



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ
ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑΣ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΑΠΟ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟ ΚΑΙ ΣΠΟΡΕΛΑΙΑ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FTIR)**

ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

Επιβλέπων: Φώτιος Τσόπελας, Επίκουρος Καθηγητής ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2024

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας στο εργαστήριο Ενόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά την περίοδο του χειμερινού εξαμήνου του ακαδημαϊκού έτους 2023-2024. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μίας πρωτότυπης και φιλικής προς το περιβάλλον αναλυτικής τεχνικής που θα έχει την ικανότητα να διαφοροποιεί τα παρθένα ελαιόλαδα από έλαια κατώτερης ποιότητας (σπορέλαια, πυρηνέλαιο). Η ανάθεση και η επίβλεψη της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε από τον κύριο Φώτιο Τσόπελα, Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Χημικών Επιστημών, Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω τον κύριο Φώτιο Τσόπελα για τη σημαντική υποστήριξη που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, καθώς και την Δρ. Χημικό Μηχανικό του ΕΜΠ Λαμπρινή-Αρετή Τσακανίκα για την βοήθεια που παρείχε κατά την εκτέλεση των μετρήσεων με το φασματοόμετρο υπερύρου (FTIR).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	2
Ευρετήριο Εικόνων.....	5
Ευρετήριο Πινάκων.....	7
Περίληψη	8
Abstract.....	9
1 Θεωρητικό Μέρος	10
1.1 Ελαιόλαδο.....	10
1.1.1 Η Ελιά	10
1.1.2 Από την ελιά στο ελαιόλαδο.....	11
1.1.3 Η χημική σύσταση του ελαιόλαδου.....	13
1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου.....	14
1.1.5 Ποιοτικές κατηγορίες ελαιόλαδου.....	15
1.1.6 Παραγωγή και κατανάλωση ελαιόλαδου.....	17
1.1.7 Το ελαιόλαδο και η Ελληνική Οικονομία-Εξέλιξη της τιμής του ελαιόλαδου.....	19
1.1.8 Νομοθετικό πλαίσιο που διέπει την παραγωγή ελαιόλαδων.....	20
1.2 Πυρηνέλαιο.....	23
1.3 Σπορέλαια.....	23
1.4 Η Νοθεία του ελαιόλαδου.....	24
1.5 Διεθνείς και Ελληνικοί φορείς υπεύθυνοι για τον έλεγχο του ελαιόλαδου.....	25
1.6 Σημασία του ελέγχου της νοθείας του ελαιόλαδου στην Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση.....	26
1.7 Ενόργανες τεχνικές ελέγχου νοθείας του ελαιόλαδου.....	26
1.7.1 Πρότυπες τεχνικές ανίχνευσης της νοθείας του ελαιόλαδου.....	27
1.7.2 Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης.....	28
1.7.2.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	29

1.7.2.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC).....	30
1.7.3 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC).....	31
1.7.4 Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές.....	31
1.7.4.1 Κυκλική Βολταμμετρία.....	32
1.7.5 Φασματομετρικές τεχνικές ανάλυσης.....	34
1.7.5.1 Φασματομετρία Raman.....	35
1.7.5.2 Φασματομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis).....	36
1.7.5.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	37
1.7.5.4 Φασματομετρία Υπερύθρου (IR)- Φασματομετρία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	38
1.8 Χημειομετρία.....	40
1.8.1 Ορισμός της Χημειομετρίας.....	40
1.8.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA).....	41
1.8.3 Διακριτή (διακριτική) ανάλυση μερικών τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA).....	42
1.8.4 Ανάλυση μίας κλάσης (Class Modeling).....	43
1.8.5 Ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares).....	44
2 Πειραματικό Μέρος.....	45
2.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας.....	45
2.2 Προκαταρκτικά πειράματα.....	47
2.3 Αντιδραστήρια, υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.....	47
2.3.1 Έλαια που χρησιμοποιήθηκαν.....	47
2.3.2 Επιλογή μέσου εκχύλισης.....	50
2.3.3 Φασματόμετρο Υπερύθρου (IR).....	51
2.4 Πειραματική διαδικασία.....	52
2.4.1 Εκχύλιση των ελαίων.....	53

2.4.2 Παρασκευή δισκίων KBr.....	57
2.4.3 Πραγματοποίηση των μετρήσεων.....	58
2.4.4 Υπολογιστικά εργαλεία.....	59
2.5 Αποτελέσματα.....	60
2.6 Επεξεργασία των μετρήσεων.....	63
2.6.1 Χημειομετρική επεξεργασία.....	63
2.6.1.1 PCA για 4000-400 cm ⁻¹	63
2.6.1.2 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class modeling) για 4000-400 cm ⁻¹	64
2.6.1.3 PCA για 1800-400 cm ⁻¹	66
2.6.1.4 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class modelling) για 1800-400 cm ⁻¹	68
Συμπεράσματα.....	70
Προτάσεις.....	71
Βιβλιογραφία.....	72

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή ελιάς (σε τόνους) για το έτος 2013	11
Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου.....	12
Εικόνα 3: Το ελαιϊκό οξύ.....	14
Εικόνα 4: Τα ποσοστά παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου για τα έτη 2017-2018 και 2018-2019.....	18
Εικόνα 5: Κατανάλωση σε (kg) ελαιόλαδου ανά κάτοικο για το έτος 2019 σε διάφο- ρες χώρες.....	19
Εικόνα 6: Εξέλιξη της παγκόσμιας τιμής του ελαιόλαδου κατά την περίοδο 1990- 2023.....	20

Εικόνα 7: Τριγωνική κυματομορφή δυναμικού.....	33
Εικόνα 8: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.....	46
Εικόνα 9: Οργανολογία ενός φασματόμετρου FTIR.....	51
Εικόνα 10: Φασματόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	52
Εικόνα 11: Συγκριτικό διάγραμμα φάσματος IR παρθένου ελαιόλαδου για τις αναλογίες όγκων 40/20 και 50/10.....	54
Εικόνα 12: Συγκριτικό διάγραμμα φάσματος IR ηλιέλαιου για τις αναλογίες 40/20 και 50/10.....	54
Εικόνα 13: Η διάταξη της εκχύλισης πριν την ανάδευση.....	55
Εικόνα 14: Η διάταξη της εκχύλισης μετά την ανάδευση.....	56
Εικόνα 15: Φιαλίδια με εκχυλίσματα ελαιόλαδου (ανοιχτό πράσινο χρώμα), πυρηνέλαιου (διαφανές), ηλιέλαιου (διαφανές), αραβοσιτέλαιου (διαφανές), σογιέλαιο (διαφανές).....	56
Εικόνα 16: Η διάταξη της πρέσας και τα σύνεργα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δισκίων.....	57
Εικόνα 17: Δισκίο KBr αφού προστεθεί εκχύλισμα και εξατμιστεί η μεθανόλη.....	58
Εικόνα 18: Συγκριτικό φασματομετρικό διάγραμμα IR μεταξύ ενός παρθένου ελαιόλαδου και ενός σπορέλαιου.....	60
Εικόνα 19: Συγκριτικό φασματομετρικό διάγραμμα IR μεταξύ ενός παρθένου ελαιόλαδου και ενός πυρηνέλαιου.....	62
Εικόνα 20: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την ανάλυση παρθένων ελαίων, σπορέλαιων και πυρηνέλαιων για την περιοχή (4000-400 cm^{-1}).....	64
Εικόνα 21: Μοντελοποίηση μίας κλάσης για την περιοχή 4000-400 cm^{-1}	65
Εικόνα 22: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την ανάλυση παρθένων ελαίων, σπορέλαιων και πυρηνέλαιων για την περιοχή (1800-400 cm^{-1}).....	66
Εικόνα 23: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την ανάλυση	

παρθένων ελαιόλαδων και μη ελαιόλαδων για την περιοχή (1800-400 cm^{-1}). Επισημαίνεται η περιοχή των παρθένων ελαιόλαδων.....	67
Εικόνα 24: Μοντελοποίηση μίας κλάσης για την περιοχή 1800-400 cm^{-1}	68

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τα ΠΟΠ και ΠΓΕ ελαιόλαδα.....	22
Πίνακας 2: Μέσες τιμές πώλησης ελαίων σε ελληνικά σούπερ μάρκετ κατά το έτος 2024.....	24
Πίνακας 3: Παρθένα ελαιόλαδα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.....	48
Πίνακας 4: Ηλιέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.....	48
Πίνακας 5: Αραβοσιτέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία....	49
Πίνακας 6: Σογιέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.....	49
Πίνακας 7: Πυρηνέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.....	49
Πίνακας 8: Οι παράμετροι των μετρήσεων με το φασματόμετρο FTIR.....	59

Περίληψη

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη της φασματομετρικής συμπεριφοράς διάφορων τύπων ελαίων, όπως παρθένα ελαιόλαδα, πυρηνέλαια, ηλιέλαια, σογιέλαια και αραβοσιτέλαια. Στόχος της εργασίας αποτελεί η ανάπτυξη μίας πρωτότυπης αναλυτικής μεθόδου που θα είναι ικανή να διαχωρίζει τα παρθένα ελαιόλαδα από τα υπόλοιπα κατώτερης ποιότητας έλαια. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν συνολικά 47 έλαια όλων των παραπάνω ειδών, τα οποία είναι διαθέσιμα στην ελληνική αγορά. Η μέθοδος που προτάθηκε περιλαμβάνει την εκχύλιση υγρού-υγρού των ελαίων με διαλύτη μεθανόλη. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η αναλογία ελαίου/μεθανόλης 50/10. Ωστόσο λόγω κορεσμού της φάσης της μεθανόλης στο έλαιο, η αναλογία απορρίφθηκε και χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 40/20. Στη συνέχεια τα μεθανολικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο FTIR KBr. Τα δισκία KBr που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν εργαστηριακά. Για την κατηγοριοποίηση των ελαίων, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των δεδομένων (datapoints) των φασμάτων FTIR, τα οποία υποβλήθηκαν σε χημειομετρική ανάλυση με την μέθοδο της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και της μοντελοποίησης μίας κλάσης (Class Modeling). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η περιοχή του φάσματος FTIR ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), ωστόσο καμία από τις δύο χημειομετρικές μεθόδους δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη χημειομετρική ανάλυση μόνο η περιοχή με τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές ($1800-400\text{ cm}^{-1}$). Παρατηρήθηκε λοιπόν πως με τη μέθοδο ανάλυσης κύριων συνιστωσών PCA, τα ελαιόλαδα συγκεντρώνονταν σε μία συγκεκριμένη περιοχή του χώρου. Ακόμα η μέθοδος μοντελοποίησης μίας κλάσης (Class Modeling) διέκρινε σε ικανοποιητικό βαθμό τα παρθένα ελαιόλαδα από τα κατώτερης ποιότητας έλαια που αναλύθηκαν.

Λέξεις- κλειδιά: Νοθεία ελαιόλαδου, παρθένο ελαιόλαδο, πυρηνέλαιο, σπορέλαια, φασματομετρία FTIR, ανάλυση κύριων συνιστωσών PCA, μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class Modeling).

Abstract

This diploma thesis presents a study on the spectrometric behavior of various types of oils, including virgin olive oils, pomace oils, sunflower oils, soybean oils, and corn oils. The objective of this work is to develop a novel analytical method capable of distinguishing virgin olive oils from lower quality oils. To achieve this goal, a total of 47 oils representing all the aforementioned types available in the Greek market were collected. The proposed method involves liquid-liquid extraction of the oils using methanol as the solvent. Initially, a oil-to-methanol ratio of 50/10 was utilized. However, due to saturation of the methanol phase by the oil, this ratio was deemed unsuitable, leading to the selection of a 40/20 ratio. The resulting methanolic extracts were subsequently analyzed using Fourier transform infra-red spectrometry (FT-IR) with KBr tablets prepared in the laboratory. To categorize the oils, data points from the FTIR spectra were extracted and subjected to chemometric analysis using principal component analysis (PCA) and Class Modeling methods. Initially, the entire FT-IR spectrum range ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) was considered. However, neither of the two chemometric methods yielded satisfactory results. Consequently, only the region displaying the most statistically significant differences ($1800-400\text{ cm}^{-1}$) was utilized for further analysis. The results revealed that the PCA method concentrated olive oils within a specific area of the space, while the Class Modeling method effectively distinguished virgin olive oils from the lower quality oils analyzed, achieving satisfactory discrimination.

Keywords: Olive oil adulteration, virgin olive oil, pomace oil, seed oils, FTIR spectrometry, principal component analysis PCA, Class Modeling.

1 Θεωρητικό Μέρος

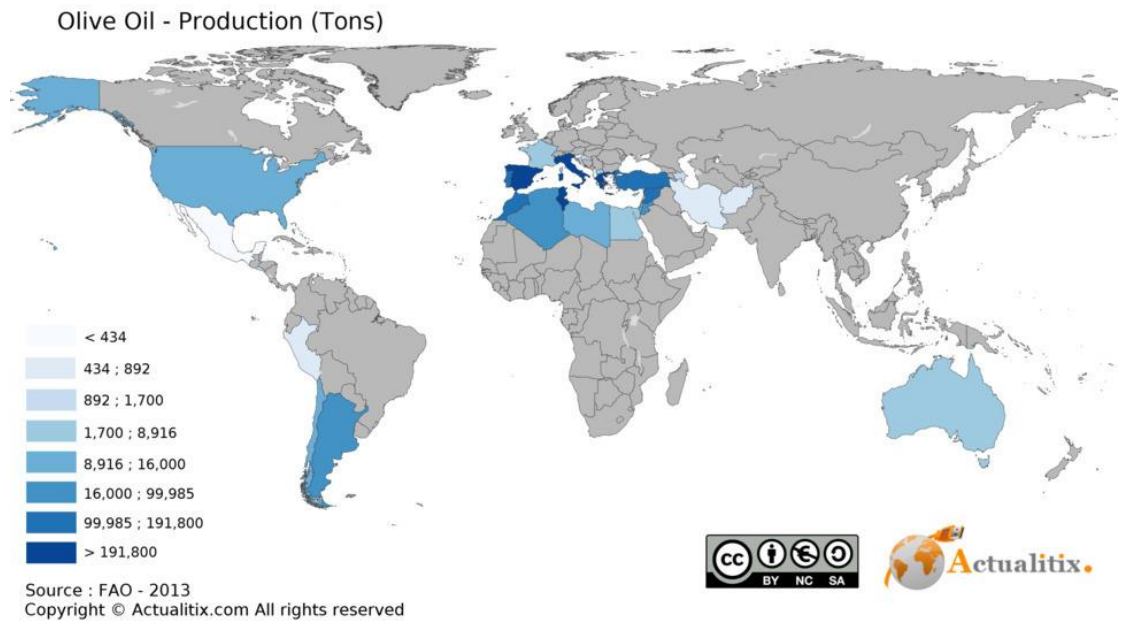
1.1 Ελαιόλαδο

1.1.1 Η Ελιά

Η ελιά (*Olea europaea*) ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* και το γένος *Olea*. Είναι ένα υποτροπικό, καρποφόρο, αειθαλές δέντρο και χαρακτηρίζεται ως ανώτερο φυτό. Είναι αγγειόσπερμο, σπερματόφυτο, δικότυλο και συμπέταλο της τάξης των στρεψιανθών. Το είδος *Olea europaea* είναι το μόνο από τα τριάντα είδη του γένους *Olea* που παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον. Η ευρωπαϊκή ελιά (*Olea europaea*) έχει δύο υποείδη, την καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea sativa*) και την αγριελιά (*Olea europaea var oleaster* ή *vulgaris* ή *sylvestris*).

Στα βάθη των αιώνων χάνεται η εμφάνιση του δέντρου της ελιάς. Η συστηματική καλλιέργεια του δέντρου της ελιάς στη Μεσόγειο χρονολογείται από το 2^ο αιώνα π.Χ. Λέγεται ότι το ελαιόδεντρο υπήρχε στη λεκάνη της Μεσογείου από όταν ο πρωτόγονος άνθρωπος ασχολήθηκε με τη γεωργία. Στον Ελλαδικό χώρο η ελιά καλλιεργείται από τα Μινωικά χρόνια, όπως μαρτυρούν τα ευρήματα των ανασκαφών. Το ελαιόλαδο είναι γνωστό εδώ και μερικές χιλιάδες χρόνια. Πρώτα οι αρχαίοι Αιγύπτιοι και έπειτα οι Φοίνικες, ακολουθώντας την ίδια μέθοδο με την οποία ο Αιγύπτιοι παραλάμβαναν το έλαιο από τους σπόρους. Το ελαιόλαδο δε χρησιμοποιούνταν από πάντα ως τρόφιμο. Οι αρχαίοι λαοί θεωρούσαν το ελαιόλαδο ευγενές προϊόν, τόσο που στα Ομηρικά χρόνια το χρησιμοποιούσαν ως μέσο καλλωπισμού. Από τον 6^ο αιώνα π.Χ. ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως είδος διατροφής. Έκτοτε απέκτησε μεγάλη οικονομική σημασία και η παραγωγή του συνδέθηκε άμεσα με την οικονομική ανάπτυξη της περιοχής το παρήγαγε.

