

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

Απομόνωση και προσδιορισμός σκουαλενίου σε ελληνικά μονοποικιλιακά  
εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα

**Χριστίνα-Παναγιώτα Η. Ζωντανού**

Επιβλέπων καθηγητής:

Μαλλούχος Αθανάσιος , Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα

2020

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

Απομόνωση και προσδιορισμός σκουαλενίου σε ελληνικά μονοποικιλιακά  
εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα

“Isolation and determination of Squalene in Greek monovarietal extra virgin olive oils”

**Χριστίνα-Παναγιώτα Η. Ζωντανού**

Εξεταστική Επιτροπή:

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Γαρδέλη Χρυσαιγή, Επίκουρη καθηγήτρια ΓΠΑ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής ΓΠΑ

## **Απομόνωση και προσδιορισμός σκουαλενίου σε ελληνικά μονοποικιλιακά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα**

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα υγιεινό και πολύ θρεπτικό συστατικό της διατροφής του ανθρώπου και οι ευεργετικές του ιδιότητες είναι ευρέως γνωστές. Οφείλονται κυρίως στη μοναδική του σύσταση σε λιπαρά οξέα, καθώς και σε πληθώρα βιοδραστικών ουσιών, που μπορεί να θεωρούνται ποσοτικά μικρότερης σημασίας, αλλά παρουσιάζουν πολύ σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η σύσταση του ελαιολάδου έχει αποτελέσει αντικείμενο πληθώρας μελετών και φαίνεται ότι από τους σημαντικότερους παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η ποικιλία του ελαιολάδου και η γεωγραφική του προέλευση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του σκουαλενίου σε δείγματα ελληνικών μονοποικιλιακών εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων και η διερεύνηση της επίδραση της ποικιλίας και της γεωγραφικής προέλευσης σε αυτήν. Αρχικώς, εφαρμόστηκε μια μέθοδος απομόνωσης και προσδιορισμού του σκουαλενίου μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του σκουαλενίου και ταυτόχρονα της σύστασης των λιπαρών οξέων μέσω Αέριας Χρωματογραφίας σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο του Διεθνούς Συμβουλίου του Ελαιολάδου (IOOC) και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ως προς τον προσδιορισμό του σκουαλενίου. Βρέθηκε ότι οι δύο μέθοδοι δεν διέφεραν στατιστικώς. Κατόπιν, τα δεδομένα της σύστασης των λιπαρών οξέων και της περιεκτικότητας σκουαλενίου υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία με μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης μέσω της πλατφόρμας *Metaboanalyst*.

Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε πως τα εγχώρια παρθένα ελαιόλαδα που μελετήθηκαν είχαν μέτρια περιεκτικότητα σκουαλενίου σε σχέση με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικη χαρακτηρίζονταν από σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σκουαλενίου σε σχέση με τα δείγματα των ποικιλιών Κολοβή και Αδραμυτιανή. Φαίνεται ακόμη ότι τα δείγματα που προέρχονταν από την περιοχή της Πελοποννήσου χαρακτηρίζονταν από σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σκουαλενίου σε σχέση με τα δείγματα που προέρχονται από τη Λέσβο, ωστόσο για τη διερεύνηση του παράγοντα της γεωγραφικής προέλευσης, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκαν και σε διαφορετικές ποικιλίες, γεγονός που πιθανόν να επηρέασε το αποτέλεσμα.

Η σύσταση των λιπαρών οξέων όλων των ελαιολάδων κυμάνθηκε στα ευρέως αποδεκτά όρια. Από τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής προέκυψε σαφής διαχωρισμός των ελαιολάδων με βάση τις ποικιλίες Κορωνέικη, Κολοβή και Αδραμυτιανή, γεγονός που υποδεικνύει τη σημαντικότητα της επίδρασης της ποικιλίας στη σύσταση των λιπαρών οξέων και του σκουαλενίου. Επιπλέον, ήταν ικανοποιητικός και ο διαχωρισμός των δειγμάτων με βάση τη γεωγραφική προέλευση (Πελοπόννησος, Λέσβος).

**Επιστημονική περιοχή:** Ανάλυση ελαιολάδου

**Λέξεις κλειδιά:** εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, σκουαλένιο, λιπαρά οξέα, ποικιλία ελιάς Κορωνέικη, ποικιλία ελιάς Κολοβή, ποικιλία ελιάς Αδραμυτιανή

## **Isolation and determination of Squalene in Greek monovarietal extra virgin olive oils**

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of Chemistry and Food Analysis

### **ABSTRACT**

Olive oil constitutes a healthy and nutritious compound of human nutrition and its beneficial properties are well-known. These are mainly due to the unique fatty acid composition and its content of various bioactive substances, which although may be considered quantitatively less important, they present some significant biological properties. The chemical composition of olive oil has been the subject of many studies and the olive variety and its geographical origin are some of the most important factors that affect it.

The aim of the present work was to determine the Squalene's content in Greek monovarietal extra virgin olive oils and also, to investigate the effect of the variety and geographical origin on it. At first, a method of isolation and determination of Squalene via Solid Phase Extraction (SPE) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was implemented. In addition, the simultaneous determination of Squalene content and composition of fatty acids was achieved via Gas Chromatography, according to the official method of International Olive Oil Council (IOOC) and the results from these two methods were compared for the determination of Squalene content. According to the results, the two methods didn't differ statistically. The data of fatty acids and squalene content were then statistically processed by multivariate analysis methods via "Metaboanalyst" online platform.

Considering the results, all olive oils studied were found to have relatively moderate Squalene content in comparison with other bibliography values. Moreover, "Koroneiki" samples were characterized by significantly higher Squalene content in comparison with "Kolovi" and "Adramitiani" samples. It was also found that samples from Peloponnese were characterized by significantly higher Squalene content in comparison with samples from Lesvos. However, the samples that were used to investigate the factor of geographical origin belonged to different olive varieties too, and this fact may have affected the result.

The fatty acid composition of all olive oils was within the widely accepted limits. According to the results of the multivariate analysis, there was a clear distinction of olive oils based on the Koroneiki, Kolovi and Adramitiani varieties, which indicates the significant effect of the variety on the fatty acid composition and Squalene content. Furthermore, the separation of olive oils based on the geographical origin (Peloponnese, Lesvos) was satisfactory.

**Scientific area:** Olive oil analysis

**Key words:** extra virgin olive oil, squalene, fatty acids, olive variety Koroneiki, olive variety Kolovi, olive variety Adramitiani

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, με τίτλο «Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου», στην κατεύθυνση «Χημεία Τροφίμων και Διατροφή», στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το εργαστηριακό μέρος της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Μαλλούχο Αθανάσιο, για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του, καθώς και για την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Θα ήθελα ακόμη να επισημάνω ότι με την ιδιαίτερη συμβολή του συνετέλεσε στην εξέλιξη του τρόπου σκέψης μου, με έφερε ένα βήμα πιο κοντά στην επιστήμη μας και γι' αυτό, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν να διαβάσουν και να αξιολογήσουν τη μελέτη μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη Μικρού Θεανώ, Διδάκτορα του Εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την αμέριστη βοήθειά της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τα αγαπημένα μου πρόσωπα που ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και με στήριξαν με κάθε δυνατό μέσο.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

## Πίνακας περιεχομένων

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΕΡΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....	2
1.1 Τα συστατικά του ελαιολάδου .....	2
1.2 Ποικιλίες ελιάς .....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΣΚΟΥΑΛΕΝΙΟ .....	6
2.1 Γενικά γνωρίσματα.....	6
2.2 Πηγές σκουαλενίου .....	7
2.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	7
2.4 Βιοδραστικότητα .....	8
2.5 Χημική σύνθεση σκουαλενίου .....	9
2.6 Ο ρόλος του σκουαλενίου στη σταθερότητα ελαιολάδου .....	9
2.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα σκουαλενίου στο ελαιόλαδο.....	10
2.7.1 Τεχνολογικοί παράγοντες.....	10
2.7.2 Ποικιλία ελιάς και γεωγραφική προέλευση.....	11
2.7.3 Στάδιο ωρίμανσης και περίοδος ελαιosuγκομιδής .....	11
2.7.4 Συνθήκες αποθήκευσης ελαιολάδου .....	12
2.8 Προσδιορισμός σκουαλενίου στο ελαιόλαδο .....	12
2.8.1 Προκατεργασία δειγμάτων .....	12
2.8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός σκουαλενίου .....	13
ΣΚΟΠΟΣ.....	14
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ .....	16
3.1 Δείγματα ελαιολάδων .....	16
3.2 Προσδιορισμός σκουαλενίου με Υγρή Χρωματογραφία .....	18
3.3 Προσδιορισμός σκουαλενίου και σύστασης λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία .....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
4.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού σκουαλενίου με HPLC.....	26
4.1.1 Περιεκτικότητα σκουαλενίου προσδιορισμένη με HPLC σε δείγματα ελληνικών ελαιολάδων .....	27
4.1.2 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων .....	29
4.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού σκουαλενίου με GC .....	33

4.2.1 Περιεκτικότητα σκουαλενίου προσδιορισμένη με GC σε δείγματα ελληνικών ελαιολάδων .....	35
<b>4.3 Σύγκριση μεθόδων .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Αποτελέσματα προσδιορισμού της %σύντασης των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων .</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων .....</b>	<b>39</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>52</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>54</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύντασης των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων από την ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία (GC) εκφρασμένα ως ποσοστά επί τις συνολικής ποσότητας των λιπαρών οξέων. ....</b>	<b>59</b>

## Ευρετήριο πινάκων, διαγραμμάτων και εικόνων

### Πίνακες

<b>Πίνακας 1:</b> Σύνταση λιπαρών οξέων ελαιολάδου προσδιορισμένη με αέρια χρωματογραφία(%m/m μεθυλεστέρες), Καν. 2568/91. <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	
<b>Πίνακας 2:</b> Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σκουαλενίου .....	8
<b>Πίνακας 3:</b> Δείγματα ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη .....	16
<b>Πίνακας 4:</b> Συνθήκες ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία .....	20
<b>Πίνακας 5:</b> Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας.....	23
<b>Πίνακας 6:</b> Περιεκτικότητα σκουαλενίου (mg/kg) στα δείγματα ελαιολάδου μετά από ανάλυση με HPLC. Τα δείγματα με μπλε χρώμα προέρχονται από την Πελοπόννησο ενώ τα πράσινα από τη Λέσβο.....	27
<b>Πίνακας 7:</b> Στατιστικά στοιχεία για τις ποικιλίες Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή .....	29
<b>Πίνακας 8:</b> LSD test. Το * σημαίνει πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.....	30
<b>Πίνακας 9:</b> Στατιστικά στοιχεία για τα ελαιόλαδα από την Πελοπόννησο και τη Λέσβο .....	31
<b>Πίνακας 10:</b> Στατιστικά στοιχεία των δειγμάτων των νομών Μεσσηνίας, Κορινθίας .....	31
<b>Πίνακας 11:</b> Περιεκτικότητα σκουαλενίου (mg/kg) στα δείγματα ελαιολάδου .....	35
<b>Πίνακας 12:</b> Στατιστικά στοιχεία ποικιλιών και προελεύσεων ως προς το σκουαλένιο (GC).....	36
<b>Πίνακας 13:</b> Μέση τιμή και τυπική απόκλιση λιπαρών οξέων κάθε ποικιλίας και γεωγραφικής προέλευσης .....	38
<b>Πίνακας 14:</b> Σύνταση λιπαρών οξέων εκφρασμένα ως % της συνολικής ποσότητας. Λιπαρά οξέα: μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0), παλμιτελαϊκό (C16:1), δεκαεπτανοϊκό (C17:0), cis-δεκαεπτενοϊκό (C17:1), στεατικό (C18:0), ελαϊκό (C18:1), λινελαϊκό (C18:2), λινολενικό (C18:3), αραχιδικό (C20:0), βεχενικό (C22:0), λιγνοκηρικό (C24:0).....	59

### Διαγράμματα

<b>Διάγραμμα 1:</b> Πρότυπη καμπύλη αναφοράς σκουαλενίου με HPLC.....	19
<b>Διάγραμμα 2:</b> Πρότυπη καμπύλη αναφοράς σκουαλενίου με GC .....	24
<b>Διάγραμμα 3:</b> Θηκογράμματα των ποικιλιών Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή.....	30
<b>Διάγραμμα 4:</b> Θηκογράμματα των ελαιολάδων που προέρχονται από την Πελοπόννησο(PEL) και τη Λέσβο(LES). .....	31
<b>Διάγραμμα 5:</b> Θηκογράμματα των νομών Μεσσηνίας, Κορινθίας, Λέσβου. ....	32

<b>Διάγραμμα 6:</b> Διάγραμμα του γραμμικού μοντέλου που εφαρμόστηκε .....	38
<b>Διάγραμμα 7:</b> (α) ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), (β) PCA biplot: δείχνει ποιες μεταβλητές επηρεάζουν τις κύριες συνιστώσες.....	41
<b>Διάγραμμα 8:</b> Γράφημα των κύριων συνιστωσών του μοντέλου PLS-DA. Τα δείγματα ελαιολάδων ταξινομήθηκαν ως προς την ποικιλία. ....	42
<b>Διάγραμμα 9:</b> Διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με τη μέθοδο LOOCV .....	42
<b>Διάγραμμα 10:</b> Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA.....	43
<b>Διάγραμμα 11:</b> Η σημαντικότητα της συμβολής των ουσιών στο διαχωρισμό των κλάσεων του μοντέλου PLS-DA.....	43
<b>Διάγραμμα 12:</b> Θερμικός χάρτης. Απεικονίζεται η μέση τιμή της σχετικής αφθονίας των συστατικών σε κάθε ποικιλία.....	45
<b>Διάγραμμα 13:</b> (α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), (β) PCA Biplot .....	46
<b>Διάγραμμα 14:</b> Γράφημα των κύριων συνιστωσών του μοντέλου PLS-DA. Τα δείγματα ελαιολάδων ταξινομήθηκαν ως προς τη γεωγραφική τους προέλευση. ....	47
<b>Διάγραμμα 15:</b> Διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με τη μέθοδο LOOCV .....	47
<b>Διάγραμμα 16:</b> Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA.....	48
<b>Διάγραμμα 17:</b> Σημαντικότητα συνεισφοράς κάθε ουσίας στο διαχωρισμό μεταξύ των γεωγραφικών προελεύσεων βάσει VIP scores .....	48
<b>Διάγραμμα 18:</b> Θερμικός χάρτης. Απεικονίζεται η μέση τιμή της σχετικής αφθονίας των συστατικών για κάθε περιοχή προέλευσης.....	50

## Εικόνες

<b>Εικόνα 1:</b> Ελιά “Κορωνέικη” .....	5
<b>Εικόνα 2:</b> “Ελιά Αδραμυτιανή” .....	5
<b>Εικόνα 3:</b> Ελιά “Κολοβή” .....	6
<b>Εικόνα 4:</b> Χημική δομή Σκουαλενίου .....	7
<b>Εικόνα 5:</b> Χημική σύνθεση Σκουαλενίου (Cornforth et al.,1959).....	9
<b>Εικόνα 6:</b> Χρωματογράφημα προτύπου δείγματος 250μg/mL .....	26
<b>Εικόνα 7:</b> Χρωματογράφημα του δείγματος KOL_LES_OO_26 .....	26
<b>Εικόνα 8:</b> Χρωματογράφημα του δείγματος KOR_MES_OO_26 .....	34
<b>Εικόνα 9:</b> Χρωματογράφημα GC δείγματος ελαιολάδου και προτύπου.....	36
<b>Εικόνα 10:</b> Χρωματογράφημα του δείγματος KOR_MES_OO_26.....	39
<b>Εικόνα 11:</b> Θηκογράμματα με την κανονικοποιημένη τιμή των λιπαρών οξέων και σκουαλενίου των ελαιολάδων των ποικιλιών Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή.....	45
<b>Εικόνα 12:</b> Θηκογράμματα με την κανονικοποιημένη τιμή των λιπαρών οξέων και σκουαλενίου των ελαιολάδων από την Πελοπόννησο και τη Λέσβο.....	50



# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Ελλάδα είναι μία από τις κορυφαίες χώρες παραγωγής ελαιόλαδου και κατατάσσεται τρίτη μετά την Ισπανία και Ιταλία. Στην Ελλάδα και την Ιταλία καταναλώνεται κατά κύριο λόγο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, ενώ στην Ισπανία αυτή η κατηγορία ελαιολάδου αντιπροσωπεύει λιγότερο από το μισό της συνολικής κατανάλωσης. Οι ελληνικές ποικιλίες ελιάς ξεπερνούν τις 40 και το 90% της έκτασης καλλιεργείται με 20 από αυτές, προσαρμοσμένες σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα που παράγονται κυρίως με παραδοσιακές πρακτικές καλλιέργειας, είναι κατά κύριο λόγο εξαιρετικής ποιότητας (Kalogeropoulos&Tsimidou, 2014). Η ποικιλία «Κορωνέικη» που προέρχεται από τη νότια Πελοπόννησο, και συγκεκριμένα από την Κορώνη της Μεσσηνίας, είναι η κυριότερη ποικιλία και καλλιεργείται σε διάφορες περιοχές της χώρας. Οι κυριότερες ελαιοπαραγωγικές περιοχές στην Ελλάδα είναι η Πελοπόννησος, η Κρήτη και η Λέσβος (Martakos et al., 2019). Τα οφέλη της κατανάλωσης ελαιόλαδου είναι γνωστά ήδη από την αρχαιότητα, καθώς αποτελεί ένα πολύ υγιεινό και πολύ θρεπτικό συστατικό της διατροφής του ανθρώπου, λόγω των πλούσιων συστατικών του τα οποία διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές κι άλλες ιδιότητες. Το ελαιόλαδο, εκτός από τη μοναδική του σύνθεση σε λιπαρά οξέα, περιέχει πληθώρα βιοδραστικών ουσιών όπως τοκοφερόλες, σκουαλένιο, πολυφαινόλες κ.α., που παρά τη μικρή τους περιεκτικότητα, συμβάλλουν στις προστατευτικές του ιδιότητες. Η περιεκτικότητα αυτών των συστατικών φαίνεται να εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων και κυρίως από την ποικιλία της ελιάς, τη γεωγραφική προέλευση, τις συνθήκες καλλιέργειας και από τις παραμέτρους παραγωγής ελαιολάδου- σύστημα συμπίεσης, φυγοκέντρωσης, προσθήκη νερού κ.α. Επιπλέον, πολλές μελέτες συνδέουν την ποιότητα του ελαιολάδου με την συγκέντρωση αυτών των συστατικών και ως εκ τούτου, έχει μεγάλη σημασία η δυνατότητα προσδιορισμού τους με γρήγορες, οικονομικές και αποτελεσματικές μεθόδους (Martakos et al., 2019). Ένα από αυτά τα συστατικά αυτά, το οποίο αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας μελέτης, είναι το σκουαλένιο. Αποτελεί το κύριο συστατικό του ασαπωνοποίητου κλάσματος του ελαιόλαδου και τα οφέλη του στην υγεία του ανθρώπου, οι φυσικοχημικές του ιδιότητες και η χημική του σύνθεση έχουν απασχολήσει πολλούς ερευνητές τα τελευταία χρόνια (Naziri, 2013).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΕΡΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

### 1.1 Τα συστατικά του ελαιολάδου

Το παρθένο ελαιόλαδο είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία της μεσογειακής διατροφής και στην κατανάλωσή του αποδίδεται μια σειρά ευεργετικών ιδιοτήτων για την υγεία λόγω της μοναδικής του σύστασης. Αποτελείται κυρίως από τριακυλογλυκερόλες (~99%) και δευτερεύοντος από ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο- και διακυλογλυκερόλες καθώς και από μια σειρά υδρογονανθράκων, στερολών, αλειφατικών αλκοολών, φαινολικών συστατικών, τοκοφερολών και χρωστικών (Boskou et al., 2006). Η σύστασή του επηρεάζεται από γεωγραφικούς, αγρονομικούς και τεχνολογικούς παράγοντες (Diraman et al., 2010).

#### Λιπαρά οξέα

Τα κύρια λιπαρά οξέα που ανευρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι το Παλμιτικό (C16:0), Παλμιτελαϊκό (C16:1), Στεατικό (C18:0), Ελαϊκό (C18:1), Λινελαϊκό (C18:2) και Λινολενικό οξύ (C18:3), ενώ το Μυριστικό (C14:0), το Δεκαεπτανοϊκό (C17:0) και Εικοσανοϊκό οξύ (C20:0) βρίσκονται σε ίχνη. Το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου έχει θεσπίσει όρια για τη σύσταση των λιπαρών οξέων (Πίνακας 1), καθώς και για την περιεκτικότητα των *trans* λιπαρών οξέων για κάθε κατηγορία ελαιολάδου.

*Πίνακας 1: Σύσταση λιπαρών οξέων ελαιολάδου προσδιορισμένη με αέρια χρωματογραφία(%m/m μεθυλεστέρες), Καν. 2568/91*

Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα (%)
Μυριστικό οξύ (C14:0)	≤0,30
Παλμιτικό οξύ (C16:0)	7,50-20
Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1)	0,30-3,50
Στεατικό οξύ (C18:0)	0,50-5,00
Δεκαεπτανοϊκό οξύ (C17:0)	≤0,30
Δεκαεπτανοϊκό οξύ (C17:1)	≤0,30
Στεατικό οξύ (C18:0)	0,50-5,00
Ελαϊκό οξύ (C18:1)	55,00-83,00
Λινελαϊκό οξύ (C18:2)	2,50-21,00
Λινολενικό οξύ (C18:3)	≤ 1,00
Αραχιδικό οξύ (C20:0)	≤ 0,60
Εικοσανοϊκό οξύ (C20:1)	≤ 0,40
Βεχενικό οξύ (C22:2)	≤ 0,20
Λιγνοκηρικό οξύ (C24:0)	≤ 0,20

Η σύσταση των λιπαρών οξέων μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στα δείγματα κι εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η ζώνη παραγωγής, η γεωγραφική προέλευση, το κλίμα, η ποικιλία της ελιάς. Παραδείγματος χάριν, τα ελληνικά, ιταλικά και ισπανικά ελαιόλαδα έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε Λινελαϊκό και Παλμιτικό οξύ ενώ έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε Ελαϊκό οξύ. Από την άλλη, ελαιόλαδα από την Τυνησία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε Λινελαϊκό και Παλμιτικό οξύ ενώ έχουν χαμηλά επίπεδα Ελαϊκού οξέος. Ένας ακόμη παράγοντας είναι το επίπεδο ωρίμανσης της ελιάς. Έχει

αναφερθεί πως πρώτα σχηματίζεται το Ελαϊκό οξύ και υπάρχει ανταγωνιστική σχέση μεταξύ Ελαϊκού και Παλμιτικού, Παλμιτελαιικού και Λινελαϊκού οξέος (Boskou et al., 2006). Στον πίνακα 1 δίνονται τα όρια της ποσοστιαίας σύστασης των λιπαρών οξέων βάσει του Κανονισμού EC 2568/91.

### **Ακυλογλυκερόλες**

Οι τριακυλογλυκερόλες που βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο ελαιόλαδο είναι οι OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-50%), POL (5,5-7%) και SOO (3-7%), ενώ οι POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO και LLL ανευρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες. (O=Ελαϊκό οξύ P=Παλμιτικό οξύ, S=Στεατικό οξύ, L=Λινελαϊκό οξύ, Ln=Λινολενικό οξύ). Όσον αφορά στις διακυλογλυκερόλες, η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 1,0-2,8% και επικρατούν ενώσεις με 34 και 36 άτομα άνθρακα. Οι μονοακυλογλυκερόλες βρίσκονται σε πολύ ποσότητες, μικρότερες από 0,25% (Boskou et al., 2006).

### **Φαινολικές ενώσεις**

Μία πολύ σημαντική κατηγορία ενώσεων του ελαιολάδου είναι οι πολικές φαινολικές ενώσεις, καθώς καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητά του βελτιώνοντας την οξειδωτική σταθερότητα και συμβάλλοντας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενώ επίσης θεωρούνται ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου. Είναι κυρίως σεκοϊριδοειδή και απλές φαινόλες, φλαβονοειδή και λιγνάνες. Οι συνήθεις τιμές του ολικού πολικού φαινολικού κλάσματος είναι 100-300 mg CAE/kg ελαιολάδου (Kalogeropoulos&Tsimidou, 2014).

### **Υδρογονάνθρακες**

Οι υδρογονάνθρακες που ανευρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο ελαιόλαδο είναι το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Το σκουαλένιο αποτελεί το κύριο συστατικό του ασαπνωποίητου κλάσματος και περίπου το 90% του υδρογονανθρακικού κλάσματος. Επιπλέον, το υδρογονανθρακικό κλάσμα αποτελείται από διτερπενικούς και τριτερπενικούς υδρογονάνθρακες, ισοπρενοϊδείς πολυολεφίνες και κ-παραφίνες (Lanzón et al., 1994; Boskou et al., 2006).

### **Τοκοφερόλες**

Οι τοκοφερόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και διακρίνονται ως προς τη θέση και τον αριθμό των μεθυλικών ομάδων σε α-, β-, γ-, δ-. Η α-τοκοφερόλη αντιπροσωπεύει το 90% του συνολικού περιεχομένου σε τοκοφερόλες στο ελαιόλαδο. Τα ελληνικά ελαιόλαδα βρίσκονται ανάμεσα σε αυτά με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα τοκοφερολών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά αλλά η υδρογόνωση του ελαιολάδου οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσής τους (Boskou et al., 2006).

### **Χρωστικές**

Ο χαρακτηριστικός πρασινοκίτρινος χρωματισμός του ελαιολάδου οφείλεται στην παρουσία χλωροφυλλών και καροτενοειδών κι επηρεάζεται από την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης, τους τεχνολογικούς παράγοντες και τις συνθήκες αποθήκευσης.

Από τις χλωροφύλλες κυριαρχεί η φαιοφυτίνη και τα κύρια καροτενοειδή του ελαιολάδου είναι η λουτεΐνη και το β-καροτένιο (Boskou et al., 2006).

