οξέων, οι δυνατοί συνδυασμοί είναι πάρα πολλοί, και συνεπώς και τα είδη των τριγλυκεριδίων είναι πάρα πολλά. Από τα περίπου 50 λιπαρά οξέα που συμμετέχουν στη δομή των τριγλυκεριδίων, τα 16 είναι κορεσμένα, ενώ τα υπόλοιπα είναι ακόρεστα. Από την αναλογία των κορεσμένων και των ακόρεστων λιπαρών οξέων στο μόριο του τριγλυκεριδίου, καθορίζεται, κατά γενικό κανόνα, και η θερμοκρασία κατά την οποία η κατάσταση του μεταβάλλεται από στερεά σε υγρή. Έτσι, τα διάφορα τριγλυκερίδια μπορεί να είναι στερεά στη θερμοκρασία δωματίου και καλούνται λίπη, είτε να είναι υγρά και καλούνται έλαια. (Κυριτσάκης, 2007).

Εκτός από τα τριγλυκερίδια, το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά που προέρχονται από τον ελαιόκαρπο ή σχηματίζονται κατά την παραλαβή του.όπως:

- Ελεύθερα λιπαρά οξέα (προϊόντα υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων)
- Φωσφολιπίδια
- Στερόλες
- Φαινόλες
- Αλειφατικές αλκοόλες
- Χρωστικές
- Τοκοφερόλες

- Πτητικές οργανικές ενώσεις
- Διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες, κ.λ.π.

Τα συστατικά του ελαιολάδου, διακρίνονται σε σαπωνοποιήσιμα (τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κ.α) και ασαπωνοποίητα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α). Το 98,0-99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο ασαπωνοποίησιμα. Παρά το γεγονός ότι το ασαπωνοποίησιμο κλάσμα είναι ποσοτικά μικρό, τα συστατικά του διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό καθώς και βιολογικό ρόλο (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.1 Σύσταση ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα

Η σύσταση του ελαιολάδου καθώς και των άλλων φυτικών ελαίων σε λιπαρά οξέα δεν είναι σταθερή. Εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως:

- η ποικιλία της ελιάς,
- οι εδαφικές καθώς και κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής και
- ο βαθμός ωριμότητας του καρπού,

αλλά και διάφοροι άλλοι παράγοντες επηρεάζουν την σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα, όπως η προσβολή του καρπού από παράσιτα (δάκος) ή από μύκητες αλλά και από το χρόνο συγκομιδής του ελαιοκάρπου ή τους τρόπους συγκομιδής του ελαιοκάρπου και από τα μέσα μεταφοράς και αποθήκευσης του ελαιοκάρπου και τους τρόπους αποθήκευσης του ελαιοκάρπου και το χρόνο αποθήκευσης του ελαιοκάρπου, επίσης από το τύπο του ελαιουργείου και τις πρακτικές που εφαρμόζονται και τα χρησιμοποιούμενα υλικά και τα υλικά κατασκευής του ελαιουργείου, τέλος από την αποθήκευση και τη διατήρηση του ελαιολάδου. Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου είναι ακόρεστα. Μεταξύ αυτών σε μεγαλύτερη αναλογία απαντά το μονοακόρεστο ελαϊκό (C18:1), όπου (C) σημαίνει άνθρακας και (18) ότι έχει 18 άτομα άνθρακα και το (:1) ότι έχει ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Το δεύτερο σημαντικότερο ακόρεστο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το λινελαϊκό (C18:2). Άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα που απαντούν, στο ελαιόλαδο αλλά σε μικρές ποσότητες, είναι το λινολενικό (C18:3), το αραχιδονικό (C20:4) και το παλμιτελαϊκό (C16:1). Από τα

κορεσμένα οξέα αυτό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία είναι το παλμιτικό (C16:0) ακολουθεί το στεατικό (C18:0) Τα κύρια τριγλυκερίδια του ελαιολάδου είναι αυτά στα οποία απαντά το ελαϊκό οξύ, καθώς αποτελούν το 70-80% του βάρους του ελαίου. Επειδή τα τριγλυκερίδια αυτά είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, το ελαιόλαδο στο σύνολο του παραμένει σε υγρή κατάσταση στις συνήθεις θερμοκρασίες δωματίου. Εκτός από τα κύρια λιπαρά οξέα που προαναφέρθηκαν, στο ελαιόλαδο απαντούν σε ποσοστό μικρότερο όμως του 0,1%, μυριστικό οξύ (C14:0), λαουρικό οξύ (C12:0) και αραχιδικό οξύ (C20:0). Έχουν προσδιοριστεί σε ίχνη και οξέα με είκοσι τέσσερα άτομα άνθρακα (C24) (Κυριτσάκης, 2007). Η επιτροπή Codex Alimentarius (1970), καθιέρωσε για τα λίπη και τα έλαια τα παρακάτω όρια (ελάχιστα και μέγιστα) για τα βασικά λιπαρά οξέα του ελαιολάδου: ελαϊκό οξύ 56-83%, παλμιτικό οξύ 7-20% και λινελαϊκό οξύ 3-20%. Τα συνήθη όρια μέσα στα οποία κυμαίνεται η περιεκτικότητα του ελαιολάδου στα διάφορα λιπαρά οξέα δίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Διακύμανση της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα.

| Λιπαρά οξέα | Περιεκτικότητα % | Λιπαρά οξέα | Περιεκτικότητα % |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Ελαϊκό οξύ | 56,0 - 83,0 | Μυριστικό οξύ | ίχνη - 0,1 |
| Παλμιτικό οξύ | 7,5-20,0 | Αραχιδικό οξύ | ≤ 0,8 |
| Λινελαϊκό οξύ | 3,5-20,0 | Βεχενικό οξύ | ≤ 0,2 |
| Στεατικό οξύ | 0,5-5,0 | Λιγνοκερικό οξύ | ≤1,0 |
| Παλμιτελαϊκό οξύ | 0,3-3,5 | Εκαεπτανοϊκό οξύ | ≤ 0,5 |
| Λινολενικό οξύ | ίχνη - 1,5 | Εκαεπτενείκό οξύ | ≤ 0,6 |

(Κυριτσάκης, 2007)

1.1.2 Φωσφολιπίδια του ελαιολάδου

Το παρθένο ελαιόλαδο είναι φτωχό σε φωσφολιπίδια. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από 35 έως 40 mg/kg. Η μεγαλύτερη ποσότητα των φωσφολιπιδίων προέρχεται από το πυρήνα του ελαιοκάρπου. Τα φωσφολιπίδια που απαντούν

στο ελαιόλαδο είναι κυρίως η λεκιθίνη καθώς και η κεφαλίνη. Το ελαϊκό οξύ είναι το κυριότερο από τα λιπαρά οξέα που συνθέτουν το μόριο των φωσφολιπιδίων του ελαιολάδου. (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.3 Ασαπwnοποίηση κλάσμα

Η ποσότητα και η σύσταση του κλάσματος των ασαπwnοποίητων συστατικών του ελαιολάδου εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τον τρόπο με τον οποίο έχει γίνει η παραλαβή του. Ελαιόλαδο λόγω χάρη το οποίο παραλαμβάνεται με την εφαρμογή της υδραυλικής πίεσης, έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ασαπwnοποίητα συστατικά σε σύγκριση με ελαιόλαδο το οποίο παραλαμβάνεται με εκχύλιση (Fedeli, 1993). Τα κυριότερα από τα συστατικά που περιέχονται στο ασαπwnοποίητο κλάσμα του παρθένου ελαιολάδου και του πυρηνελαίου δίνονται στον Πίνακα 2. Με βάση τον πίνακα τα δύο έλαια διαφέρουν ως προς την εκατοστιαία περιεκτικότητα του κλάσματος αυτού σε επί μέρους τάξεις ασαπwnοποίητων συστατικών.

Πίνακας 2 Σύσταση του κλάσματος των ασαπwnοποίητων συστατικών του παρθένου ελαιολάδου και του πυρηνελαίου (%).

| Τάξη ασαπwnοποίητων συστατικών | % περιεκτικότητα σε παρθένο ελαιόλαδο | % περιεκτικότητα σε πυρηνέλαιο |
|--|---------------------------------------|--------------------------------|
| Σκουαλένιο και άλλοι υδρογονάνθρακες | 30-50 | 12 |
| Στερόλες | 15 | 25 |
| Τριτερπενοειδείς αλκοόλες | 10 | 12 |
| Ανώτερες αλειφατικές αλκοόλες (λιπαρές αλκοόλες) | - | 16 |
| Καροτενοειδή, τοκοφερόλες και άλλα συστατικά | 25-45 | 35 |

(Κυριτσάκης, 2007)

Στον Πίνακα 3 δίνεται η περιεκτικότητα του παρθένου και του εξευγενισμένου ελαιολάδου σε μη γλυκεριδικά συστατικά. Η σύσταση των διαφόρων τάξεων ασαπwnοποίητων συστατικών π.χ. των στερολών και των τριτερπενοειδών αλκοολών χρησιμεύει στην εξακρίβωση της αυθεντικότητας του

ελαιολάδου (μέσο ελέγχου νοθείας). Είναι φανερό από τον ορισμό του ασαπωνοποίητου κλάσματος ότι όλες οι κατηγορίες μικροσυστατικών του ελαιολάδου δεν απομονώνονται με τα ασαπωνοποίητα συστατικά. Μέρος των γλυκεριδίων και των φωσφατιδίων σαπωνοποιείται. Επίσης οι πολικές φαινόλες οι οποίες είναι διαλυτές στο νερό, απομακρύνονται. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια μιας αναλυτικής εργασίας με ασαπωνοποίητο υλικό, πολύτιμες πληροφορίες χάνονται αφού σημαντικά συστατικά όπως οι στερόλες και οι λιπαρές αλκοόλες είναι παρούσες τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εστεροποιημένη μορφή. Ωστόσο, το ασαπωνοποίητο κλάσμα είναι ένα καθιερωμένο ποιοτικό κριτήριο, και συχνά χρησιμοποιείται σε ρουτίνες ανάλυσης γιατί δίνει το συνολικό ποσό των πιο σημαντικών μη γλυκεριδικών συστατικών όπως οι στερόλες, οι υδρογονάνθρακες, οι λιπαρές αλκοόλες και οι χρωστικές. Η ποσοτικοποίηση των ασαπωνοποίητων εξαρτάται από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Για αυτό και όταν παρουσιάζονται αποτελέσματα θα πρέπει να αναφέρεται ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε. (Κυριτσάκης, 2007).

Πίνακας 3 Περιεκτικότητα του παρθένου και του εξευγενισμένου ελαιολάδου σε μη γλυκεριδικά συστατικά.

| Μη γλυκεριδικά συστατικά | Παρθένο ελαιόλαδο (mg/kg) | Εξευγενισμένο ελαιόλαδο (mg/kg) |
|---|---------------------------|---------------------------------|
| Υδρογονάνθρακες | 3800 | 390 |
| Τοκοφερόλες | 150 | 100 |
| Φαινόλες | 350 | 80 |
| Πτητικοί εστέρες | 100 | 30 |
| Πτητικές καρβονυλικές ενώσεις (αλδεΐδες και κετόνες) | 40 | 10 |
| Αλειφατικές αλκοόλες | 200 | 100 |
| Τριτερπτενοειδείς αλκοόλες και τριτερπενικές διαλκοόλες | 3500 | 2500 |
| Στερόλες | 500 | 1500 |

(Κυριτσάκης, 2007)

1.1.4 Βασικότερες τάξεις ασαπωνοποιήτων συστατικών του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο έχει θεωρηθεί υπεύθυνο για τη μείωση της χοληστερόλης πλάσματος, με αποτέλεσμα τη μείωση της θνησιμότητας σε ασθενείς με καρδιαγγειακά νοσήματα. Υπεύθυνες ουσίες του ελαιολάδου για τα πλεονεκτήματα υγείας που αποδίδει φαίνεται να είναι τα μικροσυστατικά αυτού όπως φαινολικές ενώσεις, τριτερπενικά οξέα, τοκοφερόλες, σκουαλένιο (πρόδρομη ένωση των στερολών) και καροτενοειδή, τα οποία είναι γνωστά αντιοξειδωτικά. (Trichopoulos et al., 2005).

1.1.5 Υδρογονάνθρακες

Δύο υδρογονάνθρακες είναι παρόντες σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο, το σκουαλένιο και το β-καροτένιο (το τελευταίο αναπτύσσεται στην παράγραφο των χρωστικών). Το σκουαλένιο είναι η πρόδρομη ένωση στη βιοσύνθεση των στερολών. Πρόκειται για πολυακόρεστο υδρογονάνθρακα με τριάντα άτομα άνθρακα. Είναι το συστατικό με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ασαπωνοποιήτο κλάσμα (έως 40% κατά βάρος). (Κυριτσάκης, 2007).