Το ελαιόδεντρο όπως γίνεται αντιληπτό είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη Μεσόγειο. Η Νότια Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Γαλλία, η Τουρκία, η Κύπρος, η Συρία, ο Λίβανος είναι μερικές από τις σημαντικότερες ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου. Η καλλιέργεια της ελιάς ωστόσο δε περιορίζεται γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου. Η ελιά μέσω των Ισπανών μεταναστών διαδόθηκε στην Καλιφόρνια, στη Νότια Αριζόνα και την Λατινική Αμερική, καθώς επίσης και στην Αυστραλία μέσω των Ιταλών. Σήμερα καλλιεργείται ακόμα σε περιοχές της Ιαπωνίας και του Πακιστάν. [1]

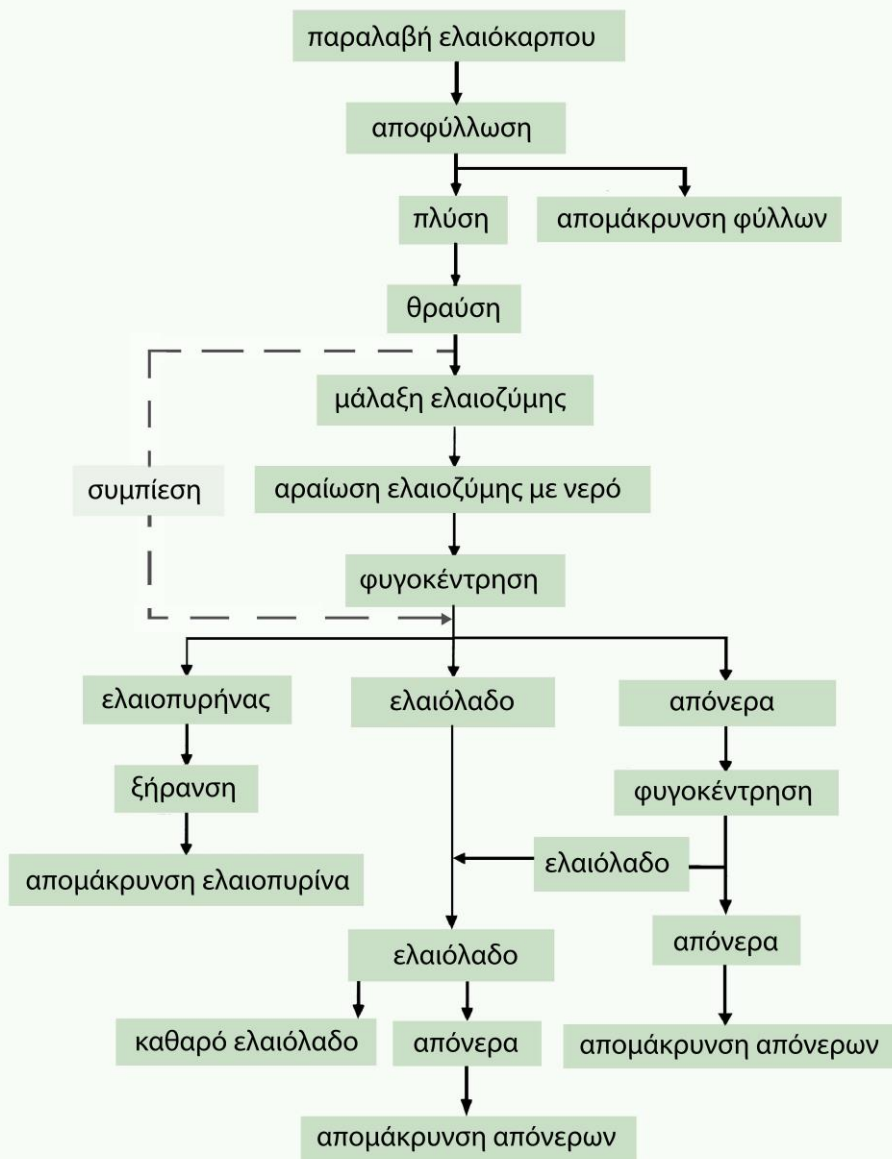


Εικόνα 1: Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή ελιάς (σε τόνους) για το έτος 2013.
[2]

1.1.2 Από την ελιά στο ελαιόλαδο

Σχεδιάστηκε και παρουσιάζεται παρακάτω το διάγραμμα ροής της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου.

ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

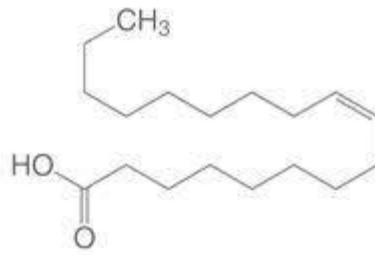


Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου.

1.1.3 Η χημική σύσταση του ελαιολάδου

Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το κυριότερο συστατικό του ελαιόλαδου. Τα τριγλυκερίδια του ελαιόλαδου δεν έχουν την ίδια χημική σύσταση, αποτελούνται δηλαδή από τριεστέρες της γλυκερόλης με διάφορα λιπαρά οξέα (κορεσμένα ή ακόρεστα). Εκτός από τα τριγλυκερίδια το λάδι περιέχει και άλλα οργανικά συστατικά σε πιο μικρές ποσότητες. Αυτά τα συστατικά ωστόσο είναι πολύ σημαντικά για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Μεταξύ αυτών των συστατικών περιλαμβάνονται τα εξής:

- ❖ Ελεύθερα λιπαρά οξέα προερχόμενα από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Τα κυριότερα ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το λινολενικό, καθώς και το παλμιτικό και το στεατικό που είναι κορεσμένα οξέα.
- ❖ Αλειφατικές αλκοόλες
- ❖ Στερόλες
- ❖ Φωσφολιπίδια, όπως η λεκιθίνη και η κεφαλίνη σε μικρές ποσότητες
- ❖ Φαινόλες και πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και προστατεύουν το ελαιόλαδο από οξειδώσεις (τάγγισμα) από το οξυγόνο ή την ηλιακή ακτινοβολία. Ένα ελαιόλαδο που έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες χαρακτηρίζεται ως καλής ποιότητας, καθώς εκτός από το ότι έχει μεγάλη διάρκεια ζωής, η κατανάλωσή του λειτουργεί αντιοξειδωτικά προστατεύοντας τα κύτταρα του οργανισμού από τις οξειδώσεις. Ακόμα η φαινολική σύσταση του ελαιολάδου είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της προέλευσής του. Μερικές από τις πιο σημαντικές πολυφαινόλες που έχουν ταυτοποιηθεί είναι η τυροσόλη, η ελαιασίνη, η βαλλίνη, το καφεϊκό οξύ, η υδροξυτυροσόλη, το φερουλικό οξύ και η ελαιοκανθόλη.
- ❖ Διάφορα Ρητινοειδή
- ❖ Τοκοφερόλες
- ❖ Χρωστικές ουσίες όπως οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Το χρώμα του ελαιολάδου είναι είτε πρασινωπό είτε χρυσοκίτρινο. Η χρωροφύλλη a είναι αυτή που δίνει κυανοπράσινο χρώμα, ενώ η b δίνει κιτρινοπράσινη απόχρωση. Τα καροτενοειδή δίνουν κίτρινη απόχρωση. Η ποσοτική σύσταση των παραπάνω συστατικών δίνουν στο ελαιόλαδο το χαρακτηριστικό του χρώμα, το οποίο διαφέρει από ελαιόλαδο σε ελαιόλαδο. [3]



Εικόνα 3: Το ελαϊκό οξύ. [4]

Η ποσοτική σύσταση του ελαιόλαδου σε λιπαρά οξέα παρουσιάζει διαφοροποιήσεις μεταξύ των διάφορων ελαιόλαδων. Μερικοί από τους παράγοντες που την επηρεάζουν είναι οι εξείς:

- ❖ Η γεωγραφική προέλευση του ελαιόλαδου
- ❖ Η ηλικία των δένδρων
- ❖ Η ποιότητα της ελιάς
- ❖ Ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού
- ❖ Οι συνθήκες που γίνεται η συγκομιδή των καρπών
- ❖ Η μέθοδος παραγωγής του ελαιόλαδου που ακολουθείται στο ελαιοτριβείο

1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ποιότητα του ελαιόλαδου έχουν καθοριστεί ορισμένα κριτήρια από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου (ΔΣΕ). Τα κριτήρια αυτά περιλαμβάνουν:

- ❖ Το βαθμό οξείδωσης
- ❖ Την οξύτητα
- ❖ Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (χρώμα, γεύση, οσμή)

Οξείδωση ελαιόλαδου: Η αποθήκευση του ελαιόλαδου σε ακατάλληλες συνθήκες (έκθεση στον ήλιο, υψηλές θερμοκρασίες) οδηγεί στο λεγόμενο τάγισμα του ελαιόλαδου. Πρόκειται για μια σοβαρή αλλοίωση του ελαιόλαδου, που οδηγεί σε μείωση της ποιότητάς του. [5]

Οξύτητα ελαιόλαδου: Εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό (π.χ. 0,8%, 0,8g ελεύθερων λιπαρών οξέων (ελαϊκό οξύ)/100g ελαιόλαδου) και όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο περισσότερα είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η οξύτητα είναι ένα σημαντικό κριτήριο για την κατάταξη του ελαιόλαδου σε μια κατηγορία. Έχουν καθοριστεί όρια που καθορίζουν την ποιότητα του ελαιόλαδου. Συγκεκριμένα ένα ελαιόλαδο με οξύτητα έως 2% χαρακτηρίζεται ως βρώσιμο, ενώ ένα ελαιόλαδο με οξύτητα μεγαλύτερη από 2% χαρακτηρίζεται ως βιομηχανικό. [5]

Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου: Η γεύση και η οσμή του έχουν μία άμεση σχέση μεταξύ τους και αποτελούν σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για την αξιολόγηση του εκάστοτε ελαιόλαδου. Ακόμα το χρώμα του ελαιόλαδου (πρασινωπό ή χρυσοκίτρινο) αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό οργανοληπτικό χαρακτηριστικό, το οποίο εξαρτάται άμεσα από τη σύστασή του σε χρωστικές ουσίες, καθώς και οι συνθήκες παραγωγής του από το ελαιοτριβείο. [5]

1.1.5 Ποιοτικές κατηγορίες ελαιόλαδων

Σύμφωνα με την Νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Αγορανομικός Κώδικας και Κανονισμός (ΕΚ) 1513/2001 όπως τροποποίησε τον Κανονισμό 133/1966 (ΕΟΚ)), το ελαιόλαδο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως ακολούθως [6]:

A. Παρθένα ελαιόλαδα

Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες ιδίως θερμικές, οι οποίες δεν συνεπάγονται αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της καθίζησης, της φυγοκέντρωσης και της διήθησης, εξαιρουμένων των ελαίων που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και κάθε μίγματος με έλαια άλλης φύσης. Τα έλαια αυτά κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες και λαμβάνουν τις ακόλουθες ονομασίες:

I. Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 6,5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 0,8 g ανά 100 g λιπαρής ύλης. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mEq O₂/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος του 20, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση με 0,22 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση με 0,01.

II. Παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 5,5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 2,0 g ανά 100 g λιπαρής ύλης. Ο αριθμός υπεροξειδίων και η τιμή ΔΚ καθορίζονται όπως στο ελαιόλαδο της προηγούμενης κατηγορίας, ενώ η τιμή K₂₇₀ ορίζεται στα 0,25. και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

III. Υποβαθμισμένο (Lamprante – Μειονεκτικό) ελαιόλαδο

Πρόκειται για παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι ανώτερη των 2,0 g ανά 100 g λιπαρής ύλης και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. Το ελαιόλαδο λαμπάντε είναι ακατάλληλο για κατανάλωση ως έχει και προορίζεται για ραφινάρισμα ή για βιομηχανική χρήση.

B. Εξευγενισμένο ή ραφιναρμένο ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο το οποίο λαμβάνεται από εξευγενισμένο παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g λιπαρής ύλης, ενώ παράλληλα δεν έχει υποστεί αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mEq O₂/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 5, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση με 1,1 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση με 0,16. Τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

Γ. Ελαιόλαδο (αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα).

Ελαιόλαδο προερχόμενο από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένου ελαιόλαδου με εξαίρεση του μειονεκτικού (υποβαθμισμένου–Lamprante), του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1,0 g ανά 100 g λιπαρής ύλης και ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mEq O₂/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 15, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση με 0,9 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση με 0,15. Τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

Δ. Ακατέργαστο πυρηνέλαιο

Είναι το έλαιο το οποίο εξάγεται από την ελαιοπυρήνα ως υποπροϊόν της ελαιοουργίας, με την χρησιμοποίηση διαλύτη. Το έλαιο αυτό δεν μπορεί να καταναλωθεί όπως είναι και πρέπει να υποστεί επεξεργασία του εξευγενισμού.

Ε. Εξευγενισμένο πυρηνέλαιο

Είναι το έλαιο το οποίο λαμβάνεται από ραφινάρισμα του ακατέργαστου πυρηνελαίου του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g λιπαρής ύλης. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mEq O₂/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 5, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση με 2 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση με 0,2.

ΣΤ. Πυρηνέλαιο

Είναι το έλαιο το οποίο αποτελείται από μείγμα ραφιναρτισμένου πυρηνελαίου και παρθένου (σε μικρότερο ποσοστό), του οποίου η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει το 1 g ανά 100 g λιπαρής ύλης. Ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mEq O₂/kg ελαίου είναι μικρότερος ή ίσος με 15, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση με 2 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση με 0,18 και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

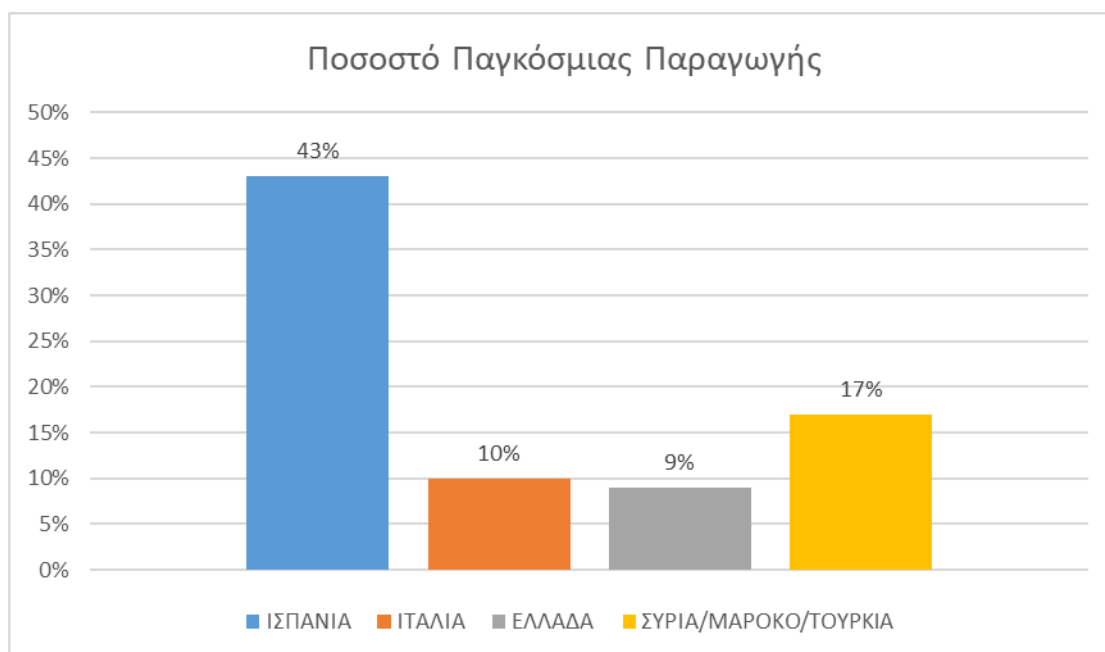
1.1.6 Παραγωγή και Κατανάλωση Ελαιόλαδου

Η ελαιοκαλλιέργεια είναι μια καλλιέργεια με πολλές ιδιαιτερότητες. Μια φυτεία απαιτεί από πέντε έως και επτά χρόνια προκειμένου να γίνει πλήρως παραγωγική, γεγονός που σημαίνει πως παρουσιάζει δυσκαμψία στη γεωργική προσαρμογή στις οικονομικές τάσεις. Τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνται σε περιθωριακές περιοχές με χαμηλή παραγωγικότητα (λοφώδεις ή ορεινές περιοχές) με φτωχό και πετρώδες έδαφος, οι οποίες δεν είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν για άλλες καλλιέργειες. Τέλος είναι ακόμα μια καλλιέργεια στην οποία η μέγιστη δραστηριότητα σημειώνεται το χειμώνα.