### **Αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες**

Βρίσκονται είτε στην ελεύθερη είτε στην εστεροποιημένη μορφή. Οι πιο σημαντικές είναι οι λιπαρές αλκοόλες και οι διτερπενικές αλκοόλες. Το κλάσμα των λιπαρών αλκοολών αποτελείται από γραμμικές κορεσμένες αλκοόλες με περισσότερα από 16 άτομα άνθρακα. Η συγκέντρωσή τους συνήθως δεν ξεπερνά τα 250 mg/kg. Η φυτόλη και η γερανυλογερανιόλη είναι οι κύριες διτερπενοειδείς αλκοόλες του αλειφατικού αλκοολικού κλάσματος του ελαιολάδου σε ελεύθερη κι εστεροποιημένη μορφή. Η φυτόλη έχει βρεθεί μεταξύ 25-595mg/kg, ενώ η γερανυλογερανιόλη σε επίπεδα μικρότερα από 50 mg/kg. Ακόμη, οι εστέρες των λιπαρών αλκοολών με λιπαρά οξέα (κηροί) είναι μεγάλης σημαντικότητας καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήριο για τη διαφοροποίηση διάφορων τύπων ελαιολάδου. Το παρθένο ελαιόλαδο περιέχει κηρούς σε επίπεδα χαμηλότερα από 150 mg/kg (Boskou et al., 2006).

### **Στερόλες**

Οι στερόλες είναι λιπίδια που σχετίζονται με την ποιότητα του ελαιολάδου και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της γνησιότητας. Το συνολικό περιεχόμενο σε στερόλες στο παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 1000-2000 mg/kg και από την Ευρωπαϊκή Ένωση (EC Regulation 2568, 1991) τα 1000 mg/kg έχουν οριστεί ως κατώτατο όριο (Boskou et al., 2006).

### **Τριτερπενικά οξέα**

Είναι βιολογικά ενεργά συστατικά και ανευρίσκονται σε ίχνη στο ελαιόλαδο. Τα κύρια τριτερπενικά οξέα είναι το ελενολικό και μασλινικό οξύ όπου βρίσκονται στο φλοιό του ελαιόκαρπου (Boskou et al., 2006).

### **Πτητικά συστατικά**

Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 280 συστατικά στο πτητικό κλάσμα του ελαιολάδου. Πρόκειται για υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, εστέρες κ.α. Από αυτά, μόνο τα 67 βρίσκονται σε ποσότητες μεγαλύτερες από το κατώτατο όριο ώστε να συμβάλουν στο άρωμα του ελαιολάδου και 20 από αυτά συμβάλουν στη γεύση (Boskou et al., 2006). Ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα, και κυρίως με C<sub>6</sub> γραμμικές ακόρεστες και κορεσμένες αλδεΐδες και αλκοόλες έχουν τη σημαντικότερη συνεισφορά στο άρωμα (Inglese et al., 2011).

## **1.2 Ποικιλίες ελιάς**

Η ποικιλία της ελιάς είναι ένας από τους πιο σημαντικούς αγρονομικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του παρθένου ελαιολάδου, καθώς και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Beltrán et al., 2016). Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ελληνικά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα από τρεις ποικιλίες.

#### **A. Κορωνέικη- Olea europaea var microarpa alba ή mastoides.**

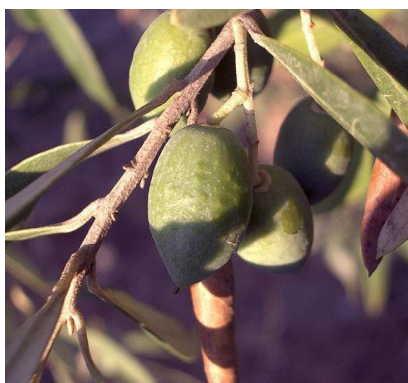
Η Κορωνέικη αναφέρεται και διαφορετικά ως «Ψιλολιά», «Κρητικιά», «Βάτσικη», «Κορωνιά», «Κορώνι», «Λαδολιά» και «Λιανολιά». Καλλιεργείται κυρίως στους νομούς Μεσσηνίας, Λακωνίας, Αιτωλοακαρνανίας, Κεφαλληνίας, Ζακύνθου, Σάμου, Κυκλάδων, Ρεθύμνου, Ηρακλείου και Λασιθίου. Ανήκει στις μικρόκαρπες ποικιλίες και η ωρίμανση ξεκινά αρχές Οκτωβρίου έως τέλος Δεκεμβρίου. Έχει σταθερή καρποφορία και ικανοποιητικές αποδόσεις καρπού ανά δέντρο, αλλά το μικρό μέγεθος των καρπών δυσχεραίνει τη συλλογή. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι φτάνει το 27%. Το παραγόμενο λάδι είναι ίσως το πιο εκλεκτό συγκριτικά με τις υπόλοιπες ποικιλίες με πολύ καλό άρωμα και γεύση (Ποντίκης, 2000).



*Εικόνα 1: Ελιά "Κορωνέικη"*

#### **B. Αδραμυτινή- Olea europaea var med. Subrotunda**

Η Αδραμυτιανή ή «Αϊβαλιώτικη» ή «Φραγκολιά» καλλιεργείται κυρίως στο νομό Λέσβου και ανήκει στις μεσόκαρπες ποικιλίες. Ο καρπός έχει υποστρόγγυλο έως ελαφρά ωοειδές σχήμα. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι είναι περίπου 23%. Θεωρείται ανθεκτική στο ψύχος και το ελαιόλαδο που παράγεται θεωρείται καλής ποιότητας. Ο καρπός έχει στρογγυλό σχήμα και μεσαίο μέγεθος (Ποντίκης, 2000).



*Εικόνα 2: "Ελιά Αδραμυτιανή"*

#### **Γ. Κολοβή- Olea europaea var. pyriformis**

Η ποικιλία Κολοβή ή «Βαλανολιά» ή «Βαλάνα» ή «Μυτιληνιά» καλλιεργείται στη Λέσβο, τη Χίο και την Εύβοια και ανήκει στις μεσόκαρπες ποικιλίες. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι είναι περίπου 25%. Χρησιμοποιείται τόσο για την παραγωγή ελαιολάδου

εκλεκτής ποιότητας, όσο και για την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών, αλλά έχει υψηλές απαιτήσεις σε έδαφος και πότισμα. Η συλλογή ξεκινά το Νοέμβριο (Ποντίκης, 2000).



Εικόνα 3: Ελιά "Κολοθή"

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΣΚΟΥΑΛΕΝΙΟ

### 2.1 Γενικά γνωρίσματα

Το σκουαλένιο ( $C_{30}H_{50}$ ) είναι ένα *all-trans* τριτερπένιο που ανακαλύφθηκε το από τον Dr. Mitsumaru Tsujimoto κατά τον διαχωρισμό του ασαπυνοποιητού κλάσματος από το ηπατικό έλαιο καρχαρία και του προσέδωσε αυτή την ονομασία από την οικογένεια των καρχαριών «*Squalidae*» (Tsujimoto, 1916). Πρόκειται για ένα μόριο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί ενδιάμεσο της βιοσύνθεσης των στερολών- χοληστερόλη, φυτοστερόλες. Ερευνητές πιστεύουν ότι έχει ιδιαίτερη συμβολή στην υγεία και τη χημειοπροστατευτική δράση ενάντια σε συγκεκριμένες μορφές καρκίνου (Boskou et al., 2006) γι' αυτό κι έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών κι έχει αποτελέσει αντικείμενο μιας σειράς μελετών.

Βρίσκεται τόσο στο ζωικό όσο και το φυτικό βασίλειο. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του συναντώνται στο ήπαρ συγκεκριμένων ειδών ψαριών και ειδικά σε καρχαρίες που ζουν σε βάθος μεγαλύτερο από 400 μέτρα (Tsujimoto, 1920). Θεωρείται σημαντικό για την επιβίωση των ζώων που ζουν σε βαθιά νερά, όπου η παροχή του οξυγόνου είναι φτωχή και οι πιέσεις πολύ υψηλές (Popa et al., 2014). Ακόμη, υπάρχει σε μικρές ποσότητες και στο ανθρώπινο σώμα. Συγκεκριμένα, ο άνθρωπος στα πρώτα χρόνια της ζωής του έχει στο αίμα του τη μέγιστη συγκέντρωση, αλλά τα επίπεδα μειώνονται απότομα ανάμεσα στα 30 και 40 έτη της ηλικίας. Στο ανθρώπινο σώμα συντίθεται στο συκώτι κι εκκρίνεται σε μεγάλες ποσότητες από τους σμηγματογόνους αδένες. Μεταφέρεται στο αίμα από λιποπρωτεΐνες χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας (Reddy&Couvreur, 2009). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σκουαλενίου στον άνθρωπο συναντάται στα λιπίδια του δέρματος και ισούται περίπου με 500  $\mu\text{g/g}$  και στο λιπώδη ιστό 300 $\mu\text{g/g}$ . Στο ήπαρ, όπου λαμβάνει χώρα και η βιοσύνθεσή του, είναι μόλις 75  $\mu\text{g/g}$  και στο έντερο 42  $\mu\text{g/g}$  (Liu, 1976).



## 2.2 Πηγές σκουαλενίου

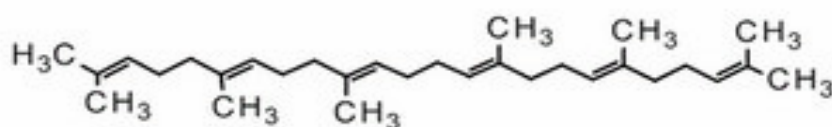
Οι κύριες πηγές σκουαλενίου είναι ζώα, φυτικές πηγές και συνθετικές μέθοδοι. Το ήπαρ καρχαρία μπορεί να δώσει υψηλές ποσότητες (400-860 g/kg ελαίου), ωστόσο για λόγους επικινδυνότητας εξαφάνισης των σπάνιων θαλάσσιων ειδών αυξάνεται η παραγωγή από φυτικές πηγές (Lozano-Grande et al., 2018). Βρίσκεται σε πληθώρα φυτικών πηγών όπως το σογιέλαιο (9,9 mg/100g), το έλαιο από κουκούτσια σταφυλιού (14,1 mg/100g), το φουντουκέλαιο (27,9 mg/100g), το φιστικέλαιο (27,4 mg/100g), το καλαμποκέλαιο (27,4 mg/100g) (Frega et al., 1992), το ηλιέλαιο (13,8 mg/100g) (Nergiz&Celikkale, 2011) ενώ σε αρκετά μεγάλη συγκέντρωση το συναντούμε στον αμάρανθο (5942 mg/100g) (Lozano-Grande et al., 2018). Έχει βρεθεί επίσης σε όσπρια και δημητριακά όχι όμως σε υψηλά επίπεδα, ενώ από τους ξηρούς καρπούς η κυριότερη πηγή είναι το Βραζιλιάνικο καρύδι (1,4 g/kg ελαίου) (Naziri, 2013).

Από το σύνολο των φυτικών πηγών, το ελαιόλαδο θεωρείται η κυριότερη διατροφική πηγή για τον άνθρωπο. Το σκουαλένιο αντιπροσωπεύει το 50% του ασαπνωποίητου κλάσματος του ελαιολάδου, ενώ αποτελεί το 90% του κλάσματος υδρογονανθράκων. Η περιεκτικότητα μπορεί να κυμαίνεται από 200 έως 7500 mg/kg ελαίου, ενώ σε δείγματα ελληνικών ελαιολάδων έχουν αναφερθεί ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, έως και 12000 mg/kg ελαίου (Murkovic et al., 2004), και στο πυρηνέλαιο πάνω από 3400 mg/kg ελαίου (Ketenoglu et al., 2018). Υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωσή του στο ελαιόλαδο σε σχέση με άλλα εδώδιμα φυτικά έλαια, όπου ακόμη και εξευγενισμένο, περιέχει 25 με 30 φορές περισσότερο σκουαλένιο συγκριτικά με τα σπορέλαια (Nergiz&Celikkale, 2011; Rao, 1998).

Μια εναλλακτική πηγή, αν κι εποχική, θεωρούνται τα απόβλητα ελαιοτριβείων. Η περιεκτικότητα σκουαλενίου σε απόβλητα απόσπησης ελαιολάδου κυμαίνεται από 100 έως 300 g/kg ελαίου, ενώ στα απόβλητα απόσπησης κατά τον εξευγενισμό φοινικελαίου είναι 2-13 g/kg ελαίου και σογιελαίου 18-35 g/kg ελαίου (Naziri, 2013).

## 2.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Το σκουαλένιο αποτελείται από μια υδρογονοανθρακική αλυσίδα με έξι μονάδες ισοπρενίου. Οι έξι διπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα καθιστούν το μόριο ένα από τα πιο ακόρεστα λιπίδια όπου είναι ευαίσθητο στην οξειδωση (Lopez et al., 2014; Lozano-Grande et al., 2018).



Εικόνα 4: Χημική δομή Σκουαλενίου



Είναι άχρωμο και άοσμο με μοριακό βάρος 410,7 g/mol, πυκνότητα 0,858 g/mL, διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτο στο νερό (Lopez et al., 2014; Wołosik et al., 2013; Lozano-Grande et al., 2018). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται επιγραμματικά οι φυσικοχημικές του ιδιότητες και στην Εικόνα 4 η δομή του.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σκουαλενίου

Ιδιότητα	Τιμή
Μοριακό βάρος	410,7 g/mol
Σημείο Τήξεως	-75°C
Δείκτης διάθλασης	1.499
Ιξώδες στους 25°C	12 cP
Πυκνότητα	0,858 g/mL
Σημείο βρασμού στους 25 °C	285 °C
Σημείο ανάφλεξης	110 °C
Αριθμός ιωδίου	381 g/100g
Επιφανειακή τάση	~32 mN/m

## 2.4 Βιοδραστικότητα

Η μέση πρόσληψη σκουαλενίου υπολογίζεται 30 mg/ημέρα αλλά όταν η κατανάλωση σε ελαιόλαδο είναι υψηλή ή συνοδεύεται και με άλλες τροφές που περιέχουν το μόριο, η πρόσληψη μπορεί να φτάσει έως και 200-400 mg/ημέρα, όπως παρατηρήθηκε στις χώρες της Μεσογείου (Salvo et al., 2017). Από το σκουαλένιο που καταναλώνεται-εξεγενές- το 60-80% απορροφάται και κατανέμεται σε διάφορους ιστούς, ενώ το ενδογενές πρώτα συντίθεται στο συκώτι κι έπειτα μεταφέρεται στο δέρμα και σε διάφορα όργανα μέσω του αίματος (Gnes, 2013; Lozano-Grande et al., 2018). Πωλείται στην αγορά τα τελευταία χρόνια με τη μορφή κάψουλας για τις ευεργετικές του ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου (Nergiz&Çelikkale, 2011).

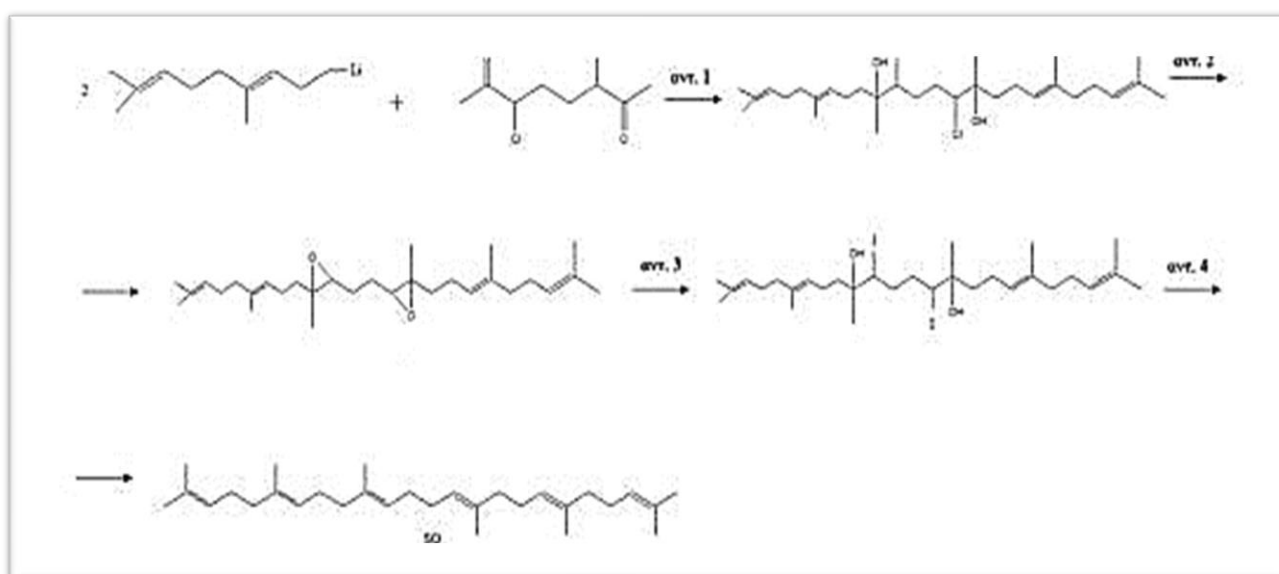
Η κατανάλωση του σκουαλενίου φαίνεται πως έχει προστατευτική δράση έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων, μειώνοντας την ολική χοληστερόλη, την LDL χοληστερόλη και τα επίπεδα τριγλυκεριδίων δρώντας ως υπερχοληστερολαιμικός παράγοντας, έχοντας έτσι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (Lozano-Grande et al., 2018). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της μείωσης ή μη αύξησης κινδύνου εκδήλωσης κάποιων τύπων καρκίνου-στήθους και παχέος εντέρου-και της κατανάλωσης παρθένου ελαιόλαδου, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σκουαλενίου σε αυτό (Newmark, 1997; Rao, 1998; Smith, 1998; Quiles et al., 2010) κι έχει αναφερθεί η δράση του ως ενισχυτικό αντικαρκινικών φαρμάκων (Reddy&Couvreur, 2009; Naziri, 2013). Επιπλέον επιδρά πολύ θετικά στο δέρμα έχοντας την ικανότητα να απορροφά ως και το ένα τέταρτο του βάρους του σε οξυγόνο, κάτι που προλαμβάνει δερματικές παθήσεις, την εμφάνιση ακμής και ρυτίδων (Huang et al., 2009). Βρίσκει χρήση στη βιομηχανία καλλυντικών κι αντιηλιακών. Αυτό γιατί διαθέτει φωτοπροστατευτικές ιδιότητες έναντι της ακτινοβολίας UV, έχει υδρόφοβο χαρακτήρα, γαλακτοματοποιητικές ιδιότητες αλλά και μεγάλη συμβατότητα με την επιφάνεια της επιδερμίδας, όπου απορροφάται αποτελεσματικά χωρίς να αφήνει λιπαρά υπόλοιπα (Wołosik et al., 2013). Έχει αναφερθεί ακόμη ότι κατά την έκθεση στην



ηλιακή ακτινοβολία το σκουαλένιο είναι ο πρώτος στόχος στην επιφάνεια του δέρματος, δρώντας σαν ένας αποτελεσματικός αποσβέστης του  $^1\text{O}_2$ . (Kohno et al., 1995).

## 2.5 Χημική σύνθεση σκουαλενίου

Η σύνθεση του σκουαλενίου προτάθηκε κατά τη διερεύνηση της σύνθεσης των τερπενίων, μέσω της αντίδρασης Whitting-Scholkopf μεταξύ του 1,4-διβρωμοβουτανίου και της 6,10-διμεθυμο-5,9-ενδεκαδιεν-2-όνης (Dicker&Whitting, 1958). Προέκυψε μίγμα υδρογονανθράκων και η απομόνωση του all-trans SQ έγινε με κατεργασία με διάλυμα θειουρίας (Naziri, 2013). Για τη στερεοειδική σύνθεση σκουαλενίου χρησιμοποιήθηκαν και οι συνήθειες μέθοδοι σύνθεσης ολεφινών, με απόδοση υψηλότερη από 70% σε all-trans σκουαλένιο. Η αλληλουχία των αντιδράσεων όπως προτάθηκαν από τον Cornforth και συνεργάτες το 1959 δίνονται στην **Εικόνα 5**.



**Εικόνα 5:** Χημική σύνθεση Σκουαλενίου (Cornforth et al., 1959)

Αντιδρά το 9-λιθιο-2,6-διμεθυλο-2,6-διένιο με διχλωροοκταδιενόνη προς σχηματισμό διχλωροϋδρίνης (αντ.1). Προκύπτει ένα δισεποξειδικό παράγωγο (αντ.2) που στη συνέχεια ανάγεται προς διωδυδρίνη (αντ.3) και μετά από αφαλογόνωση σχηματίζεται σκουαλένιο (αντ.4). Ο καθαρισμός του πραγματοποιείται με διάλυμα θειουρίας (Naziri, 2013).

## 2.6 Ο ρόλος του σκουαλενίου στη σταθερότητα ελαιολάδου

Σύμφωνα με τους Grigoriadou et al., (2007) η περιεκτικότητα σκουαλενίου στο παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 2000 και 5100 mg/kg, ενώ παρόμοια αποτελέσματα εξέφρασαν και οι Nenadis&Tsimidou, (2002), Perez-Camino et al., (2002). Οι Murkovic et al., (2004) αναφέρουν ότι η συγκέντρωσή του στα ελληνικά ελαιόλαδα κυμαίνεται μεταξύ 5,1-9,6 g/L.

Οι Psomiadou&Tsimidou, (1999) μελέτησαν εκτενώς το ρόλο του σκουαλενίου στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου. Ως υπόστρωμα χρησιμοποίησαν το κλάσμα

των τριακυλογλυκερολών του ελαιόλαδου πλήρως απαλλαγμένο από φυσικά αντιοξειδωτικά, στο οποίο προστέθηκαν δύο συγκεντρώσεις σκουαλενίου (200 και 7000 mg/kg). Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε φούρνο στους 40 και 62°C και η έκταση της οξείδωσης προσδιορίστηκε μέσω του αριθμού υπεροξειδίων και της συγκέντρωσης των συζυγιακών διενίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σκουαλένιο είχε μια μέτρια αντιοξειδωτική δράση και στις δύο θερμοκρασίες όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση 7000 mg/kg, ενώ δεν είχε σχεδόν καμία επίδραση όταν προστέθηκε σε συγκέντρωση 200 mg/kg και γι' αυτό, φαίνεται πως η αντιοξειδωτική του δράση είναι εξαρτώμενη της συγκέντρωσης. Το εύρημα αυτό είναι σημαντικό εάν ληφθεί υπόψιν ότι τα καλής ποιότητας παρθένα ελαιόλαδα που ικανοποιούν τις προϋποθέσεις της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας συνήθως περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις σκουαλενίου μεταξύ 800-12000 mg/kg (Lanzón et al., 1994; Psomiadou&Tsimidou, 1999). Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση του σκουαλενίου παρουσία κύριων αντιοξειδωτικών (α-τοκοφερόλη, καφεϊκό οξύ) και από τα αποτελέσματα προέκυψε πως το μίγμα τους είχε ελαφρώς καλύτερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με την περίπτωση της προσθήκης μόνο της α-τοκοφερόλης ή του καφεϊκού οξέος, ωστόσο η συμβολή του δε θεωρήθηκε ιδιαίτερα σημαντική. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι δεν υπήρξε κάποια επίδραση του σκουαλενίου στην περίοδο επαγωγής του ελαιόλαδου σε δοκιμές με συσκευή Rancimat στους 100 και 120°C. Τέλος, αντέδρασε ελάχιστα με το DPPH. Συμπερασματικά, ο ρόλος του σκουαλενίου στην αυτοοξείδωση του ελαιόλαδου φαίνεται πως είναι αμελητέος. Η ασθενής αντιοξειδωτική του δράση πιθανόν να οφείλεται στο ότι το σκουαλένιο, έχοντας έξι διπλούς δεσμούς, οξειδώνεται με ανταγωνιστικό τρόπο ως προς τις τριακυλογλυκερόλες του ελαιόλαδου, οδηγώντας έτσι σε μείωση του ρυθμού οξείδωσης (Psomiadou&Tsimidou, 1999).

## 2.7 Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα σκουαλενίου στο ελαιόλαδο

Η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε σκουαλένιο εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η ποικιλία της ελιάς (De Leonardis et al., 1998; Manzi et al., 1998), η γεωγραφική προέλευση και η τεχνολογία εξαγωγής του ελαίου, ενώ μειώνεται δραματικά κατά τη διαδικασία του ραφινάρισματος (Lanzón et al., 1994; Psomiadou&Tsimidou, 1999).

### 2.7.1 Τεχνολογικοί παράγοντες

Οι Nergiz&Çelikkale, (2011) μελέτησαν τις μεταβολές της συγκέντρωσης του σκουαλενίου σε ποικιλία φυτικών ελαίων κατά τις διαδικασίες του εξευγενισμού και όσον αφορά στο ελαιόλαδο, η συνολική μείωση έφτασε 40,94%, συγκριτικά με το ακατέργαστο έλαιο. Οι Kalogeropoulos&Tsimidou, (2014) υποστηρίζουν ότι η περιεκτικότητα σκουαλενίου σε αποσμημένα ελαιόλαδα αναμένεται να είναι δέκα φορές χαμηλότερη σε σχέση με το παρθένο ελαιόλαδο και γι' αυτό, τα απόβλητα απόσμησης ελαιόλαδου αποτελούν ένα από τα υποπροϊόντα που χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση σκουαλενίου. Ακόμη, σύμφωνα με τη μελέτη των Martakos et al., (2019), η προσθήκη νερού κατά τη μάλαξη οδήγησε σε μείωση της περιεκτικότητας των τοκοφερολών και αύξηση του σκουαλενίου. Άλλοι παράγοντες όπως το υψόμετρο της καλλιέργειας, το αν αυτή ήταν βιολογική ή συμβατική, το πότισμα και η προσθήκη λιπασμάτων, καθώς και η φυγοκέντρηση δύο ή τριών φάσεων, δεν παρουσίασαν κανένα αντίκτυπο στις συγκεντρώσεις.