Πίνακας 4 Περιεκτικότητα διαφόρων λιπαρών υλών σε σκουαλένιο

| Λιπαρή ύλη | Αριθμός δειγμάτων | Σκουαλένιο (mg/100g ελαίου) |
|-----------------------|-------------------|-----------------------------|
| Παρθένο ελαιόλαδο | 44 | 136-708 |
| Βαμβακέλαιο | 12 | 4-12 |
| Αραβοσιτέλαιο | 9 | 19-36 |
| Αραχιδέλαιο | 11 | 13-49 |
| Ηλιέλαιο | 3 | 8-19 |
| Σογιέλαιο | 9 | 7-17 |
| Σησαμέλαιο | 1 | 3 |
| Αμυγδαλέλαιο | 1 | 21 |
| Βούτυρο | 1 | 7 |
| Λίπος όρνιθας | 1 | 4 |
| Χοίρειο λίπος (λαρδί) | 1 | 3 |
| Βόειο λίπος (στέαρ) | 1 | 10 |

(Κυριτσάκης, 2007)

Στο ελαιόλαδο έχουν ταυτοποιηθεί και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, όπως το πυρένιο, το φλουορανθένιο, το χρυσένιο, κ.α. Οι

υδρογονάνθρακες αυτοί δεν είναι ωστόσο φυσικά συστατικά του ελαιολάδου, αλλά προσμίξεις που η παρουσία τους οφείλεται κατά κύριο λόγο στη ρύπανση του περιβάλλοντος. Άλλοι υδρογονάνθρακες παρόντες στο ελαιόλαδο είναι οι παραφίνες, από C11 έως C30. Όσον αφορά στη συγκέντρωση των αρωματικών πολυκυκλικών υδρογονανθράκων υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις στη βιβλιογραφία. Οι ποσότητες που αναφέρονται μπορεί να ποικίλουν από μικρότερο του ρρb και έως 700 ρρb. Αυτές οι διαφορές προφανώς οφείλονται στις αναλυτικές δυσκολίες που υπάρχουν στις διάφορες τεχνικές που εφαρμόζονται για την προετοιμασία των δειγμάτων και επίσης στην έλλειψη μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό της ωριμότητας των ελιών από διάφορες ζώνες παραγωγής. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες συνήθως παρατίθενται στη βιβλιογραφία ως κανονικά συστατικά του κλάσματος των υδρογονανθράκων, αλλά όπως δηλώνει ο Tiscornia αυτά τα συστατικά είναι περισσότερο «επιμολυντές» παρά μεταβολίτες (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.6 Τριτερπενικά οξέα

Τα τριτερπενικά οξέα ανήκουν στην ομάδα των τερπενίων με τρία μόρια ισοπρενίου. Στην ίδια ομάδα ανήκουν οι φυτοστερόλες, το σκουαλένιο και τα καροτενοειδή. Τριτερπενικά οξέα έχουν βρεθεί σε διάφορα τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως ελαιόλαδο, όσπρια, βότανα, κ.ά. Αυτά που συνήθως βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι τρία. Κυρίως στο ολεανολικό οξύ έχει αποδοθεί η οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου (Boskou 2007). Έχει φανεί ότι επηρεάζονται περισσότερο από την οξύτητα του ελαιολάδου, παρά από την ποικιλία της ελιάς, την ωριμότητα και τη μέθοδο εκχύλισής του (Pérez-Camino & Cert 1999). Σύμφωνα με τους Kalogeropoulos et al. (2010), στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες δράσεις των τριτερπενικών οξέων, όπως αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντί-HIV, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντί-υπερλιπιδαιμική (Angeh et al. 2007; Siqueira et al. 2007; Yu et al. 2006). Το σκουαλένιο ανήκει στα τερπένια και είναι πρόδρομη ουσία των στερολών, οι οποίες περιέχονται στο ελαιόλαδο. Οι τελευταίες έχει βρεθεί ότι ασκούν προστατευτική δράση στην οξείδωση της LDL πρωτεΐνης. Το σκουαλένιο έχει βρεθεί άφθονο σε συκώτι καρχαρία, καθώς επίσης σε φυτικής προέλευσης έλαια και κυρίως στο ελαιόλαδο. Βρέθηκε ότι ασκεί αντιοξειδωτική δράση και προστασία από τον καρκίνο και γενικά

θεωρείται μαζί με το προφίλ των λιπαρών οξέων και το φαινολικό περιεχόμενο, συνυπεύθυνο για τα πλεονεκτήματα υγείας που αποδίδονται στο ελαιόλαδο (Amarowitz, 2009; Andrikopoulos, et al., 2002; Boskou, 2007b; Smith, 2000). Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε σκουαλένιο εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία της ελιάς, αλλά και τον τρόπο εκχύλισης του ελαιολάδου (Nenadis & Tsimidou 2002).

1.1.7 Καροτενοειδή

Άλλη μια κατηγορία ουσιών που ανήκει στα τερπένια είναι τα καροτενοειδή. Το β-καροτένιο ή προβιταμίνη Α, αποτελείται από μια πολυενική αλυσίδα με εννιά trans-(E) διπλούς δεσμούς, στα άκρα της οποίας συνδέονται δύο β-ιονονικοϊδακτύλιοι. Πολυμερή του β-καροτένιου είναι το α-καροτένιο και το λυκοπένιο. Είναι μια χρωστική του ελαιολάδου που του παρέχει και αυτή προστασία από την οξειδωση, ενώ η κατανάλωσή του έχει βρεθεί ότι παρέχει προστασία και από μορφές καρκίνου (Cooper, Eldrige, and Peters 1999). Τα κύρια καροτενοειδή που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι η λουτεΐνη, το β-καροτένιο, η βιολαξανθίνη και οι νεοξανθίνη. Η λουτεΐνη προς το τέλος της περιόδου συλλογής γίνεται το κυρίαρχο συστατικό στις ελιές γιατί κατά την διάρκεια της ωρίμανσης, λαμβάνει χώρα μια σημαντική μείωση των χλωροφυλλών. Τα ολικά καροτενοειδή συνήθως κυμαίνονται μεταξύ 1 και 20 ppm στο ελαιόλαδο. Το β-καροτένιο απαντάται σε ποσότητες από 0,5 ppm ως 4 ppm. (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.8 Χρωστικές

Το παρθένο ελαιόλαδο έχει χρώμα το οποίο κυμαίνεται από πρασινοκίτρινο ως χρυσαφί ανάλογα με την ποικιλία και το βαθμό ωριμότητας της ελιάς. Η σύνθεση και η ολική περιεκτικότητα των χρωστικών που εκ φύσεως υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι παράμετροι ποιότητας διότι σχετίζονται με το χρώμα το οποίο είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό αξιολόγησης της ποιότητας του ελαιολάδου. Οι χρωστικές σχετίζονται επίσης με τους μηχανισμούς της αυτοοξειδωσης και της φωτοοξειδωσης. Οι χλωροφύλλες α και β, και οι φαιοφυτίνες α και β είναι υπεύθυνες για το χρώμα. Η περιεκτικότητά τους στο φυσικό ελαιόλαδο ποικίλει μεταξύ 1 ppm και 20 ppm. Η φαιοφυτίνη α κυριαρχεί και η συγκέντρωσή της φτάνει στο 70-80% των ολικών χρωστικών. Αν τα λάδια έχουν παραχθεί από μαύρες

ελιές η φαιοφυτίνη α είναι πρακτικά η μόνη χρωστική από αυτήν την κατηγορία που θα υπάρχει. Η χλωροφύλλη β διαφέρει ως προς την α στο ότι έχει αλδεϋδική ομάδα (CHO) αντί μεθύλιο (CH₃) στο τρίτο άτομο άνθρακα. Η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλες εξαρτάται ως ένα βαθμό από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του λαδιού. Η απευθείας φυγοκέντριση παράγει λάδια τα οποία είναι 20-40% πλουσιότερα σε χλωροφύλλες συγκριτικά με αυτά από πίεση. Το στάδιο ωριμότητας είναι επίσης σημαντικό για τη συγκέντρωση της χλωροφύλλης στο λάδι. Στα πρώτα στάδια συλλογής της ελιάς, οι χλωροφύλλες κυριαρχούν. Στο τέλος της περιόδου συλλογής (Ιανουάριος, Φεβρουάριος), η συγκέντρωσή τους μειώνεται σε λίγα ppm και οι ξανθοφύλλες παρότι επίσης μειώνονται, γίνονται τα κύρια συστατικά των χρωστικών του ελαιολάδου. Η βιομηχανική διαδικασία εξαγωγής έχει μια επιπλέον επίδραση στις χρωστικές. Οι δύο τύποι καταστρέφονται μερικώς, αλλά η αποδόμηση των χλωροφυλλών είναι μεγαλύτερη από ότι των καροτενοειδών. (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.9 Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι τάξη οργανικών χημικών ενώσεων, οι οποίες είναι απαραίτητες για την κανονική αύξηση και διατήρηση ενός ζωντανού οργανισμού, ο οποίος δεν είναι σε θέση να τις συνθέσει μόνος του. Η ανεπαρκής παρουσία των βιταμινών στον οργανισμό προκαλεί ορισμένες ασθένειες, που είναι γνωστές ως αβιταμινώσεις. Η βιταμίνη E απαντά στο ελαιόλαδο, όπως και σε όλες σχεδόν τις φυσικές λιπαρές ύλες. Στο ελαιόλαδο απαντά επίσης και η προβιταμίνη A (β-καροτένιο) (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.10 Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι σημαντικά συστατικά του ελαιολάδου. Πρόκειται για ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Συνεισφέρουν στη σταθερότητα του ελαιολάδου. Τα διαιτητικά πλεονεκτήματα του ελαιολάδου πηγάζουν μερικώς από τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του και μερικώς από την παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών. Σήμερα όλοι οι ειδικοί συμφωνούν ότι η έμμεση ζημιά που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες στον ανθρώπινο οργανισμό σχετίζεται με κυτταρικές και έξωκυτταρικές αλλαγές, οι οποίες συμβαίνουν με τον καιρό κατά τη διαδικασία της γήρανσης είτε σε χρόνιες ασθένειες αλλά και κατά τη στεφανιαία

νόσο. Αναφορές έχουν επίσης γίνει για τα πλεονεκτήματα της βιταμίνης E και στους εξακριβωμένους πλέον παράγοντες οι οποίοι μειώνουν τους κινδύνους της στεφανιαίας (π.χ διακοπή του καπνίσματος, έλεγχος του βάρους, χαμηλότερη κατανάλωση κεκορεσμένων λιπαρών και χοληστερόλης, σωματική άσκηση, κτλ). Από τις επί μέρους ομόλογες τοκοφερόλες οι οποίες έχουν βρεθεί στο ελαιόλαδο η α- τοκοφερόλη αποτελεί την κύρια και καλύπτει 88,5% του συνόλου. Η β- μαζί με τη γ- τοκοφερόλη αποτελούν το 9,9% και η δ- τοκοφερόλη το 1,6% του συνόλου των τοκοφερολών (Fedeli, 1993). Η συνολική συγκέντρωση των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο ποικίλει. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε α- τοκοφερόλη κυμαίνεται από 12-150 mg/kg. Όλες οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά των ελαίων καθώς παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Η σταθερότητα μάλιστα του ελαιολάδου στην οξείδωση οφείλεται και στην παρουσία των τοκοφερολών οι οποίες οξειδώνονται εύκολα. Οι τοκοφερόλες α- και γ- σε ελαιόλαδα διαφορετικών κατηγοριών και σε πυρηνέλαια βρήκαν σημαντική διαφοροποίηση στην περιεκτικότητα μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών. Κατά τον εξευγενισμό του ελαιολάδου παρατηρούνται απώλειες ως και 50% στα επίπεδα της α- τοκοφερόλης (Κυριτσάκης, 2007). Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε τοκοφερόλες εξαρτάται πάρα πολύ από την ποικιλία. Οι συγκεντρώσεις τους είναι της τάξεως από 5 ppm ως 300 ppm. Συνηθισμένες τιμές που έχουν αναφερθεί για καλής ποιότητας λάδια κυμαίνονται μεταξύ 100 ppm και 300 ppm, Τιμές χαμηλές όπως 5 ppm έχουν αναφερθεί σε εμπορικά λάδια υψηλής οξύτητας (Andrikorou et al, 2002). Η συγκέντρωση σε τοκοφερόλες είναι υψηλότερη αν οι ελιές συλλεχθούν κατά την πρώτη περίοδο της συγκομιδής (Fedeli, 1993). Προς το τέλος της περιόδου συγκομιδής οι τοκοφερόλες είναι σημαντικά μειωμένες. Η βιοσύνθεση των τοκοφερολών συνεχίζεται και μετά τη συγκομιδή. Το λάδι που παράγεται από ελιές οι οποίες αλέστηκαν αμέσως μετά τη συγκομιδή, μπορεί να έχει μια πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες συγκριτικά με ελαιόλαδο που παράχθηκε από τις ίδιες ελιές οι οποίες όμως αποθηκεύτηκαν για 10 με 15 μέρες πριν την άλεση. Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες αποτελούν μορφές της βιταμίνης E. Η πλέον δραστική μορφή βιταμίνης E στο σώμα μας είναι η α-τοκοφερόλη. Τοκοφερόλες που έχουν βρεθεί στο ελαιόλαδο είναι οι α-, β-, γ- και δ- τοκοφερόλες, με την α- να αποτελεί το 90% αυτών. Έχουν αντιοξειδωτική δράση με εντονότερη τη δ-, μετά τη γ-, τη β- και ασθενέστερη την α- τοκοφερόλη και είναι από τα αποτελεσματικότερα αντιοξειδωτικά στη λιπιδική φάση και ιδιαίτερα στις βιομεμβράνες. Επίσης έχουν

βιταμινική δράση με αντίστροφη δραστικότητα, που σημαίνει ότι η α- είναι δραστικότερη των β-, γ- και τέλος δ- τοκοφερόλης (Boskou D. 2007; Chiou et al. 2009). Η θερμοκρασία και το φως δρουν ανασταλτικά για τις τοκοφερόλες. Η δράση τους βασίζεται στη δέσμευση ελεύθερων ριζών και την αυτοξειδωσή τους ώστε να προστατευθούν τα λιπαρά οξέα και οι λιποπρωτεΐνες από την οξειδωση (Chiou et al. 2012; Harwood et al. 2002). Παρόλα αυτά δεν βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο ελαιόλαδο.