Υπάρχουν περισσότερα από 11 εκατομμύρια εκτάρια καλλιεργούμενης ελιάς στον κόσμο σύμφωνα με το διεθνές συμβούλιο ελαιόλαδου, τα οποία εξαπλώνονται σε 47 ελαιοπαραγωγικές χώρες. Από το σύνολο των παραγόμενων ελιών μόνο ένα μέρος προορίζεται για την παραγωγή ελαιόλαδου. Οι ελιές που προορίζονται για παραγωγή ελαιόλαδου συλλέγονται στο βόρειο ημισφαίριο από τον Οκτώβριο έως τον Απρίλιο και στο νότιο ημισφαίριο από τον Απρίλιο έως τον Ιούλιο. Υπάρχουν περισσότερα από 12.000 ελαιοτριβεία στον κόσμο τα 4/5 εκ των οποίων χρησιμοποιούν φυγοκεντρικά συστήματα. Σύμφωνα με τα δεδομένα του 2012 η παγκόσμια συνολική

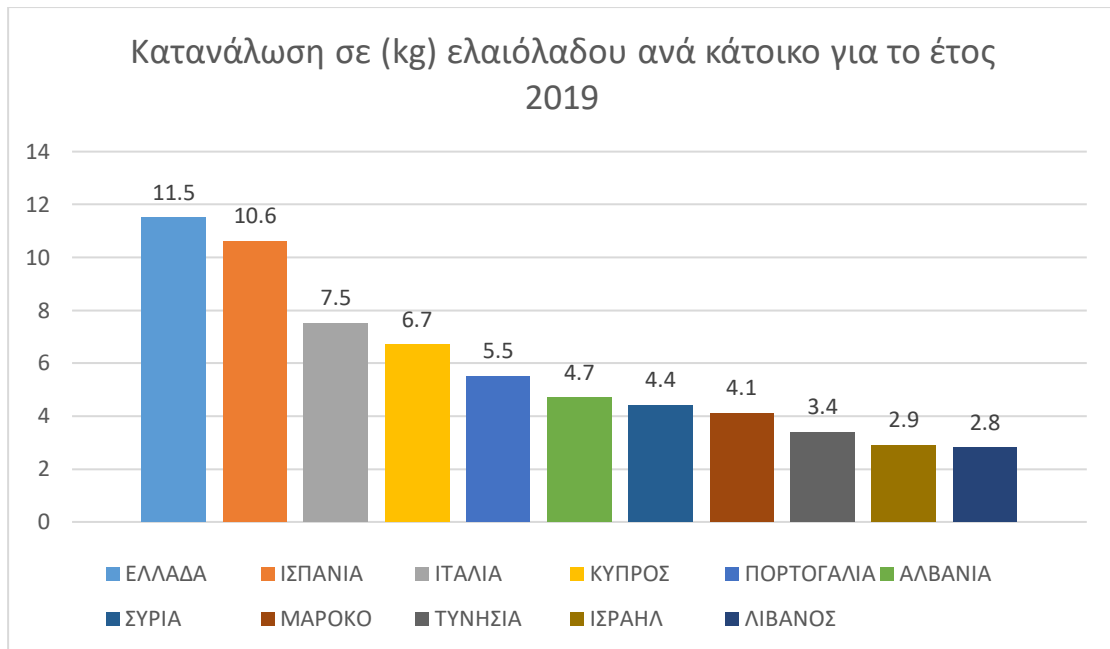
ετήσια παραγωγή βρώσιμων ελαίων και λιπών ανέρχεται σε 180 εκατομμύρια τόνους εκ των οποίων τα 3,1 είναι ελαιόλαδο. Αυτό σημαίνει πως το ελαιόλαδο αντιπροσωπεύει το 1,7% του συνόλου των βρώσιμων ελαίων και λιπών.

Στη λεκάνη της Μεσογείου η παραγωγή του ελαιόλαδου αντιπροσωπεύει το 93% της παγκόσμιας παραγωγής. Πιο συγκεκριμένα για το έτος 2015-2016 σύμφωνα με το διεθνές συμβούλιο ελαιόλαδου, η παραγωγή του ελαιόλαδου στην περιοχή της Μεσογείου ανέρχεται σε 2.312.038 τόνους, τη στιγμή που η παγκόσμια παραγωγή ανήλθε σε 3.520.000 τόνους. Περισσότερο από τα $\frac{3}{4}$ της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου πραγματοποιείται σε τρεις χώρες. Πρώτη θέση έχει η Ισπανία (43%), δεύτερη θέση η Ιταλία (10%) και τρίτη θέση η Ελλάδα (9%). Γίνεται επομένως αντιληπτό πως η Ελλάδα διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον τομέα της παραγωγής ελαιόλαδου. [7]



Εικόνα 4: Τα ποσοστά παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου για τα έτη 2017-2018 και 2018-2019. [7]

Η κατά κεφαλήν κατανάλωση του ελαιόλαδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις διατροφικές συνήθειες της κάθε χώρας. Σε χώρες όπως η Κίνα, ο Καναδάς και η Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής είναι ακόμα σε πολύ χαμηλό επίπεδο. Με την καθιέρωση μιας Μεσογειακής Διατροφής θα μπορέσει να επιτευχθεί αύξηση της κατανάλωσης σε χώρες που δε το καταναλώνουν παραδοσιακά. [8]



Εικόνα 5: Κατανάλωση σε (kg) ελαιόλαδου ανά κάτοικο για το έτος 2019 σε διάφορες χώρες. [9]

1.1.7 Το ελαιόλαδο και η Ελληνική Οικονομία- Εξέλιξη της τιμής του ελαιόλαδου

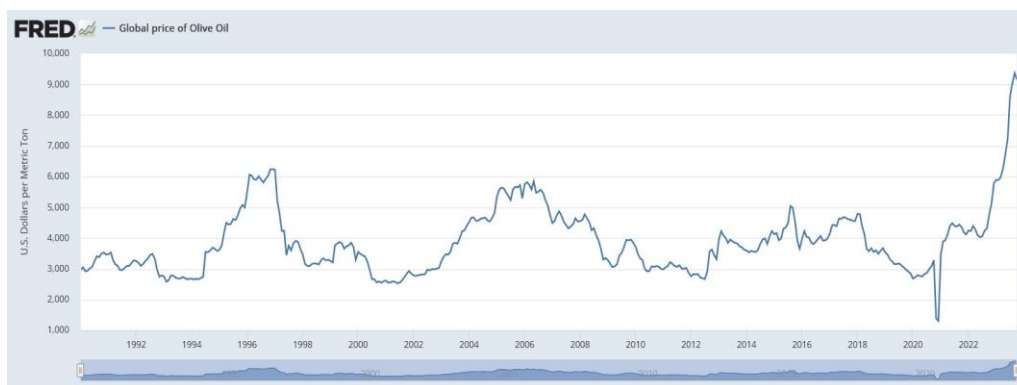
Από τις προηγούμενες παραγράφους γίνεται κατανοητό πως η παραγωγή του ελαιόλαδου αποτελεί έναν από του πιο σημαντικούς κλάδους της Ελληνικής Οικονομίας. Το 2015 η Εθνική Τράπεζα διεξήγαγε κλαδική μελέτη σύμφωνα με την οποία η παραγωγή του ελαιόλαδου αντιπροσωπεύει το 9% της αξίας της Ελληνικής αγροτικής παραγωγής.[10] Η Ελλάδα ως η τρίτη μεγαλύτερη δύναμη στην παραγωγή του ελαιόλαδου, μετά την Ισπανία και την Ιταλία παράγει 0,3 εκατομμύρια τόνους ελαιόλαδο ανά έτος. Αυτή η παραγωγή συνεισφέρει σε ποσοστό 0,4% στο συνολικό ΑΕΠ της χώρας και 7,5-10% στο αγροτικό ΑΕΠ της χώρας. Ακόμα το ελαιόλαδο αντιπροσωπεύει το 1,5% των συνολικών εξαγωγών της χώρας. [10]

Στον κλάδο της παραγωγής του ελαιόλαδου στη χώρα δραστηριοποιούνται περισσότερες από 450 χιλιάδες αγροτικές οικογένειες (Τράπεζα Πειραιώς 2014). Αξίζει να σημειωθεί πως οι άνθρωποι αυτοί δραστηριοποιούνται σε λιγότερο ανεπτυγμένες περιοχές της χώρας (Χίος, Πρέβεζα, Θεσπρωτία, Αιτωλοακαρνανία κ.α.), συμβάλλοντας στην οικονομική ενίσχυση και ανάπτυξη αυτών των περιοχών. [10]

Το ελαιόλαδο αποτελεί σημαντικό συστατικό της Ελληνικής διατροφής. Μεγάλο μέρος της παραγωγής του λοιπόν αφορά την ιδιοκατανάλωσή του. Εδώ έρχεται το

πρόβλημα της μη τυποποίησης. Η Ελλάδα κατέχει την πρώτη θέση στην κατανάλωση ελαιόλαδου (15 κιλά ανά κάτοικο ετησίως). Το 75% της εγχώριας κατανάλωσης ελαιόλαδου είναι μη τυποποιημένο, σε αντίθεση με την Ισπανία όπου το ποσοστό αυτό αντιπροσωπεύει το 32%. Η μη τυποποίηση έχει σημαντικό αντίκτυπο τόσο στην οικονομία, όσο και στην ποιότητα του ελαιόλαδου.

Η τιμή του ελαιόλαδου όπως και κάθε προϊόντος μεταβάλλεται με το χρόνο. Μία περίοδος υψηλών θερμοκρασιών και ξηρασίας οδήγησε στην ερημοποίηση μεγάλων ελαιοπαραγωγικών εκτάσεων στην πρώτη ελαιοπαραγωγική χώρα στον κόσμο, την Ισπανία. Αυτό είχε ως συνέπεια τη μείωση της παραγωγής στο μισό και παράλληλα την αύξηση της τιμής του ελαιόλαδου κατά 130% σύμφωνα με το US Department of Agriculture. Ενισχύθηκε λοιπόν η αγορά του ελαιόλαδου από άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες όπως την Ιταλία, την Ελλάδα και την Πορτογαλία. Παρακάτω παρουσιάζεται η εξέλιξη της παγκόσμιας τιμής του ελαιόλαδου κατά την περίοδο 1990-2023.



Εικόνα 6: Εξέλιξη της παγκόσμιας τιμής του ελαιόλαδου κατά την περίοδο 1990-2023. [11]

1.1.8 Νομοθετικό πλαίσιο που διέπει την παραγωγή ελαιόλαδων

Η Ευρωπαϊκή Ένωση αναγνώρισε πως τα διαφορετικά μικροκλίματα, τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά, καθώς και οι ιδιαίτερες παραδόσεις κάθε τόπου παίζουν καθοριστικό ρόλο στο τελικό αγροτικό προϊόν που παράγεται. Το 1992 σε μία προσπάθεια να προστατέψει την παραγωγή αυτή με γεωγραφική ένδειξη, θέσπισε για πρώτη φορά τον κανονισμό 2018/92. Ο κανονισμός αυτός προστατεύει τις γεωγραφικές ενδείξεις και τις ονομασίες προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Επίσης θέσπισε και τον κανονισμό 2082/92, οποίος διέπει το καθεστώς για τις βεβαιώσεις ιδιοτυπίας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Με αυτούς λοιπόν τους κανονισμούς η Ευρωπαϊκή Ένωση έδωσε τη δυνατότητα στους καταναλωτές να μπορούν να λαμβάνουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την

ακριβή προέλευση των προϊόντων που καταναλώνουν, καθώς και των μεθόδων με τις οποίες έχει γίνει η επεξεργασία τους. [12]

Οι κανονισμοί που θέσπισε η Ευρωπαϊκή Ένωση το 1992, έως σήμερα έχουν τροποποιηθεί 2 φορές. Η πρώτη φορά συνέβη το 2006, οπότε και ο κανονισμός 2018/92 αντικαταστάθηκε από τον 510/06 και ο κανονισμός 2082/92 από τον 509/06. Η αντικατάσταση είχε ως στόχο τη βελτίωση του συστήματος και η σκοπιμότητά τους δεν άλλαξε σημαντικά. Η δεύτερη φορά που έγινε τροποποίηση ήταν το 2012. Συγκεκριμένα την 21^η Νοεμβρίου 2012 η Ευρωπαϊκή Ένωση συγχώνευσε τους κανονισμούς 510/06 και 509/06 σε ένα ενιαίο νομοθετικό πλαίσιο. Με την τελευταία τροποποίηση ακόμα προστέθηκαν και άλλα σχήματα ποιότητας, όπως «Προϊόν νησιωτικής προέλευσης» και «Προϊόν ορεινής παραγωγής» κ.α. [12]

Συγκεκριμένα βάση των παραπάνω κανονισμών υπάρχουν δύο κύριες ενδείξεις στα προϊόντα:

- ❖ **Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ):** Η ένδειξη αυτή προσδιορίζει τον τόπο από τον οποίο κατάγεται το προϊόν (περιοχή ή χώρα). Ακόμα προσδιορίζει την ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά που οφείλονται στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που συμπεριλαμβάνει τόσο τους φυσικούς, όσο και τους ανθρώπινους παράγοντες, και όλα τα στάδια της παραγωγής που πραγματοποιούνται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.
- ❖ **Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ):** Η ένδειξη αυτή προσδιορίζει προϊόντα τα οποία έχουν μια συγκεκριμένη φήμη ή ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό που οφείλεται στην περιοχή από την οποία προέρχονται. Όπως στα ΠΟΠ, έτσι και στα ΠΓΕ, όλα τα στάδια της παραγωγής πραγματοποιούνται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής.

Προκειμένου ένα προϊόν να χαρακτηριστεί Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) ή Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΓΕ), πρέπει να πληροί ορισμένες προδιαγραφές. Οι πιο σημαντικές από αυτές τις προδιαγραφές παρουσιάζονται στη συνέχεια:

- Αποδεικτικά στοιχεία της καταγωγής του προϊόντος.
- Τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του προϊόντος.
- Το όνομα και την ονομασία προέλευσης του γεωργικού προϊόντος.
- Την ακριβή περιγραφή της μεθόδου παραγωγής που ακολουθήθηκε για την παραγωγή του προϊόντος.
- Αποδεικτικά στοιχεία δοκιμών και ελέγχων που δικαιολογούν την επισήμανση των προϊόντων ως ΠΟΠ ή ΠΓΕ.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται ο κατάλογος ελαιόλαδων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) και Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (ΠΓΕ) στα πλαίσια του Καν. (ΕΟΚ) αριθ. 510/06 του Συμβουλίου.

Πίνακας 1: Τα ΠΟΠ και ΠΓΕ ελαιόλαδα. [13]

A/A	Ονομασία Προϊόντος	Κατηγορία Αναγνώρισης (ΠΟΠ ή ΠΓΕ)
1	Βιάννος Ηρακλείου Κρήτης	ΠΟΠ
2	Λυγουριό Ασκληπείου	ΠΟΠ
3	Βόρειος Μυλοπόταμος Ρεθύμνης Κρήτης	ΠΟΠ
4	Κροκεές Λακωνίας	ΠΟΠ
5	Πετρίνα Λακωνίας	ΠΟΠ
6	Κρανίδι Αργολίδας	ΠΟΠ
7	Πεζά Ηρακλείου Κρήτης	ΠΟΠ
8	Αρχάνες Ηρακλείου Κρήτης	ΠΟΠ
9	Λακωνία	ΠΓΕ
10	Χανιά Κρήτης	ΠΓΕ
11	Κεφαλονιά	ΠΓΕ
12	Ολυμπία	ΠΓΕ
13	Λέσβος ή Μυτιλήνη	ΠΓΕ
14	Πρέβεζα	ΠΓΕ
15	Ρόδος	ΠΓΕ
16	Θάσος	ΠΓΕ
17	Καλαμάτα	ΠΟΠ
18	Κολυμβάρι Χανίων Κρήτης	ΠΟΠ
19	Σητεία Λασιθίου Κρήτης	ΠΟΠ
20	Αποκορώνας Χανίων Κρήτης	ΠΟΠ
21	Σάμος	ΠΓΕ
22	Ζάκυνθος	ΠΓΕ
23	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Θραψανό	ΠΟΠ
24	Φοινίκι Λακωνίας	ΠΟΠ
25	Άγιος Ματθαίος	ΠΓΕ
26	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Τροιζηνία	ΠΟΠ
27	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο Σέλινο Κρήτης	ΠΟΠ
28	Αγουρέλαιο Χαλκιδικής	ΠΟΠ
29	Μεσσαρά	ΠΟΠ
30	Γαλανό Μεταγγιτσίου Χαλκιδικής	ΠΟΠ
31	ΚΡΙΤΣΑ/KRITSA	ΠΓΕ
32	ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΑΚΡΗΣ/ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΑΚΡΙΣ	ΠΟΠ