### 2.7.2 Ποικιλία ελιάς και γεωγραφική προέλευση

Η ποικιλία της ελιάς είναι ένας πολύ σημαντικός αγρονομικός παράγοντας που επηρεάζει ισχυρά την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε σκουαλένιο.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ισπανικά ελαιόλαδα διαφορετικών ποικιλιών, η διακύμανση στην περιεκτικότητα σκουαλενίου αποδόθηκε στην ποικιλία της ελιάς, καθώς όλες οι υπόλοιπες μεταβλητές ήταν όμοιες. Όλες οι ποικιλίες καλλιεργήθηκαν στον ίδιο δενδρόκηπο υπό τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας, η ελαιοσυγκομιδή πραγματοποιήθηκε στο ίδιο επίπεδο ωρίμανσης και η εξαγωγή ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο (Beltrán et al., 2016). Στη μελέτη των Ambra et al., (2017) σε μονοποικιλιακά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα ιταλικών ποικιλιών αναλύθηκαν τα λιπαρά οξέα καθώς και μια σειρά από βιοδραστικά συστατικά κι εντοπίστηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ποικιλίες ως προς την περιεκτικότητα σκουαλενίου. Επίσης, σύμφωνα με τους Salvo et al., (2017) και η γεωγραφική προέλευση ίσως έχει σημαντικό ρόλο. Οι Mansour et al., (2015) μελετώντας ελαιόλαδα από την Τυνησία δύο διαφορετικών ποικιλιών και διαφορετικών προελεύσεων (κεντρική και νότια Τυνησία) παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα σκουαλενίου διέφερε μεταξύ των δύο ποικιλιών. Επιπλέον, διαφορά υπήρξε και ανάμεσα σε ελαιόλαδα της ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. Σε μία ακόμη μελέτη ανάμεσα σε ελαιόλαδα τριών ισπανικών ποικιλιών και τεσσάρων γεωγραφικών προελεύσεων το σκουαλένιο βρέθηκε ως μια από τις μεταβλητές με τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα των ελαιολάδων ως προς την ποικιλία και τη γεωγραφική προέλευση (Sayago et al., 2019). Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες σε ελληνικά ελαιόλαδα έχουν διερευνήσει με τη σειρά τους την επίδραση των παραγόντων της ποικιλίας και της γεωγραφικής προέλευσης ως προς την περιεκτικότητα σκουαλενίου. Οι Martakos et al., (2019) υποστηρίζουν ότι η ποικιλία επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα του σκουαλενίου, καθώς και ότι η γεωγραφική προέλευση αποτελεί κρίσιμο παράγοντα. Οι Mikrou et al., (2020) συμφωνούν όσον αφορά στην επίδραση της ποικιλίας κι επιπλέον, μελετώντας δείγματα ελαιολάδου ίδιας ποικιλίας από υποπεριοχές της ίδιας περιοχής, κατέληξαν στο ότι μαζί με τους γενετικούς παράγοντες, τα επίπεδα του σκουαλενίου είναι πιθανό να επηρεάζονται και από το οικοσύστημα και τις γεωργικές πρακτικές.

### 2.7.3 Στάδιο ωρίμανσης και περίοδος ελαιοσυγκομιδής

Ένας ακόμη παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα σε σκουαλένιο είναι το επίπεδο ωρίμανσης των καρπών της ελιάς κατά τη συγκομιδή. Σύμφωνα με τους Martakos et al., (2019), ελαιόλαδα που παράγονται από καρπούς στα πρώιμα στάδια της ωρίμανσής τους περιέχουν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις σκουαλενίου, καρροτενοειδών και τοκοφερολών. Η μελέτη των Fernández-Cuesta et al., (2013) σε καρπούς ελιάς έδειξε πως η περιεκτικότητα σκουαλενίου αυξήθηκε σημαντικά από το Σεπτέμβριο (4102 mg/kg) μέχρι το Νοέμβριο (4673 mg/kg) αλλά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στη συγκομιδή του Νοεμβρίου και Δεκεμβρίου. Οι καρποί που συλλέχθηκαν το Σεπτέμβριο είχαν ήδη υψηλή περιεκτικότητα σκουαλενίου και συγκεκριμένα το 87% του τελικού σκουαλενίου, ενώ οι καρποί που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο είχαν το 93%. Στη μελέτη των Sakouhi et al., (2011), η μέγιστη περιεκτικότητα σκουαλενίου βρέθηκε σε έλαιο που ελήφθη από ελαιόκαρπους που συλλέχθηκαν 21 εβδομάδες μετά την ανθοφορία (12802 mg/kg), στη συνέχεια παρατηρήθηκε δραματική μείωση μετά από 26 εβδομάδες από την ανθοφορία (3501 mg/kg), ενώ στο τελικό στάδιο της ωρίμανσης η συγκέντρωση έφτασε μόλις 1265 mg/kg. Οι ερευνητές αποδίδουν τη

μείωση αυτή στη συμμετοχή του σκουαλενίου στη βιοσύνθεση άλλων συστατικών, όπως στερόλες και τριτερπένια.

#### 2.7.4 Συνθήκες αποθήκευσης ελαιολάδου

Στη μελέτη των [Rastrelli et al., \(2002\)](#) όπου αναλύθηκαν ελαιολάδα αποθηκευμένα σε πληρωμένες σκουρόχρωμες φιάλες αποθήκευσης και φιάλες πληρωμένες μέχρι τη μέση, οι μεγαλύτερες αλλαγές στη συγκέντρωση του σκουαλενίου παρατηρήθηκαν σε αυτές που ήταν γεμισμένες μέχρι τη μέση, λόγω του μεγαλύτερου επιπέδου οξυγόνου. Η α-τοκοφερόλη ήταν το πρώτο συστατικό που οξειδώθηκε (-20% μετά από 2 μήνες και -92% μετά από 12 μήνες) προστατεύοντας το σκουαλένιο κατά τους πρώτους μήνες, αλλά η συγκέντρωσή του μειώθηκε δραματικά μετά από 6 μήνες.

## 2.8 Προσδιορισμός σκουαλενίου στο ελαιολάδο

### 2.8.1 Προκατεργασία δειγμάτων

Η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού του σκουαλενίου που προτείνεται από τον *AOAC (Association of Official Analytical Chemists, (1999))* βασίζεται στη σαπωνοποίηση, τις επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις με διαλύτες και την κλασματοποίηση μέσω χρωματογραφικής στήλης, ωστόσο έχουν αναπτυχθεί κι άλλες μέθοδοι με πολύ καλά αποτελέσματα.

Οι [Nenadis&Tsimidou, \(2002\)](#) πρότειναν την προκατεργασία του δείγματος ελαιολάδου με κλασματική κρυστάλλωση πριν την ανάλυση με υγρή χρωματογραφία (HPLC), ως μια γρήγορη, απλή και οικονομική μέθοδο. Μερικά χρόνια αργότερα οι [Grigoriadou et al., \(2007\)](#) βελτιστοποίησαν μια μέθοδο προκατεργασίας των δειγμάτων με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE- Solid Phase Extraction) για την εκχύλιση σκουαλενίου και α-τοκοφερόλης πριν την ανάλυση με HPLC. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, το σκουαλένιο παραλαμβάνεται μέσα από φυσίγγιο SPE πληρωμένο με silica μετά από έκλουση με εξάνιο, ενώ η α-τοκοφερόλη απομονώνεται με μίγμα εξανίου/διαιθυλαιθέρα 99:1 v/v. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να φανεί πολύ χρήσιμη στον επίσημο έλεγχο του ελαιολάδου ([Boskou, 2009](#)). Το έκλουσμα εξανίου από τα φυσίγγια SPE επιτρέπει την απομόνωση ενός κλάσματος ελεύθερου από τριακυλογλυκερόλες και πλούσιου σε σκουαλένιο και γι' αυτό, καθίσταται δυνατή η χρήση 100% ακετονιτριλίου (ACN) ως κινητή φάση στην ανάλυση HPLC. Εάν το δείγμα περιέχει τριακυλογλυκερόλες, είναι υποχρεωτική η χρήση μίγματος ακετόνης/ακετονιτριλίου ως κινητή φάση ή εναλλακτικά οι προσεκτικές εκπλύσεις με τέτοια μίγματα. Κάτι τέτοιο όμως έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας και την αύξηση του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Αντιθέτως, χρησιμοποιώντας μόνο 100% ακετονιτρίλιο ως διαλύτη έκλουσης, το όριο ανίχνευσης ήταν 6,2 ng/10μL και το όριο ποσοτικοποίησης 7,8 ng/μL. Αυτά τα όρια ήταν τρεις φορές μικρότερα από εκείνα που αναφέρονται σε προηγούμενες μελέτες ([Grigoriadou et al., 2007](#); [Nenadis&Tsimidou, 2002](#)).

Στην ίδια μελέτη εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι προπαρασκευής δειγμάτων ελαιολάδου πριν την ανάλυση HPLC: **α) κλασματική κρυστάλλωση β) εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και γ) σαπωνοποίηση**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα επίπεδα σκουαλενίου ήταν συγκρίσιμα μεταξύ των τριών μεθόδων. Επισημαίνουν ακόμη ότι η



μέθοδος που περιλαμβάνει την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) αποδείχθηκε γρήγορη και αξιόπιστη καθώς δίνει τη δυνατότητα παραλαβής κλασμάτων πλούσιων σε δευτερεύουσες ποσοτικά ενώσεις.

### 3.8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός σκουαλενίου

Ο αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σκουαλενίου σε ελαιόλαδο είναι οι χρωματογραφικές τεχνικές: Υγρή και Αέρια Χρωματογραφία.

Για την Υγρή Χρωματογραφία οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι αντίστροφης φάσης (C<sub>18</sub>). Οι ανιχνευτές που έχουν αξιοποιηθεί είναι ο Ανιχνευτής Υπεριώδους (UV), ο Ανιχνευτής Δείκτη Διάθλασης (RI) (Naziri, 2013), καθώς επίσης και ο Ανιχνευτής Συστοιχίας Φωτοδιόδων (DAD). Ο τελευταίος έχει χρησιμοποιηθεί σε μια σειρά μελετών για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σκουαλενίου, χρωστικών και αντιοξειδωτικών του ελαιολάδου, καθώς η τεχνική HPLC-DAD προσφέρει πολύ καλό διαχωρισμό και σχετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, ενώ ο ανιχνευτής παρέχει πολύ καλή σταθερότητα σήματος. Το μεγάλο πλεονέκτημα του Ανιχνευτή Συστοιχίας Φωτοδιόδων (DAD) είναι η ταυτόχρονη παρακολούθηση σε προκαθορισμένα μήκη κύματος κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ επιπλέον δίνεται η δυνατότητα συνπροσδιορισμού του σκουαλενίου με άλλες ενώσεις, όπως οι τοκοφερόλες (Martakos et al., 2019).

Στην Αέρια Χρωματογραφία χρησιμοποιείται κυρίως ο Ανιχνευτής Ιονισμού Φλόγας (FID) και τριχοειδείς στήλες χαμηλής πολικότητας, κατάλληλες για το διαχωρισμό αλειφατικών υδρογονανθράκων. Η στατική φάση αποτελείται κυρίως από σιλοξάνιο (π.χ. διμεθυλοπολυσιλοξάνιο/διφαινυλοπολυσιλοξάνιο, 95:5w/w). Οι συνθήκες εξαρτώνται από το εάν είναι επιθυμητός ο συνπροσδιορισμός κι άλλων συστατικών (Naziri, 2013).

## ΣΚΟΠΟΣ

---

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του σκουαλενίου σε ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα διαφορετικών ποικιλιών και προελεύσεων με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της ποικιλίας της ελιάς και της γεωγραφικής προέλευσης στην περιεκτικότητα σκουαλενίου. Τα δείγματα ελαιολάδων αναλύθηκαν με δύο μεθόδους προκειμένου να επιτευχθεί σύγκριση της αποτελεσματικότητας της αναπτυσσόμενης μεθόδου SPE-HPLC με μέθοδο που κάνει χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC). Για τη μέθοδο SPE-HPLC δεν χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά φυσίγγια SPE, αλλά παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος της ανάλυσης. Επιπλέον, για να επιτευχθεί βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές έκλουσης του σκουαλενίου από τα φυσίγγια SPE με διαφορετικούς όγκους διαλύτη έκλουσης. Κατά την ανάλυση των ελαιολάδων με αέρια χρωματογραφία, ταυτόχρονα με το σκουαλένιο προσδιορίστηκε η ποσοστιαία σύσταση των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων. Τα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση για διερευνηθεί εάν τα δεδομένα αυτά μπορούν να φανούν χρήσιμα στη διάκριση των δειγμάτων ελαιολάδων βάσει ποικιλίας και γεωγραφικής προέλευσης.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

### 3.1 Δείγματα ελαιολάδων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη παρελήφθησαν στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος **“Εμβληματική Δράση: Οι δρόμοι της ελιάς”** στο οποίο συμμετέχει το Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συλλέχθηκαν κατά την ελαιοπαραγωγική περίοδο 2019-2020. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν 58. Ανήκαν σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες και συγκεκριμένα τα 25 ήταν της ποικιλίας Κορωνέικη, τα 7 της Αδραμυτιανής και τα υπόλοιπα 26 της Κολοβής. Τα 25 δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικη προέχονταν από την Πελοπόννησο και πιο συγκεκριμένα τα 5 από το νομό Κορινθίας και τα 20 από το νομό Μεσσηνίας. Τα υπόλοιπα 33 δείγματα των ποικιλιών Κολοβή και Αδραμυτιανή προέρχονταν από τη Λέσβο. Ο κωδικός του κάθε ελαιολάδου, καθώς και η ποικιλία - προέλευση, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

*Πίνακας 3: Δείγματα ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη*

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΥΠΟΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ
KOR_MES_OO_13	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_14	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_15	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_16	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_17	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_18	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΤΡΙΦΥΛΛΙΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_19	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MESS_OO_20	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_21	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_22	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_23	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_24	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_25	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_26	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_27	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_28	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_29	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_30	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_31	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_MES_OO_32	ΜΕΣΣΗΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΑΤΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_KOR_OO_01	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΑΘΙΚΙΑ (ΛΑΚΚΑ ΣΕΣΙ)	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ

KOR_KOR_00_02	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΑΡΧ. ΝΕΜΕΑ (ΣΠΗΛΙΤΣΑ)	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ(ΜΕΣΟΚΑΠΡΗ)
KOR_KOR_00_03	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΞΥΛΟΚΕΡΙΖΑ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_KOR_00_04	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΑΓΙΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ	ΚΩΡΩΝΕΙΚΗ
KOR_KOR_00_05	ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΑΡΧ. ΚΟΡΙΝΘΟΣ	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ
KOL_LES_00_17	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_18	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
ADR_LES_00_19	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
KOL_LES_00_20	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_21	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_22	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_23	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_24	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_25	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_26	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
ADR_LES_00_27	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
ADR_LES_00_28	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
ADR_LES_00_29	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
ADR_LES_00_30	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
ADR_LES_00_31	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
ADR_LES_00_32	ΛΕΣΒΟΣ		ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ
KOL_LES_00_33	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_34	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_35	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_36	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_37	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_38	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_39	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_40	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_41	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_42	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_43	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_44	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_45	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_46	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_00_47	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ

KOL_LES_OO_48	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ
KOL_LES_OO_49	ΛΕΣΒΟΣ		ΚΟΛΟΒΗ

### 3.2 Προσδιορισμός σκουαλενίου με Υγρή Χρωματογραφία

Ο προσδιορισμός του σκουαλενίου στα δείγματα ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης με Ανιχνευτή Συστοιχίας Φωτοδιόδων (HPLC-DAD), αφού προηγουμένως απομονώθηκε το κλάσμα του σκουαλενίου με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE- Solid Phase Extraction). Η μέθοδος βασίζεται σε αυτή που περιγράφεται από τους [Perez-Camino et al., \(2002\)](#) και [Grigoriadou et al., \(2007\)](#). Τα φυσίγγια SPE παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.

#### Εργαστηριακός εξοπλισμός

##### Υλικά- Σκεύη

- ❖ Κενά φυσίγγια SPE
- ❖ Πηκτή πυριτίας - Silica gel 60 (70-230 Mesh ASTM, for column chromatography)
- ❖ Ποτήρια ζέσεως
- ❖ Πιπέτες Pasteur
- ❖ Ογκομετρικές φιάλες 10mL
- ❖ Φιαλίδια των 1,5mL με βιδωτό πώμα
- ❖ Σιφώνια του 1mL και 2mL
- ❖ Μηχανική πιπέτα
- ❖ Σφαιρικές φιάλες ζέσεως
- ❖ Γυάλινο χωνί
- ❖ Γυάλινη ράβδος
- ❖ Μικροσύριγγες GasTight των 50μL, 100μL, 500μL, 1mL

##### Συσκευές

- ❖ Αναλυτικός ζυγός (ακρίβεια 0,1mg)
- ❖ Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού
- ❖ Σύστημα HPLC της εταιρείας Perkin Elmer, μοντέλο Flexar, αποτελούμενο από αντλία με σύστημα απαέρωσης διαλυτών, αυτόματο δειγματολήπτη, συσκευή θερμοστάτησης στηλών και Ανιχνευτή Συστοιχίας Φωτοδιόδων.

##### Αντιδραστήρια

- ❖ Σκουαλένιο, 99%
- ❖ Εξάνιο (αναλυτικής καθαρότητας)
- ❖ Ακετόνη (αναλυτικής καθαρότητας)
- ❖ Ακετονιτρίλιο (καθαρότητας HPLC)
- ❖ Αέριο άζωτο

## Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

### Παρασκευή πρότυπου μητρικού διαλύματος σκουαλενίου

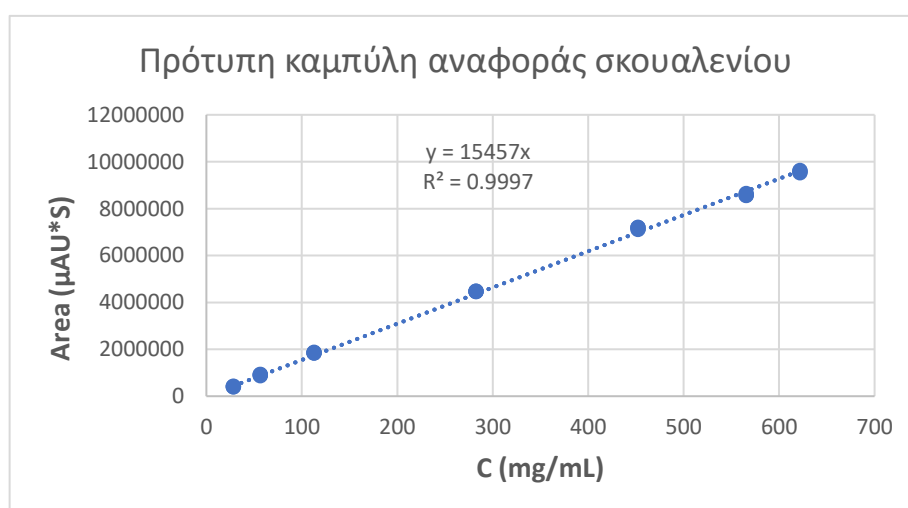
Ζυγίζεται 0,1g (με ακρίβεια 0,1 mg) σκουαλενίου σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και συμπληρώνεται με εξάνιο μέχρι τη χαραγή. Η συγκέντρωση είναι 10mg/mL.

### Παρασκευή πρότυπου διαλύματος εργασίας σκουαλενίου

Από το πρότυπο μητρικό διάλυμα σκουαλενίου μεταφέρεται 1mL σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με εξάνιο. Η συγκέντρωση είναι 1000μg/μL.

### Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων βαθμονόμησης

Από το διάλυμα εργασίας (1000μg/μL) παραλαμβάνονται με μικροσύριγγα GasTight 25, 50, 100, 250, 400, 500, 550 μL και μεταφέρονται σε φιαλίδια των 1,5mL με βιδωτό πώμα. Ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου κι ύστερα προστίθεται 1mL ακετόνης για την επαναδιάλυση του σκουαλενίου. Μετά από ανάλυση στο χρωματογράφο προέκυψε η ακόλουθη καμπύλη αναφοράς (**Διάγραμμα 1**).



**Διάγραμμα 1:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς σκουαλενίου με HPLC

## Πειραματική διαδικασία

### Απομόνωση σκουαλενίου με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων της απομόνωσης του σκουαλενίου προηγήθηκαν δοκιμές έκλουσης από τα φυσιγγία SPE με 10, 12 και 15 mL εξανίου σύμφωνα με την πορεία που περιγράφεται στη συνέχεια και βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο επιλέχθηκε η έκλουση με 15mL εξανίου.

- ❖ Σε κάθε φυσιγγίο προστίθεται περίπου 1g Silica gel, η οποία προηγουμένως έχει θερμανθεί σε φούρνο στους 120°C για 24 ώρες και στη συνέχεια έχει προστεθεί απιονισμένο νερό σε ποσοστό 2% της μάζας της.
- ❖ Προστίθεται μια ποσότητα εξανίου περίπου μέχρι τη μέση και ακολουθεί ανάδευση με γυάλινη ράβδο έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες. Αφού το στρώμα Silica έχει πακτωθεί, αφήνεται να εκλουστεί το εξάνιο με τη βαρύτητα με ροή 0,5mL/min περίπου.
- ❖ Ακολουθεί ακόμη μια έκλυση με 6mL εξανίου σε κάθε φυσιγγίο.
- ❖ Στο φυσιγγίο μεταφέρεται με μηχανική πιπέτα 0,1g δείγματος ελαιολάδου, αφού προηγουμένως έχει διαλυτοποιηθεί σε φιαλίδιο με 0,5mL εξανίου. Τα τοιχώματα του φιαλιδίου εκπλένονται δύο φορές με 0,5mL εξανίου την κάθε φορά και η υπολοιπούμενη ποσότητα μεταφέρεται εντός του φυσιγγίου.
- ❖ Αφήνεται να εισέλθει όλη η ποσότητα του δείγματος στη στατική φάση με ροή <0,5 mL/min.
- ❖ Το κλάσμα του σκουαλενίου εκλύεται με 15 mL εξάνιο και συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη.
- ❖ Ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού (40°C) και το κλάσμα σκουαλενίου επαναδιαλύεται με την προσθήκη 2 mL ακετόνης.
- ❖ Ακολουθεί ανάλυση HPLC.

#### **Πειραματική πορεία για την HPLC-DAD**

Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία.

*Πίνακας 4: Συνθήκες ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία*

Ανιχνευτής	Συστοιχίας Διόδων με εύρος σάρωσης 200-400 nm
Στήλη χρωματογραφίας	Waters Shperisorb 5μm ODS2 4.6mm x 250mm
Ισοκρατικό σύστημα διαλυτών έκλυσης	Ακετονιτρίλιο:ακετόνη 70:30 v/v
Ροή κινητής φάσης	1,5mL/min
Όγκος έγχυσης δείγματος	10μL
Μήκος κύματος προσδιορισμού	215nm
Θερμοκρασία στήλης	30°C
Χρόνος ανάλυσης	7min

- ❖ Πραγματοποιείται διήθηση των διαλυτών της κινητής φάσης με συσκευή διήθησης Millipore.
- ❖ Πριν ξεκινήσει η ανάλυση, η στήλη εξισορροπείται εκλύοντας κινητή φάση για 15 λεπτά προκειμένου να εξισορροπηθεί το σύστημα.

- ❖ Τα δείγματα τοποθετούνται στο δίσκο του αυτόματου δειγματολήπτη. Ο όγκος έγχυσης ορίζεται σε 10μL.
- ❖ Τα χρωματογραφήματα καταγράφονται στα 215nm.

## Επικύρωση της μεθόδου

### Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με απομόνωση και προσδιορισμό του σκουαλενίου σε ένα δείγμα ελαιολάδου της ποικιλίας Κολοβή με προέλευση από τη Λέσβο και σε ένα δείγμα ηλιελαίου. Πραγματοποιήθηκαν 5 επαναληπτικοί προσδιορισμοί για κάθε έλαιο.

### Ανάκτηση

Ο έλεγχος της ανάκτησης έγινε σε 3 επίπεδα εμβολιασμού: 700mg/kg, 5000mg/kg και 10000mg/kg. Για τα πρώτο επίπεδο χρησιμοποιήθηκε το δείγμα ηλιελαίου και για τα υπόλοιπα δύο επίπεδα το δείγμα ελαιολάδου, τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως στον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας.

- ❖ Αρχικά υπολογίζεται η ποσότητα σκουαλενίου που πρέπει να προστεθεί στο δείγμα με βάση την αρχική συγκέντρωση που είχε το έλαιο και την επιθυμητή τελική για κάθε επίπεδο εμβολιασμού.
- ❖ Ζυγίζεται 0,1g δείγματος ελαιολάδου/ηλιελαίου σε φιαλίδιο των 1,5mL και προστίθεται σε αυτό με μικροσύριγγα ο απαιτούμενος όγκος του διαλύματος εργασίας σκουαλενίου (1000μg/mL) για κάθε επίπεδο εμβολιασμού.

Η ίδια πειραματική πορεία της εκχύλισης SPE και της ανάλυσης HPLC ακολουθείται 5 φορές για το κάθε επίπεδο.

### Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα του μοντέλου ελέγχθηκε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης σε εύρος συγκεντρώσεων 28-1000μg/mL και βρέθηκε ικανοποιητική έως τα 622μg/mL.

### Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) αποτελεί το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης παραμέτρου που μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα. Ως όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση προσδιοριζόμενης ουσίας που μπορεί να διακριθεί από τη μηδενική συγκέντρωση. Για τον υπολογισμό τους χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης και οι τύποι:

$$\text{LOD}=3.3 \cdot \text{Sa} / \text{κλίση}$$

$$\text{LOQ}=10 \cdot \text{Sa} / \text{κλίση}$$

Όπου Sa= τυπική απόκλιση της τεταγμένης.

### 3.3 Προσδιορισμός σκουαλενίου και σύστασης λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του σκουαλενίου και η σύσταση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα με Αέρια Χρωματογραφία, μετά από μετεστεροποίηση της λιπαρής ύλης όπως περιγράφεται από τον κανονισμό (EEC) No 2568/91.