1.1.11 Στερόλες

Οι στερόλες είναι σημαντικά μη γλυκεριδικά συστατικά. Σχετίζονται με την ποιότητα του ελαιολάδου και χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο της αυθεντικότητας του. Πρόκειται για κυκλικές αλκοόλες μεγάλου μοριακού βάρους. Βρίσκονται σε όλες τις φυσικές λιπαρές ύλες είτε ελεύθερες είτε δεσμευμένες με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα. Είναι διαλυτές στα λίπη, στα έλαια και στους μη πολικούς διαλύτες και αδιάλυτες στο νερό. Αποτελούν την κύρια τάξη των ασαπυνοποιήτων συστατικών των λιπαρών υλών, όταν δεν είναι δεσμευμένες.

Στο ελαιόλαδο υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες στερολών: οι κοινές στερόλες (απομεθυλοστερόλες), οι 4α-μέθυλοστερόλες, οι 4,4-διμέθυλοστερόλες (τριτερπενικές αλκοόλες) και οι τριτερπενικές διαλκοόλες. (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.11.1 Κοινές στερόλες (απομεθυλοστερόλες)

Μέσω αέριου χρωματογράφου αναλύθηκε το κλάσμα των στερολών του ελαιολάδου. Η ανάλυση έδειξε ότι εκτός από τις κύριες στερόλες (καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη, β-σιποστερόλη και 5-αβεναστερόλη) βρέθηκαν σε ίχνη 7-αβεναστερόλη και ορισμένες άλλες στερόλες. Είναι γεγονός ότι η β-σιποστερόλη αποτελεί σχεδόν το σύνολο του στερολικού κλάσματος των ελαιολάδων. Η συνολική περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε στερόλες κυμαίνεται από 180 έως 265 mg/100g (Κυριτσάκης, 2007). Στη διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιολάδου αυξάνεται ο βαθμός οξειδωσης με παράλληλη μείωση της περιεκτικότητας του σε στερόλες. Η συγκέντρωση της σιποστερόλης, της καμπεστερόλης και της στιγμαστερόλης στο ελαιόλαδο είναι ανεξάρτητη από την οξύτητα και τα άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Η εξακρίβωση της σύστασης του στερολικού

κλάσματος μπορεί να βοηθήσει στη διαπίστωση πιθανής νοθείας του ελαιολάδου με άλλα φυτικά έλαια. Υψηλή συγκέντρωση στιγμαστερόλης στο ελαιόλαδο υποδηλώνει την παρουσία σογιέλαιου. (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.11.2 4α-Μεθυλοστερόλες

Από το ελαιόλαδο καθώς και από άλλα φυτικά έλαια έχει απομονωθεί ένα κλάσμα τα συστατικά του οποίου εμφανίζουν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), πολικότητα ανάλογη αυτής των στερολών. Στο κλάσμα αυτό απαντούν τέσσερις τουλάχιστον 4α-μεθυλοστερόλες, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν κατόπιν διαχωρισμού τους με αέριο χρωματογραφία και ταυτοποίησής τους με φασματογράφο μάζας (Gas chromatography/Mass Spectrometry). (Κυριτσάκης, 2007).

Πρόκειται για τις:

4α-μεθυλο-24-μεθυλενο-.7-χοληστενο-3β-όλη

4α, 14α-διμεθυλο-9,19-κυκλοπροπανο-24-μεθυλενο-χοληστενο-3β όλη

4α,14α-διμεθυλο-24-μεθυλενο-.8χοληστενο-3β-όλη και

4α-μεθυλ-(24Z)-24-αιθυλιδενο-.7-χοληστενο-3β-όλη.

1.1.11.3 Τριτερπενικές διαλκοόλες

Οι δύο κύριες τριτερπενικές διαλκοόλες του ελαιολάδου είναι η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη. Απόλυτες ποσότητες ερυθροδιόλης και ουβαόλης κυμαίνονται από 1-20mg/100g στο ελαιόλαδο και μπορεί να είναι ως και 280mg/100g στο πυρηνέλαιο. Οι τριτερπενικές διαλκοόλες μπορεί να εξαχθούν και να χρωματογραφηθούν μαζί με το κλάσμα των 4-δυσμεθυλοστερολών. Η σχετική τους περιεκτικότητα στο ολικό κλάσμα όπως καθορίζεται από την αέριαχρωματογραφία χρησιμοποιείται ως μια αξιόπιστη μέθοδος για το διαχωρισμό του ελαιολάδου από το πυρηνέλαιο (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.11.4 4,4- ιμεθυλοστερόλες (τριτερπενικές αλκοόλες)

Οι τριτερπενικές αλκοόλες που απαντούν στο ελαιόλαδο είναι η α- και η β-αμυρίνη και ορισμένες άλλες τριτερπενικές αλκοόλες. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από 100 έως 150mg/100g ελαιολάδου (Κυριτσάκης, 2007).

1.1.12 Πολυφαινόλες

Πολυφαινόλες είναι οι ουσίες που περιέχουν τουλάχιστον ένα βενζολικό δακτύλιο με τουλάχιστον ένα υδροξύλιο. Σύμφωνα με το Σφλώμο (2011) οι πολυφαινόλες που βρίσκονται σε φυτικά προϊόντα λέγονται βιοφαινόλες. Είναι σχετικά πολικές ενώσεις, δυσδιάλυτες στα λίπη, με έντονη αντιοξειδωτική δράση. Περιέχονται κυρίως στη σάρκα του ελαιόκαρπου, και από εκεί περνούν μερικώς στο ελαιόλαδο κατά την ελαιοποίηση. Ανάλογα με τις καλλιεργητικές μεθόδους, τις εδαφικές και κλιματικές συνθήκες, τις τεχνικές μεταφοράς και αποθήκευσης υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στα ποσά των πολυφαινολών του καρπού. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος φαίνεται να επιδρά θετικά στη δημιουργία πολυφαινολών στην ελιά (Boskou, 2009; Salvador et al., 2003; Gimeno et al., 2002). Αντίστοιχα και το είδος και οι συνθήκες του ελαιοτριβείου επηρεάζουν την ποσότητα ολικών πολυφαινολών στο παραγόμενο ελαιόλαδο. Τα ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν λιγότερο ή καθόλου νερό (διφασικά) για το διαχωρισμό του ελαίου, φαίνεται ότι παράγουν έλαια με μεγαλύτερο πολυφαινολικό περιεχόμενο. Σημαντικές φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, και σε μικρότερες ποσότητες το καφεϊκό, το γαλλικό, το βανιλικό, το πρωτοκατεχικό οξύ, κ.ά. Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη, παρέχουν ισχυρή αντιοξειδωτική προστασία στο ελαιόλαδο, μετρημένη και με τη μέθοδο της δέσμευσης της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH), (Visioli et al., 2004). Η προέλευσή τους φαίνεται να είναι η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης (Gómez-Alonso et al., 2003). Στην πλειονότητα των ελαιολάδων ευρίσκεται η τυροσόλη, ενώ η υδροξυτυροσόλη είναι παρούσα στα ελαιόλαδα με μεγάλη περιεκτικότητα ολικών πολυφαινολών, περισσότερο από 200 mg / kg (Tsimidou et al., 1992). Η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί ότι ασκεί προστατευτική δράση επί του καρδιαγγειακού συστήματος περιορίζοντας την αθηροσκλήρωση,

την οξειδωση της LDL και των ερυθροκυττάρων, (González-Santiago et al. 2006; González-Santiago, Fonollá, and Lopez-Huertas 2010; Manna et al. 1999; Wiseman et al. 1996). Επίσης βρέθηκε ότι προστατεύει το DNA από το οξειδωτικό stress που οδηγεί στην απόπτωση (Cells et al. 2008).

Η πλέον σημαντική πολυφαινόλη του ελαιολάδου είναι η υδροξυτυροσόλη, που έχει φανεί ότι επιδρά θετικά στην υγεία των ανθρώπων (Cells et al. 2008; Manna et al. 1999; Zoidou et al. 2010). Ως προϊόν υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης, η υδροξυτυροσόλη έχει αποτελέσει ένδειξη ωρίμανσης του καρπού της ελιάς στην ποικιλία Gemlik, ενώ σε άλλες που μελετήθηκαν όχι (Bonoli et al. 2004). Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι η τόσο σημαντική για την ανθρώπινη υγεία υδροξυτυροσόλη, αυξομειώνεται ανάλογα με τα στάδια ωρίμανσης του καρπού και ανάλογα την ποικιλία ελιάς. Από τη βιβλιογραφία, είναι γνωστό ότι η αντιοξειδωτική δράση του ελαιολάδου αποδίδεται κυρίως στην υδροξυτυροσόλη ως την πιο δραστική βιοφαινόλη του ελαιολάδου, τις τοκοφερόλες, τα τερπενικά οξέα, το σκουαλένιο καθώς και τις συνολικές πολυφαινόλες (Manna et al. 1999; El Riachy et al. 2011).

Το εξευγενισμένο ελαιόλαδο δεν περιέχει πολυφαινόλες γιατί οι τελευταίες είναι πολικά συστατικά και απομακρύνονται πλήρως από το νερό κατά τον εξευγενισμό. Τα φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στο ελαιόλαδο και στις μαργαρίνες είναι διαφορετικά από αυτά των ελιών. Οι τελευταίες περιέχουν κυρίως γλυκοζίτες όπως ελευροπαΐνη, φερβασκοσίδη, λουτεολίνη και ρουτίνη. (Κυριτσάκης 2007).

2 Κριτήρια ποιότητας και κατηγορίες ελαιολάδου

Τα βασικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας του ελαιολάδου είναι:

- Η οξύτητα,
- η οξείδωση,
- το χρώμα και
- τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (άρωμα, γεύση).

Καθένα από τα παραπάνω ποιοτικά κριτήρια αξιολογεί κάτι το διαφορετικό (π.χ υδρόλυση, οξείδωση, κλπ), γι' αυτό το λόγο πρέπει όλα να λαμβάνονται υπόψη για τη σωστή αξιολόγηση του ελαιολάδου. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται τόσο από τη σύσταση του ελαιολάδου όταν αυτό βρίσκεται ακόμα στον ελαιόκαρπο, καθώς και από τις διάφορες αλλοιώσεις τις οποίες υφίσταται στα στάδια που μεσολαβούν από το σχηματισμό του στον καρπό μέχρι την κατανάλωση. (Κυριτσάκης, 2007).

2.1 Οξύτητα

Η οξύτητα αποτελεί το βασικότερο κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης του ελαιολάδου. Με βάση την οξύτητα, το ελαιόλαδο διακρίνεται σε φαγώσιμο ή βιομηχανικό και ανάλογα διαμορφώνεται και η τιμή του και η εμπορευσιμότητα του. Η οξύτητα του ελαιολάδου εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την ποιοτική κατάσταση του ελαιοκάρπου από τον οποίο προέρχεται και μεταβάλλεται πολύ λίγο μετά την παραλαβή του απ' αυτόν. Μικρή αύξηση της οξύτητας του ελαιολάδου, μετά την παραλαβή του από τον ελαιόκαρπο, οφείλεται κυρίως στην παρουσία υδρολυτικών ενζύμων και υγρασίας στο ίζημα (μούργα), που συγκεντρώνεται στον πυθμένα των δοχείων αποθήκευσης και διατήρησης. (Κυριτσάκης, 2007).