1.2 Πυρηνέλαιο

Πυρηνέλαιο ονομάζεται το έλαιο που αποχωρίζεται από τον πλακούντα πιεστηρίων (ελαιοπυρήνα) ή το υπόλειμμα των φυγοκεντρικών ή άλλου τύπου διαχωριστήρων, ύστερα από μερική ξήρανση και εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Τα στάδια που ακολουθούνται προκειμένου να παραλάβουμε από τον ελαιοπυρήνα το πυρηνέλαιο παρουσιάζονται στη συνέχεια. Αρχικά πραγματοποιείται ξήρανση του ελαιοπυρήνα, κατά την οποία ο καρπός της ελιάς μεταφέρεται σε μεγάλα κυλινδρικά ξηραντήρια, τα οποία θερμαίνονται και περιστρέφονται. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η απομάκρυνση της μεγαλύτερης ποσότητας νερού που περιέχουν. Στη συνέχεια ακολουθεί η διεργασία της εκχύλισης. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση συνήθως είναι το εξάνιο. Μετά το τέλος της εκχύλισης γίνεται απομάκρυνση του διαλύτη. Το έλαιο που παραλαμβάνουμε ονομάζεται ακάθαρτο πυρηνέλαιο ή Bruto πυρηνέλαιο. Το ξηρό υπόλειμμα του πυρήνα που παραλαμβάνεται ονομάζεται πυρηνόξυλο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν θερμαντικό μέσο με θερμαντική ικανότητα περίπου το 1/3 αυτής του πετρελαίου θέρμανσης. Τέλος μέσω της διεργασίας του ραφινάρισματος από το ακάθαρτο πυρηνέλαιο, παραλαμβάνουμε το εξευγενισμένο πυρηνέλαιο. Το γνωστό σε όλους πυρηνέλαιο προκύπτει προσθέτοντας στο εξευγενισμένο πυρηνέλαιο μια μικρή ποσότητα extra παρθένου ελαιόλαδου. [14]

Το πυρηνέλαιο προκειμένου να καταναλωθεί πρέπει να πληροί ορισμένες προδιαγραφές. Συγκεκριμένα στο ακατέργαστο πυρηνέλαιο η μέγιστη οξύτητα του φτάνει στο 1,5% με ανώτατο αριθμό υπεροξειδίων 15 mEq O₂/kg ελαίου και με σταθερή K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 2 και χωρίς όρια για τη σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,2. Στο εξευγενισμένο πυρηνέλαιο η οξύτητα δε πρέπει να υπερβαίνει το 0,3%, ο αριθμός υπεροξειδίων εκφρασμένος σε mEq O₂/kg ελαίου πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 10, η σταθερά K₂₇₀ μικρότερη ή ίση του 2 και η σταθερά ΔΚ μικρότερη ή ίση του 0,2. Τέλος στο προς κατανάλωση πυρηνέλαιο η οξύτητά του δε πρέπει να υπερβαίνει το 0,1%. [14]

1.3 Σπορέλαια

Τα σπορέλαια μπορούν να εξαχθούν από θρυμματισμένους σπόρους με υγρό ή υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Η απόδοση της διεργασίας εξαρτάται από τη πίεση και τη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση, καθώς επίσης και από το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων του σπόρου. Τα κλάσματα λαδιού που λαμβάνονται μπορεί να διαφέρουν σε χρώμα, γεύση και οσμή σε διάφορες πιέσεις και θερμοκρασίες. Παραδείγματα συχνά χρησιμοποιούμενων σπορέλαιων είναι το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο, το αραβοσιτέλαιο και το κραμβέλαιο. [15]

1.4 Η Νοθεία του ελαιόλαδου

Το ελαιόλαδο είναι ένα είδος φυτικού ελαίου το οποίο παράγεται με ψυχρή έκθλιψη των καρπών της ελιάς. Η χρήση του ελαιόλαδου κατά το μαγείρεμα έχει διαπιστωθεί πως μπορεί να έχει πολλά οφέλη. Το μαγείρεμα με ελαιόλαδο έχει διαπιστωθεί πως ενισχύει τη γεύση και το άρωμα του φαγητού. Ακόμα συμβάλει στην ευζωία και την υγεία αυτών που το καταναλώνουν. Συγκεκριμένα είναι γνωστό πως μπορεί να μειώσει τα λιπίδια του αίματος και να προστατεύσει από καρδιαγγειακές παθήσεις. Το ελαιόλαδο είναι πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και περιέχει επίσης μια ποικιλία βιοενεργών μορίων μεταξύ των οποίων τοκοφερόλες, στερόλες, β-καροτίνη και πολυφαινόλες. Για όλους τους παραπάνω λόγους το ελαιόλαδο είναι ένα λάδι με μεγάλη ζήτηση και υψηλότερη τιμή από τα περισσότερα λάδια. Είναι λοιπόν συχνό φαινόμενο να νοθεύεται με έλαια χαμηλότερης τιμής με στόχο το κέρδος.

Μερικά από τα έλαια που προτιμώνται για τη νοθεία του ελαιόλαδου είναι το πυρηνέλαιο, το ηλιέλαιο, το σογιέλαιο, το καλαμποκέλαιο και το κραμβέλαιο. Από αυτά τα έλαια το πυρηνέλαιο παράγεται από παραπροϊόντα της ελιάς, ενώ όλα τα υπόλοιπα από φυτά που καλλιεργούνται πιο εύκολα από την ελιά. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως όλα τα παραπάνω λάδια προτιμώνται κυρίως για βαθύ τηγάνισμα και δεν προτιμάται η απευθείας κατανάλωσή τους. [16],[17] Η μέση τιμή πώλησης των εν λόγω ελαίων διαφέρει σημαντικά από αυτή του ελαιόλαδου. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μέσες τιμές πώλησης των ελαίων στα ελληνικά σούπερ μάρκετ.

Πίνακας 2: Μέσες τιμές πώλησης ελαίων σε ελληνικά σούπερ μάρκετ κατά το έτος 2024.

Έλαιο	Τιμή πώλησης (σε €/L)
Ελαιόλαδο	10-15
Πυρηνέλαιο	5
Ηλιέλαιο	2-5
Αραβοσιτέλαιο	2-5
Σογιέλαιο	2-3

1.5 Διεθνείς και Ελληνικοί φορείς υπεύθυνοι για τον έλεγχο του ελαιόλαδου

Το International Olive Council (IOC) είναι ο μοναδικός διεθνής διακυβερνητικός οργανισμός στον κόσμο στον τομέα του ελαιόλαδου και των επιτραπέζιων ελιών. Ιδρύθηκε το 1959 στη Μαδρίτη της Ισπανίας υπό την αιγίδα των Ηνωμένων Εθνών. Έως το 2006 ήταν γνωστό ως το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου οπότε και μετονομάστηκε. Κύρια αποστολή του Συμβουλίου αποτελεί η εξασφάλιση της βιώσιμης και υπεύθυνης ανάπτυξης της ελαιοκαλλιέργειας και χρησιμεύει ως παγκόσμιο φόρουμ για τη συζήτηση ζητημάτων πολιτικής και την αντιμετώπιση τρεχουσών και μελλοντικών προκλήσεων. Αναλυτικότερα συμβάλει στην:

- ❖ Προώθηση της διεθνούς συνεργασίας σε έργα έρευνας και ανάπτυξης, κατάρτισης και μεταφοράς τεχνολογίας.
- ❖ Βελτίωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της ελαιοκαλλιέργειας και της ελαιοβιομηχανίας.
- ❖ Δημιουργία εκστρατειών με στόχο την προώθηση της κατανάλωσης των επιτραπέζιων ελιών και του ελαιόλαδου.
- ❖ Προσφορά αξιόπιστων στατιστικών για την αγορά της ελιάς και του ελαιόλαδου.
- ❖ Συζήτηση και επίλυση σχετικών θεμάτων μέσω της συνεργασίας του τόσο με τον ιδιωτικό, όσο και με τις κυβερνήσεις όσο και με τον ιδιωτικό τομέα.

Στα ενεργά μέλη του IOC περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων και κορυφαίοι διεθνείς παραγωγοί και εξαγωγείς ελαιόλαδου και επιτραπέζιων ελιών. Τα μέλη του IOC αντιπροσωπεύουν περίπου το 94% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου, τα περισσότερα από τα οποία είναι Μεσογειακές χώρες (Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Γαλλία κ.α.). [7]

Στην Ελλάδα αρμόδιος οργανισμός για τον έλεγχο της ποιότητας του ελαιόλαδου και γενικότερα όλων των τροφίμων είναι ο ΕΛΓΟ«ΔΗΜΗΤΡΑ». Πιο συγκεκριμένα κύριο αντικείμενο του ΕΛΓΟ«ΔΗΜΗΤΡΑ» είναι η ανάπτυξη και υποστήριξη δράσεων που αποσκοπούν στον εκσυγχρονισμό και την ανάπτυξη του αγροτικού τομέα της χώρας, τη βελτίωση των παραγωγικών διαδικασιών, την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας, την πιστοποίηση των ποιοτικών αγροτικών προϊόντων & τροφίμων, την καθιέρωση και πιστοποίηση ορθών γεωργικών πρακτικών και τους ελέγχους στην αλυσίδα παραγωγής-διακίνησης του γάλακτος και κρέατος στη χώρα. Ο οργανισμός διαθέτει τρία πλήρως εξοπλισμένα εργαστήρια (στα Χανιά, στην Καλαμάτα και στη Μυτιλήνη), μέσω των οποίων εκτελεί ελέγχους γνησιότητας, ποιότητας και ασφάλειας του ελαιόλαδου. [18]

1.6 Σημασία του ελέγχου της νοθείας του ελαιόλαδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση

Το πρόβλημα των δόλιων δραστηριοτήτων στη βιομηχανία τροφίμων παίρνει όλο και μεγαλύτερες διαστάσεις. Οι δραστηριότητες αυτές περιλαμβάνουν μια σειρά από παράνομες και ανήθικες μεθόδους όπως η αραίωση, η αντικατάσταση και η μη εξουσιοδοτημένη βελτίωση των προϊόντων διατροφής. Οι ενέργειες αυτές έχουν ως κύριο κίνητρο το οικονομικό κέρδος, αλλά ο αντίκτυπος τους δεν περιορίζεται μόνο σε ζητήματα νομιμότητας. Τέτοιου είδους πρακτικές μπορεί να έχουν αρνητικές συνέπειες στην υγεία των καταναλωτών. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως ο έλεγχος της νοθείας του ελαιόλαδου αποτελεί ζήτημα μεγάλης σημασίας.

Η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου αποτελεί θέμα μεγάλης σημασίας για την Ευρωπαϊκή Ένωση. Σκοπός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αποτελεί η ανάπτυξη της εμπιστοσύνης των καταναλωτών και η εξασφάλιση της εμπορίας καλής φήμης ελαιόλαδου. Με το πρόγραμμα Horizon 2020 η Ευρωπαϊκή Ένωση αναπτύσσει τέτοιες μεθόδους που διασφαλίζει ότι τα προϊόντα που παράγονται είναι ποιοτικά, εξαλείφει τα εμπόδια στην καινοτομία και διευκολύνει τον ιδιωτικό και το δημόσιο τομέα να συνεργαστούν για την παροχή καινοτομίας. Ένα εκ των προγραμμάτων που η Ευρωπαϊκή Ένωση χρηματοδοτεί έρευνες είναι για την ανεύρεση νοθευμένου ελαιόλαδου. Χαρακτηριστικό είναι πως η σφραγίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης συνιστά εγγύηση της ποιότητας του ελαιόλαδου. [19]

Το πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Ένωσης Horizon 2020 (προϋπολογισμός περίπου 80 δισεκατομμύρια ευρώ για τα έτη 2014-2020) περιελάβανε δύο προκηρύξεις. Η πρώτη πρόσκληση που έληγε στις 12/3/2014 αναφερόταν στην ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου με άλλα έλαια και στην ανίχνευση τυχόν μη επιθυμητών επεξεργασιών του ελαιόλαδου. Η δεύτερη πρόσκληση έληγε στις 11/6/2015 αναφερόταν στην ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών για τον έλεγχο της ποιότητας του ελαιόλαδου. Παράλληλα σκοπό είχε τη συνεργασία χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης με άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες έξω από αυτή. [19]

1.7 Ενόργανες τεχνικές ελέγχου νοθείας του ελαιόλαδου

Το πρόβλημα της ανάπτυξης μιας πρότυπης αναλυτικής μεθόδου για τον εντοπισμό της νοθείας του ελαιόλαδου αν και έχει προσεγγιστεί ποικιλοτρόπως, δεν υπάρχουν αναγνωρισμένες διαδικασίες από την Ευρωπαϊκή Ένωση, το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιόλαδου και τις Η.Π.Α. Τα περιθώρια επομένως για περαιτέρω έρευνα είναι μεγάλα. Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένες μέθοδοι, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως κοινά αποδεκτές για τον έλεγχο της νοθείας του ελαιόλαδου. Το πρόβλημα με

αυτές τις μεθόδους είναι πως είναι ιδιαίτερα δαπανηρές και απαιτούν πολύ χρόνο για τη διεξαγωγή τους. Για το σκοπό αυτό έχει γίνει σημαντική προσπάθεια για την ανάπτυξη πιο απλών αναλυτικών μεθόδων οι οποίες σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους δίνουν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα με χαμηλό κόστος και μικρό χρόνο ανάλυσης. [20] Ορισμένες από αυτές τις μεθόδους θα παρουσιαστούν στη συνέχεια.

1.7.1 Πρότυπες τεχνικές ανίχνευσης της νοθείας του ελαιόλαδου.

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό την νοθείας των ελαιόλαδων έχουν προταθεί διάφορες μεθοδολογίες. Μία αρχική προσέγγιση εστίασε γύρω από την ακριβή χημική σύσταση ορισμένων δεικτών όπως οι τριακυλογλυκερόλες, οι τοκοτριενόλες, πολικές ενώσεις και το σύνολο της καμπεστερόλης. Οι τεχνικές αυτές ωστόσο περιλαμβάνουν τη χρήση τόσο αέριας, όσο και υγρής χρωματογραφίας. Οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων είναι ότι είναι χρονοβόρες, απαιτούν τη χρήση επικίνδυνων χημικών ουσιών και προϋποθέτουν τη διεξαγωγή τους από επαρκώς καταρτισμένο προσωπικό. Μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση ενόργανων μεθόδων που αποκτούν ολοκληρωμένη και πολυμεταβλητή απεικόνιση χρησιμοποιώντας Υπέρυθρη Φασματοσκοπία μετασηματισμού Fourier (FTIR), Φασματοσκοπία Raman, Φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου (MIR), Φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIR), και πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR). Τέλος έχει γίνει εφαρμογή χρωματογραφικών τεχνικών και τεχνικών με βάση το DNA με σκοπό την ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου και της γεωγραφικής ιχνηλασιμότητας των ελαιόλαδων.

Το Νοέμβριο του 2013, το Διεθνές Συμβούλιο Ελιάς (IOC), θέσπισε μία μέθοδο για τον εντοπισμό ξένων ελαίων στο ελαιόλαδο. Η μέθοδος αν και ιδιαίτερα πολύπλοκη και χρονοβόρα, έδινε σημαντικά αποτελέσματα. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση ελαίων όπως το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο, το φουντουκέλαιο κ.α., τα οποία έχουν προστεθεί στο ελαιόλαδο. Έχει αρκετά χαμηλά όρια ανίχνευσης (από 5% έως 15%), τα οποία ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του ελαίου, αδυνατεί ωστόσο να εντοπίσει το είδος του ελαίου με το οποίο έχει γίνει η νοθεία. Η μέθοδος χρησιμοποιεί υγρή χρωματογραφία (HPLC) αντιστρόφου φάσεως με διαθλασίμετρο (refractive index detector) για τον εντοπισμό τριακυλογλυκερολών και την αέρια χρωματογραφία (GC) με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού για τον προσδιορισμό μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. [21]

Μία ακόμα πρότυπη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου με τα διάφορα σπορέλαια είναι η δοκιμή Bellier. Η αντίδραση Bellier πρέπει να είναι θετική. Το αντιδραστήριο Bellier αποτελείται από κορεσμένο εν ψυχρό διάλυμα ρεζορκίνης σε βενζόλιο. Η ανατάραξη του μείγματος αντιδραστηρίου

Bellier και πυκνού νιτρικού οξέος διαρκεί για 15 δευτερόλεπτα. Εάν εμφανιστεί ιώδες ή ερυθροϊώδες χρώμα κατά τη διάρκεια ή πριν το τέλος της ανατάραξης τότε στο υπό διερεύνηση έλαιο υπάρχει ποσότητα σπορέλαιου. Εάν αυτό συμβεί αργότερα δε λαμβάνεται υπόψη ο χρωματισμός. [22]

1.7.2 Χρωματογραφικές Τεχνικές Ανάλυσης

Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μια σημαντική ομάδα ποικίλων μεθόδων, οι οποίες βοηθούν στο διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μείγματα. Στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα διαλύεται σε μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι υγρό, αέριο, ή υπερκώρεστο ρευστό. Η κινητή φάση διέρχεται μέσω μίας στατικής φάσης (stationary phase), η οποία είναι καθηλωμένη σε μία στήλη ή σπανιότερα στατική επιφάνεια. Τα συστατικά της στατικής φάσης κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Όσο πιο ισχυρά κατακρατούνται τα συστατικά από τη στατική φάση, τόσο πιο αργά κινούνται κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα όσο πιο ασθενώς κατακρατούνται τα συστατικά από τη στατική φάση, τόσο πιο γρήγορα κινούνται κατά μήκος της ροής της κινητής φάσης. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα συστατικά του δείγματος να διαχωρίζονται με βάση τη διαφορά στη ευκινήσια τους καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, στις οποίες τα συστατικά μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά. [23]

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους. Με βάση το είδος των στατικών και κινητών φάσεων που βρίσκονται σε επαφή. Διακρίνονται στις [23]:

- ❖ Χρωματογραφία στήλης. Η στατική φάση συγκρατείται σε μία στενή στήλη από την οποία διέρχεται η κινητή φάση μέσω πίεσης.
- ❖ Επίπεδη χρωματογραφία. Η στατική φάση συγκρατείται σε μία επίπεδη πλάκα ή στους πόρους ενός χαρτιού.