#### Εργαστηριακός εξοπλισμός

##### Υλικά- Σκεύη

- ❖ Ογκομετρικές φιάλες των 10, 25, 100mL
- ❖ Σιφώνιο πλήρωσεως των 2mL
- ❖ Σιφώνιο του 1mL
- ❖ Σύριγγα Gas-Tight
- ❖ Φιαλίδια με βιδωτό πώμα (10mL)
- ❖ Φιαλίδια των 2mL
- ❖ Πιπέτες Pasteur

##### Συσκευές

- ❖ Αναλυτικός ζυγός
- ❖ Σύστημα Αέριας Χρωματογραφίας με Ανιχνευτή Ιοντισμού Φλόγας (Shimadzu GC2010 Plus) και αυτόματο δειγματολήπτη

##### Αντιδραστήρια

- ❖ Επτάνιο (χρωματογραφικής καθαρότητας)
- ❖ Μεθανόλη (αναλυτικής καθαρότητας)
- ❖ Μεθανολικό διάλυμα KOH 2M: Για την παρασκευή του διαλύονται 11,2g KOH σε 100mL μεθανόλης
- ❖ Σκουαλένιο, 99%
- ❖ Τετραδεκάνιο, 99%
- ❖ Σκουαλάνιο, 99%

##### Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας

Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων με Αέρια Χρωματογραφία.

*Πίνακας 5: Συνθήκες αέριας χρωματογραφίας*

Στήλη χρωματογραφίας	Agilent CP-Wax 52CB (30 m*0,32 mm i.d., d.f. 0,25μm)
Θερμοκρασία εισαγωγέα	250
Θερμοκρασία FID	270
Φέρον αέριο	Ήλιο (He)
Όγκος έγχυσης δείγματος	1μL
Λόγος διαμοιρασμού (split ratio)	1/100
Χρόνος ανάλυσης	35

### Παρασκευή διαλυμάτων

#### Διαλύματα παρακαταθήκης εσωτερικών προτύπων

- ❖ Διάλυμα σκουαλανίου (7,5mg/mL): Ζυγίζεται 0,075g σκουαλανίου σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με επτάνιο.
- ❖ Διάλυμα τετραδεκανίου (7,5mg/mL): Ζυγίζεται 0,075g τετραδεκανίου σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με επτάνιο.

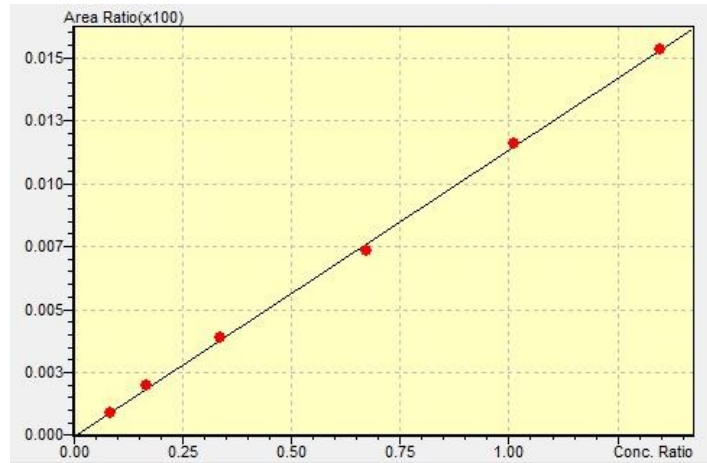
#### Διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων

Διάλυμα εργασίας σκουαλανίου και τετραδεκανίου (300μg/mL): Σε ογκομετρική φιάλη των 25mL μεταφέρεται 1mL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης εσωτερικών προτύπων και συμπληρώνεται με επτάνιο μέχρι τη χαραγή.

#### Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης σκουαλενίου

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης είχαν συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 300, 400 και 500μg/mL. Από μητρικό διάλυμα σκουαλενίου σε επτάνιο (10mg/mL) μεταφέρθηκαν 25, 50, 100, 200, 300, 400 και 500μL με σύριγγα GasTight σε ογκομετρικές φιάλες των 10mL στις οποίες προστέθηκαν 400μL από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης εσωτερικών προτύπων (σκουαλάνιο 7,5mg/mL, τετραδεκάνιο 7,5mg/mL) και συμπληρώθηκαν με επτάνιο μέχρι τη χαραγή. Μετά από ανάλυση στην Αέριο Χρωματογράφο προέκυψε η ακόλουθη καμπύλη αναφοράς (**Διάγραμμα 2**).





**Διάγραμμα 2:** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς σκουαλενίου με GC

## Πειραματική διαδικασία

### Παρασκευή μεθυλεστέρων

Σε φιαλίδιο των 5mL με βιδωτό πώμα με παρέμβυσμα από τεφλόν-σιλικόνη ζυγίζεται 0,1g ελαιολάδου (με ακρίβεια 0,1mg). Στη συνέχεια προστίθενται 2mL από το διάλυμα εργασίας εσωτερικών προτύπων (300μg/mL) και 0,2mL μεθανολικού διαλύματος KOH 2M. Στη συνέχεια, το μίγμα αναδεύεται έντονα για 1 λεπτό και αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 20 λεπτά, προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις και να διαυγάσει η ανώτερη στιβάδα. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων, μια ποσότητα από την ανώτερη στιβάδα που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων και το σκουαλένιο μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 2mL με βιδωτό πώμα. Το φιαλίδιο τοποθετείται στον αυτόματο δειγματολήπτη του αέριου χρωματογράφου.

### Επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού σκουαλενίου

#### Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με προσδιορισμό του σκουαλενίου σε ένα δείγμα ελαιολάδου 3 φορές. Χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα ελαιολάδου και ηλιελαίου που χρησιμοποιήθηκαν και για την επικύρωση της μεθόδου HPLC.

#### Ανάκτηση

Ο έλεγχος της ανάκτησης πραγματοποιήθηκε σε 3 επίπεδα εμβολιασμού: 700mg/kg, 5000mg/kg και 10000mg/kg. Για τα πρώτο επίπεδο χρησιμοποιήθηκε το δείγμα ηλιελαίου και για τα άλλα δύο το δείγμα ελαιολάδου.

- ❖ Παρασκευάζεται διάλυμα σκουαλενίου σε επτάνιο για τους εμβολιασμούς με συγκέντρωση 10mg/mL. Σε ογκομετρική φιάλη των 10mL μεταφέρεται 0,1g σκουαλενίου και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με επτάνιο.

- ❖ Υπολογίζεται η απαιτούμενη ποσότητα σκουαλενίου που πρέπει να προστεθεί από το διάλυμα σκουαλενίου 10mg/mL στα δείγματα για κάθε επίπεδο εμβολιασμού βάσει της αρχικής και της επιθυμητής συγκέντρωσης του ελαίου.
- ❖ Ζυγίζεται 0,1g ελαιολάδου/ηλιελαίου σε φιαλίδιο των 5mL και προστίθεται σε αυτό ο απαιτούμενος όγκος του διαλύματος σκουαλενίου (10mg/mL) για κάθε επίπεδο εμβολιασμού με μικροσύριγγα GasTight.
- ❖ Ακολουθεί η ίδια πορεία προκατεργασίας των δειγμάτων και η έγχυση στον αέριο χρωματογράφο. Για κάθε επίπεδο εμβολιασμού πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

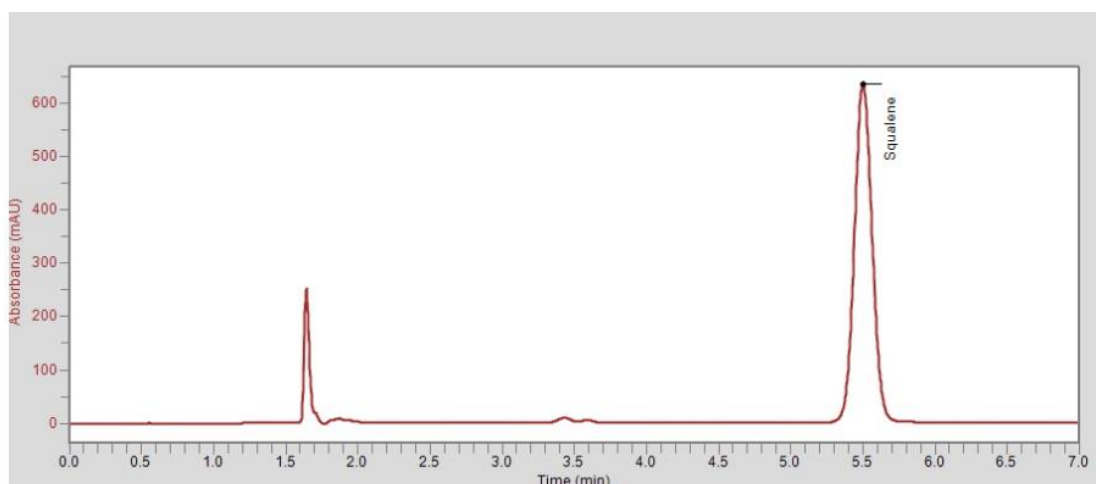
### **Γραμμικότητα**

Η γραμμικότητα του μοντέλου ελέγχθηκε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης σε εύρος συγκεντρώσεων 25-500μg/mL και βρέθηκε ικανοποιητική.

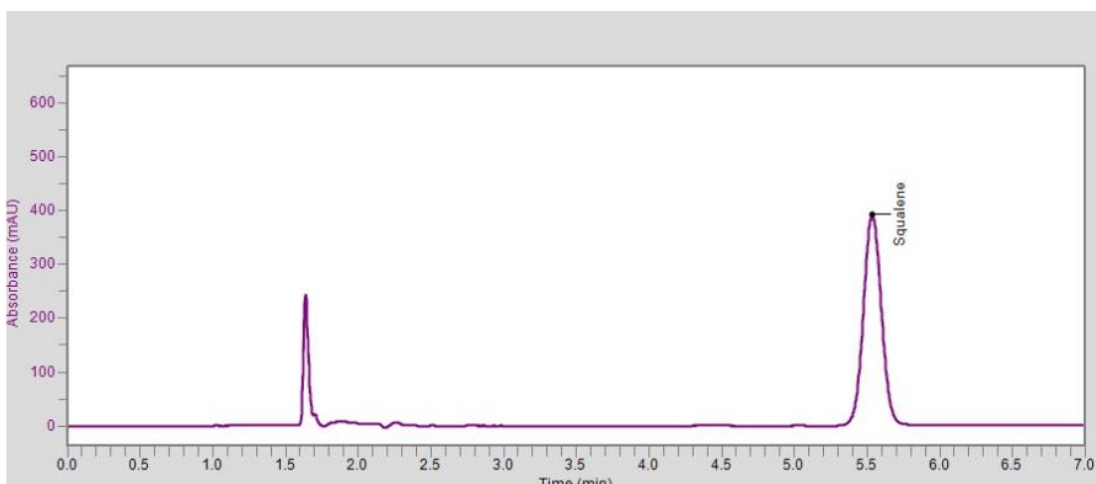
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Αποτελέσματα προσδιορισμού σκουαλενίου με HPLC

Αναλύθηκαν 58 δείγματα μονοποικιλιακών εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων με τη μέθοδο SPE-HPLC που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2. Για την εύρεση του βέλτιστου όγκου εξανίου που χρησιμοποιήθηκε για την έκλυση του σκουαλενίου από τα φυσίγγια SPE προηγήθηκαν δοκιμές έκλυσης με 10, 12 και 15mL εξανίου σε δείγμα ελαιολάδου. Υποβάλλοντας τις συγκεντρώσεις σκουαλενίου που παρελήφθησαν από τις δοκιμές αυτές σε ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) για τη σύγκριση πολλαπλών δειγμάτων, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά (P-Value= 0,0221) μεταξύ των δοκιμών με 10, 12 και 15mL, με την τελευταία να οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σκουαλενίου από τις υπόλοιπες. Συνεπώς, η έκλυση του σκουαλενίου από τα φυσίγγια SPE στα δείγματα ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε με 15mL εξανίου. Η απουσία συνέκλυσης τριακυλογλυκερολών ελέγχθηκε με HPLC. Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του προτύπου δείγματος 250μg/mL και στην **Εικόνα 7** ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα του δείγματος KOL\_LES\_OO\_26.



**Εικόνα 6:** Χρωματογράφημα προτύπου δείγματος 250μg/mL



**Εικόνα 7:** Χρωματογράφημα του δείγματος KOL\_LES\_OO\_26

## Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα βρέθηκε πολύ ικανοποιητική στο δείγμα ελαιολάδου (RSD= 1,6%) και μάλιστα ήταν καλύτερη από τις τιμές που αναφέρονται από τους Grigoriadou et al., (2007) (RSD=4.6% και 6,4%) και από τους Perez-Camino et al., (2002) για SPE-GC (RSD=3,5-6,0%).

Στο δείγμα ηλιελαίου, η επαναληψιμότητα βρέθηκε λιγότερο ικανοποιητική (RSD=6,2%). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση σκουαλενίου στο ηλιέλαιο ήταν αρκετά χαμηλή (μέση τιμή = 162 mg/kg) στο όριο ανίχνευσης της μεθόδου, ενώ η καμπύλη βαθμονόμησης αφορούσε σε περιοχές μεγαλύτερης συγκέντρωσης με βάση τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν (>550mg/kg).

## Ανάκτηση

Ο έλεγχος της ανάκτησης πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα: 700, 5000, 10000mg/kg. Βρέθηκε αρκετά ικανοποιητική και για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού και ίση με 111,9±6,6%, 88,6±3,7% και 100,1±3,7% αντίστοιχα. Η επαναληψιμότητα της ανάκτησης βρέθηκε ικανοποιητική και για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού με CV=4,8%, 3,4% και 3,0% αντίστοιχα. Οι τιμές ανάκτησης που αναφέρουν οι Grigoriadou et al., (2007) για επίπεδα συγκέντρωσης 700 και 4000mg/kg είναι 88±9% και 85±4% αντίστοιχα.

## Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) βρέθηκε 167mg/kg και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 507mg/kg.

### 4.1.1 Περιεκτικότητα σκουαλενίου προσδιορισμένη με HPLC σε δείγματα ελληνικών ελαιολάδων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό του σκουαλενίου με την τεχνική HPLC στα 58 δείγματα ελαιολάδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 εκφρασμένα σε mg/kg ελαιολάδου. Επιπλέον φαίνεται η προέλευση του κάθε δείγματος, καθώς και η ποικιλία της ελιάς. Τα 25 δείγματα είναι της ποικιλίας Κορωνέικης, τα 7 της Αδραμυτιανής και τα υπόλοιπα 26 της Κολοβής.

*Πίνακας 6: Περιεκτικότητα σκουαλενίου (mg/kg) στα δείγματα ελαιολάδου μετά από ανάλυση με HPLC. Τα δείγματα με μπλε χρώμα προέρχονται από την Πελοπόννησο ενώ τα πράσινα από τη Λέσβο.*

Δείγμα ελαιολάδου	Ποικιλία	Προέλευση	Υποπεριοχή	Σκουαλένιο (mg/kg)
KOR_MES_OO_13	Κορωνεικη	Μεσσηνία	Τριφυλλία	4190
KOR_MES_OO_14	Κορωνεικη	Μεσσηνία	Τριφυλλία	6415
KOR_MES_OO_15	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Τριφυλλία	3724
KOR_MES_OO_16	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Τριφυλλία	4499
KOR_MES_OO_17	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Τριφυλλία	4066
KOR_MES_OO_18	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Τριφυλλία	4917
KOR_MES_OO_19	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3915

KOR_MES_OO_20	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3725
KOR_MES_OO_21	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	4269
KOR_MES_OO_22	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3620
KOR_MES_OO_23	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3948
KOR_MES_OO_24	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3779
KOR_MES_OO_25	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	4670
KOR_MES_OO_26	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3890
KOR_MES_OO_27	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	4860
KOR_MES_OO_28	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	4556
KOR_MES_OO_29	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	4332
KOR_MES_OO_30	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	4242
KOR_MES_OO_31	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3717
KOR_MES_OO_32	Κορωνέικη	Μεσσηνία	Καλαμάτα	3396
KOR_KOR_OO_01	Κορωνέικη	Κόρινθος	Αθήκια	4202
KOR_KOR_OO_02	Κορωνέικη	Κόρινθος	Αρχ. Νεμέα	4959
KOR_KOR_OO_03	Κορωνέικη	Κόρινθος	Ξυλοκέριζα	5627
KOR_KOR_OO_04	Κορωνέικη	Κόρινθος	Αγ.Βασίλειος	6327
KOR_KOR_OO_05	Κορωνέικη	Κόρινθος	Αρχ.Κόρινθος	5645
KOL_LES_OO_17	Κολοβή	Λέσβος		4821
KOL_LES_OO_18	Κολοβή	Λέσβος		3328
ADR_LES_OO_19	Αδραμυτιανή	Λέσβος		5072
KOL_LES_OO_20	Κολοβή	Λέσβος		3424
KOL_LES_OO_21	Κολοβή	Λέσβος		2690
KOL_LES_OO_22	Κολοβή	Λέσβος		3846
KOL_LES_OO_23	Κολοβή	Λέσβος		3882
KOL_LES_OO_24	Κολοβή	Λέσβος		4360
KOL_LES_OO_25	Κολοβή	Λέσβος		2960
KOL_LES_OO_26	Κολοβή	Λέσβος		3693
ADR_LES_OO_27	Αδραμυτιανή	Λέσβος		2199
ADR_LES_OO_28	Αδραμυτιανή	Λέσβος		2167
ADR_LES_OO_29	Αδραμυτιανή	Λέσβος		2768
ADR_LES_OO_30	Αδραμυτιανή	Λέσβος		2610
ADR_LES_OO_31	Αδραμυτιανή	Λέσβος		2841
ADR_LES_OO_32	Αδραμυτιανή	Λέσβος		2840
KOL_LES_OO_33	Κολοβή	Λέσβος		3597
KOL_LES_OO_34	Κολοβή	Λέσβος		4859
KOL_LES_OO_35	Κολοβή	Λέσβος		3962
KOL_LES_OO_36	Κολοβή	Λέσβος		2998
KOL_LES_OO_37	Κολοβή	Λέσβος		2793
KOL_LES_OO_38	Κολοβή	Λέσβος		2648
KOL_LES_OO_39	Κολοβή	Λέσβος		2733
KOL_LES_OO_40	Κολοβή	Λέσβος		3311
KOL_LES_OO_41	Κολοβή	Λέσβος		3448
KOL_LES_OO_42	Κολοβή	Λέσβος		2397
KOL_LES_OO_43	Κολοβή	Λέσβος		3468
KOL_LES_OO_44	Κολοβή	Λέσβος		3514

KOL_LES_OO_45	Κολοβή	Λέσβος		3700
KOL_LES_OO_46	Κολοβή	Λέσβος		3284
KOL_LES_OO_47	Κολοβή	Λέσβος		3380
KOL_LES_OO_48	Κολοβή	Λέσβος		3850
KOL_LES_OO_49	Κολοβή	Λέσβος		3678

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης σκουαλενίου από το σύνολο των 58 δειγμάτων ελαιολάδων είναι 3838 mg/kg, ενώ οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 2167 και 6415 mg/kg. Ο συντελεστής μεταβλητότητας (RSD%) είναι ίσος με 24,38%.

#### 4.1.2 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ελαιολάδων υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση μέσω του λογισμικού **Statgraphics Centurion**. Το δείγμα *ADR\_LES\_OO\_19* δεν συμπεριλήφθηκε στους στατιστικούς ελέγχους διότι αποτελεί έκτροπη τιμή της ποικιλίας Αδραμυτιανή (πραγματοποιήθηκε έλεγχος με τη δοκιμασία Grubb's test).

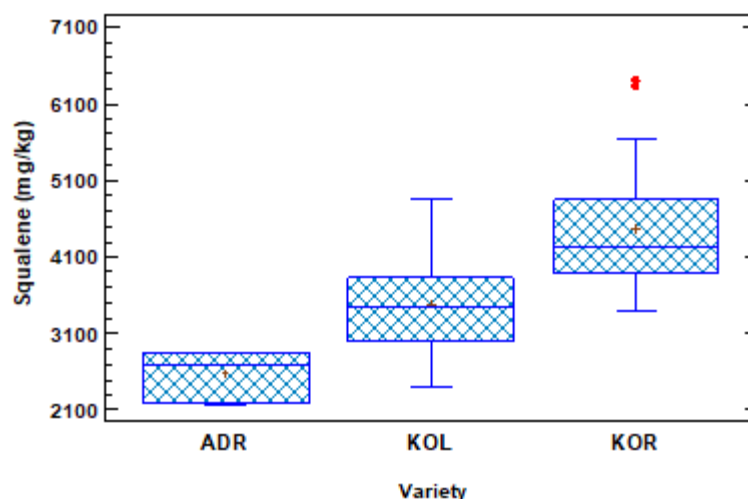
##### 4.1.2.1 Επίδραση ποικιλίας ελαιολάδου

Αρχικά, διερευνήθηκε εάν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά της περιεκτικότητας σκουαλενίου ανάμεσα στις ποικιλίες Κορωνέικη, Κολοβή και Αδραμυτιανή. Κάτι τέτοιο θα υποδείκνυε ότι η ποικιλία της ελιάς επηρεάζει την περιεκτικότητα σκουαλενίου, όπως έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες. Από το σύνολο των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση, τα 25 ανήκουν στην ποικιλία Κορωνέικη, τα 6 στην Αδραμυτιανή και τα υπόλοιπα 26 στην Κολοβή. Στον **Πίνακα 7** παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία κάθε ποικιλίας βάσει των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

*Πίνακας 7: Στατιστικά στοιχεία για τις ποικιλίες Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή*

Ποικιλία	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	RSD%	Εύρος
Κορωνέικη	4460	815	18	3018
Κολοβή	3486	613	17	2462
Αδραμυτιανή	2571	312	12	673

Μεγαλύτερη μέση τιμή παρουσίασε η ποικιλία Κορωνέικη (4460 mg/kg), δεύτερη ήταν η Κολοβή (3486 mg/kg) και τέλος η Αδραμυτιανή (2571 mg/kg). Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε μονόδρομη ανάλυση της διακύμανσης (*One-Way ANOVA*). Στο **Διάγραμμα 3** που ακολουθεί βλέπουμε τα θηκογράμματα των τριών ποικιλιών. Από αυτό δίνεται μια πρώτη ένδειξη για το ότι η μέση περιεκτικότητα σκουαλενίου ανάμεσα στις τρεις ποικιλίες διαφέρει



**Διάγραμμα 3:** Θηκογράμματα των ποικιλιών Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή

Ο έλεγχος ANOVA για τα δείγματα των τριών ποικιλιών έδωσε P-Value<0.01, πράγμα που σημαίνει ότι σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών της περιεκτικότητας σκουαλενίου των τριών ποικιλιών. Στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν ομαδοποιήσεις ή διαφορές μεταξύ των ποικιλιών. Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος Fisher's Least Significant Difference (LSD), σύμφωνα με τον οποίο οι μέσες τιμές της περιεκτικότητας σκουαλενίου των τριών ποικιλιών διαφέρουν όλες μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

**Πίνακας 8:** LSD test. Το \* σημαίνει πως υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά

Σύγκριση		Διαφορά	+/- Όρια
Αδραμυτιανή – Κολοβή	*	-915,055	628,442
Αδραμυτιανή - Κορωνέικη	*	-1888,96	630,795
Κολοβή - Κορωνέικη	*	-973,904	388,67

#### 4.1.2.2 Επίδραση γεωγραφικής προέλευσης ελαιολάδου

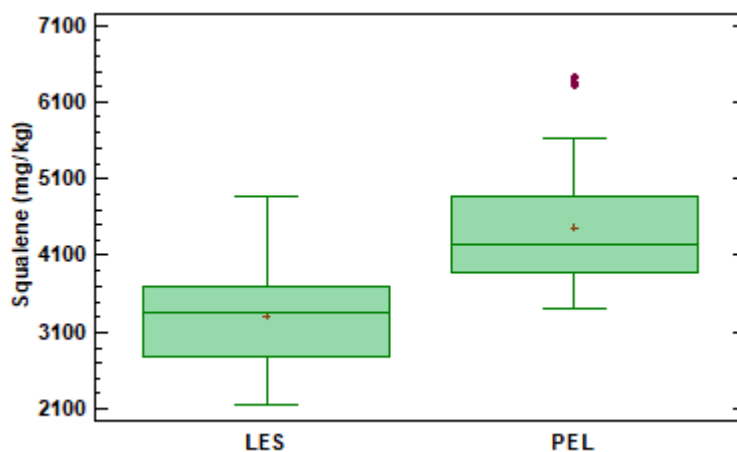
Ομαδοποιώντας τα δείγματα σύμφωνα με τη γεωγραφική τους προέλευση- Πελοπόννησος και Λέσβος- διερευνήθηκε εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα σκουαλενίου μεταξύ των δειγμάτων των δύο γεωγραφικών προελεύσεων.

Τα δείγματα που προέρχονται από την Πελοπόννησο είναι 25 και τα υπόλοιπα 32 προέρχονται από τη Λέσβο. Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία των δειγμάτων από την Πελοπόννησο και τη Λέσβο. Τα δείγματα που παρέρχονται από την Πελοπόννησο είχαν μεγαλύτερη μέση τιμή συγκέντρωσης σκουαλενίου (4460mg/kg) σε σχέση με τα δείγματα της Λέσβου (3314mg/kg).

**Πίνακας 9:** Στατιστικά στοιχεία για τα ελαιόλαδα από την Πελοπόννησο και τη Λέσβο

Προέλευση	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	RSD%	Εύρος
Πελοπόννησος	4460	815	18	3018
Λέσβος	3314	671	20	2692

Στο **Διάγραμμα 4** παρουσιάζονται τα θηκογράμματα των δύο περιοχών προέλευσης, από όπου φαίνεται ότι η διάμεσος είναι μεγαλύτερη στα δείγματα της Πελοποννήσου.



**Διάγραμμα 4:** Θηκογράμματα των ελαιολάδων που προέρχονται από την Πελοπόννησο(PEL) και τη Λέσβο(LES).

Από τη σύγκριση των μέσων τιμών των δειγμάτων από την Πελοπόννησο και τη Λέσβο με Student's-test προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P\text{-value} < 0,05$ ) μεταξύ των δύο γεωγραφικών περιοχών. Τα δείγματα από την Πελοπόννησο χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη συγκέντρωση σκουαλενίου με μέση τιμή 4460 ( $\pm 816$ ) mg/kg ενώ τα δείγματα από τη Λέσβο είχαν μέση τιμή 3315 ( $\pm 672$ ) mg/kg.