2.2 Οξείδωση

Η οξείδωση αποτελεί κριτήριο ελέγχου της ποιοτικής κατάστασης του ελαιολάδου και γενικότερα των λιπαρών υλών. Ο προσδιορισμός της γίνεται

κυρίως με τον υπολογισμό των υπεροξειδίων, τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες φάσμα και με ορισμένες άλλες τεχνικές. (Κυριτσάκης, 2007).

2.2.1 Αριθμός υπεροξειδίων

Ο προσδιορισμός του αριθμού των υπεροξειδίων, αποτελεί βασικό κριτήριο ελέγχου του βαθμού οξειδωσης του ελαιολάδου. Για το παρθένο ελαιόλαδο, θα πρέπει αυτός ο αριθμός να είναι μικρότερος ή ίσος του 20 όριο το οποίο έχει καθιερώσει το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) καθώς και η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε),

2.2.2 Απορρόφηση στο υπεριώδες φάσμα

Ο προσδιορισμός της απορρόφησης του ελαιολάδου στο υπεριώδες φάσμα χρησιμοποιείται κατά κανόνα, για τον έλεγχο της ποιοτικής του κατάστασης και ειδικότερα για τον προσδιορισμό του βαθμού της οξειδωτικής του αλλοίωσης. Η μέτρηση γίνεται σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους, σε διαφορετικά μήκη κύματος 232 nm και 270 nm. Στα 232 nm απορροφούν το μέγιστο τα πρωτογενή προϊόντα της οξειδωσης (συζυγή υπεροξειδία), ενώ στα 270 nm απορροφούν το μέγιστο τα δευτερογενή προϊόντα της οξειδωσης (αλδεΐδες, κετόνες). Ο προσδιορισμός των σταθερών K232 και K270 μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον έλεγχο της νοθείας του ελαιολάδου με ραφινρισμένο ελαιόλαδο ή σπορέλαια, τα οποία υποβάλλονται υποχρεωτικά στη διεργασία του ραφινρισματος γιατί στα 232 και στα 270 nm απορροφούν επίσης και τα συζυγή διένια και τριένια τα οποία προκύπτουν κατά το ραφινάρισμα (εξευγενισμό). Όταν οι τιμές των σταθερών K232 και K270 είναι υψηλές και εκτός των επιθυμητών ορίων υπάρχει περίπτωση να έχουμε νοθεία του ελαιολάδου με ραφινρισμένα ελαιόλαδα. Επομένως, αν γίνει παράλληλα και ο προσδιορισμός του βαθμού οξειδωσης με τη μέθοδο των υπεροξειδίων είναι δυνατόν να καταλήξουμε σε συμπέρασμα αν οι υψηλές τιμές K232 και K270 που βρέθηκαν οφείλονται σε οξειδωση ή σε νοθεία. Μία καλύτερη εικόνα της ποιοτικής κατάστασης του ελαιολάδου δίνει ο προσδιορισμός των απορροφήσεων σε μήκη κύματος 262 nm, 268 nm και στα 274 nm, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$K = K268 - (K262 + K274) / 2$$

2.3 Χρώμα

Το χρώμα του ελαιολάδου αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη ποιότητας. Αποτελεί βασικό παράγοντα μιας οργανοληπτικής εξέτασης. Συνήθως διαφέρει από ελαιόλαδο σε ελαιόλαδο και αρκετές φορές επηρεάζει τις τελικές επιλογές του καταναλωτικού κοινού. Το είδος των χρωστικών ουσιών, οι οποίες επικρατούν στον ελαιόκαρπο κατά το στάδιο της συγκομιδής, καθορίζει βασικά το χρώμα του ελαιολάδου, το οποίο παραλαμβάνεται. Το χρώμα του ελαιολάδου είναι πράσινο στην αρχή της περιόδου συγκομιδής, όταν ο ελαιόκαρπος είναι ακόμη άγουρος και επικρατούν οι χλωροφύλλες. Με την πάροδο του χρόνου κατά την ωρίμανση του ελαιοκάρπου, το ελαιόλαδο παίρνει ένα κίτρινο προς χρυσαφί χρώμα επειδή υπάρχουν περισσότερες καροτίνες. Τελικά πλέον υπερώριμος ελαιόκαρπος δίνει ελαιόλαδο με έντονα φαιό χρώμα. (Κυριτσάκης, 2007).

2.4 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των χαρακτηριστικών (άρωμα και γεύση) του ελαιολάδου αποτελεί το βασικότερο κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης. Η οργανοληπτική αξιολόγηση γίνεται από ειδικευμένα άτομα, δοκιμαστές και προτιμάται να γίνεται σε κατάλληλα διαμορφωμένους χώρους. Στη μέθοδο όμως υπεισέρχεται και το υποκειμενικό στοιχείο του δοκιμαστή κάτι που, οπωσδήποτε, αποτελεί βασικό μειονέκτημα. Με κριτήριο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, διαφοροποιήθηκε το ελαιόλαδο στα εξής κατηγορίες:

Αγουρέλαιο: Προέρχεται από άγουρο ελαιόκαρπο και έχουν χαρακτηριστική πικρή γεύση.

Πικρό ελαιόλαδο: Παραλαμβάνεται από ελαιόκαρπο, ο οποίος περιέχει μεγάλες ποσότητες φύλλων.

Φρουτώδες: Έχει τη γεύση φρέσκου καλής ποιότητας και φυσιολογικά ώριμου ελαιοκάρπου.

Ελαιόλαδο με καλή γεύση: Όλα τα ελαιόλαδα με τη χαρακτηριστική διακριτική γεύση, χωρίς την παρουσία δυσάρεστων οσμών.

Ελαττωματικό: Ελαιόλαδο το οποίο παρουσιάζει γεύση και οσμή μούχλας, χωματίλας, ταγγάδας, κ.λ.π.

Ας σημειωθεί ότι τα αγουρέλαια αποτελούν μία σημαντική κατηγορία ελαιολάδων που θα πρέπει να προτιμώνται γιατί έχουν ευνοϊκή επίδραση στην υγεία.

2.5 Κατηγορίες ελαιολάδου και πυρηνελαίου καθορισμένες από το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) και την Ευρωπαϊκή ένωση (Ε.Ε)

Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) καθώς και η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε), με αποφάσεις τους που βασίζονται σε ορισμένα κριτήρια και χαρακτηριστικά, κατατάσσουν το ελαιόλαδο σε διάφορες κατηγορίες. Σύμφωνα με τους πιο πρόσφατους κανονισμούς, διακρίνονται οι εξής κατηγορίες ελαιολάδου και πυρηνελαίου:

2.5.1 Παρθένο ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο, το οποίο παραλαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικά ή φυσικά μέσα και κατά την παραλαβή του εφαρμόζονται συνθήκες, κυρίως θερμικές, οι οποίες δεν προκαλούν αλλοιώσεις στην ποιότητα του. Το ελαιόλαδο της συγκεκριμένης κατηγορίας δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία παρά μόνο πλύση, μετάγγιση, φυγοκέντριση και διήθηση. Στην κατηγορία αυτή δεν περιλαμβάνονται τα εστεροποιημένα ελαιόλαδα, μείγματα άλλων λαδιών, ούτε αυτά τα οποία εκχυλίζονται με διαλύτη. (Κυριτσάκης, 2007).

Το παρθένο ελαιόλαδο περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες:

2.5.2 Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει το 0,8%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε meqO_2/kg ελαίου είναι ≤ 20 , η σταθερά $K_{270} \leq 0,22$ και η σταθερά $\Delta K \leq 0,01$ συν τον υπολοίπων

χαρακτηριστικών που πρέπει να είναι εντός ορίων του κανονισμού (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.3 Παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 2%. Ο αριθμός υπεροξειδίων και η τιμή K καθορίζονται όπως του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, ενώ η τιμή K270 ορίζεται στα 0,25 συν των υπολοίπων χαρακτηριστικών που πρέπει να είναι εντός ορίων του κανονισμού (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.4 Ελαιόλαδο λαμπάντε

Παρθένο ελαιόλαδο με οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, που υπερβαίνει το 2%. Το ελαιόλαδο λαμπάντε είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως έχει και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση. (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.5 Ραφιναρισμένο ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο, το οποίο παραλαμβάνεται έπειτα από ραφινάρισμα παρθένων ελαιολάδων και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,3g /100g ελαιολάδου. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mgO₂/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 5, η σταθερά K270 μικρότερη ή ίση με 1,1 και η σταθερά K μικρότερη ή ίση με 0,16 συν των υπολοίπων χαρακτηριστικών που πρέπει να είναι εντός ορίων του κανονισμού. (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.6 Ελαιόλαδο ή γνήσιο ελαιόλαδο ή αγνό ή κουπέ

Έλαιο το οποίο προκύπτει έπειτα από ανάμιξη εξευγενισμένου (ραφιναρισμένου) και παρθένου ελαιολάδου (εκτός από λαμπάντε) και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mgO₂/kg ελαίου είναι ≤ 15 , η σταθερά K270 $\leq 0,9$ και η σταθερά K $\leq 0,15$ συν των υπολοίπων χαρακτηριστικών που πρέπει να είναι εντός ορίων του κανονισμού. (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.7 Ακατέργαστο πυρηνέλαιο

Είναι το έλαιο το οποίο εξάγεται από τον ελαιοπυρήνα ως υποπροϊόν της ελαιουργίας, με τη χρησιμοποίηση διαλύτη. Το λάδι αυτό δεν μπορεί να καταναλωθεί όπως είναι και πρέπει να υποστεί την επεξεργασία του εξευγενισμού. (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.8 Ραφιναρισμένο πυρηνέλαιο

Έλαιο το οποίο λαμβάνεται από ραφινάρισμα του ακατέργαστου πυρηνελαίου του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 0,3%. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mgO₂/kg ελαίου είναι ≤ 10 , η σταθερά K270 ≤ 2 και η σταθερά K $\leq 0,2$. (Κυριτσάκης, 2007).

2.5.9 Πυρηνέλαιο

Το πυρηνέλαιο είναι λάδι που προέρχεται από την επεξεργασία του πυρήνα καθώς και της ψίχας της ελιάς. Τα ελαιοτριβεία δεν μπορούν να αφαιρέσουν το σύνολο του ελαιολάδου που περιέχει η ελιά, για αυτό ακολουθείται μία περαιτέρω επεξεργασία που ολοκληρώνει την απομάκρυνση του ελαιολάδου. Η ποιότητα του πυρηνελαίου διαφοροποιείται από τα σπορέλαια, διότι διατηρεί τα βασικά χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες του ελαιολάδου. Συγκεκριμένα, η χημική του σύσταση το καθιστά πιο ανθεκτικό στις υψηλές θερμοκρασίες τηγανίσματος σε σχέση με τα σπορέλαια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άφοβα για διαδοχικά τηγανίσματα. Επίσης, περιέχει υψηλά ποσοστά μονοακόρεστων υδρογονανθράκων του ελαιολάδου, τα οποία βοηθούν στη μείωση των γαστρικών υγρών καθώς και στη διευκόλυνση της πέψης. Στο πίνακα 5 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των διαφόρων κατηγοριών ελαιολάδου που μόλις προαναφέρθηκαν καθώς και διάφορα άλλα όρια άλλων χαρακτηριστικών π.χ κηρών. (Κυριτσάκης, 2007).