Περισσότερο συνηθισμένη μέθοδος διάκρισης των χρωματογραφικών τεχνικών αποτελεί η διάκριση με βάση τον τύπο των κινητών και των στατικών φάσεων. Διακρίνονται στις [23]:

- ❖ Υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC).
- ❖ Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC).
- ❖ Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical fluid chromatography, SFC)

Οι δύο πρώτοι τύποι χρωματογραφικών τεχνικών θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Στην έξοδο της στήλης τα χρωματογραφικά συστήματα συνδέονται από κατάλληλους ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές υπολογίζουν το χρόνο έκλουσης κάθε συστατικού ενώ παράλληλα επιτρέπουν τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ένας ανιχνευτής που χρησιμοποιείται συχνά στα χρωματογραφικά συστήματα είναι η φασματομετρία μαζών. Για ανιχνευτές ακόμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ηλεκτροχημικές, φασματομετρικές και άλλες τεχνικές. [23], [24]

1.7.2.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μία από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, με πωλήσεις πολλών δισεκατομμυρίων ετησίως. Μερικοί από τους λόγους που είναι τόσο διαδεδομένη αυτή η τεχνική είναι η ευαισθησία της, η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ενώσεων ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και κυρίως η δυνατότητα προσαρμογής αυτής της τεχνικής σε προσδιορισμούς ουσιών με βιομηχανικό ενδιαφέρον, πολλά επιστημονικά πεδία και το δημόσιο. Συγκεκριμένα με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης μπορούν να προσδιοριστούν πρωτεΐνες, αμινοξέα, αντιβιοτικά, νουκλεϊκά οξέα, τερπενοειδή, στεροειδή και μία μεγάλη ακόμα ποικιλία ανόργανων ουσιών και οργανομεταλλικών ενώσεων. [23]

Η μέθοδος HPLC εάν συνδυαστεί με τον κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη χημική σύσταση των ελαίων. Πρέπει ωστόσο να γίνει ερμηνεία των αποτελεσμάτων με χημειομετρικές μεθόδους. Μερικές από τις προσπάθειες προσδιορισμού της νοθείας του ελαιόλαδου με άλλα έλαια θα παρουσιαστούν στη συνέχεια. Μία προσέγγιση έχει γίνει με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντιστρόφου φάσεως με στατική φάση πυριτίου με οκτυλικό δεσμό. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε αποτελούταν από ακετόνη-ακετονιτρίλιο με αναλογία όγκων 70:30. Το χρωματογράφημα του καθαρού ελαιόλαδου συγκρίθηκε με αυτό των μειγμάτων σογιέλαιου, καλαμποκέλαιου, ηλιέλαιου με ελαιόλαδο. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως κατέστη δυνατός ο εντοπισμός της προσθήκης μόλις 1% σπορελαίων πλούσιων σε λινοελαϊκό στο ελαιόλαδο. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απαιτεί λιγότερο από 15 λεπτά. [25] Μια άλλη προσέγγιση η οποία συναντάται στη βιβλιογραφία είναι η υγροχρωματογραφική μελέτη του μη σαπωνοποιημένου κλάσματος διάφορων ελαίων, η οποία σε συνδυασμό με χημειομετρική επεξεργασία με PCA, ιεραρχική ανάλυση ομάδων και PLC-DA των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων οδήγησε στη διάκριση του ελαιόλαδου από διάφορα σπορέλαια. [26]

1.7.2.2 Αέρια Χρωματογραφία (GC)

Στην αέρια χρωματογραφία τα συστατικά του δείγματος εξατμίζονται και διαχωρίζονται ως αποτέλεσμα της κατανομής τους μεταξύ μίας κινητής αέριας φάσης και μίας υγρής ή στερεάς στατικής φάσης που υπάρχουν στη στήλη. Προκειμένου να γίνει ο χρωματογραφικός προσδιορισμός απαιτείται η εξάτμιση του δείγματος και η εισαγωγή του στην κεφαλή της χρωματογραφικής στήλης. Η ροή του αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση, πραγματοποιεί την έκλυση του δείγματος. Η αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει μία σημαντική διαφοροποίηση από όλες τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Η κινητή φάση παίζει μόνο το ρόλο του «διακινητή» και δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη.

Δύο είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τύποι αέριας χρωματογραφίας: η χρωματογραφία αερίου-αερίου (gas-solid chromatography, GSC) και χρωματογραφία αερίου-υγρού (gas-liquid chromatography, GLC). Η πρώτη χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών και αναφέρεται συχνά ως αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC). Υπάρχει ακόμα η χρωματογραφία αερίου-στερεού, η οποία βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης. Σε αυτό των τύπο αέριας χρωματογραφίας η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης. [23]

Όπως η HPLC, έτσι και η αέρια χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον προσδιορισμό της νοθείας του ελαιόλαδου. Η αέρια χρωματογραφία σε αντίθεση με την HPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως για τον διαχωρισμό του μη πολικού τμήματος του ελαίου, σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους. Η μέθοδος αυτή όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία μπορεί να εφαρμοστεί για τον εντοπισμό τόσο του νοθευμένου ελαιόλαδου, όσο και για τον προσδιορισμό της ποικιλίας και της γεωγραφικής του προέλευσης. Μπορούν να εντοπιστούν συστατικά όπως στερόλες και λιπαρά οξέα. Μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού τους μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό της νοθείας σε σπορέλαια. Η μέθοδος αυτή έχει όριο ανίχνευσης που ανέρχεται έως 10% σπορέλαιων σε ελαιόλαδα. [27]

1.7.3 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (differential scanning calorimetry, DSC) είναι μία πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη θερμική αναλυτική μέθοδος. Είναι μία μέθοδος η οποία χαρακτηρίζεται από απλότητα και ταχύτητα. Στη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης το δείγμα και ένα υλικό αναφοράς τοποθετείται στους αντίστοιχους υποδοχείς του οργάνου. Έπειτα τα θερμαντικά στοιχεία αυξάνουν τη θερμοκρασία γραμμικά με καθορισμένο ρυθμό ή τη διατηρούν σταθερή σε μία δεδομένη τιμή. Η

Θερμική θερμιδομετρία σάρωσης επομένως καταγράφει τη διαφορά στη ροή θερμότητας μεταξύ της προς ανάλυση ουσίας και της ουσίας αναφοράς. Τέλος προκύπτει ένα διάγραμμα ροής θερμότητας συναρτήσει των δύο ουσιών.

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DCS), έχει προταθεί ως μία γρήγορη τεχνική για την ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου με διάφορα σπορέλαια. Διεξήχθη λοιπόν μία μελέτη, η οποία περιλάμβανε την ανάλυση εννέα εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων, πέντε ηλιέλαιων και τριών μειγμάτων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν πως οι καμπύλες θέρμανσης των εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων παρουσιάζουν δύο μεγάλες ενδόθερμες κορυφές μετά από αργή ψύξη στους (-2°C/s), ενώ οι καμπύλες θέρμανσης των ηλιέλαιων μόνο μία. Η προσθήκη ηλιέλαιου στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο προκάλεσε μείωση στην πιο ψυχρή ενδόθερμη κορυφή. Αυτό δείχνει πως η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση νοθείας του ελαιόλαδου με ηλιέλαιο. Το όριο ανίχνευσης ποικίλει σε ποσοστό 2-10% σε ποσοστό εμπιστοσύνης 95%. [28]

1.7.4 Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές

Η ηλεκτροαναλυτική χημεία περιλαμβάνει ένα πλήθος ποσοτικών και ποιοτικών αναλυτικών τεχνικών. Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στις ηλεκτρικές ιδιότητες του αναλύτη και του διαλύματος, όταν αυτά αποτελούν τμήμα ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου. Το ηλεκτροχημικό στοιχείο αποτελείται από τα ηλεκτρόδια, το διάλυμα του ηλεκτρολύτη που άγει το ρεύμα και ένα εξωτερικό κύκλωμα που επιτελεί την εφαρμογή ή την μέτρηση των ηλεκτρικών σημάτων. Τα μεγέθη που μετρούνται περιλαμβάνουν το δυναμικό, την ένταση ρεύματος, την ηλεκτρική αντίσταση. Οι ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των υπόλοιπων τεχνικών ανάλυσης. Ορισμένα από αυτά τα πλεονεκτήματα είναι τα χαμηλά όρια ανίχνευσής τους και η λήψη πολλών πληροφοριών που περιγράφουν ηλεκτροχημικώς ενεργά συστήματα. Οι τεχνικές αυτές δίνουν πληροφορίες για τη στοιχειομετρία και την ταχύτητα διεπιφανειακής μεταφοράς φορτίου, την ταχύτητα και τη σταθερά ισορροπίας χημικών αντιδράσεων, καθώς επίσης και το βαθμό προσρόφησης και χημειορρόφησης. [23]

Οι ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ανάλυσης. Μερικοί επιπλέον λόγοι που καθιστούν τόσο διευρυμένη τη χρήση τους θα παρουσιαστούν στη συνέχεια. Πρώτον είναι η εξειδίκευση που παρουσιάζουν ως προς συγκεκριμένη οξειδωτική κατάσταση ενός στοιχείου. Για παράδειγμα με τις ηλεκτροχημικές τεχνικές ανάλυσης μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση κάθε συστατικού μίγματος δημητρίου(III) και δημητρίου(IV), σε αντίθεση με όλες τις άλλες τεχνικές στις οποίες προσδιορίζεται η ολική συγκέντρωση του δημητρίου. Ακόμα είναι το χαμηλό κόστος αυτών των τεχνικών έναντι των υπολοίπων. Χαρακτηριστικά

αναφέρεται πως ένα τυπικό ηλεκτροχημικό σύστημα κοστίζει περίπου 10.000\$, τη στιγμή που πολλά φασματοσκοπικά όργανα κοστίζουν 50.000-250.000\$. Τέλος οι ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές ανάλυσης δίνουν πληροφορίες για την ενεργότητα και όχι τη συγκέντρωση ουσιών, γεγονός που σε κάποιες περιπτώσεις είναι πολύ σημαντικό. [23]

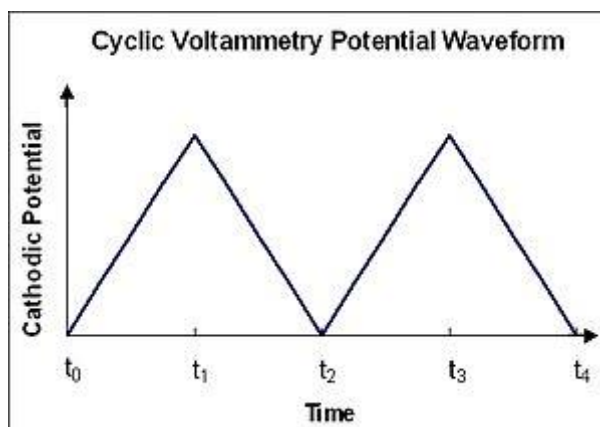
1.7.4.1 Κυκλική Βολταμμετρία

Η βολταμμετρία ή αλλιώς βολταμπερομετρία περιλαμβάνει ένα σύνολο ηλεκτροαναλυτικών τεχνικών κατά τις οποίες λαμβάνεται η πληροφορία για τον αναλύτη μέσω της μέτρησης του ηλεκτρικού ρεύματος συναρτήσεως του εφαρμοζόμενου δυναμικού σε συνθήκες που ευνοούν την πόλωση ενός ηλεκτροδίου εργασίας. Στην ειδική περίπτωση όπου το ρεύμα που εφαρμόζεται είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη, σε σταθερό δυναμικό, η τεχνική ονομάζεται αμπερομετρία. Η πόλωση ευνοείται όταν τα ηλεκτρόδια εργασίας στη βολταμμετρία και την αμπερομετρία έχουν μικρή επιφάνεια. Για το λόγο αυτό επιλέγονται ηλεκτρόδια με επιφάνεια λίγα τετραγωνικά χιλιοστόμετρα και πολλές φορές ακόμα και λίγα τετραγωνικά μικρόμετρα.

Η βολταμμετρία είναι μία τεχνική που δε χρησιμοποιείται μόνο για αναλυτικούς λόγους. Χρησιμοποιείται από πλήθος ειδικοτήτων επιστημόνων όπως χημικούς, βιοχημικούς, φυσικοχημικούς κ.α. για θεμελιώδεις μελέτες οξειδοαναγωγικών διεργασιών σε διάφορα μέσα, για τη μελέτη των μηχανισμών μεταφοράς ηλεκτρονίων σε χημικώς τροποποιημένες επιφάνειες ηλεκτροδίων και τη μελέτη των φαινομένων προσρόφησης σε επιφάνειες.

Η ανακάλυψη της βολταμμετρίας τοποθετείται χρονικά στις αρχές του 1920 και επινοήθηκε από τον Τσεχοσλοβάκο χημικό Jaroslav Heyrovsky. Το πεδίο της βολταμμετρίας ιστορικά ξεκίνησε με την πολαρογραφία, έναν ειδικό τύπο βολταμμετρίας. Στην πολαρογραφία σε αντίθεση με τις υπόλοιπες βολταμμετρικές τεχνικές, το ηλεκτρόδιο εργασίας που χρησιμοποιείται είναι το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου. Μέχρι τη δεκαετία του 1950 η πολαρογραφία αποτελούσε σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων οργανικών ουσιών και ανόργανων ιόντων σε υδατικά διαλύματα. Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 και στις αρχές της δεκαετίας του 1960 η πολαρογραφία έγινε λιγότερο σημαντική αναλυτική τεχνική και αντικαταστάθηκε σε μεγάλο βαθμό από διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές που θα παρουσιαστούν σε επόμενες παραγράφους. Στα χρόνια που ακολούθησαν οι κλασικές βολταμμετρικές τεχνικές αναπτύχθηκαν με πολλές τροποποιήσεις, όπως η διάθεση τελεστικών ενισχυτών και η διάθεσή τους σε χαμηλό κόστος, οι οποίες επανάφεραν το ενδιαφέρον σε αυτές. Πλέον χρησιμοποιούνται κυρίως για εφαρμογές περιβαλλοντικού, φαρμακευτικού και βιολογικού ενδιαφέροντος. [23]

Μια ειδική κατηγορία των βολταμμετρικών τεχνικών είναι η κυκλική βολταμμετρία. Η κυκλική βολταμμετρία είναι ίσως η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη βολταμμετρική τεχνική εξαιτίας της ευελιξίας της. Στην τεχνική αυτή καταγράφεται το ρεύμα που διαρρέει το ηλεκτρόδιο (σε ακίνητο διάλυμα) όταν επιβάλλεται σε αυτό τριγωνική κυματομορφή δυναμικού. Με την τεχνική αυτή λαμβάνονται σημαντικές πληροφορίες όπως ο αριθμός των ανταλασσομένων ηλεκτρονίων, το δυναμικό οξείδωσης ή αναγωγής, η αντιστρεπτότητα της ηλεκτροχημικής δράσης και η σταθερότητα των προϊόντων της, η παρουσία τυχόν ενδιάμεσων προϊόντων και ο συντελεστής διάχυσης των υπό μελέτη χημικών ειδών. [29]



Εικόνα 7: Τριγωνική κυματομορφή δυναμικού.