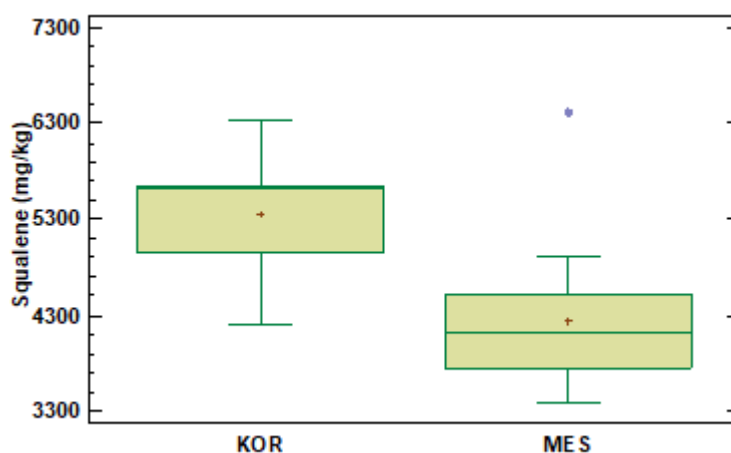
Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια ακόμη στατιστική ανάλυση με t-test ανάμεσα στα αποτελέσματα των δειγμάτων της ποικιλίας Κορωνέικη, με την ομαδοποίηση αυτή τη φορά να γίνεται με βάση το νομό από τον οποίο προέρχεται κάθε δείγμα, δηλαδή από τους νομούς Μεσσηνίας και Κορινθίας. Τα δείγματα από το νομό Μεσσηνίας είναι 20 και από το νομό Κορινθίας 5 και στον **Πίνακα 10** παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία για τα δείγματα κάθε νομού.

**Πίνακας 10:** Στατιστικά στοιχεία των δειγμάτων των νομών Μεσσηνίας, Κορινθίας

Νομός	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	RSD%	Εύρος
Μεσσηνίας	4236	664	15	3018
Κορινθίας	5353	804	15	2124



Στο **Διάγραμμα 5** παρουσιάζονται τα θηκογράμματα των δειγμάτων των δύο νομών και αρχικά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα δείγματα ελαιολάδων που προέρχονται από το ν. Κορινθίας φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σκουαλενίου.



**Διάγραμμα 5:** Θηκογράμματα των νομών Μεσσηνίας, Κορινθίας, Λέσβου.

Από τη σύγκριση των μέσων τιμών με Student's test προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P\text{-Value} < 0,05$ ). Τα δείγματα του νομού Κορινθίας χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη περιεκτικότητα σκουαλενίου (5353 mg/kg) και ακολουθούν τα δείγματα του νομού Μεσσηνίας με μέση τιμή 4237 mg/kg. Παρ' όλα αυτά, το συμπέρασμα αυτό κατατίθεται με επιφύλαξη, καθώς ο αριθμός των δειγμάτων από το νομό Κορινθίας ήταν αρκετά μικρός ( $n=5$ ).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συγκέντρωση του σκουαλενίου στο παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ 200 έως 7500 mg/kg αλλά έχουν αναφερθεί και ακόμα μεγαλύτερες τιμές (800-12000 mg/kg) (Lanzón et al., 1994; Boskou, 2006). Στη μελέτη των Grigoriadou et al., (2007) όπου ο προσδιορισμός σκουαλενίου πραγματοποιήθηκε με παρόμοια μέθοδο (SPE-HPLC), τα επίπεδα του σκουαλενίου κυμάνθηκαν μεταξύ 2000-5100 mg/kg. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τις τιμές της βιβλιογραφίας καθώς κυμαίνονται μεταξύ 2168-6416 mg/kg.

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η ποικιλία του ελαιολάδου φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα σκουαλενίου, κάτι που υποστηρίζεται από μια σειρά μελετών. Πιο συγκεκριμένα, οι Fernández-Cuesta et al., (2013) εντόπισαν αξιοσημείωτη διαφορά στη συγκέντρωση σκουαλενίου μεταξύ των ισπανικών ποικιλιών "Picual" και "Arbequina". Τις ποικιλίες Κορωνέικη και Κολοβή που χρησιμοποιήθηκαν και για την παρούσα μελέτη, σύγκριναν και οι Mikrou et al., (2020) ως προς την περιεκτικότητα σε σκουαλένιο και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ποικιλία Κορωνέικη έχει στατιστικά μεγαλύτερη συγκέντρωση σκουαλενίου ( $8576 \pm 1546$  mg/kg) σε σχέση με την Κολοβή ( $5440 \pm 822$  mg/kg).

Τα συμπεράσματα αυτά φαίνεται να επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην περιεκτικότητα σκουαλενίου μεταξύ των τριών ποικιλιών. Η ποικιλία Κορωνέικη έδωσε την υψηλότερη μέση συγκέντρωση ( $4460 \pm 815 \text{mg/kg}$ ), στη συνέχεια ήταν η Κολοβή ( $3486 \pm 613 \text{mg/kg}$ ) και τέλος η Αδραμυτιανή ( $2571 \pm 312 \text{mg/kg}$ ). Σε συμφωνία με τους Mikrou et al., (2020), η περιεκτικότητα σκουαλενίου στην ποικιλία Κορωνέικη βρέθηκε υψηλότερη από αυτήν της Κολοβής, ωστόσο οι τιμές της παρούσας μελέτης είναι εμφανώς χαμηλότερες. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι τα δείγματα που χρησιμοποίησαν οι (Mikrou et al., 2020) ήταν της ελαιοπαραγωγικής περιόδου 2018-2019, ενώ τα δείγματα της παρούσας μελέτης ήταν της περιόδου 2019-2020. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συγκέντρωση σκουαλενίου, εκτός από την ποικιλία, επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων κι ένας από αυτούς είναι και η κλιματικές συνθήκες της κάθε περιόδου. Αυτό υποδεικνύεται και από τη μελέτη των Tsotsou&Tsimidou, (2004), όπου μελετώντας ελληνικά ελαιόλαδα της περιόδου 2002-2003, η οποία δε θεωρείται μια «τυπική ελαιοπαραγωγική περίοδος» καθώς έδωσε χαμηλότερης ποιότητας ελαιόλαδα, για την ποικιλία Κορωνέικη από την Κρήτη και την Πελοπόννησο η μέση συγκέντρωση σκουαλενίου βρέθηκε μόλις  $3500 \text{mg/kg}$  (Kalogeropoulos&Tsimidou, 2014).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε συμφωνία με τους Martakos et al., (2019), ενισχύουν το συμπέρασμα ότι και η γεωγραφική προέλευση επηρεάζει την περιεκτικότητα του σκουαλενίου. Συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα είχαν τα δείγματα που προέρχονταν από την Πελοπόννησο ( $4460 \pm 815 \text{mg/kg}$ ), ενώ τα δείγματα που προέρχονταν από τη Λέσβο είχαν χαμηλότερη ( $3367 \pm 728 \text{mg/kg}$ ) με στατιστικά σημαντική διαφορά. Πρέπει παρ' όλα αυτά να σημειωθεί ότι τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη σύγκριση προέρχονταν μεν από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, παράλληλα όμως ανήκαν και σε διαφορετικές ποικιλίες, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση σκουαλενίου να επηρεάζεται και από τους δύο παράγοντες. Το συμπέρασμα λοιπόν θα ήταν σίγουρα πιο ξεκάθαρο με σύγκριση ελαιολάδων ίδιας ποικιλίας και διαφορετικής προέλευσης, έτσι ώστε το αποτέλεσμα να επηρεάζεται μόνο από τον παράγοντα της γεωγραφικής προέλευσης.

Τέλος, διαχωρίζοντας εκ νέου τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικης από την Πελοπόννησο βάσει των νομών (Μεσσηνία και Κορινθία) προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά, με τα δείγματα του νομού Κορινθίας να υπερτερούν του νομού Μεσσηνίας όσον αφορά στη συγκέντρωση σκουαλενίου. Ωστόσο, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων από το νομό Κορινθίας ( $n=5$ ) δε μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα.

## 4.2 Αποτελέσματα προσδιορισμού σκουαλενίου με GC

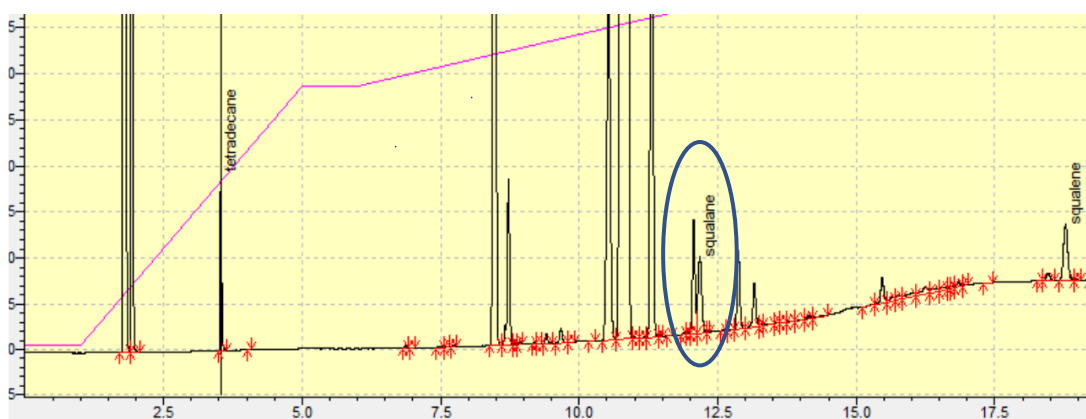
Τα δείγματα ελαιολάδου αναλύθηκαν και με την τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3. Βασικός σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα της αναπτυχθείσας μεθόδου SPE-HPLC. Για τον προσδιορισμό αρχικά εξετάστηκαν δύο διαφορετικές ουσίες

ως εσωτερικά πρότυπα, τετραδεκάνιο ( $C_{14}H_{30}$ ) και σκουαλάνιο ( $C_{30}H_{62}$ ), προκειμένου να συγκριθεί η ακρίβεια που προσφέρει κάθε μια στη μέθοδο και τελικά να επιλεγεί αυτή που εξυπηρετεί καλύτερα τους σκοπούς της ανάλυσης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος προσδιορισμός της %περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων.

### Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου βρέθηκε ικανοποιητική από τις δοκιμές σε ελαιόλαδο χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το τετραδεκάνιο (RSD=8,9%), ενώ χρησιμοποιώντας το σκουαλάνιο ήταν λιγότερο ικανοποιητική (RSD=10,3%). Επιπλέον, οι επαναλαμβανόμενες αναλύσεις στο δείγμα ηλιελαίου έδωσαν RSD=7,5% με εσωτερικό πρότυπο το τετραδεκάνιο, ενώ τα αποτελέσματα δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά με το σκουαλάνιο (RSD=20,7%).

Σύμφωνα με την μελέτη των [Perez-Camino et al., \(2002\)](#), ο προσδιορισμός του σκουαλενίου σε ελαιόλαδο με αέρια χρωματογραφία είχε καλή ακρίβεια χρησιμοποιώντας το σκουαλάνιο ως εσωτερικό πρότυπο, λόγω παρόμοιας πτητικότητας μεταξύ των δύο ενώσεων. Στη συγκεκριμένη μελέτη όμως, πριν την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία είχε προηγηθεί ο διαχωρισμός του κλάσματος υδρονονανθράκων (σκουαλενίου) και του κλάσματος των εστέρων των λιπαρών οξέων με Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE). Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος προσδιορισμός σκουαλενίου και λιπαρών οξέων και όπως φαίνεται στο παρακάτω χρωματογράφημα (**Εικόνα 8**) δεν επιτεύχθηκε καλός διαχωρισμός της κορυφής του σκουαλενίου με την κορυφή του λινολενικού οξέος (18:3). Επομένως, επιλέχθηκε το τετραδεκάνιο ως εσωτερικό πρότυπο για τα δείγματα που αναλύθηκαν.



Εικόνα 6: Χρωματογράφημα του δείγματος KOR\_MES\_OO\_26

### Ανάκτηση

Ο έλεγχος της ανάκτησης πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα τελικής συγκέντρωσης σκουαλενίου: 700, 5000, 10000mg/kg. Οι τιμές βρέθηκαν πολύ ικανοποιητικές και για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού και ήταν  $115,9 \pm 45,6\%$ ,  $92,0 \pm 2,3\%$  και  $96,4 \pm 2,2\%$  αντίστοιχα.

## Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Το όριο ανίχνευσης (LOD) βρέθηκε 181mg/kg και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) 551mg/kg

### 4.2.1 Περιεκτικότητα σκουαλενίου προσδιορισμένη με GC σε δείγματα ελληνικών ελαιολάδων

Τα δείγματα ελαιολάδων που αναλύθηκαν με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας ήταν 57. Τα 24 εξ αυτών είναι της ποικιλίας Κορωνέικης, τα 7 της Αδραμυτιανής και τα υπόλοιπα 26 της Κολοβής. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**.

*Πίνακας 11: Περιεκτικότητα σκουαλενίου (mg/kg) στα δείγματα ελαιολάδου*

Δείγμα ελαιολάδου	Σκουαλένιο (mg/kg)	Δείγμα ελαιολάδου	Σκουαλένιο (mg/kg)
KOR_MES_OO_13	4951	KOL_LES_OO_22	3603
KOR_MES_OO_14	6118	KOL_LES_OO_23	3716
KOR_MES_OO_15	4497	KOL_LES_OO_24	4621
KOR_MES_OO_16	5265	KOL_LES_OO_25	3123
KOR_MES_OO_17	5094	KOL_LES_OO_26	3491
KOR_MES_OO_18	5463	ADR_LES_OO_27	2835
KOR_MES_OO_19	5580	ADR_LES_OO_28	2392
KOR_MES_OO_20	3857	ADR_LES_OO_29	3221
KOR_MES_OO_21	3381	ADR_LES_OO_30	2589
KOR_MES_OO_22	5499	ADR_LES_OO_31	3002
KOR_MES_OO_24	4016	ADR_LES_OO_32	2880
KOR_MES_OO_25	4638	KOL_LES_OO_33	3449
KOR_MES_OO_26	4074	KOL_LES_OO_34	4015
KOR_MES_OO_27	4501	KOL_LES_OO_35	3340
KOR_MES_OO_28	3844	KOL_LES_OO_36	2742
KOR_MES_OO_29	5323	KOL_LES_OO_37	3187
KOR_MES_OO_30	4618	KOL_LES_OO_38	2908
KOR_MES_OO_31	3537	KOL_LES_OO_39	2779
KOR_MES_OO_32	3274	KOL_LES_OO_40	3332
KOR_KOR_OO_01	5143	KOL_LES_OO_41	4053
KOR_KOR_OO_02	5543	KOL_LES_OO_42	2997
KOR_KOR_OO_03	4459	KOL_LES_OO_43	3746
KOR_KOR_OO_04	5656	KOL_LES_OO_44	3436
KOR_KOR_OO_05	4922	KOL_LES_OO_45	4059
KOL_LES_OO_17	2408	KOL_LES_OO_46	3610
KOL_LES_OO_18	2863	KOL_LES_OO_47	3765
ADR_LES_OO_19	4479	KOL_LES_OO_48	4115
KOL_LES_OO_20	3548	KOL_LES_OO_49	3434
KOL_LES_OO_21	4765		

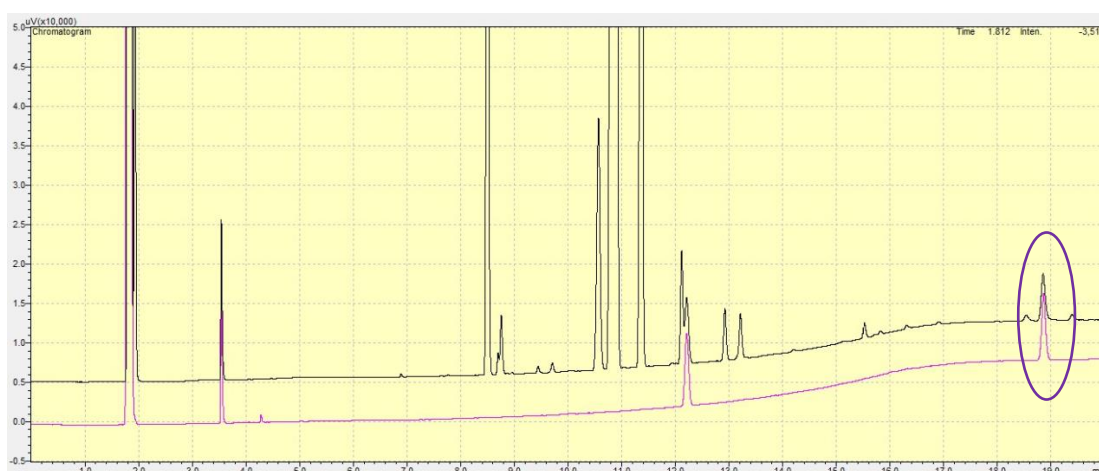
Η μέση τιμή της συγκέντρωσης σκουαλενίου από το σύνολο των 57 δειγμάτων ελαιολάδων είναι 3961mg/kg, ενώ οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 2392 και 6118mg/kg. Το εύρος των τιμών είναι 3726 και ο συντελεστής μεταβλητότητας (RSD%) είναι ίσος με 32,9%.

Στον **Πίνακα 12** παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία για κάθε ποικιλία και προέλευση ελαιολάδου. Τη μεγαλύτερη μέση τιμή και με αυτή τη μέθοδο ανάλυσης εμφάνισαν τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικη (4719mg/kg) και τη μικρότερη τα δείγματα της Αδραμυτιανής (3057mg/kg).

**Πίνακας 12:** Στατιστικά στοιχεία ποικιλιών και προελεύσεων ως προς το σκουαλένιο (GC)

	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση	RSD%	Εύρος
Πελοπόννησος	4719	790	16,7	2844
Λέσβος	3409	607	17,8	2373
Κορωνέικη	4719	790	16,7	2844
Κολοβή	3504	563	16,1	2357
Αδραμυτιανή	3057	682	22,3	2087

Στην **Εικόνα 9** με μαύρη γραμμή απεικονίζεται το χρωματογράφημα ενός δείγματος ελαιολάδου, ενώ με μωβ γραμμή το χρωματογράφημα προτύπου δείγματος. Με το σχήμα σημειώνεται η κορυφή του σκουαλενίου.



**Εικόνα 7:** Χρωματογράφημα GC δείγματος ελαιολάδου και προτύπου

### 4.3 Σύγκριση μεθόδων

Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων ως προς την περιεκτικότητα σκουαλενίου στα δείγματα ελαιολάδου συγκρίθηκαν μέσω του στατιστικού προγράμματος **Statgraphics Centurion** με τη λειτουργία της συσχέτισης μοντέλων βαθμονόμησης με έναν παράγοντα. Για την κατασκευή του γραμμικού μοντέλου μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων, στον άξονα Χ τοποθετήθηκαν ως πραγματικές τιμές τα αποτελέσματα της ανάλυσης με Αέρια Χρωματογραφία, ενώ στον άξονα Υ τα αποτελέσματα της ανάλυσης με Υγρή Χρωματογραφία. Τα δείγματα με κωδικό *KOR\_MES\_OO\_17*, *KOR\_MES\_OO\_19*,

KOR\_MES\_OO\_21, KOR\_MES\_OO\_22, KOR\_MES\_OO\_29, KOR\_KOR\_1, KOR\_KOR\_3, KOL\_LES\_17 και KOL\_LES\_OO\_21 δε συμπεριελήφθησαν στην σύγκριση λόγω απόρριψής τους ως έκτροπες τιμές.

Το γραμμικό μοντέλο που δημιουργήθηκε περιγράφεται από την εξίσωση:

$$HPLC = - 8,8608 + 0,98611 * GC$$

Εάν το κάθε δείγμα έδινε πανομοιότυπο αποτέλεσμα και με τις δύο μεθόδους, τότε η εξίσωση θα παρουσίαζε μηδενική τεταγμένη και κλίση ίση με 1. Στην πραγματικότητα όμως, κάτι τέτοιο είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί διότι ακόμα και συστηματικά σφάλματα να μην υπάρχουν, τα τυχαία σφάλματα οδηγούν τις δύο αναλυτικές διαδικασίες στο να μην δίνουν αποτελέσματα με ακριβή συμφωνία μεταξύ τους. Έτσι, πραγματοποιείται έλεγχος των ορίων εμπιστοσύνης- υψηλότερο και χαμηλότερο όριο της κλίσης και της τεταγμένης σε επίπεδο σημαντικότητας 95% ως προς το εάν συμπεριλαμβάνονται οι ιδανικές τιμές- 0 και 1 αντίστοιχα- σε αυτό το εύρος τιμών (Miller J.N & Miller J.C, 2005).

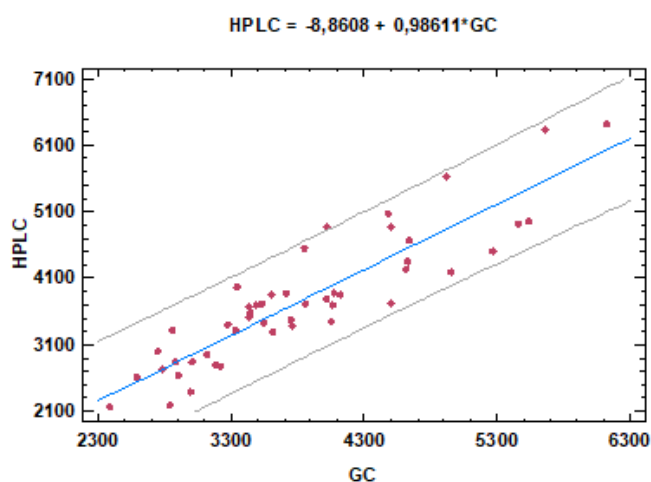
Στην περίπτωση μας η τεταγμένη βρέθηκε -8,8608, με όρια εμπιστοσύνης [-572,958-555,237] και η κλίση βρέθηκε 0,98611 με όρια εμπιστοσύνης [0,842679-1,12954], συμπεριλαμβάνοντας τις επιθυμητές τιμές 0 και 1 αντίστοιχα. Με βάση τους ελέγχους υπόθεσης, σε 95% στάθμη εμπιστοσύνης δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές αποδείξεις για το ότι η τεταγμένη δεν ισούται με μηδέν και η κλίση της ευθείας με 1, αφού βρέθηκε  $P > 0,05$  και για τις δύο υποθέσεις.

Από την ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) βρέθηκε  $P < 0,05$ , πράγμα που σημαίνει ότι για 95% στάθμη εμπιστοσύνης υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2$  για το γραμμικό μοντέλο βρέθηκε ικανοποιητικός και ίσος με 80,6%, δηλαδή το γραμμικό μοντέλο επεξηγεί το 80,6% της μεταβλητότητας των τιμών της HPLC.

Ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation Coefficient) απέδωσε ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών και βρέθηκε  $R=0,90$ . Το τυπικό σφάλμα (Standard Error) της εκτίμησης ισούται με 428,1.



Στο **Διάγραμμα 6** παρουσιάζεται το γραμμικό μοντέλο που εφαρμόστηκε μεταξύ των μεθόδων GC και HPLC. Οι δύο γκρι γραμμές περικλείουν το διάστημα εμπιστοσύνης, ενώ η μπλε γραμμή αποτελεί στην εκτίμηση του μοντέλου.



**Διάγραμμα 6:** Διάγραμμα του γραμμικού μοντέλου που εφαρμόστηκε

#### 4.4 Αποτελέσματα προσδιορισμού της %σύντασης των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων

Μέσω της μεθόδου με Αέρια Χρωματογραφία, ταυτόχρονα με το σκουαλένιο προσδιορίστηκε και η ποσοστιαία σύνταση των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων. Οι περιεκτικότητες των λιπαρών οξέων όλων των ελαιολάδων που αναλύθηκαν συμμορφώνονται με τα όρια που έχουν θεσπιστεί από τον *Κανονισμό 2568/91* που παρουσιάζονται στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο. Επιπλέον, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα στον **Πίνακα 14**, το Ελαϊκό (18:1), το Παλμιτικό (C16:0), Λινελαϊκό (C18:2) και Στεατικό οξύ (C18:0) είναι τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία.

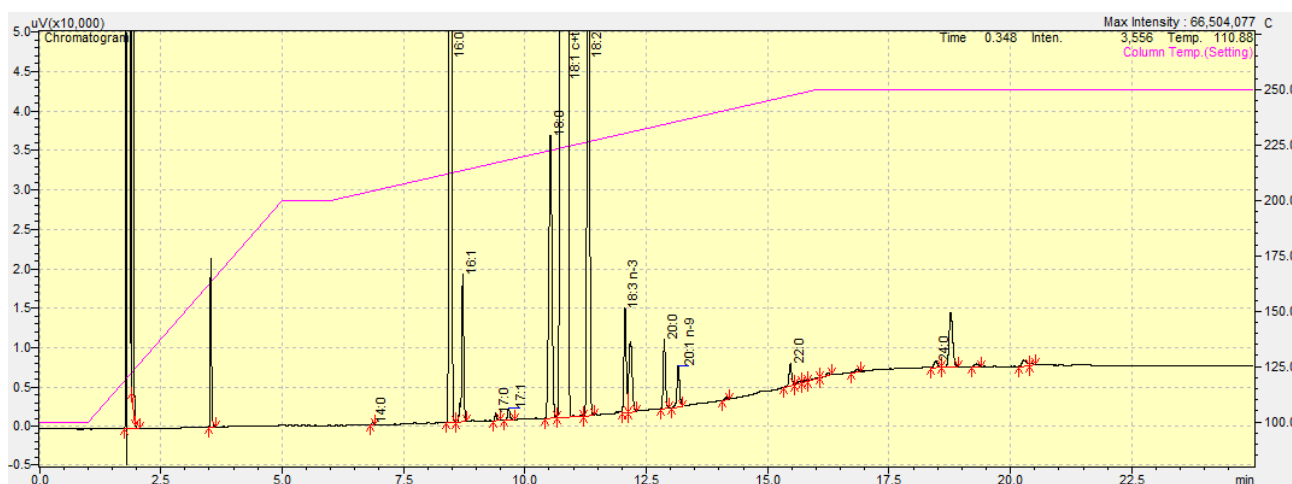
Στον **Πίνακα 13** παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση για κάθε ποικιλία και γεωγραφική προέλευση.