Πίνακας 5 Επιτρεπόμενα όρια διαφόρων χαρακτηριστικών σε διαφορετικές κατηγορίες ελαιολάδων.

| Κατηγορία ελαιολάδου | Οξύτητα (%) | Αριθμός υπεροξειδίων μεqO ₂ / kg λαδιού | Κήροι mg/kg | Αλογο-νομένοι διαλύτες | Κορεσμένα Οξέα στη θέση 2 του μορίου των τριγλυκεριδίων (%) | Στιγμα-σταδιένια (mg/kg) | Διαφορά μεταξύ της HPLC ανάλυσης και του θεωρητικού ECN 42 | K232 | K270 | K270 μετά το πέρασμα από αλουμίνα | ΔΚ | Οργανοληπτική αξιολόγηση. Μέση τιμή Ελατωμάτων (Md) | Οργανοληπτική αξιολόγηση. Μέση τιμή φρουτώδους (Mf) |
|------------------------------|-------------|--|-------------|------------------------|---|--------------------------|--|--------|--------|-----------------------------------|--------|---|---|
| Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο | ≤ 0,8 | ≤ 20 | ≤ 250 | ≤ 0,20 | ≤ 1,3 | ≤ 0,15 | ≤ 0,2 | ≤ 2,50 | ≤ 0,20 | ≤ 0,10 | ≤ 0,01 | Md = 0 | Mf>0 |
| Παρθένο ελαιόλαδο | ≤ 2,0 | ≤ 20 | ≤ 250 | ≤ 0,20 | ≤ 1,3 | ≤ 0,15 | ≤ 0,2 | ≤ 2,60 | ≤ 0,25 | ≤ 0,10 | ≤ 0,01 | Md ≤ 2,5 | Mf>0 |
| Κοινό παρθένο ελαιόλαδο | ≤ 3,3 | ≤ 20 | ≤ 250 | ≤ 0,20 | ≤ 1,3 | ≤ 0,15 | ≤ 0,2 | ≤ 2,60 | ≤ 0,25 | ≤ 0,10 | ≤ 0,01 | Md ≤ 6,0 | - |
| Παρθένο λαμπάντε ελαιόλαδο | > 3,3 | > 20 | ≤ 300 | > 0,20 | ≤ 1,3 | ≤ 0,50 | ≤ 0,3 | ≤ 3,70 | > 0,25 | ≤ 0,11 | - | Md > 6 | - |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------|------|-------|--------|-------|---|-------|--------|--------|---|--------|---|---|
| Ραφινარი- σμένο ελαιόλαδο | ≤ 0,5 | ≤ 5 | ≤ 350 | ≤ 0,20 | ≤ 1,5 | - | ≤ 0,3 | ≤ 3,40 | ≤ 1,20 | | ≤ 0,16 | - | - |
| Ελαιόλαδο | ≤ 1,5 | ≤ 15 | ≤ 350 | ≤ 0,20 | ≤ 1,5 | - | ≤ 0,3 | ≤ 3,30 | ≤ 1,00 | - | ≤ 0,13 | - | - |
| Ακατέργαστο πυρηνέλαιο | > 0,5 | - | > 350 | - | ≤ 1,8 | - | ≤ 0,6 | - | - | - | - | - | - |
| Ραφινარი- σμένο πυρηνέλαιο | ≤ 0,5 | ≤ 5 | > 350 | ≤ 0,20 | ≤ 2,0 | - | ≤ 0,5 | ≤ 2,50 | ≤ 2,50 | - | ≤ 0,25 | - | - |
| Πυρηνέλαιο | ≤ 1,5 | ≤ 15 | > 350 | ≤ 0,20 | ≤ 2,0 | - | ≤ 0,5 | ≤ 2,00 | ≤ 2,00 | - | ≤ 0,20 | - | - |

Σημείωση : Έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg χαρακτηρίζονται λαμπάντε σε περίπτωση που οι συνολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι μέχρι και 350 mg/kg ή το ποσοστό της ερυθροδιόλης και ουβαόλης είναι μέχρι 3,5. Έλαια με περιεκτικότητα σε κηρούς μεταξύ 300 και 350 mg/kg χαρακτηρίζονται ακατέργαστα πυρηνέλαια αν οι συνολικές αλειφατικές αλκοόλες είναι περισσότερες από 350 mg/kg και το ποσοστό της ερυθροδιόλης και της ουβαόλης είναι μεγαλύτερο του 3,5. Όταν πρόκειται για ανίχνευση παρουσίας ραφιναρισμένου ελαιολάδου, οπότε η τιμή του K232 ξεπερνά το όριο που του έχει τεθεί για την κατηγορία το ελαιόλαδο πρέπει να περνά από αλουμίνα και να προσδιορίζεται ξανά η τιμή. (Κυριτσάκης, 2007).

3 Έλεγχος νοθείας στο ελαιόλαδο

Το έξτρα παρθένο, βιολογικό ελαιόλαδο, είναι ένας θαυμάσιος φυσικός χυμός και υπερέχει από άλλα έλαια. Λαμβάνεται με φυσική πίεση του καρπού της ελιάς, εν αντιθέσει προς τα σπορέλαια που λαμβάνονται μετά από χημική επεξεργασία των σπόρων με διάφορους οργανικούς διαλύτες. Το έξτρα παρθένο, βιολογικό ελαιόλαδο είναι πιο εύπεπτο από τα σπορέλαια και αξιοποιείται καλύτερα από τον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι το μόνο που μπορεί να καταναλωθεί χωρίς καμία χημική κατεργασία. Σε σύγκριση με τα κοινά φυτικά έλαια, το κόστος του ελαιολάδου είναι υψηλότερο. (Κυριτσάκης, 2007).

Η επιθυμία του ανθρώπου για εύκολο κέρδος οδηγεί στη νοθεία. Η πρακτική αυτή, μπορεί να αποβεί σε αρκετές περιπτώσεις επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία. Νοθεία του ελαιολάδου από ασυνείδητους μεσάζοντες και εμπόρους εμφανιζόταν σε μεγάλη έκταση και στο παρελθόν και δυστυχώς η πρακτική αυτή θα συνεχισθεί αν οι αρμόδιοι δεν λάβουν αυστηρά μέτρα. Λόγω του ότι το ελαιόλαδο μοιάζει ως προς τα γενικά χαρακτηριστικά του με τα άλλα φυτικά έλαια είναι δυνατόν να γίνει νοθεία με προσθήκη μικρών ποσοτήτων άλλων ελαίων, χωρίς αυτή να μπορεί να γίνει αντιληπτή ούτε από τον καταναλωτή, αλλά ούτε και από εξειδικευμένα άτομα (Κυριτσάκης, 2007).

Παρακάτω αναφέρονται τα πιο συνηθισμένα μέσα νοθείας:

3.1 Πυρηνέλαιο

Το πυρηνέλαιο μετά το ραφινάρισμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λάδι φαγητού. Η ανάμειξη του με παρθένο ελαιόλαδο, δεν επιτρέπεται σε πολλές ελαιοπαραγωγικές χώρες και αν τυχόν γίνει θεωρείται νοθεία και διώκεται από τον νόμο. Το πυρηνέλαιο παρότι είναι λάδι κατά κύριο λόγο του μεσοκαρπίου της ελιάς μοιάζει περισσότερο με το σπορέλαιο γιατί εκχυλίζεται με τους ίδιους διαλύτες από τον ελαιοπυρήνα των ελαιούχων σπόρων. (Κυριτσάκης, 2007).

3.2 Ορυκτέλαιο

Το ορυκτέλαιο μπορεί να αναμιχθεί με το ελαιόλαδο και να αποτελέσει μέσο νοθείας του. Οι διάφοροι τύποι ορυκτελαίου είναι το παραφινέλαιο, τα λάδια αυτοκινήτου και γενικά των μηχανών εσωτερικής καύσης κ.τ.λ. Αυτά τα ορυκτέλαια δεν σαπωνοποιούνται με διαλύματα αλκαλίων και μεταφέρονται στα ασαπωνοποίητα συστατικά. Επί της συμπεριφοράς αυτής βασίζεται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους. Η ποιοτική ανίχνευση του ορυκτελαίου γίνεται με διάλυμα ΚΟΗ σε νερό και οινόπνευμα 96° (4% νερό κατ' όγκο) με τη σαπωνοποίηση του διαλύματος και την εμφάνιση έντονου θολώματος στο δείγμα. Σπορέλαια: Γίνεται με λάδια σπόρων τείου, σησαμέλαιο, βαμβακέλαιο, αραχιδέλαιο, κ.α (Κυριτσάκης, 2007).

3.3 Ιχθυέλαια

Περιέχουν σε αυξημένα ποσοστά, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με δύο, τρεις ή και περισσότερους δεσμούς. Τα οξέα αυτά σχηματίζουν με το βρώμιο, βρωμιοπαράγωγα, τα οποία καθιζάνουν και είναι μακροσκοπικά ορατά. (Κυριτσάκης, 2007).

3.4 Προσμίξεις με έλαια ξένων χωρών

Μπορεί οι προσμείξεις να είναι νόμιμες, όταν όμως στις ετικέτες δε γίνεται η αναγραφή, τότε η ενέργεια αυτή αποτελεί νοθεία του ελαιολάδου, με στόχο την εξαπάτηση του καταναλωτή και την αισχροκέρδεια από τις επιχειρήσεις. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5 Έλεγχος Νοθείας Ελαιολάδου

Ο πλέον σίγουρος και ίσως ο μοναδικός τρόπος για να διαπιστωθεί η νοθεία του ελαιολάδου είναι η χημική ανάλυση του. Στο παρελθόν για τον έλεγχο της γνησιότητας του ελαιολάδου χρησιμοποιούνταν τα κλασικά κριτήρια (προσδιορισμός φυσικών και χημικών σταθερών) σε συνδυασμό με τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες φώς (για τον υπολογισμό των ειδικών συντελεστών K232 και K270) και με την εφαρμογή ορισμένων άλλων μεθόδων

(Κυριτσάκης, 2007). Αυτές οι τεχνικές έχουν μελετηθεί από το διεθνές συμβούλιο ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) και αποτέλεσαν τη βάση για τις προτεινόμενες σύγχρονες τεχνικές και μεθόδους που έχουν καθιερωθεί τόσο από το Δ.Σ.Ε όσο και από την Ε.Ε για τον έλεγχο της νοθείας του ελαιολάδου. Η ανάλυση των ασαπωνοποιήτων συστατικών του ελαιολάδου (δηλαδή η διερεύνηση της σύστασης του κλάσματος των στερολών, των τοκοφερολών, των τριτερπενικών αλκοολών, κ.α) είναι πολύ χρήσιμη διότι αναδεικνύει τις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των φυτικών ελαίων (Κυριτσάκης, 2007).

Περιγραφή των βασικότερων τεχνικών και μεθόδων ελέγχου νοθείας του ελαιολάδου. Στη συνέχεια γίνεται περιγραφή των βασικότερων μεθόδων ελέγχου νοθείας του ελαιολάδου οι οποίες αποτελούν επίσημες μεθόδους του διεθνούς συμβουλίου ελαιολάδου (Δ.Σ.Ε) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε).

3.5.1 Δοκιμή Carocci – Buzzi

Η συγκεκριμένη δοκιμή, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της νοθείας του ελαιολάδου με πυρηνέλαιο, εξετάζοντας το σχηματισμό ή όχι νιφάδων στο δείγμα. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως θετικά ή αρνητικά ανάλογα με το αν θα σχηματιστούν νιφάδες ή όχι. Αν σχηματιστούν νιφάδες υπάρχει πυρηνέλαιο στο δείγμα που αναλύθηκε. Σε περίπτωση θολώματος χωρίς εμφάνιση νιφάδων δεν υπάρχει πυρηνέλαιο στο δείγμα. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.2 Δείκτης Bellier – Marcille

Ο δείκτης Bellier-Marcille δείχνει τη θερμοκρασία στην οποία αρχίζει η καθίζηση των αλάτων των λιπαρών οξέων του ελαίου. Ο συγκεκριμένος δείκτης δίνει μία ένδειξη για το «επίπεδο» των κορεσμένων λιπαρών οξέων μεγάλης αλυσίδας, τα οποία υπάρχουν στο έλαιο. Ο προσδιορισμός του δείκτη Bellier-Marcille έχει προταθεί από το Δ.Σ.Ε και προσδιορίζεται στο παρθένο και στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο, καθώς και στο εξευγενισμένο πυρηνέλαιο. Δείκτης Bellier-Marcille ορίζεται η θερμοκρασία (°C) στην οποία παρουσιάζεται εκ νέου το θόλωμα. Η θερμοκρασία δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 0,25° C, όταν η μέθοδος εφαρμόζεται εις διπλούν. Ο δείκτης για το παρθένο και το εξευγενισμένο ελαιόλαδο πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 17. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.3 Δοκιμή ανίχνευσης τσαγιελαίου

Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό κόκκινου προϊόντος όταν στο διάλυμα ελαιολάδου σε χλωροφόρμιο, προστεθεί μίγμα οξικού ανυδρίτη - θειικού οξέος. Βασίζεται στην αρχική μέθοδο του Fitelson όπως τροποποιήθηκε από τους Lieberman-Burchard. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.4 Ανίχνευση σπορελαίων με τη δοκιμή Bellier

Με τη δοκιμή αυτή ανιχνεύονται γενικά όλα τα σπορέλαια στο ελαιόλαδο. Το αντιδραστήριο Bellier αποτελείται από κορεσμένο εν ψυχρώ διάλυμα ρεζορκίνης σε βενζόλιο. Η ανατάραξη του μείγματος (αντιδραστήριο Bellier και πυκνό νιτρικό οξύ) διαρκεί 15 sec. Αν κατά τη διάρκεια ή πριν το τέλος της ανατάραξης εμφανιστεί ιώδες ή ερυθροιώδες χρώμα τότε στο ελαιόλαδο υπάρχει σπορέλαιο. Αν το χρώμα εμφανιστεί αργότερα, ο χρωματισμός αυτός δε λαμβάνεται υπόψη. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.5 Δείκτης Vizern-Gullot

Ο προσδιορισμός του δείκτη Vizern-Guillot έχει προταθεί από το Δ.Σ.Ε για τον έλεγχο της νοθείας του παρθένου και του εξευγενισμένου ελαιολάδου με ημιξηραινόμενα έλαια, δηλαδή με έλαια ο αριθμός ιωδίου των οποίων κυμαίνεται από 100 έως 150. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα περισσότερα σπορέλαια. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των ημιξηραιομένων ελαίων με το βρώμιο που οδηγεί στο σχηματισμό ιζήματος στους 0° C. Αν στο δείγμα υπάρχει ημιξηραινόμενο έλαιο σχηματίζεται ένα θρομβωμένο ίζημα, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από το ποσοστό της νοθείας και τη φύση του ελαίου που έχει χρησιμοποιηθεί για τη νοθεία. Σε περίπτωση που το μίγμα παραμένει διαυγές το ελαιόλαδο δεν είναι νοθευμένο. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.6 Αντίδραση πολυβρωμιδίων

Με την αντίδραση αυτή ανιχνεύεται στο ελαιόλαδο, η παρουσία λιπαρών υλών που περιέχουν λιπαρά οξέα με περισσότερους από δύο, μη συζυγείς διπλούς δεσμούς. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό ιζήματος λόγω της συγκράτησης βρωμίου στους διπλούς δεσμούς των οξέων αυτών. Το ίζημα αποτελούν πολυβρωμιωμένα παράγωγα τα οποία είναι αδιάλυτα σε διαιθυλαιθέρα. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.7 Προσδιορισμός στερολών

Στα έλαια απαντούν διάφορες στερόλες, όπως η καμπεστερόλη, η εργοστερόλη, η στιγμαστερόλη, η β-σιτοστερόλη και άλλες. Τα παρθένα ελαιόλαδα είναι κατά κανόνα πλούσια σε β-σιτοστερόλη. Τα επίπεδα της στερόλης αυτής στα εξευγενισμένα ελαιόλαδα είναι χαμηλότερα γιατί κατά τον εξευγενισμό και κυρίως στα στάδια της εξουδετέρωσης και του αποχρωματισμού καταστρέφεται μέρος των στερολών, ενώ στο στάδιο της απόσπησης ένα άλλο μέρος συναποσπάται με τα δύσσομα πτητικά συστατικά. Το Δ.Σ.Ε. (1995) πρότεινε τον προσδιορισμό των επί μέρους στερολών για τον έλεγχο της νοθείας (Κυριτσάκης, 2007).