Μία διάταξη βολταμμογράφου αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια που είναι βυθισμένα σε ένα διάλυμα, στο οποίο περιέχεται ο αναλύτης και αδρανής ηλεκτρολύτης (φέρων ηλεκτρολύτης) σε περίσσεια. Τα τρία ηλεκτρόδια είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας (working electrode), το ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode) και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο (auxilliary electrode). Στην κυκλική βολταμμετρία το ηλεκτρόδιο εργασίας κατασκευάζεται συνήθως από υαλώδη άνθρακα (glassy carbon), λευκόχρυσο (πλατίνα) ή χρυσό. Ακόμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα (carbon paste), το οποίο μπορεί εύκολα να κατασκευαστεί εργαστηριακά. Παλαιότερα ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιούταν συχνά το ηλεκτρόδιο αιωρούμενης σταγόνας υδραργύρου. Το ηλεκτρόδιο αυτό πλέον δε χρησιμοποιείται κυρίως λόγω του μικρού ανοδικού εύρους του αλλά και της τοξικότητας του υδραργύρου. Ως ηλεκτρόδια αναφοράς χρησιμοποιούνται ηλεκτρόδια Ag/AgCl και καλομέλινα και ως βοηθητικά ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται κυρίως αγώγιμα και χημικά υλικά με μεγάλη επιφάνεια (σύρματα λευκόχρυσου, τιτανίου και υαλώδους άνθρακα). [29]

Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό της νοθείας του ελαιόλαδου με άλλα έλαια. Συγκεκριμένα μία εφαρμογή αυτής της μεθόδου περιελάβανε τη λήψη του βολταμμετρικού δακτυλικού αποτυπώματος ελαίων και το συνδυασμό τους με χημειομετρική ανάλυση προκειμένου να ανιχνευθεί η νοθεία έξτρα παρθένου ελαιόλαδου με πυρηνέλαιο καθώς και με τα πιο

κοινά χρησιμοποιούμενα σπορέλαια όπως το ηλιέλαιο, το σογιέλαιο και το καλαμποκέλαιο. Παρασκευάστηκαν εργαστηριακά μεθανολικά εκχυλίσματα ελαίων, στα οποία προστέθηκε ως ηλεκτρολύτης αιθανολικό διάλυμα LiClO_4 με συγκέντρωση 0,1M. Τα σημεία δεδομένων των κυκλικών βολταμμογραφημάτων εξήχθησαν και υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), Διακριτή Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) και ανάλυση με το λογισμικό SIMCA. Στα αποτελέσματα φάνηκε μίας σαφής διάκριση μεταξύ των ελαιόλαδων (παρθένων και εξαιρετικά παρθένων) με τα υπόλοιπα έλαια (πυρηνέλαια και σπορέλαια). Στη μέθοδο αυτή λήφθηκαν υπόψη τα σημεία δεδομένων που καταγράφηκαν για τιμές δυναμικών από 0,6V έως 1,3V. Τέλος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της νοθείας αναπτύχθηκε ένα μοντέλο που βασίστηκε στην Ανάλυση Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS). Το όριο ανίχνευσης της νοθείας στο ελαιόλαδο βρέθηκε να είναι 2% (v/v). Τα πλεονεκτήματα από την εφαρμογή των ηλεκτροαναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της νοθείας τόσο του ελαιόλαδου, όσο και των τροφίμων γενικότερα είναι το χαμηλό κόστος ανάλυσης και η ευκολία χειρισμού των αναλυτικών οργάνων. [30]

1.7.5 Φασματομετρικές τεχνικές ανάλυσης

Οι φασματομετρικές τεχνικές αποτελούν μία σημαντική ομάδα τεχνικών ανάλυσης. Οι τεχνικές αυτές στηρίζονται στην ατομική και μοριακή φασματοσκοπία. Ο όρος φασματομετρία περιλαμβάνει ένα σύνολο από τεχνικές ανάλυσης που στηρίζονται στην αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Σήμερα η έννοια της φασματομετρίας έχει διευρυνθεί και περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ύλης και με άλλες μορφές ενέργειας, για παράδειγμα την αλληλεπίδραση ακουστικών κυμάτων και δεσμών ιόντων ή ηλεκτρονίων με την ύλη. Στη φασματομετρία μετριέται η ένταση της ακτινοβολίας με φωτοηλεκτρικούς εναλλάκτες ή άλλου τύπου ηλεκτρονικές διατάξεις. Οι φασματομετρικές τεχνικές μπορεί να στηρίζονται στην αλληλεπίδραση της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, αλλά και με λιγότερο αισθητές μορφές ακτινοβολιών όπως οι ακτίνες γ , οι ακτίνες X, η υπεριώδης ακτινοβολία, καθώς και ακτινοβολίες μικροκυμάτων και ραδιοσυχνοτήτων. Οι φασματομετρικές τεχνικές χρησιμοποιούνται από επιστήμονες για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των στοιχείων στις διάφορες μορφές που συναντώνται στην ύλη.

1.7.5.1 Φασματομετρία Raman

Αρχή της μεθόδου της φασματοσκοπίας Raman αποτελεί η σκέδαση ενός μέρους της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει σε διαφανές μέσο και ταυτόχρονα στη μετατόπιση ενός μικρού μέρους της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Το φαινόμενο της σκέδασης Raman σήμερα έχει γίνει πλήρως κατανοητό και έχει αποδειχτεί πως οφείλεται σε κβαντισμένες δονητικές μεταβολές ίδιου τύπου με αυτές που συνδέονται και με την απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Γίνεται επομένως αντιληπτό πως το φάσμα σκέδασης Raman και το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου, για το ίδιο συστατικό, έχουν πολλά κοινά μεταξύ τους. Σημειώνεται ωστόσο ότι διαφέρουν οι ομάδες που διεγείρονται στο υπέρυθρο από εκείνες που διεγείρονται στο φάσμα Raman. Οι δύο τεχνικές δίνουν διαφορετικές πληροφορίες και λειτουργούν συμπληρωματικά. Η φασματοσκοπία Raman παρουσιάζει ένα συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι της φασματοσκοπίας υπέρυθρου. Το νερό δεν προκαλεί παρεμπόδιση και επομένως μπορούν να αναλυθούν υδατικά διαλύματα.

Η φασματοσκοπία Raman ανακαλύφθηκε από τον Ινδό φυσικό C.V. Raman το 1928, από τον οποίο πήρε και το όνομά της. Ο Raman που τιμήθηκε το 1931 με το βραβείο Νόμπελ Φυσικής, ανακάλυψε πως το μήκος κύματος ενός μικρού κλάσματος της ορατής ακτινοβολίας, που σκεδάζεται από ορισμένα μόρια, διαφέρει από αυτό της ακτινοβολίας που προσπίπτει. Ακόμα συμπέρανε ότι οι μετατοπίσεις στο μήκος κύματος έχουν άμεση εξάρτηση από τη χημική δομή των μορίων που προκαλούν τη σκέδαση. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η φασματοσκοπία Raman έχει σημαντικά πλεονεκτήματα, ωστόσο η χρήση της δεν ήταν διευρυμένη έως το 1960 οπότε και έγιναν διαθέσιμα τα λέιζερ που βοήθησαν στη λήψη των φασμάτων. Σήμερα η τεχνική αυτή είναι αρκετά οικονομική και χρησιμοποιείται ευρύτατα. [23]

Το 2020 διεξήχθη μία μελέτη που αφορούσε την εφαρμογή της φασματοσκοπίας Raman για τον προσδιορισμό της νοθείας του ελαιόλαδου με κραμβέλαιο και αραβοσιτέλαιο και επεξεργασία των αποτελεσμάτων με μία μαθηματική μέθοδο που περιλάμβανε την προσαρμογή των δεδομένων σε μια εκθετική εξίσωση. Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή παρασκευάστηκαν δείγματα ελαιόλαδου με κλάσματα όγκου (0-100%) κραμβέλαιου ή αραβοσιτέλαιου. Τα έλαια αυτά διαφοροποιήθηκαν φασματοσκοπικά με τη μέθοδο αυτή. Ακόμα ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των κλασμάτων όγκου κραμβελαιίου ή αραβοσιτέλαιου που προστέθηκαν στο ελαιόλαδο. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δεν απαιτούνταν καμία προετοιμασία των δειγμάτων, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα έναντι άλλων μεθόδων προσδιορισμού της νοθείας. [31]

1.7.5.2 Φασματομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Η φασματομετρία μοριακής απορρόφησης στις φασματικές περιοχές υπεριώδους ορατού χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ανόργανων, οργανικών και βιολογικών ουσιών. Η υπεριώδης περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος αντιστοιχεί σε μήκη κύματος 100-800nm. Η φασματομετρία υπεριώδους ορατού αναφέρεται σε απορροφήσεις σε αυτή την περιοχή, οι οποίες οφείλονται σε ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Η υπεριώδης περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος διακρίνεται σε τρεις επιμέρους περιοχές. Το ορατό (800-400nm), το εγγύς υπεριώδες (400-190nm) και το άπω υπεριώδες (190-100nm). Ο αέρας απορροφά στο άπω υπεριώδες, για το λόγο αυτό προτιμάται το εγγύς υπεριώδες καθώς σε αντίθετη περίπτωση απαιτείται κενό.

Στη φασματομετρία μοριακής απορρόφησης στο υπεριώδες/ορατό μετρείται η διαπερατότητα T ή η απορρόφηση A διαλυμάτων, τα οποία τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b cm. Παρατηρείται μία γραμμική συσχέτιση μεταξύ της της συγκέντρωσης C του αναλύτη και της απορρόφησης, η οποία μαθηματικά εκφράζεται με το νόμο του Beer. Παρακάτω παρουσιάζεται η εν λόγω εξίσωση. [23]

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P}$$

Η φασματοσκοπία UV-Vis παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων αναλυτικών τεχνικών, τα οποία την καθιστούν ικανή για τον προσδιορισμό της νοθείας των ελαιόλαδων με άλλα έλαια. Από βιβλιογραφική αναζήτηση προέκυψε πως το 2017 διεξήχθη μία συγκριτική μελέτη της ικανότητας δύο μεθόδων για την ικανότητά τους να εντοπίζουν νοθευμένα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα με σογιέλαιο. Οι μέθοδοι του αξιολογήθηκαν ήταν η φασματοσκοπία φθορισμού και η φασματοσκοπία UV-Vis. Εργαστηριακά παρασκευάστηκαν νοθευμένα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα με σογιέλαιο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων επεξεργάστηκαν με διάφορες στρατηγικές πολυμεταβλητής παλινδρόμησης. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης έδειξαν πως αν και οι δύο μέθοδοι ήταν ικανές να εντοπίσουν τη νοθεία, η φασματοσκοπία UV-Vis έδωσε συγκριτικά λίγο καλύτερα αποτελέσματα. [32]

1.7.5.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) είναι μία φασματοσκοπική μέθοδος ενόργανης ανάλυσης η οποία βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (4-900 MHz). Στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στη διαδικασία της απορρόφησης συμμετέχουν οι πυρήνες, σε αντίθεση με την απορρόφηση υπεριώδους, ορατής και υπέρυθρης ακτινοβολίας στις οποίες συμμετέχουν τα ηλεκτρόνια. Στη συγκεκριμένη μέθοδο προκειμένου να υπάρξει απορρόφηση του αναλύτη, απαιτείται ισχυρό μαγνητικό πεδίο.

Στη φασματομετρία NMR χρησιμοποιείται ακτινοβολία στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων προκειμένου να διεγερθούν τα άτομα, συνήθως πρωτόνια ή άτομα άνθρακα-13. Η διέγερση έχει ως αποτέλεσμα να αλλάζουν τα σπιν τους από παράλληλα σε αντιπαράλληλα προς το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Κάθε μόριο διεγείρεται σε μία πολύ συγκεκριμένη περιοχή συχνοτήτων και χαρακτηρίζεται από ένα σύνολο χαρακτηριστικών κορυφών. Η συγκεκριμένη φασματοσκοπική μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων μεταξύ των οποίων είναι πως παρέχει πολύ περισσότερες πληροφορίες για τη μοριακή δομή από κάθε άλλη τεχνική, θεωρείται πολύ σταθερό σύστημα που δε χρειάζεται ιδιαίτερη συντήρηση οργανολογίας και τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι επαναλήψιμα στα διάφορα όργανα που είναι διαθέσιμα στην αγορά. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς μεταξύ των οποίων είναι το γεγονός ότι είναι μία μικρής ευαισθησίας τεχνική που απαιτεί λιγότερο από 1mg για πυρηνικό συντονισμό (NMR) πρωτονίου και λιγότερα από 5mg για NMR άνθρακα-13. Ακόμα η οργανολογία χαρακτηρίζεται από μεγάλο κόστος και απαιτείται εξειδικευμένος χείριστος για την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

Η φασματοσκοπία NMR παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 1924 από τον W. Pauli, ο οποίος υποστήριξε πως ορισμένοι ατομικοί πυρήνες θα πρέπει να έχουν τόσο ιδιότητες αυτοστροφορμής (spin), όσο και μαγνητικής ροπής και επομένως η έκθεσή τους σε μαγνητικό πεδίο θα οδηγούσε σε διαχωρισμό των ενεργειακών τους επιπέδων. Το 1946 οι Felix Bloch και Eduard Purcell απέδειξαν πως όταν οι πυρήνες βρεθούν σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, ως συνέπεια του μαγνητικώς επαγόμενου διαχωρισμού των ενεργειακών επιπέδων. Οι δύο φυσικοί βραβεύτηκαν με το Βραβείο Νόμπελ το 1952. Μόλις ένα χρόνο αργότερα, το 1953, παρουσιάστηκε το πρώτο εμπορικώς διαθέσιμο φασματόμετρο NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας. Ο χρόνος που μεσολάβησε από την ανακάλυψη έως της ευρείας χρήσης της μεθόδου ήταν πρωτοφανώς μικρός. Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρύτατα δύο τύποι οργάνων NMR, τα φασματόμετρα συνεχούς κύματος και τα παλμικά ή φασματόμετρα μαγνητικού μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR). [23]

Σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους, η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της νοθείας του ελαιόλαδου με άλλα έλαια. Συγκεκριμένα η φασματοσκοπία NMR σε συνδυασμό με τις χημειομετρικές τεχνικές PCA και LDA, έχει χρησιμοποιηθεί όπως προκύπτει από βιβλιογραφική έρευνα, για τον εντοπισμό του νοθευμένου ελαιόλαδο με φουντουκέλαιο. Η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 10%, ενώ η αντίστοιχη μέθοδος για βιομηχανικό ελαιόλαδο (ραφινέ) είχε όριο ανίχνευσης 5%. Ακόμα η φασματοσκοπία NMR έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της γεωγραφικής προέλευσης του ελαιόλαδου, καθώς και τον προσδιορισμό της χρονιάς συγκομιδής του. [20]

1.7.5.4 Φασματομετρία Υπερύθρου (IR)- Φασματομετρία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από την περιοχή από την περιοχή του ορατού έως την περιοχή των μικροκυμάτων. Η υπέρυθη περιοχή διαιρείται σε τρεις επιμέρους περιοχές (το Εγγύς IR (near IR) 0,8-2,5μ, το Μέσο IR (middle IR) 2,5-25μ και το Άπω IR (far IR) 25-1000μ). Το μέσο IR είναι αυτό που παρουσιάζει το μεγαλύτερο αναλυτικό ενδιαφέρον και αντιστοιχεί στην περιοχή $4.000-400\text{ cm}^{-1}$. Αρχή λειτουργίας της υπέρυθρης φασματομετρίας είναι λοιπόν η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μίας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Η φασματομετρία υπέρυθρου δε μελετά τις ηλεκτρονιακές διεγέρσεις, αλλά τις μοριακές δονήσεις (τάσης και κάμψης) και μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή της ουσίας. Δε μπορούν ωστόσο να προσδιοριστούν όλες οι ενώσεις με αυτή τη μέθοδο, καθώς απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η ύπαρξη μεταβολής στο μέγεθος και τη διεύθυνση της διπολικής ροπής του δεσμού. Διακρίνονται λοιπόν οι ενώσεις ανάλογα με το αν μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με υπέρυθη ακτινοβολία σε ενεργές και ανενεργές στο IR. [33]

Ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας μίας ένωσης είναι πολύ χαρακτηριστικό για αυτή και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμά» της. Το φάσμα μπορεί να χωριστεί σε δύο επιμέρους περιοχές. Αυτές είναι η περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων ($4000-1400\text{cm}^{-1}$) όπου οι ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων και στην περιοχή $1600-600\text{cm}^{-1}$ όπου οι απορροφήσεις οφείλονται στις δονήσεις όλου του μορίου. [33]

Τρία είναι τα κύρια είδη φασματομέτρων IR [33]:

- ❖ Τα συμβατικά IR με χρήση μονοχρωμάτορα (dispersive spectrometers)
- ❖ FT-IR φασματόμετρα (Fourier Transformed Infrared)
- ❖ Φασματόμετρα IR χωρίς παραγωγή φάσματος για ειδικού τύπου αναλύσεις