**Πίνακας 13:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση λιπαρών οξέων κάθε ποικιλίας και γεωγραφικής προέλευσης

Ποικιλία		C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0
Κορωνέικη	%m/m	0,01	12,92	0,85	0,04	0,07	2,58	76,14	5,76	0,66	0,45	0,29	0,16	0,07
	Τυπ. Απόκλιση	0,001	1,04	0,08	0,002	0,004	0,28	1,51	0,97	0,08	0,02	0,02	0,03	0,01
Κολοβή	%m/m	0,01	10,17	0,46	0,043	0,07	2,41	75,88	9,27	0,73	0,38	0,37	0,14	0,07
	Τυπ. Απόκλιση	0,002	1,38	0,06	0,01	0,01	0,15	1,49	1,22	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01
Αδραμυτιανή	%m/m	0,02	12,70	0,69	0,14	0,20	2,82	69,27	12,36	0,75	0,47	0,35	0,16	0,08
		0,004	1,09	0,05	0,03	0,04	0,24	1,19	0,68	0,09	0,03	0,02	0,03	0,01
<b>Προέλευση</b>														
Πελοπόννησος	%m/m	0,01	12,92	0,85	0,04	0,07	2,58	76,14	5,76	0,66	0,45	0,29	0,16	0,07
	Τυπ. Απόκλιση	0,001	1,04	0,08	0,002	0,01	0,28	1,51	0,97	0,08	0,02	0,02	0,03	0,01
Λέσβος	% m/m	0,01	10,71	0,51	0,06	0,10	2,50	74,47	9,92	0,74	0,40	0,37	0,15	0,07
	Τυπ. Απόκλιση	0,004	1,66	0,11	0,04	0,06	0,24	3,09	1,70	0,10	0,04	0,02	0,02	0,01

Ανάμεσα στις ποικιλίες των δειγμάτων το Ελαϊκό οξύ είχε τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στην Κορωνέικη (μέση τιμή= 76,14%) και τη χαμηλότερη στην Αδραμυτιανή (69,27%), καθώς επίσης το Παλμιτικό οξύ βρέθηκε σε μεγαλύτερη αφθονία στην Κορωνέικη (12,92%) και σε χαμηλότερη στην Κολοβή (10,17%). Το Λινελαϊκό οξύ από την άλλη βρέθηκε σε μεγαλύτερη αφθονία στην Αδραμυτιανή (12,36%) και σε χαμηλότερη στην Κορωνέικη (5,76%), όπως και το Στεατικό οξύ, όπου είχε την υψηλότερη μέση τιμή στην Αδραμυτιανή (2,82%) και τη χαμηλότερη στην Κολοβή (2,41%).

Στην **Εικόνα 10** παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του δείγματος KOR\_MES\_OO\_26, στο οποίο επισημαίνονται τα λιπαρά οξέα.



**Εικόνα 8:** Χρωματογράφημα του δείγματος KOR\_MES\_OO\_26

## 4.5 Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων

Τα δεδομένα της σύστασης των λιπαρών οξέων και της περιεκτικότητας σκουαλενίου υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση μέσω της πλατφόρμας **Metaboanalyst** προκειμένου να διερευνηθεί εάν αυτά τα συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση ελαιολάδων με βάση την ποικιλία και τη γεωγραφική τους προέλευση. Γενικά, σε μια πολυμεταβλητή ανάλυση μας ενδιαφέρει να μειώσουμε το πλήθος των μεταβλητών διατηρώντας τις κύριες συνιστώσες χωρίς όμως να χαθεί πολύτιμη πληροφορία, να ομαδοποιήσουμε ή να κατατάξουμε τα δεδομένα σε ομοειδή υποσύνολα, καθώς επίσης και να διερευνήσουμε την εξάρτηση μεταξύ των μεταβλητών.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι:

- ❖ **Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis):** Πρόκειται για μη επιβλεπόμενη μέθοδο που στοχεύει στην εύρεση των κατευθύνσεων της μέγιστης διακύμανσης σε ένα σύνολο δεδομένων (X), χωρίς όμως να λαμβάνει υπόψιν τις προκαθορισμένες κλάσεις (Y) (Xia et al., 2009). Ομαδοποιεί τα δεδομένα με βάση την ομοιότητά τους και προσπαθεί να εξηγήσει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διακύμανση με όσο το δυνατόν λιγότερες συνιστώσες (van den Berg et al., 2006).

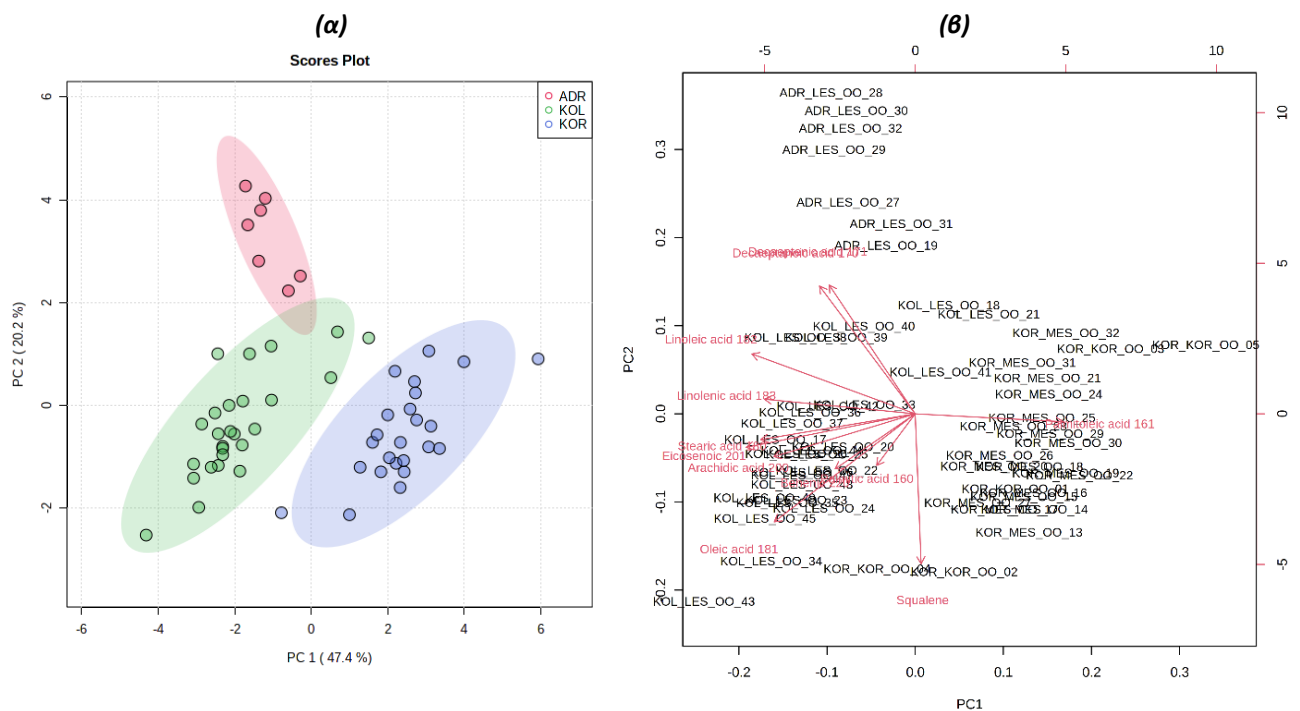


- ❖ **Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA, Partial Least Squares-Discriminant Analysis):** Μπορεί να θεωρηθεί ως η «επιβλεπόμενη» μορφή της PCA με την έννοια του ότι επιτυγχάνει μείωση των διαστάσεων αλλά με πλήρη επίγνωση των κλάσεων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ομαδοποίηση δειγμάτων (Ruiz-Perez&Narasimhan, 2017). Χρησιμοποιεί τεχνικές παλινδρόμησης για την εύρεση της κατεύθυνσης του μέγιστου της συνδιακύμανσης μεταξύ ενός συνόλου δεδομένων (X) και της κάθε κατηγορίας (Y) (Xia et al., 2009). Είναι χρήσιμη μέθοδος όταν πρόκειται να αναλυθεί μεγάλος αριθμός ανεξάρτητων μεταβλητών. Επειδή όμως ο ρόλος του μοντέλου στη μείωση των διαστάσεων μπορεί εύκολα να παρερμηνευθεί και να οδηγήσει σε υπερβολική τοποθέτηση των δεδομένων, η διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου είναι απαραίτητη (Ruiz-Perez&Narasimhan, 2017).

### **1<sup>η</sup> Πολυμεταβλητή Ανάλυση: Διάκριση ελαιολάδων βάσει ποικιλίας**

Πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων της σύστασης των λιπαρών οξέων και της περιεκτικότητας σκουαλενίου των ελαιολάδων διαχωρίζοντάς τα με βάση τις ποικιλίες Κορωνέικη, Κολοβή και Αδραμυτιανή. Στην ανάλυση δε συμπεριλήφθηκαν το Μυριστικό (C14:0) και Λιγνοκηρικό οξύ (C24:0) λόγω πολύ μικρής περιεκτικότητας (<0,1%). Επιλέχθηκε κανονικοποίηση κατά τον διάμεσο, λογαριθμική τροποποίηση των δεδομένων και αυτόματη κλιμάκωση (auto scaling) των δεδομένων. Η κανονικοποίηση του δείγματος επιτρέπει μια γενικού σκοπού προσαρμογή για της διαφορές ανάμεσα στα δείγματα, ενώ η τροποποίηση των δεδομένων και η κλιμάκωση είναι δύο προσεγγίσεις που καθιστούν τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων πιο συγκρίσιμα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα ή συνδυαστικά έτσι ώστε να επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα.

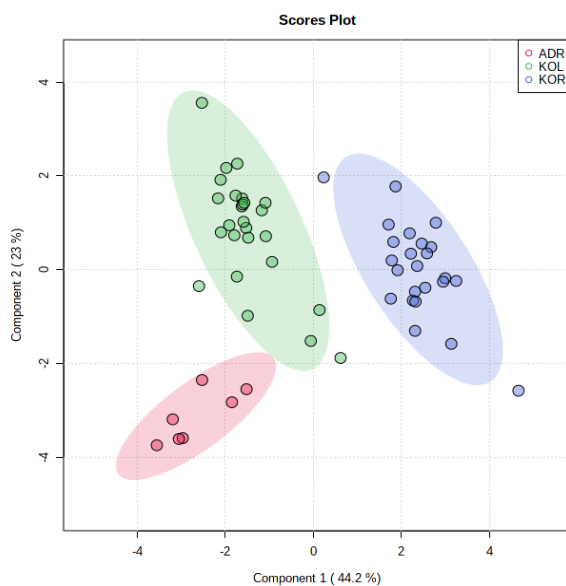
Από την ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) προέκυψε ικανοποιητικός διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδων με βάση τις ποικιλίες και το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 7α**. Όπως βλέπουμε, τα δείγματα κάθε ποικιλίας σχηματίζουν μια διακριτή ομάδα (**κόκκινο**- Αδραμυτιανή, **μπλε**- Κορωνέικη, **πράσινο**- Κολοβή) που ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες, αλλά υπάρχει μια μικρή επικάλυψη των διαστημάτων εμπιστοσύνης των ποικιλιών Κολοβή και Αδραμυτιανή. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές σχηματοποιούν τα διαστήματα εμπιστοσύνης. Οι δύο κύριες συνιστώσες εξηγούν το 67,6% της συνολικής διακύμανσης. Τα δύο δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικη που βρίσκονται εκτός διαστήματος εμπιστοσύνης προέρχονται από το νομό Κορινθίας, σε αντίθεση με τα περισσότερα δείγματα της ποικιλίας που προέρχονται από το νομό Μεσσηνίας. Το δείγμα της ποικιλίας Κολοβή που βρίσκεται πιο μακριά από το διάστημα εμπιστοσύνης είναι το KOL\_LES\_OO\_21, στο οποίο η τιμή της συγκέντρωσης σκουαλενίου βρίσκεται μακριά από αυτές των υπόλοιπων δειγμάτων της ποικιλίας, ωστόσο δεν αποτελεί σημαντική ακραία τιμή.



**Διάγραμμα 7:** (α) ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), (β) PCA biplot: δείχνει ποιες μεταβλητές επηρεάζουν τις κύριες συνιστώσες

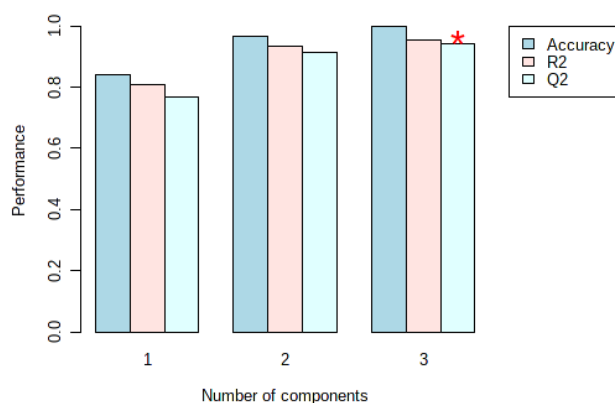
Στο **Διάγραμμα 7β** βλέπουμε ποια κύρια συνιστώσα επηρεάζει η κάθε μεταβλητή. Η κύρια συνιστώσα 1 (PC1) επηρεάζεται ισχυρά κυρίως από το εικοσενοϊκό (20:1) και λινολαϊκό οξύ (18:2), ενώ η κύρια συνιστώσα 2 (PC2) επηρεάζεται κυρίως από το σκουαλένιο και το δεκαεπτενοϊκό οξύ (17:1). Επιπλέον, από την κατεύθυνση των διανυσμάτων των μεταβλητών φαίνεται πως το σκουαλένιο και παλμιτελαϊκό οξύ (16:1) συσχετίζονται κυρίως με τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικη, δηλαδή σε αυτή την ποικιλία βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα. Τα δείγματα της Αδραμυτιανής συσχετίζονται με το δεκαεπτανοϊκό (17:0) και δεκαεπτενοϊκό οξύ (17:1), ενώ όλα τα υπόλοιπα συσχετίζονται με τα δείγματα της Κολοβής. Από το ίδιο διάγραμμα μπορούμε ακόμη να εξάγουμε πληροφορίες για τη συσχέτιση μεταξύ των ίδιων των μεταβλητών-συστατικών. Όταν η γωνία που σχηματίζουν τα διανύσματα δύο μεταβλητών είναι μικρή, τότε αυτές συσχετίζονται θετικά- παραδείγματος χάριν, το αραχιδικό (20:0) και εικοσενοϊκό οξύ (20:1). Όταν τα διανύσματα δύο μεταβλητών σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία περίπου 90°, τότε οι μεταβλητές αυτές δεν συσχετίζονται- σκουαλένιο και λινολενικό οξύ (18:3). Τέλος, όταν σχηματίζουν μεγάλη γωνία περίπου 180°, τότε οι μεταβλητές συσχετίζονται αρνητικά μεταξύ τους- παλμιτελαϊκό (16:0) και λινολενικό οξύ (18:3).

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος PLS-DA και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 8**. Προέκυψε ικανοποιητική κατάταξη των δειγμάτων ανάμεσα στις προεπιλεγμένες κλάσεις οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις τρεις διαφορετικές ποικιλίες Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή.



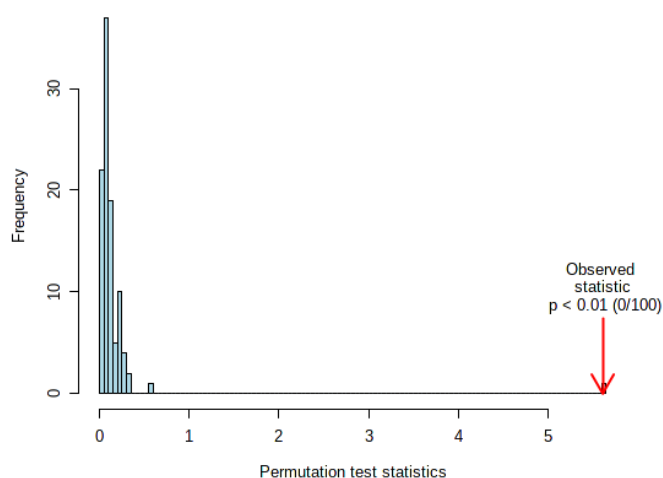
**Διάγραμμα 8:** Γράφημα των κύριων συνιστωσών του μοντέλου PLS-DA. Τα δείγματα ελαιολάδων ταξινομήθηκαν ως προς την ποικιλία.

Ακολούθησε διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου και όπως βλέπουμε στο **Διάγραμμα 9**, ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών που περιγράφουν το συγκεκριμένο μοντέλο είναι τρείς. Η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου ( $Q^2$ ), η ακρίβεια και ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) βρέθηκαν ικανοποιητικοί (0.94029, 1.0, 0.95463 αντίστοιχα). Γενικά, καλά προγνωστικά μοντέλα εμφανίζουν υψηλές τιμές  $Q^2$ , ενώ αρνητική τιμή μπορεί να σημαίνει ότι το μοντέλο δεν είναι καθόλου προγνωστικό ή ότι έχει γίνει υπερπροσαρμογή του στα δεδομένα.



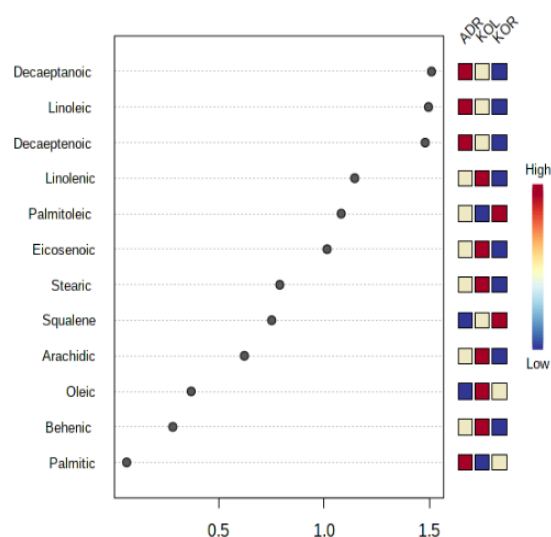
**Διάγραμμα 9:** Διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με τη μέθοδο LOOCV

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δοκιμή μεταστοιχείωσης (Permutation Test) του μοντέλου για να διερευνηθεί η σημαντικότητα του διαχωρισμού των κλάσεων. Σε αυτή τη δοκιμή πραγματοποιείται εκ νέου ταξινόμηση των δειγμάτων σε κλάσεις τυχαία. Αναπτύσσεται νέο μοντέλο, η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές (100) και τελικά συγκρίνεται η επίδοση του αρχικού μοντέλου με το νέο που αναπτύχθηκε με τυχαία ταξινόμηση και ελέγχεται αν η διαφορά τους είναι στατιστικά σημαντική. Έγινε χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within). Οι λόγοι αυτοί αναπαρίστανται γραφικά σε ιστόγραμμα, το οποίο ονομάζεται «κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων» (**Διάγραμμα 10**). Όσο πιο δεξιά βρίσκεται ο λόγος B/W του «πραγματικού» μοντέλου, τόσο πιο σημαντική η διάκριση. Όπως συμπεραίνουμε από το διάγραμμα λοιπόν, η διάκριση και διαχωρισμός των κλάσεων του αρχικού μοντέλου είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0.01$ , 0/100).



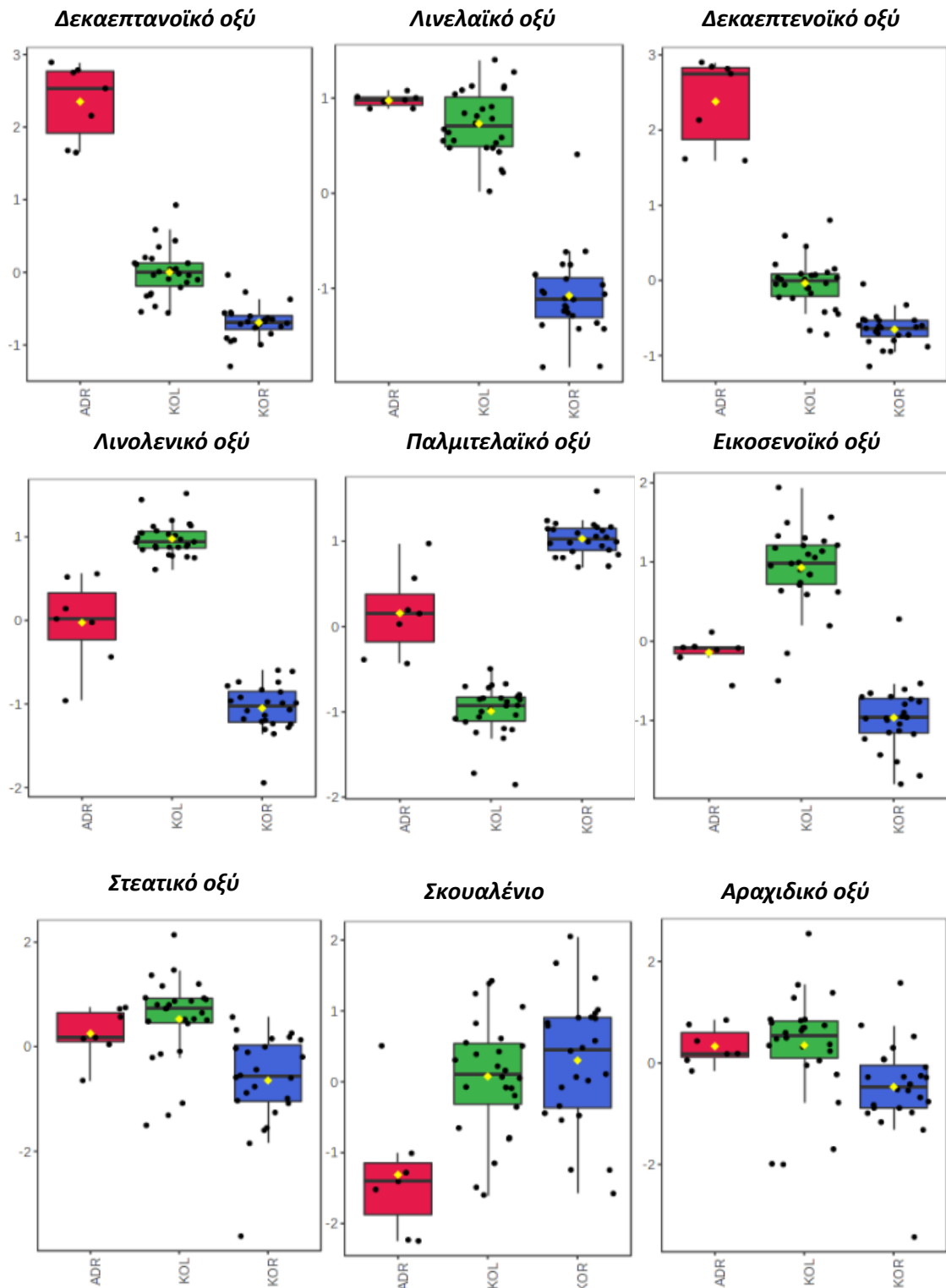
**Διάγραμμα 10:** Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA

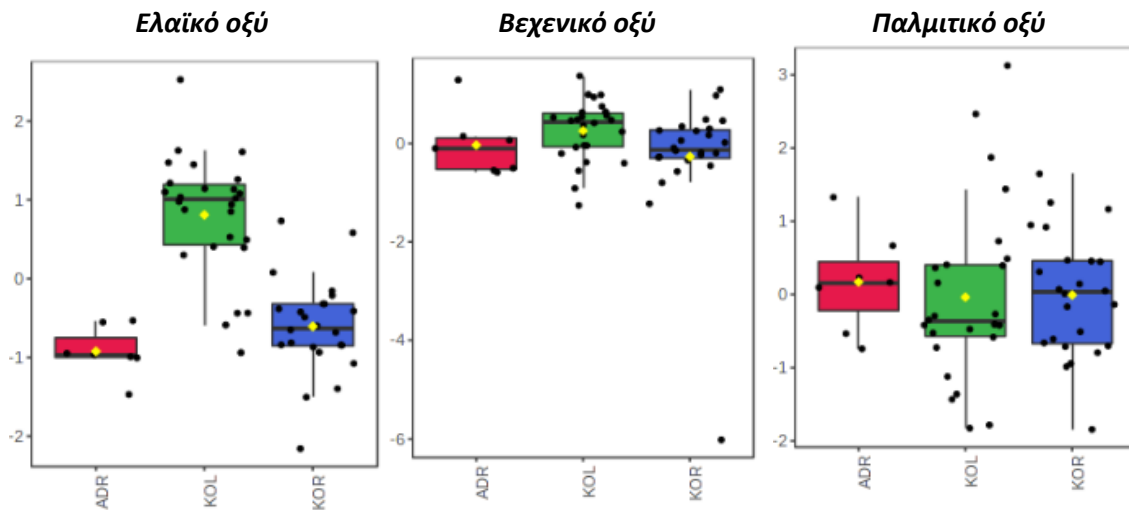
Από την ανάλυση PLS-DA, βάσει των VIP scores προέκυψε η σημαντικότητα της συνεισφοράς κάθε μεταβλητής στο διαχωρισμό των κλάσεων του μοντέλου, δηλαδή στο διαχωρισμό μεταξύ των τριών ποικιλιών ελαιολάδου (**Διάγραμμα 11**). Όπως φαίνεται από το διάγραμμα λοιπόν, τα συστατικά αυτά που συνεισφέρουν περισσότερο στο διαχωρισμό των κλάσεων και αξιολογούνται με υψηλότερο VIP score στον άξονα X είναι πρωτίστως το δεκαεπτανοϊκό οξύ, το λινολενικό οξύ και το δεκαεπτενοϊκό οξύ. Τα χρωματισμένα τετράγωνα δεξιά υποδεικνύουν τη σχετική ποσότητα του κάθε συστατικού στην αντίστοιχη κατηγορία.