Για τον προσδιορισμό των στερολών, το κλάσμα των ασαπωνοποιητών συστατικών του ελαιολάδου διέρχεται αρχικά μέσω αλουμίνας για την απομάκρυνση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια απομονώνεται το κλάσμα των στερολών με διαχωρισμό επάνω σε πλάκες TLC επιστρωμένες με Silica Gel G, και οι στερόλες μετατρέπονται σε τριμεθυλοσιλυλαιθερικά παράγωγα (TMS) τα οποία διαχωρίζονται αεριοχρωματογραφικά (Fedeli, 1993).

3.5.8 Προσδιορισμός σκουαλενίου

Η νοθεία του ελαιολάδου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας του σε σκουαλένιο. Στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο απαντούν και ισομερή του σκουαλενίου. Η παρουσία τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κριτήριο της προσθήκης εξευγενισμένου ελαιολάδου σε παρθένο ελαιόλαδο. Ο Κυριτσάκης, (2007)., προσδιόρισε τα προϊόντα που σχηματίζονται λόγω της απόσπησης νερού από το μόριο των στερολών (στεραδιένια) και τα προϊόντα ισομερίωσης του

σκουαλενίου, ως μέσο για την ανίχνευση νοθείας παρθένου με εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Αυτά τα συστατικά απομονώνονται με εφαρμογή υγρής χρωματογραφίας και ακολουθεί ανάλυση του κλάσματος σε αέριο χρωματογράφο που παραλαμβάνεται με χρήση τριχοειδούς στήλης που φέρει μέσης πολικότητας στατική φάση. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.9 Προσδιορισμός των κορεσμένων λιπαρών οξέων στη 2-θέση του μορίου των τριγλυκεριδίων

Η μέθοδος προσδιορισμού των κορεσμένων λιπαρών οξέων στη 2-θέση του μορίου των τριγλυκεριδίων έχει προταθεί από το Δ.Σ.Ε και την Ε.Ε (ΕΥ) (1991), ως μέθοδος ελέγχου της γνησιότητας του παρθένου ελαιολάδου. Το παλμιτικό και το στεατικό οξύ είναι τα κύρια κορεσμένα λιπαρά οξέα των τριγλυκεριδίων του ελαιολάδου και του πυρηνελαίου. Στεατικό οξύ δεν έχει βρεθεί στη θέση του μορίου των τριγλυκεριδίων του παρθένου ελαιολάδου, έχει όμως βρεθεί σε αυτή του μορίου των τριγλυκεριδίων του πυρηνελαίου σε αναλογία 0,2-0,3 % (στο σύνολο των λιπαρών οξέων που απαντούν στη 2-θέση). Γενικά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα και τα οξέα με περισσότερα από 20 άτομα άνθρακα απαντούν πολύ σπάνια στη 2-θέση του μορίου των τριγλυκεριδίων των διαφόρων ελαίων.

3.5.10 Προσδιορισμός κηρών

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από την απουσία κηρών με 40-46 άτομα άνθρακα. Οι κηροί βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο και στο πυρηνέλαιο. Ο προσδιορισμός των κηρών επιτρέπει τη διαφοροποίηση του πυρηνελαίου από το παρθένο ελαιόλαδο. Ο προσδιορισμός των κηρών καθώς και των ολικών αλειφατικών αλκοολών καθιστά εφικτή την ανίχνευση της νοθείας του ελαιολάδου με πυρηνέλαιο ΕΥ, (1991). Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή επιτροπή, ο προσδιορισμός των κηρών είναι πιο αποτελεσματικός σε σχέση με τον προσδιορισμό των αλειφατικών αλκοολών για τον έλεγχο της νοθείας του παρθένου ελαιολάδου (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.11 Προσδιορισμός ερυθροδιόλης

Σύμφωνα με το Δ.Σ.Ε (1995), το εκατονταπλάσιο του λόγου του αθροίσματος ερυθροδιόλης και ουβαόλης προς το σύνολο των στερολών (συμπεριλαμβανομένων και των δύο αυτών τριτερπενικών αλκοολών) σε κάθε κατηγορία ελαιολάδου, δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 4,5. Γενικά οι μέθοδοι προσδιορισμού της ερυθροδιόλης και των αλειφατικών αλκοολών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πυρηνελαίου στο ελαιόλαδο έχουν κάποια μειονεκτήματα και δυστυχώς δεν υπάρχει ακόμη αξιόπιστη μέθοδος για τη διαπίστωση της παρουσίας τους. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.12 Ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων για την εξακρίβωση της γνησιότητας του ελαιολάδου

Η συγκεκριμένη μέθοδος προϋποθέτει τη μετατροπή των λιπαρών οξέων στους μεθυλεστέρες τους που είναι πτητικοί (πολλά λιπαρά οξέα έχουν σημείο ζέσεως υψηλότερο από 400°C αλλά συχνά αποσυντίθενται σε χαμηλότερη θερμοκρασία). Τα τριγλυκερίδια έχουν επίσης υψηλό σημείο ζέσεως και ορισμένα διασπώνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αντίθετα οι μεθυλεστέρες έχουν σημαντικά χαμηλότερο σημείο ζέσεως οπότε εξαερώνονται χωρίς να διασπαστούν. Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από πολλούς ερευνητές για την ανίχνευση της παρουσίας σπορέλαιων στο ελαιόλαδο (νοθεία). Η ανίχνευση όμως της παρουσίας πυρηνελαίου στο ελαιόλαδο είναι δύσκολη γιατί η σύσταση των δύο αυτών ελαίων σε λιπαρά οξέα είναι παρόμοια. Ο λόγος που το ελαιόλαδο και το πυρηνέλαιο έχουν παρόμοια σύσταση σε λιπαρά οξέα οφείλεται στο ότι η πρώτη ύλη είναι κοινή, καθώς, κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου στο ελαιουργείο, η διαδικασία της άλεσης και της μάλαξης οδηγούν στην πλήρη ομογενοποίηση της σάρκας και του πυρήνα της ελιάς. Έτσι, το έλαιο που μένει στην ελαιοπυρήνα και παραλαμβάνεται στη συνέχεια με εκχύλιση έχει περίπου την ίδια σύσταση σε λιπαρά οξέα με το ελαιόλαδο. (Κυριτσάκης, 2007).

3.5.13 Προσδιορισμός των trans-ακόρεστων ή των trans ισομερών των ακόρεστων λιπαρών οξέων για την εξακρίβωση της γνησιότητας του ελαιολάδου.

Trans - ακόρεστα λιπαρά οξέα δεν υπάρχουν στο παρθένο ελαιόλαδο. Βρίσκονται στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο καθώς σχηματίζονται κυρίως στο στάδιο της απόσμησης, ιδίως όταν αυτή λαμβάνει χώρα σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Υπάρχουν πολλές τεχνικές προσδιορισμού των trans ακόρεστων λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο και τα άλλα έλαια. Οι κυριότερες από αυτές είναι η φασματομετρία υπερύθρου (IR), η αεριοχρωματογραφία (GC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). (Κυριτσάκης, 2007).

3.6 Προσδιορισμός βιοφαινολών με τη μέθοδο HPLC στο ελαιόλαδο

3.6.1 Σκοπός

Η μέθοδος αυτή περιγράφει μια διαδικασία για την εκχύλιση και την ποσοτικοποίηση μέσω της μεθόδου HPLC του μικροπολικών βιο-φαινολικών (BMP) ενώσεων στο ελαιόλαδο, όπως τα φυσικά και οξειδωμένα παράγωγα της ελευρωπαΐνης και της λιγστροσιδίνης, της λιγνάνης, τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα. Το φάσμα των μέτρησης είναι από 30 mg / kg έως 800 mg / kg τυροσόλης.(ΙΟOC, 2009)

3.6.2 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην άμεση εκχύλιση των μικροπολικών βιο-φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο με τη βοήθεια ενός διαλύματος μεθανόλης και μετέπειτα στην ποσοτικοποίηση με το HPLC με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή UV στα 280 nm. Το συριγγικό οξύ χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο. Το περιεχόμενο οξειδώνεται σε ελευρωπαΐνη και παράγωγα λιγστροσιδίνης, λιγνάνης, φλαβονοειδών και σε φαινολικά οξέα, τέλος εκφράζεται σε mg / kg της τυροσόλης. (ΙΟOC, 2009)

3.6.3 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Υψηλής απόδοσης υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης (HPLC), που είναι εξοπλισμένος με στήλη C18 ανάστροφης φάσης (4.6 mm χ 25 cm), τύπου Spherisorb ODS-2 5mm, 100 Å, με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή UV στα 280 nm και ολοκληρωτή σε θερμοκρασία δωματίου. Φασματικό κατεγγραφέα για σκοπούς αναγνώρισης όπου διευκολύνεται με τη χρήση ενός ανιχνευτή φωτοδιόδου με μια φασματική περιοχή από 200 nm έως 400 nm.
- Φιάλες, 10 ml και 100 ml, Κλάσης A
- Πιπέτες, 100 μl, 1000 μl και 5000 μl.
- Δοκιμαστικούς σωλήνες, με βιδωτό καπάκι, 10 ml.
- Αναδευτήρα για δοκιμαστικούς σωλήνες
- Λουτρό εκχύλισης με υπερήχους
- Φίλτρα σύριγγας Ø 13 mm, PVDF τύπου 0,45 μm.
- Φυγόκεντρος ικανή να λειτουργεί με ταχύτητα 5000 min⁻¹
- Ζυγός, ακρίβειας ± 0,001 g
- Πλαστικές σύριγγες, 5 ml.
- Συνήθης εξοπλισμός εργαστηρίου

(ΙΟΟC, 2009)

3.6.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι σε βαθμό καθαρότητας χρωματογραφίας HPLC.

- Φωσφορικό οξύ, 85% (v / v)
- Μεθανόλη βαθμού καθαρότητας χρωματογραφίας HPLC.
- Ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας χρωματογραφίας HPLC
- Νερό βαθμού καθαρότητας χρωματογραφίας HPLC
- Τριγωνική γραμμική διαβάθμιση έκλυσης: ύδωρ 0,2% H₃PO₄ (V / V) (A), μεθανόλη (B), ακετονιτρίλιο (C). Οι διαλύτες έκλυσης πρέπει να είναι απαερωμένοι. (ΙΟΟC, 2009)

Η βαθμιαία έκλυση θα πρέπει να εκτελείται ως εξής:

Πίνακας 6 Η βαθμιαία έκλυση

| Χρόνος ανά λεπτό | Ροή ml/λεπτό | A% | B% | C% |
|------------------|--------------|----|----|----|
| 0 | 1.00 | 96 | 2 | 2 |
| 40 | 1.00 | 50 | 25 | 25 |
| 45 | 1.00 | 40 | 30 | 30 |
| 60 | 1.00 | 0 | 50 | 50 |
| 70 | 1.00 | 0 | 50 | 50 |
| 72 | 1.00 | 96 | 2 | 2 |
| 82 | 1.00 | 96 | 2 | 2 |

- 2- (4 - υδροξυφαινυλο) αιθανόλη (τυροσόλη) 98%
- 3,5 διμεθοξυ 4- υδροξυ βενζοϊκό οξύ (συριγγικό οξύ) 97%
- διάλυμα εκχύλισης: μεθανόλη / νερό 80/20 (V / V).