Από τους παραπάνω τύπους φασματομέτρων IR, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φασματομέτρα FTIR εξαιτίας ορισμένων πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Τα περισσότερα από τα εμπορικά όργανα υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier βασίζονται στο συμβολόμετρο Michelson, παρόλο που συναντούνται και άλλα είδη οπτικών συστημάτων. Τα συμβατικά φασματομέτρα IR είχαν περιορισμένη ευαισθησία και οι εντάσεις των απορροφήσεων δεν ήταν μεγάλες. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να εμφανίζεται έντονος θόρυβος που σκέπαζε τις ταινίες απορρόφησης. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε με τη φασματομετρία IR με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Τα φασματομέτρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να εξετάζουν πολλά σημεία του φάσματος. Ο χρόνος για την πραγματοποίηση των μετρήσεων διαρκεί 10 έως 20 δευτερόλεπτα και πραγματοποιούνται από 20 έως 100 επαναλήψεις. Από το μέσο όρο όλων των μετρήσεων που πραγματοποιούνται προκύπτει το τελικό φάσμα. Η μείωση του θορύβου λοιπόν σε σχέση με τα συμβατικά φασματομέτρα προκύπτει από την εξέταση πολλών σημείων ταυτόχρονα. Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές λήψης φάσματος FTIR είναι η τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared Spectroscopy - DRIFT) και η τεχνική της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance Spectroscopy - ATR). [33]

Η μέθοδος FTIR σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του νοθευμένου ελαιόλαδου. Μια εφαρμογή αυτής της μεθόδου όπως προκύπτει από βιβλιογραφική έρευνα παρουσιάζεται στη συνέχεια. Σκοπός της μεθόδου ήταν η ανίχνευση του Π.Ο.Π. ελαιόλαδου Καλαμάτας από νοθευμένα δείγματα ελαιόλαδου με ηλιέλαιο. Χρησιμοποιήθηκαν 69 δείγματα Π.Ο.Π. ελαιόλαδου Καλαμάτας και 44 νοθευμένα δείγματα με ηλιέλαιο. Στη συγκεκριμένη μέθοδο δε χρησιμοποιήθηκε όλο το φάσμα, αλλά μόνο οι ζώνες $1711-1590\text{cm}^{-1}$, $1531-1476\text{cm}^{-1}$, $2386-2330\text{cm}^{-1}$, οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικές. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο της PCA. Οι ζώνες αυτές έδωσαν καλή διασπορά κατά την εκπαίδευση της PCA και υψηλό ποσοστό της συνολικής διακύμανσης, γεγονός που σημαίνει πως τα άγνωστα δείγματα επικυρώθηκαν με επιτυχία. Επομένως η μέθοδος αυτή προβλέπει με αξιοπιστία τα νοθευμένα και τα μη νοθευμένα ελαιόλαδα. [34] Σε μία άλλη μέθοδο έγινε προσπάθεια γεωγραφικής διαφοροποίησης δειγμάτων παρθένου ελαιόλαδου ποικιλίας Αμφίσσης από τις περιοχές της Φωκίδας και της Μαγνησίας. Τα δείγματα ελαιόλαδου παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην σύστασή τους και η γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). [35]

1.8 Χημειομετρία

Τα πειράματα της Αναλυτικής Χημείας συνήθως περιλαμβάνουν μετρήσεις από τις οποίες εξάγονται πληροφορίες για φυσικά συστήματα. Είναι σύνηθες αυτοί οι αριθμοί που παραλαμβάνονται από το αναλυτικό σύστημα να είναι δυσνόητοι λόγω του μεγάλου πλήθους τους και είναι δύσκολο να συσχετιστούν με το επιστημονικό πρόβλημα. Το πρόβλημα αυτό έρχεται να λύσει η Χημειομετρία. Η Χημειομετρία είναι σημαντική τόσο σε όλα τα πεδία της Χημείας, όσο και σε άλλες επιστήμες (Ιατρική, Χημική Μηχανική, Βιολογία, Φαρμακευτική Χημεία κ.α) και έχει βρει μεγάλη αποδοχή σε πεδία σχετικά με την εκτέλεση ποσοτικών πειραμάτων.

1.8.1 Ορισμός της Χημειομετρίας

Περίπου το 1970, η αύξηση της πολυπλοκότητας της χημικής οργανολογίας και των αναλυτικών διαδικασιών οδήγησε στην ανακάλυψη της Χημειομετρίας. Η Χημειομετρία στηρίζεται στη χρήση μεθοδολογιών από τη στατιστική, τα μαθηματικά, την τεχνητή νοημοσύνη και την επιχειρησιακή έρευνα και εφαρμογή τους σε χημικά συστήματα. Ο όρος Χημειομετρία επινοήθηκε στο Πανεπιστήμιο Umea στη Σουηδία από τον Svante Wold σε μία ερευνητική πρόταση για χρηματοδότηση και λίγο αργότερα ο Bruce Kowalski από το Πανεπιστήμιο της Washington, εισήγαγαν τον όρο στις ΗΠΑ. Το 1974 συστήθηκε η Διεθνής Ένωση Χημειομετρίας (International Chemometrics Society) ως συνέπεια της αναγνώρισης της Χημειομετρίας ως ενός χωριστού κλάδου της Χημείας.

Πολλοί είναι οι ορισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τη Χημειομετρία, ωστόσο αυτός που καθιερώθηκε προτάθηκε από το Massart είναι ο πιο ακριβής: Χημειομετρία είναι ο κλάδος της Χημείας, που ασχολείται με την εφαρμογή μεθοδολογιών (στρατηγικών) της στατιστικής, των μαθηματικών, και της τυπικής λογικής (formal logic) στη Χημεία με στόχο: α) το σχεδιασμό ή επιλογή των βέλτιστων πορειών (διαδικασιών) μετρήσεων και πειραμάτων, β) την εξαγωγή της μέγιστης σχετικής χημικής πληροφορίας από την ανάλυση χημικών δεδομένων, γ) την απόκτηση γνώσεων για χημικά συστήματα. Στο πεδίο της Αναλυτικής Χημείας, η Χημειομετρία χρησιμοποιείται κυρίως για την επίτευξη του βέλτιστου τρόπου εξαγωγής πληροφοριών στα συστήματα υλικών. Η Χημειομετρία βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς κλάδους πέραν της Χημείας και τείνει να γίνει αυτόνομος επιστημονικός κλάδος. Οι μεθοδολογίες «αποτίμησης της ποιότητας» ενός υλικού διαμορφώθηκαν σε ένα υποκλάδο της Χημειομετρίας με το όνομα Qualimetrics. [36],[37]

1.8.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Το 1901, ο Karl Pearson για πρώτη φορά περιέγραψε την ανάλυση PCA για την επίλυση βιομετρικών προβλημάτων. Τα επόμενα χρόνια και ειδικά τη δεκαετία του 1980 η μέθοδος εξελίχθηκε αρκετά λόγω της επικράτησης των Ηλεκτρονικών Υπολογιστών. Η ανάλυση PCA συγκαταλέγεται στις χημειομετρικές μεθόδους και αποτελεί μία από τις πιο απλές πολυμεταβλητές μεθόδους (multi-variate methods). Η μέθοδος έχει στόχο τη λήψη p μεταβλητών και να βρίσκει συνδυασμούς αυτών και ακόμα να παράγει δείκτες που δε συσχετίζονται μεταξύ τους. Η μέθοδος ουσιαστικά κάνει ένα φιλτράρισμα δεδομένων. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται χαρακτηριστικά: «Οι αισθήσεις είναι τόσο περίπλοκες που συχνά απαιτείται μία απλοποιημένη εικόνα ώστε να μπορεί το άτομο να λάβει μία γρήγορη εικόνα. Με βάση αυτό το φιλτράρισμα της ακοής και της όρασης, οδηγεί σε μία μετάφραση από πολυμεταβλητό σύστημα σε μονομεταβλητό. Σπάνια κατανοούμε ότι αυτό το φιλτράρισμα είναι ένα βιολογικό αριστούργημα το οποίο μας επιτρέπει να κατανοούμε την διαφορά μεταξύ του Παβαρότι και του Ντομίνινγκο που τραγουδάνε την ίδια άρια». [38]

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών ανήκει στις μεθόδους ταξινόμησης και εφαρμόζεται σε ένα ενιαίο πίνακα περιγραφικών μεταβλητών X (descriptions). Οι σειρές του πίνακα αντιπροσωπεύουν αντικείμενα/παρατηρήσεις και οι στήλες μεταβλητές. Οι παρατηρήσεις μπορούν σε ένα πολυδιάστατο χώρο να απεικονιστούν ως σημεία. Στο χώρο αυτό οι μεταβλητές προσδιορίζουν τους άξονες. Σημειώνεται ακόμα ότι απαιτείται κανονικοποίηση των μεταβλητών (scaling), καθώς η κλίμακα των μεταβλητών επηρεάζει το μήκος των αξόνων. Η μέθοδος PCA εξάγει ένα νέο σύνολο μεταβλητών από ένα σύνολο μεταβλητών X . Οι μεταβλητές t ονομάζονται «κύριες συνιστώσες» και περιέχουν την πληροφορία που φέρουν οι αρχικές μεταβλητές. Με τη μέθοδο αυτή λοιπόν μία ευθεία, ένα επίπεδο ή ένα υπέρ-επίπεδο προσαρμόζεται στα δεδομένα σε ένα πολυδιάστατο χώρο με τις μεταβλητές για άξονες. Αυτή η γραφική απεικόνιση καλείται διάγραμμα των συντεταγμένων (scores) και δίνει τη σχετική θέση των αντικειμένων στο χώρο, ενώ ακόμα παρέχει πληροφορίες για τη μεταξύ τους σχέση. Διαπιστώνεται λοιπόν με αυτό τον τρόπο η ύπαρξη τάσεων, outliers κλπ. Δύο είναι τα στατιστικά μεγέθη που χρησιμοποιούνται κυρίως για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, (α) ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ που εκφράζει το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις κύριες συνιστώσες, και (β) ο διασταυρώμενος συντελεστής συσχέτισης Q^2 , ο οποίος εκφράζει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των X που προβλέπεται από την κύρια συνιστώσα. [39]

1.8.3 Διακριτή (διακριτική) ανάλυση μερικών τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)

Με τη μέθοδο PCA, η οποία αναφέρθηκε προηγουμένως, οι παρατηρήσεις τοποθετούνται στο χώρο κατά το βέλτιστο δυνατό τρόπο, κάτι όμως που δεν εγγυάται το βέλτιστο διαχωρισμό των παρατηρήσεων σε ομάδες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται μία άλλη μέθοδος, η οποία ονομάζεται μέθοδος της διακριτής ανάλυσης ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). Η μέθοδος αυτή έχει στόχο την ομαδοποίηση των εισερχόμενων δεδομένων προκειμένου να φανεί η σχέση μεταξύ των ομάδων. Το πρόβλημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι κατά πόσο μπορεί να διαχωρίσει τα δεδομένα σε δύο ή σε περισσότερες ομάδες. Επιτρέπει ακόμα να τοποθετηθούν νέες μετρήσεις σε κάποια από τις ήδη υπάρχουσες ομάδες. Η μέθοδος αυτή, σε αντίθεση με την PCA, επιτρέπει στα δείγματα που εξετάζονται να μην είναι κανονικοποιημένα, διότι δεν επηρεάζονται από την τάξη μεγέθους των δειγμάτων. Πρόκειται για μία εποπτευόμενη (supervised) μέθοδο, στην οποία οι ομάδες δεδομένων (δειγμάτων) είναι ήδη γνωστές (πειραματικές ομάδες) και ο σκοπός της ανάλυσης είναι η επιβεβαίωση (ή μη) της διαφοράς μεταξύ ομάδων που είχαν καθοριστεί από την αρχή και η ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών εκείνων που περιγράφουν καλύτερα τις μεταξύ τους διαφορές. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται τα ίδια στατιστικά στοιχεία με τη μέθοδο PCA, δηλαδή ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ και ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης Q^2 . Στη μέθοδο PLS-DA, σε αντίθεση με τη μέθοδο PCA υπολογίζονται δύο συντελεστές $R^2(\text{cum})$, ο $R^2X(\text{cum})$ και ο $R^2Y(\text{cum})$. Ο συντελεστής $R^2X(\text{cum})$ εκφράζει το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες. Ο συντελεστής $R^2Y(\text{cum})$ εκφράζει το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των εξαρτημένων μεταβλητών Y που ερμηνεύεται από όλες τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες. [40]

1.8.4 Ανάλυση μίας κλάσης (Class Modeling)

Οι μέθοδοι μοντελοποίησης μίας κλάσης, σε αντίθεση με τις μεθόδους κατηγοριοποίησης/κατάταξης που αποσκοπούν στην κατάταξη ενός δείγματος σε μία συγκεκριμένη ομάδα μεταξύ δύο, εστιάζουν σε μία συγκεκριμένη ομάδα που ενδιαφέρει τη μελέτη. Παράδειγμα τέτοιων δειγμάτων είναι δείγματα που προέρχονται από μία συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή ή γνήσια (μη νοθευμένα) δείγματα μίας συγκεκριμένης κατηγορίας (π.χ. εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα). Αυτή η ομάδα αναλυτικών τεχνικών ασχολείται με την ανάπτυξη μοντέλων που στόχο έχουν την της γνησιότητας ενός αριθμού δειγμάτων. Οι μέθοδοι μίας κλάσης

ενδιαφέρουν ιδιαίτερα τον τομέα της Αναλυτικής Χημείας και τυγχάνουν ευρείας εφαρμογής στην επιβεβαίωση γνησιότητας δειγμάτων διότι είναι πιο εύκολο να μοντελοποιηθούν μέσω μίας συστηματικής δειγματοληψίας σε αντίθεση με τα νοθευμένα δείγματα στα οποία δεν είναι καθορισμένη η νοθεία.

Η ήπια ανεξάρτητη μοντελοποίηση SIMCA (Soft Independent Modeling by Class Analogy) είναι μία μέθοδος μοντελοποίησης μιας κλάσης. Η μέθοδος αυτή είναι μία προτυποποιητική μέθοδος αποτύπωσης με βάση την απόσταση και την εισήγαγε ο Svante Wold το 1977. Τα μοντέλα SIMCA στηρίζονται στις κατευθύνσεις της μέγιστης διακύμανσης σε ένα χώρο πολλαπλών δεδομένων. Για το λόγο αυτόν πρώτα γίνεται μετασχηματισμός των δεδομένων με βάση την ταξινόμηση της στήλης ή με τη μέση τιμή της στήλης, η μία από τις οποίες μετατοπίζει την προέλευση των αξόνων αναφοράς έτσι ώστε να συμπίπτει με την κεντροειδή τάξη. Έπειτα εκτελείται ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), με περιστροφή γύρω από το κέντρο της κατηγορίας και ο αριθμός των σημαντικών κατευθύνσεων της μέγιστης διακύμανσης αξιολογείται. Η αξιολόγηση συνήθως γίνεται μέσω μίας διπλής διαδικασίας διασταυρούμενης επικύρωσης. Ο λεγόμενος εσωτερικός χώρος της SIMCA ορίζεται από τις κατευθύνσεις.