**Διάγραμμα 11:** Η σημαντικότητα της συμβολής των ουσιών στο διαχωρισμό των κλάσεων του μοντέλου PLS-DA.

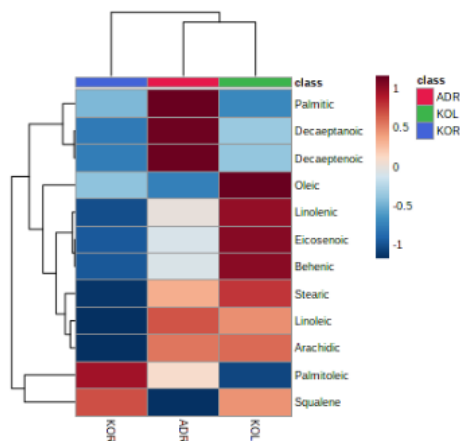
Ακολουθεί η **Εικόνα 11** στην οποία παρουσιάζονται υπό μορφή θηκογραμμάτων οι σχετικές ποσότητες των λιπαρών οξέων και του σκουαλενίου, με σειρά σημαντικότητας συνεισφοράς ως προς το διαχωρισμό.





**Εικόνα 9:** Θηκογράμματα με την κανονικοποιημένη τιμή των λιπαρών οξέων και σκουαλενίου των ελαιολάδων των ποικιλιών Κορωνέικη, Κολοβή, Αδραμυτιανή.

Τέλος, στο **Διάγραμμα 12** βλέπουμε την ομαδοποίηση των ελαιολάδων ανά ποικιλία (KOR: Κορωνέικη, KOL: Κολοβή, ADR: Αδραμυτιανή) με τη μορφή θερμικού χάρτη, στον οποίο απεικονίζεται η μέση τιμή της σχετικής αφθονίας των συστατικών.

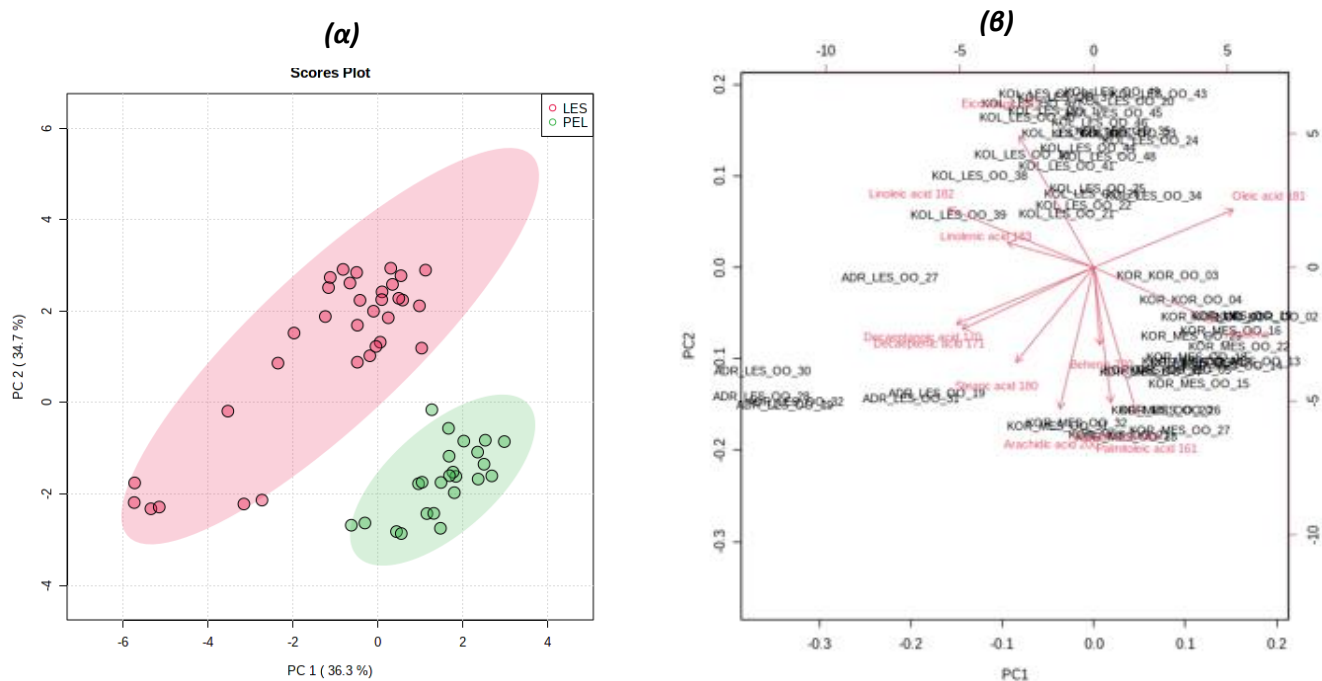


**Διάγραμμα 12:** Θερμικός χάρτης. Απεικονίζεται η μέση τιμή της σχετικής αφθονίας των συστατικών σε κάθε ποικιλία.

## 2<sup>η</sup> Πολυμεταβλητή Ανάλυση

Για τη 2<sup>η</sup> πολυμεταβλητή ανάλυση ο διαχωρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, δηλαδή ανάμεσα στην Πελοπόννησο και τη Λέσβο. Για την κανονικοποίηση των δεδομένων επιλέχθηκε η αυτόματη κλιμάκωση (auto scaling). Εφαρμόστηκε αρχικά η μέθοδος PCA και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 13**. Οι γραμμοσκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

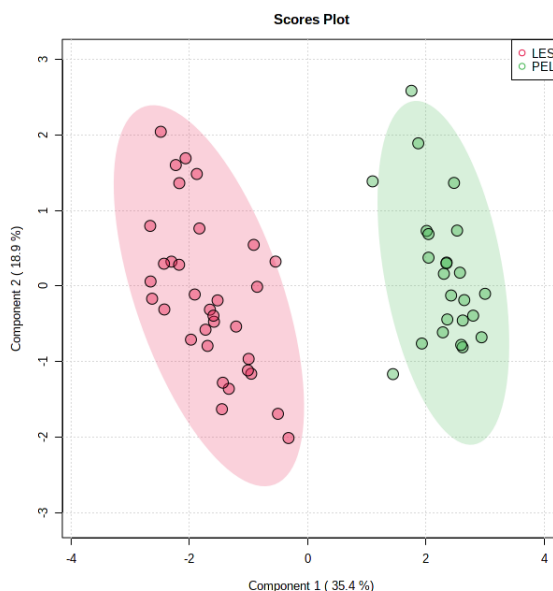
Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 13α** προέκυψε ικανοποιητικός διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου με βάση την περιοχή προέλευση. Τα δείγματα που προέρχονται από την περιοχή της Πελοποννήσου σχηματίζουν μια διακριτή ομάδα (πράσινη περιοχή) πλήρως διαχωρισμένη από την ομάδα που σχηματίζουν τα δείγματα που προέρχονται από τη Λέσβο (κόκκινη περιοχή).



**Διάγραμμα 13:** (α) Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), (β) PCA Biplot

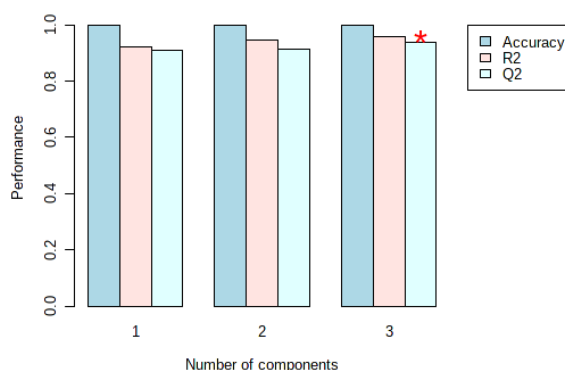
Στο **Διάγραμμα 13β** παρουσιάζεται το γράφημα Biplot της ανάλυσης PCA από το οποίο μπορούμε να συμπεράνουμε από ποιες μεταβλητές επηρεάζονται οι κύριες συνιστώσες. Η κύρια συνιστώσα 1 (PC1) επηρεάζεται κυρίως από το λινολενικό και ελαϊκό οξύ ενώ η κύρια συνιστώσα 2 (PC2) από το παλμιτελαϊκό, το αραχιδικό και παλμιτικό οξύ. Επιπλέον, από την κατεύθυνση των διανυσμάτων των μεταβλητών βλέπουμε ότι υπάρχει μεγαλύτερη συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων της Πελοποννήσου με το σκουαλένιο, το αραχιδικό, παλμιτικό, παλμιτελαϊκό και βεχενικό οξύ, ενώ το λινελαϊκό, εικοσανοϊκό, δεκαεπτενοϊκό, δεκαεπτανοϊκό και στεατικό συσχετίζονται περισσότερο με τα δείγματα της Λέσβου. Επιπλέον, οι μεταβλητές των οποίων τα διανύσματα σχηματίζουν μικρή γωνία μεταξύ τους παρουσιάζουν θετική συσχέτιση, όπως συμβαίνει μεταξύ λινελαϊκού και λινολενικού οξέος, μεταξύ παλμιτικού και παλμιτελαϊκού οξέος κ.ο.κ. Από την άλλη, οι μεταβλητές των οποίων τα διανύσματα παρουσιάζουν πολύ μεγάλη γωνία- περίπου 180°- συσχετίζονται αρνητικά, όπως συμβαίνει μεταξύ ελαϊκού και δεπαεπτενοϊκού οξέος, λινολεϊκού οξέος και σκουαλενίου κ.ο.κ. Τέλος, μεταβλητές των οποίων τα διανύσματα σχηματίζουν γωνία περίπου 90° δε συσχετίζονται, όπως συμβαίνει μεταξύ του ελαϊκού και παλμιτικού οξέος, σκουαλενίου και δεκαεπτενοϊκού οξέος κ.ο.κ.

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος ανάλυσης PLS-DA και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 14**. Προέκυψε ικανοποιητική κατάταξη των δειγμάτων στις προεπιλεγμένες κλάσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις περιοχές προέλευσης (Πελοπόννησος και Λέσβος).



**Διάγραμμα 14:** Γράφημα των κύριων συνιστωσών του μοντέλου PLS-DA. Τα δείγματα ελαιολάδων ταξινομήθηκαν ως προς τη γεωγραφική τους προέλευση.

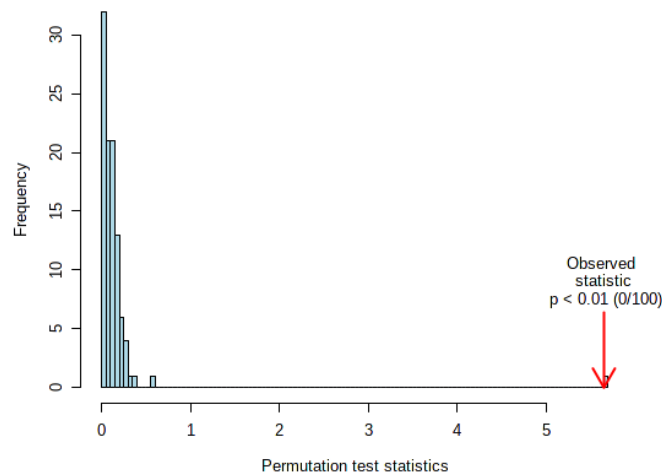
Ακολούθησε διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με τη μέθοδο LOOCV για την εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 15**. Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών που περιγράφουν αυτό το μοντέλο είναι τρεις. Οι τιμές της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου ( $Q^2$ ), της ακρίβειας και του συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ) βρέθηκαν ικανοποιητικές (0.94, 1.0, 0.94 αντίστοιχα).



**Διάγραμμα 15:** Διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με τη μέθοδο LOOCV

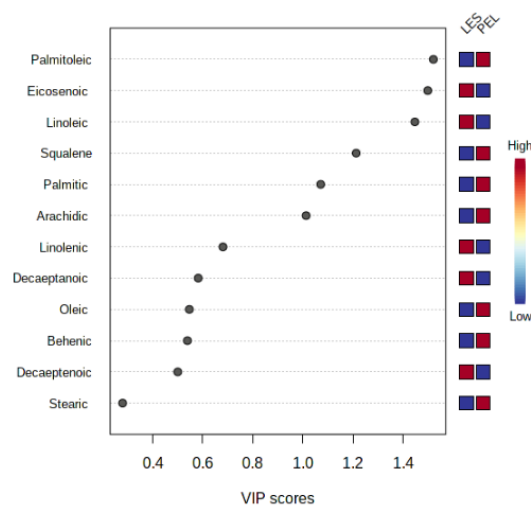


Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δοκιμή μεταστοιχείωσης (Permutation Test) του μοντέλου για να διερευνηθεί η σημαντικότητα του διαχωρισμού των κλάσεων. Στο **Διάγραμμα 16** φαίνεται ότι ο λόγος B/W του πραγματικού μοντέλου βρίσκεται δεξιά, επομένως η διάκριση είναι σημαντική και οι διαφορές μεταξύ των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου είναι στατιστικά σημαντικές ( $p < 0.01$ , 0/100).



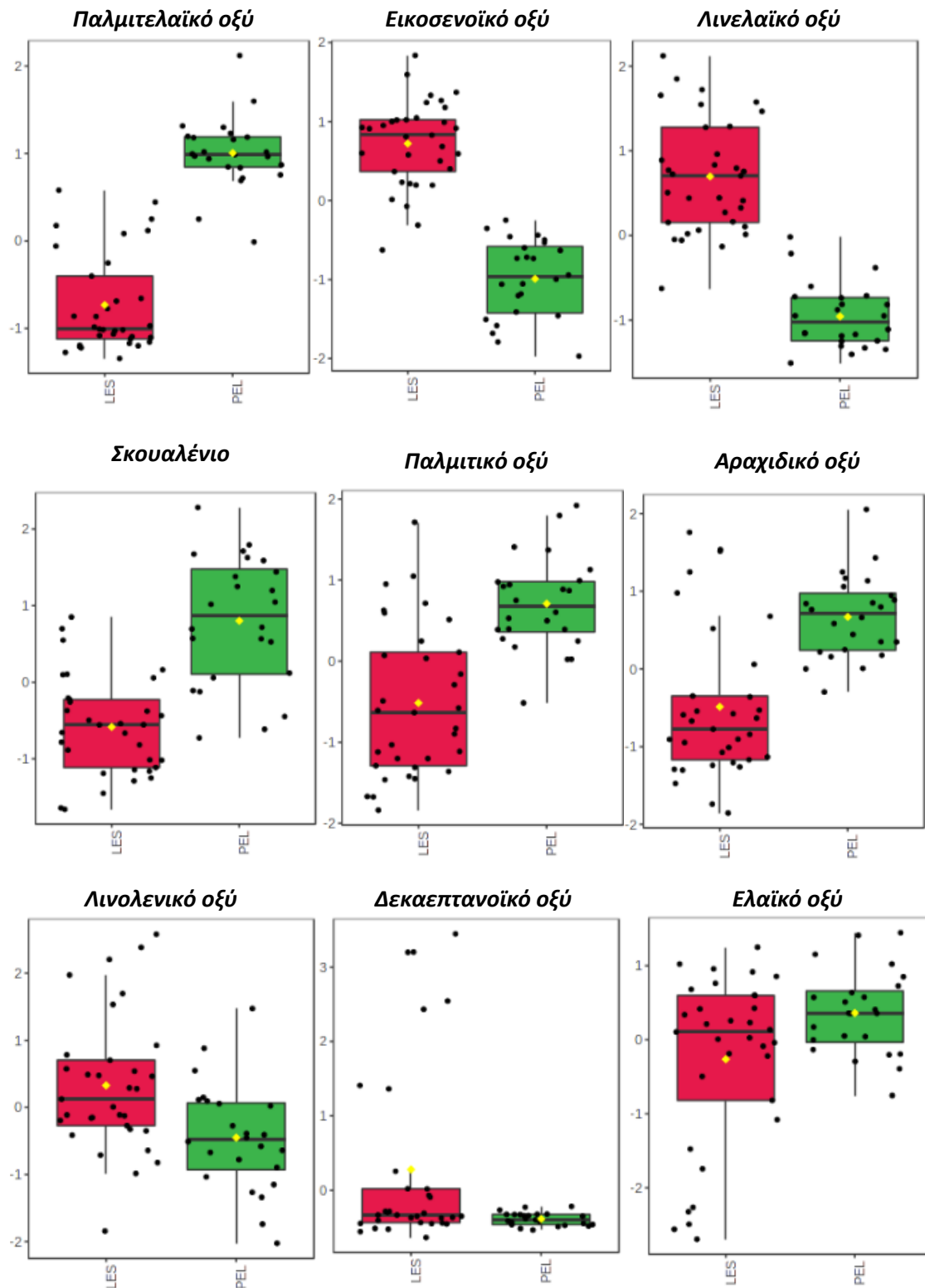
**Διάγραμμα 16:** Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA

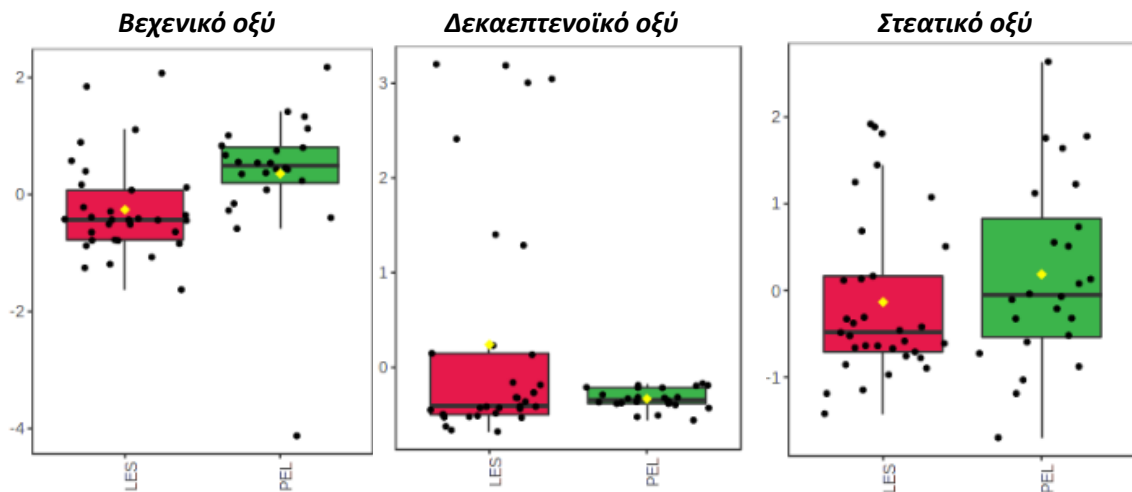
Με βάση το κριτήριο Student's test το σκουαλένιο και όλα τα λιπαρά οξέα, εκτός του στεατικού, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων των δύο προελεύσεων. Στο **Διάγραμμα 17** βλέπουμε τη σημαντικότητα της συνεισφοράς κάθε ουσίας στο διαχωρισμό των κλάσεων του μοντέλου, δηλαδή το διαχωρισμό ανάμεσα στις δύο περιοχές προέλευσης, βάσει των VIP Scores.



**Διάγραμμα 17:** Σημαντικότητα συνεισφοράς κάθε ουσίας στο διαχωρισμό μεταξύ των γεωγραφικών προελεύσεων βάσει VIP scores

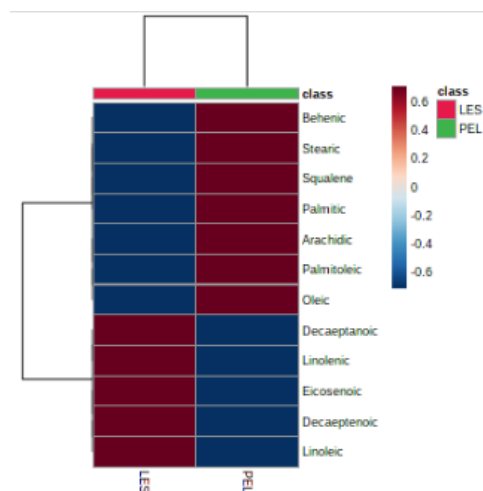
Στην **Εικόνα 12** που ακολουθεί παρουσιάζονται υπό μορφή θηκογραμμάτων οι σχετικές ποσότητες των συστατικών για τις δύο περιοχές προέλευσης. Φαίνεται ότι το Εικοσενοϊκό και το Λινελαϊκό οξύ βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στα δείγματα της Λέσβου, ενώ το Παλμιτελαϊκό, Αραχιδικό, Παλμιτικό οξύ και το Σκουαλένιο στα δείγματα της Πελοποννήσου.





**Εικόνα 10:** Θηκογράμματα με την κανονικοποιημένη τιμή των λιπαρών οξέων και σκουαλενίου των ελαιολάδων από την Πελοπόννησο και τη Λέσβο.

Τέλος, στο **Διάγραμμα 18** βλέπουμε την ομαδοποίηση των ελαιολάδων ανά περιοχή προέλευσης (LES: Λέσβος, PEL: Πελοπόννησος) με τη μορφή θερμικού χάρτη Heatmap, στον οποίο απεικονίζεται η μέση τιμή της σχετικής αφθονίας των συστατικών.



**Διάγραμμα 18:** Θερμικός χάρτης. Απεικονίζεται η μέση τιμή της σχετικής αφθονίας των συστατικών για κάθε περιοχή προέλευσης

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των δύο πολυμεταβλητών αναλύσεων, προκύπτει ότι η συγκέντρωση του σκουαλενίου καθώς και η σύσταση των λιπαρών οξέων επηρεάζονται τόσο από την ποικιλία όσο και από τη γεωγραφική προέλευση των ελαιολάδων, καθώς και ότι η σύσταση αυτών των συστατικών μπορεί να φανεί χρήσιμη για τη διάκριση ελαιολάδων βάσει ποικιλίας και γεωγραφικής προέλευσης.

Γενικά, τα λιπαρά οξέα σε σύγκριση με άλλες φυσικοχημικές παραμέτρους είναι η πιο σταθερή και πιο ενδεικτική παράμετρος για το χαρακτηρισμό ενός παρθένου ελαιολάδου

(Ollivier et al., 2003) και αποτελεί δείκτη ποιότητας και γνησιότητας. Επιπλέον, η σύστασή τους έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για τη διάκριση ελαιολάδων ως ένας πιθανός δείκτης της γεωγραφικής και γενετικής προέλευσης, όπως επιχειρήθηκε να γίνει και στην παρούσα μελέτη.

Οι Laroussi-Mezghani et al., (2015) μελέτησαν Τυνησιακά ελαιόλαδα διαφόρων ποικιλιών και κατέληξαν στο ότι είναι δυνατόν, προσδιορίζοντας τη σύσταση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, να προσδιοριστεί η ποικιλιακή προέλευση των ελαιολάδων. Ελαιόλαδα από την Τυνησία δύο ποικιλιών και διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων (κεντρική και νότια Τυνησία) μελέτησαν και οι Mansour et al., (2015) εντοπίζοντας σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητα ελαϊκού οξέος μεταξύ των δύο ποικιλιών. Επιπλέον, συγκρίνοντας τα ελαιόλαδα διαφορετικών γεωγραφικών προελεύσεων συμπέραναν ότι τα ελαιόλαδα από την κεντρική Τυνησία είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα ελαϊκού οξέος. Οι El Riachy et al., (2019) μελέτησαν στο Λίβανο δύο κλώνους της τοπικής ποικιλίας ελαιολάδου “Baladi” καθώς και εννέα ξένες ποικιλίες. Συμπέραναν ότι η ποικιλία της ελιάς και η ωρίμανση του ελαιόκαρπου είχαν σημαντική επίδραση τόσο στη σύσταση των λιπαρών οξέων όσο και στο φαινολικό προφίλ των ελαιολάδων. Η σύσταση των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε και από τους Diraman et al., (2010) όπου ταξινόμησαν με επιτυχία τουρκικά ελαιόλαδα με βάση την ποικιλία, τη γεωγραφική προέλευση και το έτος συγκομιδής. Στη μελέτη των Rondanini et al., (2011) συγκρίθηκαν δεδομένα σύστασης λιπαρών οξέων των ιταλικών ποικιλιών “Coratina” και “Frantoio” και των ισπανικών ποικιλιών “Arbequina” and “Picual” από διάφορες περιοχές της Ισπανίας και της Ιταλίας με τη σύσταση των λιπαρών οξέων των ίδιων ποικιλιών σε ελαιόλαδα προερχόμενα από περιοχές της Βορειοδυτικής Αργεντινής. Η σύσταση των λιπαρών οξέων όλων των δειγμάτων έδειξε εξάρτηση κυρίως από την ποικιλία. Επιπλέον, οι τιμές του ελαϊκού οξέος ήταν χαμηλότερες ενώ του λινελαϊκού οξέος υψηλότερες στα δείγματα της Αργεντινής σε σχέση με αυτές των δειγμάτων της Μεσογείου και για τις τέσσερις ποικιλίες. Από τα αποτελέσματα των τεσσάρων ποικιλιών, μόνο τα δείγματα της ποικιλίας “Picual” είχαν παρόμοια σύσταση λιπαρών οξέων στην Αργεντινή και τη Μεσόγειο. Τελικά συσχέτισαν τις διαφορές στη σύσταση λιπαρών οξέων κυρίως με την αλληλεπίδραση γενοτύπου και περιβάλλοντος.

Οι Tsimidou&Karakostas, (1993) ανέλυσαν τα δεδομένα της σύστασης των λιπαρών οξέων από ελληνικά ελαιόλαδα διαφόρων ποικιλιών και γεωγραφικών προελεύσεων από σοδιές 24 χρόνων και κατέληξαν στο ότι τα ελαιόλαδα μπορούν να διαχωριστούν με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση. Οι Stefanoudaki et al., (1999) μελέτησαν ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη και Μαστοειδής από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης και από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της σύστασης των λιπαρών οξέων κατέληξαν και αυτοί στο ότι είναι δυνατή η ταξινόμηση των δειγμάτων ως προς την ποικιλία αλλά και την περιοχή προέλευσης, θεωρώντας ακόμη ως πιθανούς παράγοντες το υψόμετρο και τις βροχοπτώσεις. Υποστήριξαν ακόμη ότι η σύσταση των λιπαρών οξέων έχει πολύ σημαντική διακριτική ικανότητα ακόμα και ανάμεσα σε κοντινές γεωγραφικές περιοχές. Οι Vekiari et al., (2010) μελετώντας ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη και Θρουμπολιά, παρατήρησαν ότι οι τιμές των C16:0, C16:1, C17:0, C17:1, C18:0 διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις δύο ποικιλίες.