Διάλυμα εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης (τυροσόλη και συριγγικό οξύ). Ζυγίζονται με ακρίβεια 0,030 g της τυροσόλης και 0,015 g του συριγγικού οξέος σε μια ογκομετρική φιάλη των 10 ml. Συμπληρώνεται ο όγκος με το διάλυμα μεθανόλης / νερού 80/20 (v/v) Μεταφέρονται 100 μl του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το διάλυμα μεθανόλης / νερού 80/20 (v / v) Οι συγκεντρώσεις του διαλύματος εξωτερικών προτύπων έχουν ως εξής : τυροσόλη 0,030 mg / ml, συριγγικό οξύ 0.015 mg / ml. Το διάλυμα είναι σταθερό για τρεις μήνες εάν διατηρείται στο ψυγείο στους +4° C (ΙΟΟC, 2009).

Παρασκευή του διαλύματος εσωτερικού προτύπου (συριγγικό οξύ). Ζυγίστε με ακρίβεια 0,015 g συριγγικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και συμπληρώνεται ο όγκος με το διάλυμα μεθανόλης / νερού 80/20 (v/v). Μεταφέρεται 1 ml του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Συμπληρώνεται ο όγκος με το διάλυμα μεθανόλης / νερού 80/20 (v/v). Η τελική συγκέντρωση είναι 0,015 mg/ml. Το διάλυμα είναι σταθερό για τρεις μήνες εάν διατηρείται στο ψυγείο στους +4° C. (ΙΟΟC, 2009).

3.6.5 Διαδικασία

3.6.5.1 Η προετοιμασία των δειγμάτων

Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό καπάκι των 10 ml ζυγίζονται με ακρίβεια 2,0 g του ελαιολάδου, και προστίθεται 1 ml του διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Σφραγίζεται ο σωλήνας με το βιδωτό καπάκι και ανακινείται για 30 δευτερόλεπτα ακριβώς. Προσθέστε 5 ml του διαλύματος της εκχύλισης μεθανόλης / νερού 80/20 (v/v). Ανακινήστε για 1 λεπτό ακριβώς. Εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρωση στις 5000 rpm για 25 λεπτά. Λήψη μικρής ποσότητας από την υπερκείμενο φάση και διήθηση σε πλαστικό φουσίγγιο των 5 ml, με φίλτρο PVDF 0,45 mm. (IOOC, 2009)

3.6.5.2 Ανάλυση στο HPLC

Ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο για τουλάχιστον 1 ώρα πριν από την ανάλυση.

Η στήλη χρωματογραφίας πρέπει να διατηρείται για τουλάχιστον 15 λεπτά με το διαλύτη έκλουσης

(Αρχική σύνθεση) (H_3PO_4 / μεθανόλη / ακετονιτρίλιο 96/2/2 (v/v/v))

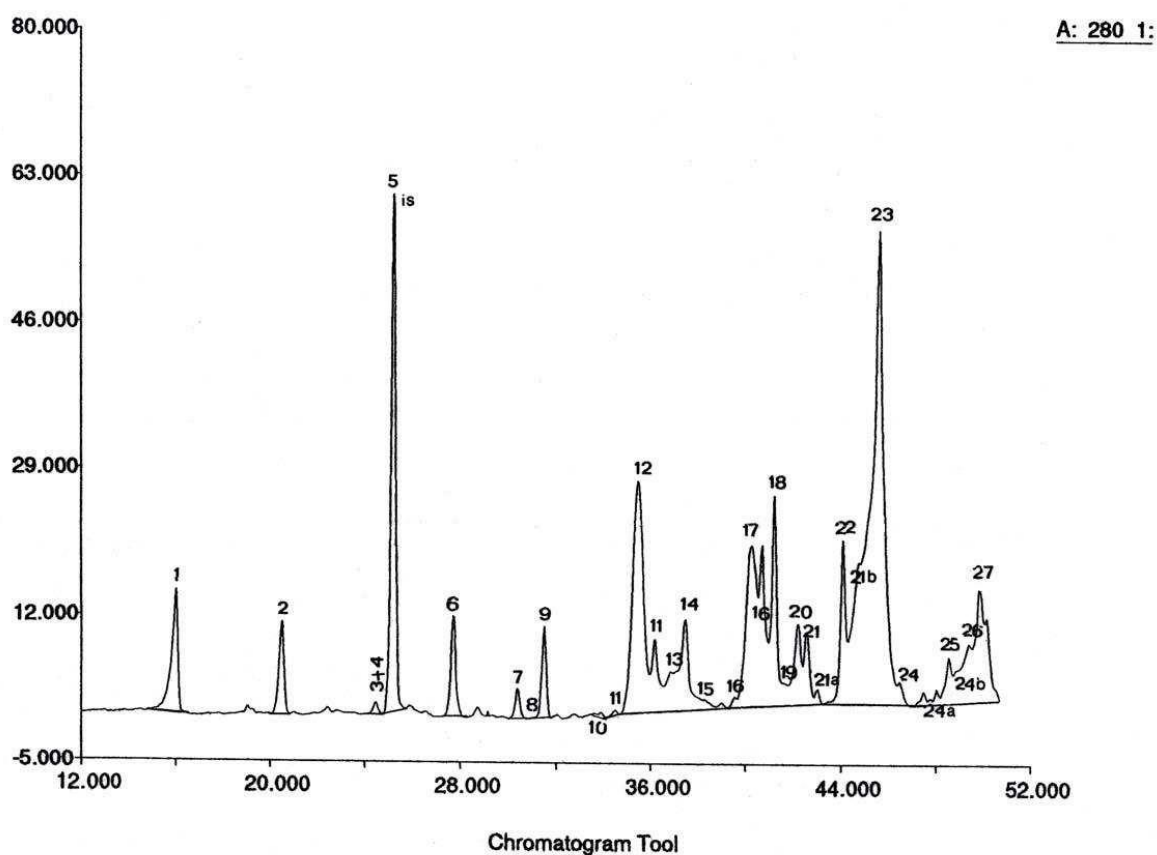
(Βαθμιαία έκλουση).

Μια τυφλή δοκιμή με έγχυση 20 μl μεθανόλης / νερού 80/20 (v/v) θα πρέπει να γίνεται με το να τρέξει μόνο το πρότυπο ώστε να εξακριβωθεί ότι δεν υπάρχει κάποια ουσία μέσα στο σύστημα. (IOOC, 2009)

Εγχέονται 20 μl διαλύματος βαθμονόμησης εξωτερικού προτύπου και καταγράφεται το χρωματογράφημα στα 280 nm Υπολογίζονται οι τιμές των συντελεστών απόκρισης (response factor) RF για 1 μg τυροσόλης και 1 μg συριγγικού οξέος.

Υπολογίζεται η αναλογία του συντελεστή απόκρισης του συριγγικού οξέος σε τυροσόλη, που ονομάζεται $RRF_{syr / Tyr}$. Σημειώνονται οι τιμές.

Εγχέονται 20 ml του τελικού διαλύματος του δείγματος στο σύστημα HPLC και καταγράφεται το χρωματογράφημα στα 280 nm. Εκτελούνται δύο ανεξάρτητοι προσδιορισμοί στο ίδιο δείγμα και επιβεβαιώνεται ότι τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός των ορίων ακρίβειας της μεθόδου. Στην εικόνα 1 δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα των βιοφαινολών σε ένα δείγμα έξτρα παρθένου ελαιολάδου όπου χαρακτηρίζεται από μεμονωμένο συστατικό. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το άθροισμα των εμβαδών των επιμέρους κορυφών για τον υπολογισμό της συνολικής περιεκτικότητας. Μετά την διαδικασία πρέπει να εγχέεται διάλυμα μεθανόλης / ακετονιτρίλιο 1/1 (v / v) διαμέσου της χρωματογραφικής στήλης με ρυθμό 1,0 ml / min επί τουλάχιστον 15 λεπτά και έπειτα να αποθηκεύεται η στήλη σε διάλυμα μεθανόλης / ακετονιτρίλιου 1/1 (V / V). (IOOC, 2009)



Εικόνα 1 HPLC χρωματογράφημα που καταγράφονται στα 280 nm το προφίλ των βιοφαινολών σε ένα έξτρα παρθένο ελαιόλαδο όπου : 1 υδροξυτυροσόλη, 2 τυροσόλη, 3 βανιλικό οξύ, 4 καφεϊνικό οξύ, 5 συριγγικό οξύ (εσωτερικό πρότυπο), 6 βανιλίνη, 7 παρα-κουμαρικό οξύ, 8 άλας υδροξυτυροσόλης, 9 φερουλικό οξύ, 10 όρθο-κουμαρικό οξύ, 11;11a αποκαρβοξυμεθυλομένη ελευρωπαΐνη άγλυκη, οξειδωμένη μορφή διαλδεΐδη, 12 αποκαρβοξυμεθυλομένη ελευρωπαΐνη άγλυκη, διαλδεΐδική μορφή, 13 ελευρωπαΐνη, 14 ελευρωπαΐνη άγλυκη, διαλδεΐδική μορφή, 15 άλας τυροσόλης, 16;16a αποκαρβοξυμεθυλομένη λιγστροσιδίνη άγλυκη, οξειδωμένη μορφή διαλδεΐδη, 17 αποκαρβοξυμεθυλομένη λιγστροσιδίνη άγλυκη, διαλδεΐδική μορφή, 18 πευκορητινόλη, 1 ακετοξυ-πευκορητινόλη, 19 κινναμωμικού οξέος, 20 λιγστροσιδίνη άγλυκη, διαλδεΐδική μορφή, 21;21a;21b ελευρωπαΐνη άγλυκη, οξειδωμένη αλδεΐδη και υδροξυλική μορφή, 22 λουτεολίνη, 23 ελευρωπαΐνη άγλυκη, αλδεΐδη και υδροξυλική μορφή, 24;24a;24b λιγστροσιδίνη άγλυκη, οξειδωμένη αλδεΐδη και

3.6.6 Έκφραση των αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός των συντελεστών απόκρισης, RF, των εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης :

RF 1 mg (συριγγικό οξύ) = Εμβαδόν κορυφής συριγγικού οξέος / mg συριγγικού οξέος στην ένεση.

RF 1 mg (τυροσόλη) = Εμβαδόν κορυφής τυροσόλης / mg τυροσόλης στην ένεση.

Υπολογισμός της αναλογίας μεταξύ των δύο συντελεστές απόκρισης (RRF) :

$RRF_{\text{sy}} / \text{Tyr} = RF_{1 \text{ mg (συριγγικού οξέος)}} / RF_{1 \text{ mg (τυροσόλης)}}$.

Η τιμή του $RRF_{\text{sy}} / \text{Tyr}$ θα πρέπει να είναι σταθερή και θα πρέπει να βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών $5,1 \pm 0,4$. Αυτό επιτρέπει το τελικό αποτέλεσμα να εκφράζεται ως τυροσόλη, χρησιμοποιώντας το συριγγικό οξύ ως το εσωτερικό πρότυπο.

Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε βιοφαινόλες στο παρθένο ελαιόλαδο : βιοφαινολικό περιεχόμενο (φυσικής και οξειδωμένης ελευρωπαΐνης και παράγωγα λιγστροσιδίνης, λιγνάνων, φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων), που εκφράζεται ως mg / kg τυροσόλης και υπολογίζεται με μέτρηση του αθροίσματος των εμβαδών των σχετικών χρωματογραφικών κορυφών (ταυτοποίηση στον Πίνακα 1) σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση, το αποτέλεσμα εκφράζεται χωρίς δεκαδικά ψηφία.

$$(\text{mg/kg}) = \frac{(\Sigma A) \times 1000 \frac{X_{RRF_{\text{sy}}}}{\text{tyr}} \times (W_{\text{sy.acid}})}{(A_{\text{sy.acid}}) \times (W)}$$

Όπου:

(ΣΑ) : άθροισμα των εμβαδών των κορυφών των βιοφαινόλων (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, φυσικής και οξειδωμένης ελευρωπαΐνης και παραγώγων λιγστροσιδίνων, λιγνάνων, φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων) που καταγράφηκαν στα 280 nm.

A syr. Acid: εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο, συριγγικό οξύ, που καταγράφηκε στα 280 nm

1000: για να εκφραστεί το αποτέλεσμα σε mg/kg.

W: βάρος σε γραμμάρια του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε

RRFsyr/tyr: συντελεστής πολλαπλασιασμού για την έκφραση των τελικών αποτελεσμάτων, ως τυροσόλη.