Συγκεκριμένα, το ποσοστό του ελαιϊκού οξέος ήταν 62,92% στα δείγματα της Θρουμπολιάς και 76,33% στα δείγματα της Κορωνέικης, ενώ η Θρουμπολιά παρουσίασε μεγαλύτερο ποσοστό λινελαϊκού οξέος σε σχέση με την Κορωνέικη. Ο λόγος ελαιϊκού/λινελαϊκού οξέος ήταν 3,5 φορές μεγαλύτερος για την Κορωνέικη σε σχέση με τη Θρουμπολιά. Τέλος, η πρόσφατη μελέτη των Mikrou et al., (2020) σε ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα από την Κρήτη, την Πελοπόννησο και τη Λέσβο των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή, υποδεικνύει ότι η σύσταση των λιπαρών οξέων, το σκουαλένιο και οι τοκοφερόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά μέσω των χημειομετρικών μεθόδων για την ταξινόμηση ελαιολάδων βάσει της ποικιλίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης από τον προσδιορισμό του σκουαλενίου με τη μέθοδο SPE-HPLC μπορούμε αρχικά να συμπεράνουμε ότι η εκχύλιση στερεάς φάσης φαίνεται να είναι μια αξιόπιστη και εύκολη μέθοδος προκατεργασίας των δειγμάτων ελαιολάδου. Με τη χρήση των φυσιγγίων SPE είναι δυνατή η παρασκευή κλασμάτων ποσοτικά πλούσια σε δευτερεύουσες ουσίες, όπως το σκουαλένιο. Τα δεδομένα της επικύρωσης της μεθόδου, δηλαδή της επαναληψιμότητας και της ανάκτησης, κρίθηκαν αρκετά ικανοποιητικά. Επιπλέον, φάνηκε πως είναι δυνατή και αξιόπιστη η χρήση φυσιγγίων SPE που παρασκευάζονται στο εργαστήριο, κι έτσι μπορεί να μειωθεί σημαντικά το κόστος ανάλυσης.

Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται σημαντικά από το αποτέλεσμα της σύγκρισης που πραγματοποιήθηκε μεταξύ αυτής και της μεθόδου που κάνει χρήση αέριας χρωματογραφίας. Αποδείχθηκε πως υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων σε 95% στάθμη εμπιστοσύνης.

Προχωρώντας, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η περιεκτικότητα σκουαλενίου επηρεάζεται σημαντικά από την ποικιλία του ελαιολάδου. Στην ίδια κατεύθυνση φαίνεται να κινείται και ο παράγοντας της γεωγραφικής προέλευσης. Ωστόσο, επειδή τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της επίδρασης της γεωγραφικής προέλευσης ανήκαν ταυτόχρονα και σε διαφορετική ποικιλία, το συμπέρασμα δε μπορεί να είναι ξεκάθαρο, διότι η περιεκτικότητα σκουαλενίου επηρεάζεται ταυτόχρονα και από τους δύο παράγοντες. Είναι ακόμη σημαντικό να αναφερθεί ότι τα ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα του ελαιοπαραγωγικού έτους 2019-2020 που αναλύθηκαν χαρακτηρίστηκαν από σχετικά χαμηλότερες τιμές συγκέντρωσης σκουαλενίου συγκριτικά με τις τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, κάτι που πιθανώς οφείλεται στο ότι το συγκεκριμένο ελαιοπαραγωγικό έτος έδωσε γενικότερα ελαιόλαδα χαμηλότερης ποιότητας.

Ένα ακόμη εύρημα της μελέτης που αξίζει να σημειωθεί είναι ο σαφής διαχωρισμός των ελαιολάδων μεταξύ των ποικιλιών Κορωνέικη, Κολοβή και Αδραμυτιανή βάσει των δεδομένων της σύστασης των λιπαρών οξέων και της συγκέντρωσης σκουαλενίου. Ικανοποιητικός ήταν και ο διαχωρισμός που προέκυψε μεταξύ των γεωγραφικών προελεύσεων των δειγμάτων (Πελοπόννησος και Λέσβος), ωστόσο για τους ίδιους

λόγους με αυτούς που προαναφέρθηκαν για την επιρροή της γεωγραφικής προέλευσης στην περιεκτικότητα σκουαλενίου, το συμπέρασμα αυτό δε μπορεί να εξαχθεί με βεβαιότητα.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τους ισχυρισμούς που αναφέρονται από τη διεθνή βιβλιογραφία για το ότι τα δεδομένα της σύστασης αυτών των συστατικών είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση ελαιολάδων βάσει ποικιλίας και γεωγραφικής προέλευσης, ωστόσο κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω διεξαγωγή μελετών τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε εγχώριο επίπεδο, καθώς τα δεδομένα για τα ελληνικά ελαιόλαδα παραμένουν ελλιπή.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

### Ξενογλώσση βιβλιογραφία

- ❖ Ambra, R., Natella, F., Lucchetti, S., Forte, V., Pastore, G., **(2017)**.  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -carotene, lutein, squalene and secoiridoids in seven monocultivar Italian extra-virgin olive oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 68, 538–545. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1265099>
- ❖ Beltrán, G., Bucheli, M.E., Aguilera, M.P., Belaj, A., Jimenez, A., **(2016)**. Squalene in virgin olive oil: Screening of variability in olive cultivars: Squalene in monovarietal virgin olive oils. *Eur.J.LipidSci.Technol.*118, 1250–1253. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500295>
- ❖ Boskou, D. (Ed.), **(2009)**. Olive oil: minor constituents and health. *CRC Press*, Boca Raton.
- ❖ Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M., **(2006)**. Olive Oil: Chemistry and Technology, Second Edition. *AOCS Publishing*. <https://doi.org/10.1201/9781439832028>
- ❖ De Leonardis, A., Macciola, V., De Felice, M., **(1998)**. Rapid determination of squalene in virgin olive oil using gas-liquid chromatography. *It. J. Food Sci.* 1, 75-80.
- ❖ Dicker D.W., Whiting, M.C., **(1958)**. Synthetical studies on terpenoids. Part I. The synthesis of squalene. *J. Chem. Soc.*, 1994-2000
- ❖ Diraman, H., Saygi, H., Hisil, Y., **(2010)**. Relationship Between Geographical Origin and Fatty Acid Composition of Turkish Virgin Olive Oils for Two Harvest Years. *J.Am.Oil Chem.Soc.* 87, 781–789. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1557-2>
- ❖ El Riachy, M., Hamade, A., Ayoub, R., Dandachi, F., Chalak, L., **(2019)**. Oil Content, Fatty Acid and Phenolic Profiles of Some Olive Varieties Growing in Lebanon. *Front. Nutr.* 6, 94. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00094>
- ❖ Fernández-Cuesta, A., León, L., Velasco, L., De la Rosa, R., **(2013)**. Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Research International* 54, 1885–1889. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.049>
- ❖ Frega, N., Bocci, F., Lercker, G., **(1992)**. Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary column. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 447–450. <https://doi.org/10.1007/BF02540946>
- ❖ Gnes, F., **(2013)**. Medical use of squalene as a natural antioxidant. *MUSBED* 4, 220–228. <https://doi.org/10.5455/musbed.20131213100404>
- ❖ Grigoriadou, D., Androulaki, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., **(2007)**. Solid phase extraction in the analysis of squalene and tocopherols in olive oil. *Food Chemistry* 105, 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.065>

- ❖ Huang, Z.-R., Lin, Y.-K., Fang, J.-Y., **(2009)**. Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules* 14, 540–554. <https://doi.org/10.3390/molecules14010540>
- ❖ Inglese, P., Famiani, F., Galvano, F., Servili, M., Esposto, S., Urbani, S., **(2011)**. Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition, in: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews* 38. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 83–147. <https://doi.org/10.1002/9780470872376.ch3>
- ❖ Kalogeropoulos, N., Tsimidou, M., **(2014)**. Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants* 3, 387–413. <https://doi.org/10.3390/antiox3020387>
- ❖ Ketenoglu, O., Sahin Ozkan, K., Yorulmaz, A., Tekin, A., **(2018)**. Molecular distillation of olive pomace oil - Multiobjective optimization for tocopherol and squalene. *LWT- Food Science and Technology* 91, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.051>
- ❖ Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagaoka, S., Takahashi, M., Mukai, K., **(1995)**. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1256, 52–56. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00005-W](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00005-W)
- ❖ Lanzón, A., Albi, T., Cert, A., Gracián, J., **(1994)**. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 285–291. <https://doi.org/10.1007/BF02638054>
- ❖ Laroussi-Mezghani, S., Vanloot, P., Molinet, J., Dupuy, N., Hammami, M., Grati-Kamoun, N., Artaud, J., **(2015)**. Authentication of Tunisian virgin olive oils by chemometric analysis of fatty acid compositions and NIR spectra. Comparison with Maghrebian and French virgin olive oils. *Food Chemistry* 173, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.002>
- ❖ Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-de la Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L.M., Ortega-Gomez, A., Abia, R., Muriana, F.J.G., **(2014)**. Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1638–1656. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.007>
- ❖ Lozano-Grande, M.A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., Martínez-Ayala, A.L., **(2018)**. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *International Journal of Agronomy* 2018, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/1829160>
- ❖ Liu, C.K. George, Ahrens, E.H., Schreiberman H. Paul., Crouse, R.John, **(1976)**. Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application. *Journal of Lipid Research* 17, 38-45.
- ❖ Mansour, A.B., Gargouri, B., Flamini, G., Bouaziz, M., **(2015)**. Effect of Agricultural Sites on Differentiation between Chemlali and Neb Jmel Olive Oils. *J. Oleo Sci.* 64, 381–392. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14204>



- ❖ Manzi, P., Panfili, G., Esti, M., Pizzoferato, L., (1998). Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 77, 115-120.
- ❖ Martakos, I., Kostakis, M., Dasenaki, M., Pentogennis, M., Thomaidis, N., (2019). Simultaneous Determination of Pigments, Tocopherols, and Squalene in Greek Olive Oils: A Study of the Influence of Cultivation and Oil-Production Parameters. *Foods* 9, 31. <https://doi.org/10.3390/foods9010031>
- ❖ Mikrou, T., Pantelidou, E., Parasyri, N., Papaioannou, A., Kapsokefalou, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., (2020). Varietal and Geographical Discrimination of Greek Monovarietal Extra Virgin Olive Oils Based on Squalene, Tocopherol, and Fatty Acid Composition. *Molecules* 25, 3818. <https://doi.org/10.3390/molecules25173818>
- ❖ Miller, J.N., Miller, J.C., (2005). Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5th ed., ed. *Pearson Prentice Hall*, Harlow, England; New York.
- ❖ Murkovic, M., Lechner, S., Pietzka, A., Bratacos, M., Katzogiannos, E., (2004). Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 61, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.002>
- ❖ Nenadis, N., Tsimidou, M., (2002). Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 79, 257–259. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0470-1>
- ❖ Nergiz, C., Çelikkale, D., (2011). The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils. *J. Food Sci. Technol.* 48, 382–385. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0190-2>
- ❖ Newmark, H.L., (1997). Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6, 1101–1103.
- ❖ Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J.P., Guère, M., (2003). Triacylglycerol and Fatty Acid Compositions of French Virgin Olive Oils. Characterization by Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5723–5731. <https://doi.org/10.1021/jf034365p>
- ❖ Perez-Camino, C.M., Moreda, W., Mateos, R., Cert, A., (2002). Determination of Esters of Fatty Acids with Low Molecular Weight Alcohols in Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4721–4725. <https://doi.org/10.1021/jf025542+>
- ❖ Popa, I., Popa, O., Băbeanu, N.E., Niță, S., (2014). Squalene- Natural Resources and applications. *Farmacia* 62, 840–862.
- ❖ Psomiadou, E., Tsimidou, M., (1999). On the Role of Squalene in Olive Oil Stability. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4025–4032. <https://doi.org/10.1021/jf990173b>
- ❖ Quiles, J.L., Sánchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, C.L., Granados-Principal, S., Bertoli, E., Battino, M., Ramirez-Tortosa, M.C., (2010). Virgin olive oil minor components

as natural drugs for the treatment of breast cancer: preliminary experiments on squalene. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3, 221–225. <https://doi.org/10.1007/s12349-010-0019-6>

❖ Rao, C., (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 19, 287–290. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.2.287>

❖ Rastrelli, L., Passi, S., Ippolito, F., Vacca, G., De Simone, F., (2002). Rate of Degradation of  $\alpha$ -Tocopherol, Squalene, Phenolics, and Polyunsaturated Fatty Acids in Olive Oil during Different Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5566-5570. <https://doi.org/10.1021/jf011063j>

❖ Reddy, L.H., Couvreur, P., (2009). Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 1412-1426. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.005>

❖ Rondanini, D.P., Castro, D.N., Searles, P.S., Rousseaux, M.C., (2011). Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y Aceites* 62, 399–409. <https://doi.org/10.3989/gya.125110>

❖ Ruiz-Perez, D., Narasimhan, G., (2017). So you think you can PLS-DA? (preprint). *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/207225>

❖ Sakouhi, F., Herchi, W., Sbei, K., Absalon, C., Boukhchina, S., (2011). Characterisation and accumulation of squalene and n-alkanes in developing Tunisian *Olea europaea* L. fruits: Squalene and n-alkanes in developing Tunisian *Olea europaea* L. fruits. *International Journal of Food Science & Technology* 46, 2281–2286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02747.x>

❖ Salvo, A., La Torre, G.L., Di Stefano, V., Capocchiano, V., Mangano, V., Saija, E., Pellizzeri, V., Casale, K.E., Dugo, G., (2017). Fast UPLC/PDA determination of squalene in Sicilian P.D.O. pistachio from Bronte: Optimization of oil extraction method and analytical characterization. *Food Chemistry* 221, 1631-1636. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.126>

Sayago, A., González-Domínguez, R., Urbano, J., Fernández-Recamales, Á., (2019). Combination of vintage and new-fashioned analytical approaches for varietal and geographical traceability of olive oils. *LWT* 111, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.009>

❖ Smith, T., (1998). Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 19, 703–706. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.4.703>

❖ Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F., Koutsaftakis, A., (1999). Classification of virgin olive oils of the two major cretan cultivars based on their fatty acid composition. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 76, 623–626. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0013-7>

- ❖ Tsimidou, M., Karakostas, K., (1993). Geographical classification of Greek virgin olive oil by non-parametric multivariate evaluation of fatty acid composition. *J. Sci. Food Agric.* 62, 253–257. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620308>
- ❖ Tsujimoto, M., (1920). Squalene: A Highly Unsaturated Hydrocarbon in Shark Liver Oil. *J. Ind. Eng. Chem.* 12, 63–72. <https://doi.org/10.1021/ie50121a020>
- ❖ Tsujimoto, M., (1916). A highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil. *J. Ind. Eng. Chem.* 8, 889–896. <https://doi.org/10.1021/i500010a005>
- ❖ van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- ❖ Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Kourkoutas, Y., Kamoun, N., Msallem, M., Psimouli, V., Arapoglou, D., (2010). Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Koroneiki varieties from southern Greece. *Grasas y Aceites* 61, 221–231. <https://doi.org/10.3989/gya.108709>
- ❖ Wołosik, K., Knaś, M., Zalewska, A., Niczyporuk, M., Przystupa, A.W., (2013). The importance and perspective of plant-based squalene in cosmetology. *J Cosmet Sci* 64, 59–66.
- ❖ Xia, J., Psychogios, N., Young, N., Wishart, D.S., (2009). MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research* 37, W652–W660. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>

## Ελληνική βιβλιογραφία

- ❖ Ναζίρη, Ε., (2013). Αναζήτηση νέων πηγών σκουαλενίου και περαιτέρω διερεύνηση των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- ❖ Τσότσου, Α., Τσιμίδου, Μ.Ζ., (2004). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Δημοσίευτη εργασία, Θεσσαλονίκη.
- ❖ Ποντίκης, Κ., 2000. Ειδική δενδροκομία, ελαιοκομία. Τόμος 3. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- ❖ Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/1991 Σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαίων καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύστασης των λιπαρών οξέων των ελαιολάδων από την ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία (GC) εκφρασμένα ως ποσοστά επί τις συνολικής ποσότητας των λιπαρών οξέων.

**Πίνακας 14:** Σύσταση λιπαρών οξέων εκφρασμένα ως % της συνολικής ποσότητας. Λιπαρά οξέα: μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0), παλμιτελαϊκό (C16:1), δεκαεπτανοϊκό (C17:0), cis-δεκαεπτενοϊκό (C17:1), στεατικό (C18:0), ελαϊκό (C18:1), λιγνολαϊκό (C18:2), λιγνολενικό (C18:3), αραχιδικό (C20:0), βεχενικό (C22:0), λιγνοκηρικό (C24:0)

ΔΕΙΓΜΑ	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0
KOR_MES_													
OO_13	0,01	13,20	0,85	0,04	0,07	2,55	77,11	4,78	0,51	0,42	0,27	0,14	0,05
KOR_MES_													
OO_14	0,01	12,99	0,84	0,04	0,07	2,45	76,70	5,27	0,64	0,45	0,31	0,16	0,076
KOR_MES_													
OO_15	0,01	15,10	0,82	0,04	0,06	2,57	74,66	5,26	0,58	0,43	0,28	0,14	0,06
KOR_MES_													
OO_16	0,01	12,34	0,82	0,04	0,07	2,38	77,89	4,82	0,65	0,44	0,31	0,16	0,07
KOR_MES_													
OO_17	0,01	13,30	0,79	0,04	0,07	2,51	76,70	4,88	0,67	0,46	0,32	0,17	0,07
KOR_MES_													
OO_18	0,01	12,13	0,83	0,04	0,08	2,48	77,44	5,23	0,71	0,47	0,32	0,17	0,08
KOR_MES_													
OO_19	0,01	11,68	0,84	0,04	0,08	2,22	79,02	4,37	0,72	0,44	0,33	0,19	0,07
KOR_MES_													
OO_20	0,01	12,54	0,84	0,04	0,07	2,82	76,25	5,78	0,62	0,47	0,29	0,21	0,06
KOR_MES_													
OO_21	0,01	13,40	0,89	0,04	0,07	2,99	74,82	6,11	0,71	0,48	0,25	0,16	0,06
KOR_MES_													
OO_22	0,01	13,23	0,88	0,04	0,07	2,27	76,87	5,04	0,64	0,41	0,30	0,16	0,06
KOR_MES_													
OO_24	0,01	12,08	0,90	0,04	0,08	2,72	76,13	6,38	0,67	0,45	0,29	0,17	0,07
KOR_MES_													
OO_25	0,01	12,35	0,88	0,04	0,08	2,66	76,12	6,12	0,71	0,46	0,31	0,17	0,08
KOR_MES_													
OO_26	0,01	14,11	0,81	0,05	0,08	2,68	75,63	5,03	0,63	0,46	0,28	0,18	0,06
KOR_MES_													
OO_27	0,01	14,18	0,79	0,04	0,07	2,85	75,31	5,18	0,61	0,46	0,26	0,17	0,07
KOR_MES_													
OO_28	0,01	13,67	0,85	0,04	0,07	2,99	74,40	6,32	0,68	0,47	0,27	0,18	0,06
KOR_MES_													
OO_29	0,01	10,71	0,85	0,04	0,08	2,50	78,24	5,78	0,76	0,46	0,31	0,19	0,07
KOR_MES_													
OO_30	0,01	12,34	0,91	0,04	0,07	2,52	76,53	5,96	0,66	0,45	0,29	0,16	0,06
KOR_MES_													
OO_31	0,01	12,59	0,88	0,04	0,07	3,21	74,13	7,21	0,79	0,51	0,31	0,17	0,07
KOR_MES_													
OO_32	0,01	13,43	0,96	0,05	0,07	2,96	73,17	7,63	0,72	0,48	0,29	0,15	0,08
KOR_KOR_													
OO_1	0,01	12,73	0,80	0,04	0,07	2,40	76,11	6,35	0,60	0,41	0,29	0,14	0,06
KOR_KOR_													
OO_2	0,01	11,68	0,70	0,04	0,06	2,45	78,92	4,64	0,58	0,43	0,27	0,15	0,07
KOR_KOR_													
OO_3	0,01	13,34	0,88	0,04	0,07	2,31	75,17	6,66	0,66	0,44	0,32	0,04	0,07
KOR_KOR_													
OO_4	0,01	11,95	0,65	0,04	0,07	2,34	75,29	8,12	0,54	0,43	0,32	0,17	0,07
KOR_KOR_													
OO_5	0,01	14,88	1,06	0,04	0,08	2,09	74,63	5,38	0,84	0,43	0,31	0,16	0,08
KOL_LES_O													
O_17	0,01	9,00	0,42	0,03	0,06	2,56	76,31	9,94	0,69	0,40	0,39	0,14	0,06
KOL_LES_O													
O_18	0,01	11,84	0,52	0,04	0,07	2,30	72,99	10,41	0,91	0,37	0,34	0,12	0,07
ADR_LES_													
OO_19	0,01	12,92	0,76	0,14	0,22	2,35	70,54	11,39	0,61	0,42	0,33	0,21	0,09

KOL_LES_O O_20	0,01	9,47	0,44	0,04	0,07	2,16	77,89	8,20	0,75	0,37	0,37	0,14	0,09
KOL_LES_O O_21	0,01	10,49	0,64	0,05	0,10	2,36	75,25	9,20	0,93	0,41	0,34	0,14	0,07
KOL_LES_O O_22	0,01	11,35	0,46	0,04	0,06	2,66	75,79	7,84	0,78	0,41	0,36	0,15	0,08
KOL_LES_O O_23	0,01	10,54	0,42	0,04	0,07	2,24	76,98	8,05	0,69	0,37	0,37	0,16	0,06
KOL_LES_O O_24	0,01	10,02	0,45	0,04	0,07	2,31	77,45	8,03	0,69	0,37	0,36	0,14	0,07
KOL_LES_O O_25	0,01	13,35	0,44	0,04	0,07	2,38	73,86	8,33	0,67	0,36	0,32	0,11	0,06
KOL_LES_O O_26	0,01	11,77	0,46	0,05	0,08	2,41	75,07	8,56	0,67	0,38	0,35	0,14	0,06
ADR_LES_ OO_27	0,02	11,11	0,60	0,10	0,14	2,85	71,25	12,13	0,79	0,44	0,36	0,13	0,06
ADR_LES_ OO_28	0,02	12,56	0,67	0,17	0,23	3,03	69,15	12,34	0,77	0,49	0,35	0,14	0,07
ADR_LES_ OO_29	0,02	12,71	0,68	0,16	0,22	3,02	68,55	12,82	0,75	0,49	0,35	0,14	0,09
ADR_LES_ OO_30	0,02	12,08	0,67	0,13	0,19	3,00	68,37	13,51	0,89	0,50	0,38	0,18	0,08
ADR_LES_ OO_31	0,02	14,73	0,74	0,10	0,15	2,71	68,01	11,86	0,69	0,45	0,31	0,16	0,08
ADR_LES_ OO_32	0,02	12,77	0,70	0,16	0,23	2,81	69,00	12,50	0,76	0,47	0,34	0,17	0,07
KOL_LES_O O_33	0,01	9,78	0,50	0,04	0,07	2,34	75,54	9,99	0,76	0,39	0,37	0,14	0,08
KOL_LES_O O_35	0,01	13,53	0,40	0,04	0,07	2,41	75,45	6,59	0,63	0,35	0,34	0,13	0,06
KOL_LES_O O_35	0,01	11,70	0,41	0,04	0,07	2,28	75,74	8,22	0,64	0,34	0,36	0,13	0,06
KOL_LES_O O_36	0,01	9,62	0,43	0,04	0,06	2,37	75,20	10,59	0,73	0,38	0,39	0,12	0,06
KOL_LES_O O_37	0,01	9,08	0,43	0,04	0,07	2,37	76,07	10,26	0,69	0,38	0,39	0,13	0,07
KOL_LES_O O_38	0,01	10,75	0,48	0,06	0,09	2,57	72,30	12,06	0,71	0,40	0,36	0,12	0,08
KOL_LES_O O_39	0,01	9,63	0,48	0,05	0,08	2,91	74,67	10,07	0,95	0,46	0,41	0,20	0,07
KOL_LES_O O_40	0,01	9,31	0,52	0,05	0,09	2,33	74,59	11,41	0,75	0,37	0,38	0,13	0,06
KOL_LES_O O_41	0,01	10,14	0,57	0,04	0,08	2,22	74,94	10,11	0,87	0,38	0,38	0,18	0,07
KOL_LES_O O_42	0,01	9,02	0,41	0,04	0,06	2,57	75,86	10,17	0,85	0,40	0,40	0,14	0,06
KOL_LES_O O_43	0,01	8,32	0,39	0,03	0,06	2,37	78,50	8,86	0,53	0,37	0,37	0,14	0,06
KOL_LES_O O_44	0,01	10,59	0,44	0,04	0,07	2,43	76,28	8,43	0,73	0,39	0,37	0,13	0,06
KOL_LES_O O_45	0,01	8,62	0,41	0,04	0,06	2,45	77,72	8,99	0,67	0,39	0,39	0,14	0,10
KOL_LES_O O_46	0,01	9,18	0,45	0,04	0,08	2,40	76,76	9,44	0,68	0,38	0,38	0,15	0,06
KOL_LES_O O_47	0,01	9,27	0,45	0,04	0,07	2,42	76,77	9,29	0,69	0,39	0,38	0,14	0,07
KOL_LES_O O_48	0,01	9,47	0,45	0,04	0,07	2,45	77,20	8,58	0,72	0,40	0,38	0,16	0,07
KOL_LES_O O_49	0,01	8,67	0,42	0,04	0,06	2,36	77,61	9,28	0,64	0,37	0,39	0,14	0,06