W syr. Acid: βάρος, σε mg, του συριγγικό οξύ που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο σε 1 ml του διαλύματος που προστίθεται στο δείγμα. (IOOC, 2009)

Πίνακας 7 Ταυτοποίηση των κορυφών βιοφαινόλες. Μέγιστη απορρόφηση (max ABS UV) αξίες και σχετικοί χρόνοι κατακράτησης (RRT) *

| Κορυφή | Βιοφαινόλες | RRT | Μέγιστη απορρόφηση UV σε nm |
|--------|---|------|-----------------------------|
| 1 | Υδροxyτυροσόλη | 0,62 | 230-280 |
| 2 | Τυροσόλη | 0,80 | 230-275 |
| 3 | Βανιλικό οξύ | 0,96 | 260 |
| 4 | Καφεϊνικό οξύ | 0,99 | 325 |
| 5 | Συριγγικό οξύ (εσωτερικό πρότυπο) | 1,00 | 280 |
| 6 | Βανιλίνη | 1,10 | 310 |
| 7 | Παρα-Κουμαρικό οξύ | 1,12 | 310 |
| 8 | Άλας υδροxyτυροσόλης | 1,20 | 232-285 |
| 9 | Φερουλικό οξύ | 1,26 | 325 |
| 10 | Όρθο-κουμαρικό οξύ | 1,31 | 325 |
| 11;11a | Αποκαρβοxyμεθυλομένη ελευρωπαΐνη άγλυκη, οξειδωμένη μορφή διαλδεΰδη | - | 235-280 |
| 12 | Αποκαρβοxyμεθυλομένη | 1,45 | 235-280 |

| | | | |
|------------|--|------|-------------|
| | ελευρωπαϊνή άγλυκη, διαλδεϋδική μορφή | | |
| 13 | Ελευρωπαϊνή | 1,48 | 230-280 |
| 14 | Ελευρωπαϊνή άγλυκη, διαλδεϋδική μορφή | 1,52 | 235-280 |
| 15 | Άλας τυροσόλης | 1,54 | 230-280 |
| 16;16a | Αποκαρβοξυμεθυλομένη λιγστροσιδίνη άγλυκη, οξειδωμένη μορφή διαλδεϋδη | 1,63 | 235-275 |
| 17 | Αποκαρβοξυμεθυλομένη λιγστροσιδίνη άγλυκη, διαλδεϋδική μορφή | 1,65 | 235-275 |
| 18 | Πευκορητινόλη, 1 ακετοξυ-πευκορητινόλη | 1,69 | 232-280 |
| 19 | Κινναμωμικού οξέος | 1,73 | 270 |
| 20 | Λιγστροσιδίνη άγλυκη, διαλδεϋδική μορφή | 1,74 | 235-275 |
| 21;21a;21b | Ελευρωπαϊνή άγλυκη, οξειδωμένη αλδεϋδη και υδροξυλική μορφή | - | 232-280 |
| 22 | Λουτεολίνη | 1,79 | 255-350 |
| 23 | Ελευρωπαϊνή άγλυκη, αλδεϋδη και υδροξυλική μορφή | 1,87 | 235-280 |
| 24;24a;24b | Λιγστροσιδίνη άγλυκη, οξειδωμένη αλδεϋδη και υδροξυλική μορφή | - | 235-275 |
| 23 | Απιγενίνη | 1,98 | 230-270-340 |
| 26 | Μεθυλ-λουτεολίνη | - | 255-350 |
| 27 | Λιγστροσιδίνη άγλυκη, αλδεϋδη και υδροξυλική μορφή | 2,03 | 235-275 |

(*) Ο σχετικός χρόνος συγκράτησης, RRT, υπολογίζεται σε σχέση με το χρόνο συγκράτησης του συριγγικού οξέος. Ταυτοποίηση εκτελείται με HPLC-MS.

Έκθεση αναφοράς

Η έκθεση αποτελεσμάτων πρέπει να διευκρινίζει τα ακόλουθα στοιχεία:

(Α) Τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

(Β) Τα αποτελέσματα της δοκιμής, εκφρασμένα σε mg / kg του ελαίου (χωρίς δεκαδικά ψηφία).

(Γ) Η τιμή του RRT που χρησιμοποιείται για τους υπολογισμούς.

(Δ) Κάθε απόκλιση από αυτή τη μέθοδο, γίνεται με συμφωνία μεταξύ των ενδιαφερομένων μερών ή για οποιοδήποτε άλλο λόγο.

(Ε) Τα στοιχεία ταυτότητας του εργαστηρίου, ημερομηνία κατά την οποία πραγματοποιήθηκε η δοκιμή και η υπογραφή του επόπτη ελέγχου. (ΙΟΟC, 2009)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αναλύσεις στο ελαιόλαδο έχουν στόχο να αναγνωρισθεί η αυθεντικότητα και η ποιότητα του γι' αυτό και το διεθνές συμβούλιο ελαιόλαδου έχει θεσπίσει ένα κανονισμό όπου κατηγοριοποιεί το ελαιόλαδο, ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αλλά και μέσω οργανοληπτικής αξιολόγησής του, σε κατηγορίες. Στον κανονισμό αυτό η παγκόσμια αγορά είναι υποχρεωμένη να συμμορφώνεται για να εμπορεύεται τυποποιημένο ελαιόλαδο. Αυτός ο κανονισμός όμως παρόλο που είναι τεκμηριωμένος με τις απαραίτητες αναλύσεις, έχει ακόμα κενά που κάποιοι τα γνωρίζουν και τα εκμεταλλεύονται με όφελος το κέρδος αντί της ποιότητας και της ασφάλειας του καταναλωτή. Έτσι το κενό έρχεται να συμπληρώσει ο προσδιορισμός των βιοφαινολών με τη προτεινόμενη μέθοδο αφού οι βιοφαινόλες είναι υπεύθυνες για τη γεύση και την αντοχή του ελαιολάδου στην οξείδωση, καθώς επίσης επηρεάζουν και τη διατροφική αξία του ελαιολάδου.

Στην παρούσα εργασία έγινε εμφανές ότι μπορεί να διαπιστωθεί μέσω του προσδιορισμού των βιοφαινολών στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο HPLC η νοθεία με εξευγενισμένο ελαιόλαδο καθώς όταν το ελαιόλαδο εξευγενίζεται χάνει μέρος των βιοφαινολών του και άρα αν νοθευτεί θα έχουμε μικρότερη συγκέντρωση σε αυτές.

Επίσης υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης της μεθόδου για να γίνει πιο σύντομη και να εξοικονομείται χρόνος και κατανάλωση διαλυτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amarowitz, R. 2009. "Squalene: A natural antioxidant?" *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 411–412.

Andrikopoulos, N.K., A.C. Kaliora, A.N. Assimopoulou, and V.P. Papageorgiou. 2002. "Inhibitory activity of minor polyphenolic and non-polyphenolic constituents of olive oil against the in vitro LDL oxidation." *Journal of Medicinal Food* 5: 1–7.

Angeh, J E, X Huang, I Sattler, G E Swan, H Dahse, A Härtl, and J N Eloff. 2007. "Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae)." *Journal of Ethnopharmacology* 110(1): 56–60.

Bonoli, Matteo, Alessandra Bendini, Lorenzo Cerretani, Giovanni Lercker, and Tullia Gallina Toschi. 2004. "Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(23): 7026–7032.

Boskou D. 2007. 97 *World review of nutrition and dietetics* 180–210 *Olive oil. Chemistry and Technology*. Second edi. ed. Boskou D. Thessaloniki, Greece: AOCS Press.

Boskou, D. 2009. *Olive Oil. Minor Constituents and Health*. London, New York: CRC Press.

Cells, Mononuclear, H L Cells, Roberto Fabiani, Patrizia Rosignoli, Angelo De Bartolomeo, Raffaella Fuccelli, Maurizio Servili, Gian Francesco Montedoro, and Guido Morozzi. 2008. "Oxidative DNA Damage Is Prevented by Extracts of Olive Oil , Hydroxytyrosol , and Other Olive Phenolic Compounds in Human Blood." *The Journal of Nutrition* (April): 1411–1416.

Chiou, Antonia, Nick Kalogeropoulos, George Boskou, and Fotini N. Salta. 2012. "Migration of health promoting microconstituents from frying vegetable oils to French fries." *Food Chemistry* 133(4): 1255–1263.

Codex Alimentarius (1970)

Cooper, D.A., A.L Eldrige, and J.C. Peters. 1999. "Dietary Carotenoids and Certain Cancers, Heart Disease, and Age-related Macular Degeneration: A Review of Recent Research." *Nutrition Reviews* 57: 201–214.

European Union (EU) Regulation No 2568/91 d.d July (1991) , Annex XVII. Determination of stigmastadienes in vegetable oils.

El Riachy, Milad, Feliciano Priego-Capote, Lorenzo León, Luis Rallo, and María Dolores Luque de Castro. 2011. "Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(6): 678–691.

Fedeli E, (1993). *Olive Oil Technology*.

Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M., De la Torre M.C., Lopez-Salbater M.C. 2002. "The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics , a-tocopherol , and b-carotene) in virgin olive oil." *Food Chemistry* 78: 207–211.

Gómez-Alonso, Sergio, Giuseppe Fregapane, M Desamparados Salvador, and Michael H Gordon. 2003. "Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3): 667–72.

González-Santiago, M, E Martín-Bautista, J J Carrero, J Fonollá, L Baró, M V Bartolomé, P Gil-Loyzaga, and E López-Huertas. 2006. "One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic

rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development." *Atherosclerosis* 188(1): 35–42.

González-Santiago, Maria, Juristo Fonollá, and Eduardo Lopez-Huertas. 2010. "Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins." *Pharmacological Research* 61(4): 364–370.

Harwood, John L, Parveen Yaqoob, United Kingdom, and Human Nutrition. 2002. "Nutritional and health aspects of olive oil." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 685–697.

International olive oil council (IOOC) (2009), Determination of biophenols in olive oils by hplc, COI/T.20/Doc No 29, Spain.

Kiosseoglou, B., Vlachopoulou, I. and Boskou, D.(1987). Esterified 4-monomethyl and 4,4dimethyl-sterols in some vegetable oils.

Manna, C, P Galletti, V Cucciolla, G Montedoro, and V Zappia. 1999. "Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10(3): 159–165.

Nenadis, Nikolaos, and Maria Tsimidou. 2002. "Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79(3): 257–259.

Pérez-Camino, M C, and A Cert. 1999. "Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4): 1558–1562.

Salvador, M.D., Aranda, F., , Gomez - Alonso S., Fregapane, G. 2003. "Influence of extraction system , production year and area on Cornicabra virgin olive oil : a study of five crop seasons." *Food Chemistry* 80: 359–366.

Siqueira, Jarbas Mota, Rodrigo Rebelo Peters, Andressa Córneo Gazola, Patrícia Baier Krepsky, Mareni Rocha Farias, Giles Alexander Rae, Artur José de Brum-Fernandes, and Rosa Maria Ribeiro-do-Valle. 2007. "Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn." *Life Sciences* 80(15): 1382–1387.

Smith, T J. 2000. "Squalene: Potential chemopreventive agent." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9: 1841–1848.

Trichopoulou, Antonia, Christina Bamia, and Dimitrios Trichopoulos. 2005. "Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece." *Archives of Internal Medicine* 165(8): 929–35.

Tsimidou M., Papadopoulos G. & Boskou D. 1992. "Phenolic compounds and stability of virgin olive oil--Part I." *Food Chemistry* 45: 141–144.

Visioli, F., P. Bogani, S. Grande, and C. Galli. 2004. "Olive oil and oxidative stress." *Grasas y Aceites* 55(1): 66–75.

Wiseman, S a, J N Mathot, N J de Fouw, and L B Tijburg. 1996. "Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits." *Atherosclerosis* 120(1-2): 15–23.

Yu, Donglei, Yojiro Sakurai, Chin-Ho Chen, Fang-Rong Chang, Li Huang, Yoshiki Kashiwada, and Kuo-Hsiung Lee. 2006. "Anti-AIDS agents 69. Moronic acid and other triterpene derivatives as novel potent anti-HIV agents." *Journal of Medicinal Chemistry* 49(18): 5462–5469.

Zoidou, Evagelia, Eleni Melliou, Evangelos Gikas, Anthony Tsarbopoulos, Prokopios Magiatis, and Alexios-Leandros Skaltsounis. 2010. "Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional rich source of oleuropein." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(1): 46–50.

Κυριτσάκης Κ. Α. (2007). Ελαιόλαδο, Συμβατικό και βιολογικό βρώσιμη, ελιά -
πάστα ελιάς, 4^η έκδοση. Αθήνα : Εκδόσεις Cory city, σελ 63-88,363-383,454-
458,539-594.

Μπαλατσούρας Γ.Δ (1997). Σύγχρονη ελαιοκομία (το ελαιόδενδρο – το ελαιόλαδο -
η επιτραπέζια ελιά) Τόμος II, Το ελαιόλαδο, Αθήνα, Σελ 53-420.

Σφλώμος Κ. (2011), Χημεία τροφίμων με στοιχεία διατροφής Τόμος I : Χημεία
τροφίμων, Β' έκδοση. Αθήνα : Εκδόσεις ΝΟΤΑ. Σελ 505