Το σχήμα που μπορεί να έχει ένα τέτοιο μοντέλο μπορεί να είναι ένα τμήμα (μονοδιάστατος εσωτερικός χώρος), ένα ορθογώνιο (διδιάστατος εσωτερικός χώρος), ένα παραλληλεπίπεδο ή ένα υπερπαραλληλεπίπεδο (τριών ή πολυδιάστατων διαστάσεων). Οι υπολογισμοί (δηλαδή οι αποστάσεις μεταξύ κάθε δείγματος και του μοντέλου ο χώρος που ορίζονται από τις μη σημαντικές κατευθύνσεις, που ονομάζεται εξωτερικός χώρος SIMCA) υπολογίζονται τότε και χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό μιας απόστασης από το μοντέλο κλάσης (OD), σε συνδυασμό με την απόσταση στο εσωτερικό διάστημα βαθμολογίας (ID), για να ορίσουμε την αποκαλούμενη αυξημένη απόσταση SIMCA από τα δείγματα s στην κλάση C (ds, C). Η κρίσιμη τιμή αυτής της απόστασης, που καθορίζει την αποδοχή/απόρριψη ενός νέου δείγματος από το μοντέλο, καθορίζεται από την κρίσιμη τιμή των στατιστικών Fisher σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης, δεδομένου ότι τα υπόλοιπα υποτίθεται ότι ακολουθούν μια πολυμεταβλητή κανονική κατανομή. [41]

1.8.5 Ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares)

Η Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση χρησιμοποιείται στην περίπτωση που τα δεδομένα περιγράφονται από πολλές μεταβλητές. Το μοντέλο που λαμβάνουμε όταν οι μεταβλητές μας είναι αρκετά περισσότερες από τις παρατηρήσεις μας να μην προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα, αποτυγχάνει ωστόσο να προβλέψει τα νέα δεδομένα. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται over-fitting. Η Παλινδρόμηση Μερικών

Ελαχίστων τετραγώνων (PLS), σε αντίθεση με την Παλινδρόμηση Κύριων Συνιστωσών, η οποία βρίσκει συνιστώσες του πίνακα X που ερμηνεύουν καταλλήλως τον ίδιο πίνακα, βρίσκει συνιστώσες του X που προβλέπουν τον πιο κατάλληλο τρόπο τον Y. Οι συγκεκριμένες συνιστώσες είναι βασική προϋπόθεση να ερμηνεύουν τη μέγιστη δυνατή διασπορά ανάμεσα στο X και στο Y. Η Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων έχει επομένως ως στόχο να εξαγάγει τις λανθάνουσες μεταβλητές (latent variables), οι οποίες ερμηνεύουν τη μέγιστη της διασποράς στην απόκριση και παράλληλα οδηγεί στην καλή μοντελοποίηση των αποκρίσεων. Το ακρώνυμο PLS για το λόγο αυτό καλείται επίσης projection to latent structures. [42],[43],[44]

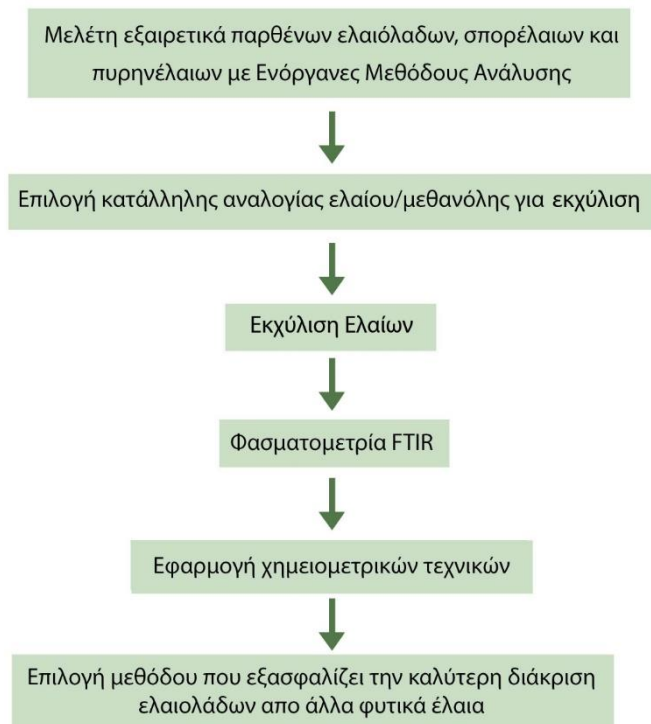
Στην ανάλυση PLS ιδιαίτερη σημασία έχουν τα στατιστικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν το μοντέλο, R^2 και Q^2 . Ο συντελεστής Q^2 καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την βέλτιστη πολυπλοκότητα του μοντέλου. Ο συμβατικός συντελεστής R^2 από την άλλη αυξάνεται με την αύξηση των διαστάσεων του μοντέλου και η τιμή του θα τείνει να πλησιάζει το 1 (δηλαδή 100%). Η ανάπτυξη ενός μοντέλου μερικών ελαχίστων τετραγώνων επιτρέπει τον προσδιορισμό μεγεθών όπως το όριο ποσοτικοποίησης και το όριο ανίχνευσης. Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται (LOQ) ή λειτουργική ευαισθησία ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης δίνεται από τον εξής τύπο: $LOQ=10*SD$, όπου SD η τυπική απόκλιση. Το όριο ανίχνευσης (LOD) ορίζεται ως η ελάχιστη ποσότητα μίας ουσίας που μπορεί να μετρηθεί. [45]

2 Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας

Στις προηγούμενες παραγράφους αναπτύχθηκε διεξοδικά το ζήτημα της νοθείας του ελαιόλαδου με άλλα έλαια, καθώς και ποικίλες μέθοδοι που έχουν προταθεί για την ανίχνευση της νοθείας. Ακόμα τονίστηκαν οι λόγοι που καθιστούν τόσο σημαντική την ικανότητα προσδιορισμού του νοθευμένου ελαιόλαδου και οι συνέπειες από τον ανεπαρκή προσδιορισμό της νοθείας. Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η ανάπτυξη μίας πρωτοποριακής, φιλικής προς το περιβάλλον και βιώσιμης αναλυτικής διαδικασίας με την οποία θα καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός της νοθείας. Η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος προσδοκάται να χαρακτηρίζεται από προτυπία, απλότητα, επαναληψιμότητα και ακρίβεια στα αποτελέσματα. Στοιχείο ακόμα αποτελεί η δυνατότητα να μπορεί μελλοντικά η μέθοδος αυτή να εφαρμοστεί στο πεδίο, χωρίς να απαιτείται μεταφορά των δειγμάτων ελαίου στο εργαστήριο για ανάλυση.

Αρχικά διεξήχθησαν αρκετά προκαταρκτικά πειράματα, τα οποία θα αναφερθούν σε επόμενες παραγράφους. Η μέθοδος που τελικά επιλέχθηκε συνοπτικά αποτελούνταν από τα εξής στάδια. Αρχικά παρασκευάστηκαν μεθανολικά εκχυλίσματα από διάφορα έλαια, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται παρθένα ελαιόλαδα, ηλιέλαια, σογιέλαια, καλαμποκέλαια και πυρηνέλαια. Τα μεθανολικά αυτά εκχυλίσματα μετρήθηκαν με φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier. Τα δείγματα δεν τοποθετήθηκαν απευθείας στην υποδοχή του φασματομέτρου, αλλά προστέθηκαν σε δισκία KBr που είχαν παρασκευαστεί εργαστηριακά. Τέλος αναλύθηκαν τα αποτελέσματα με χημειομετρικές τεχνικές, όπως η μη εποπτευόμενη μέθοδος της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) και η εποπτευόμενη τεχνική της μοντελοποίησης ταξινόμησης (Class Modeling). Οι μέθοδοι αυτοί θα εμφανίσουν τις σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των ελαιόλαδων, των σπορέλαιων και των πυρηνέλαιων, βάση των οποίων θα προσδιοριστεί η ενδεχόμενη νοθεία του ελαιόλαδου από άλλα έλαια.



Εικόνα 8: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.

2.2 Προκαταρκτικά πειράματα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σκοπός της παρούσας διπλωματικής αποτελεί η ανάπτυξη μίας πρωτότυπης αναλυτικής μεθοδολογίας που θα μπορεί να ανιχνεύσει το νοθευμένο ελαιόλαδο. Η πρώτη προσέγγιση στηρίχθηκε στην ανάλυση με κυκλική βολταμμετρία, των πτητικών, τόσο του ελαιόλαδου, όσο και διάφορων άλλων ελαίων. Η συγκεκριμένη ιδέα στηρίχθηκε στο γεγονός ότι τα πτητικά συστατικά κάθε ελαίου περιέχουν ενώσεις που οξειδώνονται σε διαφορετικά δυναμικά. Για το λόγο αυτό σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 3 mL αιθανόλης και 3 mL ελαίου. Στη συνέχεια έγινε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex,

προκειμένου να αναδευτούν οι δύο φάσεις και να περάσουν στην φάση που είναι πλούσια σε αιθανόλη ενώσεις που περιέχονται στο έλαιο. Στη συνέχεια το μείγμα προστέθηκε σε ένα γυάλινο και κλεισμένο με παραφίλμ φιαλίδιο, στο οποίο πραγματοποιήθηκε μαγνητική ανάδευση υπό θέρμανση (60°C) για 15 min. Στο φιαλίδιο τοποθετήθηκε κάθετα ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (glassy carbon), στην επιφάνεια του οποίου περνούσαν τα πτητικά συστατικά του ελαιόλαδου. Έπειτα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου προστέθηκαν 50μL αιθανολικού διαλύματος LiClO_4 0,1M και πραγματοποιήθηκε βολταταμετρική ανάλυση. Με δεδομένο πως τα έλαια και ιδιαίτερα το ελαιόλαδο περιέχουν σημαντική ποσότητα αντιοξειδωτικών τα οποία μπορούν να υποστούν ηλεκτροχημική οξείδωση σε θετικά δυναμικά, επιλέχθηκε μία σάρωση από -0,2V έως τα 1,2 V. Το «ηλεκτροχημικό αποτύπωμα» του ελαιόλαδου και των υπόλοιπων ελαίων ωστόσο δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφοροποιήσεις που να επιτρέπουν τον προσδιορισμό της νοθείας. Για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη αναλυτική διαδικασία απορρίφθηκε.

Επόμενη μέθοδος που προτάθηκε ήταν η ανάλυση με φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, μεθανολικών εκχυλισμάτων ελαίων. Η μέθοδος αυτή ήταν αυτή που εν τέλη επιλέχθηκε. Προκειμένου ωστόσο να καθοριστεί η βέλτιστη αναλογία ελαίου και μεθανόλης, διεξήχθησαν διάφορα προκαταρκτικά πειράματα που θα παρουσιαστούν αναλυτικά στη συνέχεια.

2.3 Αντιδραστήρια, υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

2.3.1 Έλαια που αναλύθηκαν

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός ελαίων τα οποία είναι διαθέσιμα στην ελληνική αγορά και πωλούνται τόσο ως τυποποιημένα, όσο και ως μη τυποποιημένα. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 47 έλαια, εκ των οποίων 25 παρθένα ελαιόλαδα, 5 ηλιέλαια, 4 αραβοσιτέλαια, 6 σογιέλαια και 7 πυρηνέλαια. Τα έλαια αυτά είναι τόσο νέας παραγωγής (2021-2023), όσο και παλαιότερης παραγωγής (2017-2021). Τα έλαια που είναι παλαιότερης παραγωγής ήταν διατηρημένα σε συνθήκες ψύξης (4°C), ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα οξείδωσης και υποβάθμισής τους. Η παραγωγή των ελαίων είναι από όλη την Ελληνική επικράτεια. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται ομαδοποιημένα τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν. Τα ονόματα των ελαίων είναι αυτά που αναφέρονται στις ετικέτες τους.

Πίνακας 3: Παρθένα ελαιόλαδα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

α/α	Ονομασία ελαίου
1	Ελαιόλαδο Minerva Kalamata
2	Ελαιόλαδο Gaea
3	Ελαιόλαδο Σκούρτη
4	Ελαιόλαδο Λατζιμάς
5	Ελαιόλαδο Marata
6	Ελαιόλαδο Καλαμών (χύμα)
7	Ελαιόλαδο Χονδροελιά (χύμα)
8	Ελαιόλαδο Καλαμών Άμφισσας
9	Ελαιόλαδο Δωρικό ΕΑΣ Λακωνία
10	Ελαιόλαδο Βόρειος Μυλοπόταμος
11	Ελαιόλαδο Δολιανίτικο
12	Ελαιόλαδο Altis
13	Ελαιόλαδο Terra Creta
14	Ελαιόλαδο Ευγενές
15	Ελαιόλαδο Altis Klassiko
16	Ελαιόλαδο Minerva Klassiko
17	Ελαιόλαδο Economy
18	Ελαιόλαδο Achaia
19	Ελαιόλαδο Minerva Χωριό
20	Ελαιόλαδο Xenia
21	Ελαιόλαδο Μεσολογγίου (χύμα)
22	Ελαιόλαδο Καλαμάτας 1 (χύμα)
23	Ελαιόλαδο Βιολογικό Gaea
24	Ελαιόλαδο Καλαμάτας 2 (χύμα)
25	Ελαιόλαδο Terra Creta Estate

Πίνακας 4: Ηλιέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

α/α	Ονομασία ελαίου
1	Ηλιέλαιο Ομοσπονδία
2	Ηλιέλαιο OK
3	Ηλιέλαιο SOL
4	Ηλιέλαιο Sanola (KORE)
5	Ηλιέλαιο Promn

Πίνακας 5: Αραβοσιτέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

α/α	Ονομασία ελαίου
1	Αραβοσιτέλαιο AB
2	Αραβοσιτέλαιο Corola (KORE)
3	Αραβοσιτέλαιο Γαλαξίας
4	Αραβοσιτέλαιο Minerva

Πίνακας 6: Σογιέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

α/α	Ονομασία ελαίου
1	Σογιέλαιο Elomas
2	Σογιέλαιο AB
3	Σογιέλαιο 365
4	Σογιέλαιο Το Λαμπερό
5	Σογιέλαιο AB (για dressing)
6	Σογιέλαιο Marata

Πίνακας 7: Πυρηνέλαια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

α/α	Ονομασία ελαίου
1	Πυρηνέλαιο Γαλαξίας
2	Πυρηνέλαιο Minerva Niki
3	Πυρηνέλαιο 365
4	Πυρηνέλαιο OK
5	Πυρηνέλαιο Farmer
6	Πυρηνέλαιο AB
7	Πυρηνέλαιο Μικρές Φάρμες

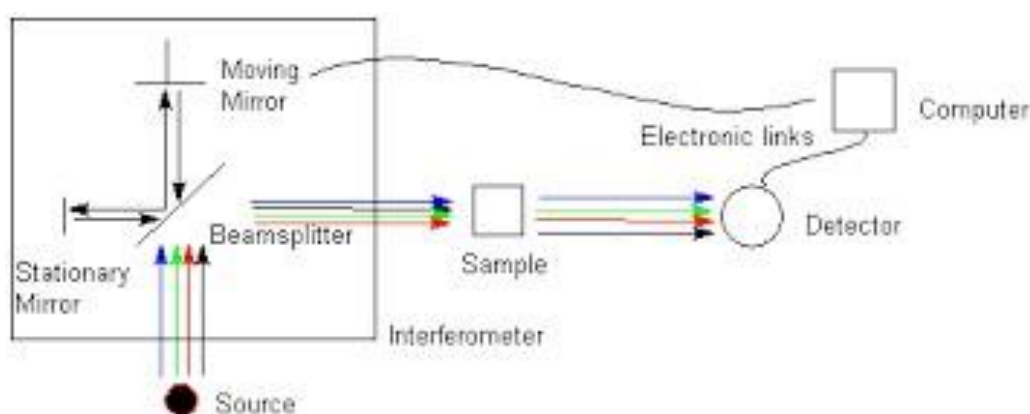
2.3.2 Επιλογή του μέσου εκχύλισης

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε εκχύλιση υγρού-υγρού του ελαίου με μεθανόλη. Η μεθανόλη παρουσιάζει πολλές ιδιότητες που την καθιστούν ένα ιδανικό διαλύτη σε εκχυλήσεις υγρού-υγρού. Η μεθανόλη (CH_3OH ή MeOH) είναι η πιο απλή αλκοόλη (άκυκλη, κορεσμένη, μονοσθενής) και είναι ένα άχρωμο, ελαφρύ, εύφλεκτο και τοξικό υγρό με οσμή χαρακτηριστική. Είναι ένας πολικός οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε εργαστηριακό επίπεδο. Οι λόγοι που την καθιστούν τόσο δημοφιλή είναι τόσο οι ιδιότητές της, όσο και η χαμηλή της τιμή. Το μέγεθός της είναι μεγαλύτερο από το νερό (διάμετρος: 0,408, επιφάνεια Van der Waals: 35,8 και όγκος Van der Waals: 21,7), για το λόγο αυτό λιγότερα μόρια μπορούν να περιστοιχίζουν ένα μόριο διαλυμένης ουσίας. Ακόμα έχει τιμή διηλεκτρικής σταθεράς ϵ_r υψηλή (32,66), συγκρίσιμη με εκείνη άλλων πολικών πρωτικών διαλυτών, σημαντικά χαμηλότερη όμως του νερού. Η διπολική ροπή της μεθανόλης έχει τιμή 1,7 D και είναι και πάλι μικρότερη του νερού. Η μεθανόλη μπορεί να αναμιχθεί πλήρως στο νερό, παρόλα αυτά το σύστημα έχει αρνητική τιμή ενθαλπίας (εξώθερμη αντίδραση). Ο δείκτης πολικότητας $E_T^{(30)}$ έχει τιμή 50,4 που είναι και πάλι μικρότερη από αυτή του νερού, ομοίως και η τιμή της παραμέτρου πολικότητας π^* (0,60) και της ικανότητας προσφοράς δεσμού υδρογόνου α (0,98), ενώ η τιμή που τη χαρακτηρίζει ως δέκτη δεσμών υδρογόνου β είναι 0,66. [46]

Η μεθανόλη εμφανίζει μεγάλη δραστικότητα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και κατά την επαφή της με πολικές φαινολικές ενώσεις, αντιδρά με εκείνες που διαθέτουν αλδεϋδική ομάδα, σύμφωνα με μελέτες με φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί καθαρή μεθανόλη το παράγωγο της αντίδρασης σχηματίζεται σε ποσοστό 96%. Γίνεται επομένως αντιληπτό πως στο πολικό κλάσμα της εκχύλισης του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου υπάρχουν ενώσεις χαρακτηριστικές που επιτρέπουν τον προσδιορισμό του. [47]

2.3.3 Φασματόμετρο Υπερύθρου (IR)

Τρία είναι τα είδη οργάνων υπερύθρου που διατίθενται στην αγορά, όργανα με μονοχρωμάτορα φράγματα διασποράς της ακτινοβολίας, όργανα μετασχηματισμού Fourier και μη διασπειρόμενα φωτόμετρα που χρησιμοποιούν φίλτρα ή ένα αέριο που απορροφεί και εφαρμόζονται για την ανάλυση αερίων της ατμόσφαιρας σε ειδικά μήκη κύματος. Τα περισσότερα όργανα για μετρήσεις υπερύθρου, έως τη δεκαετία του '80, βασίζονταν σε φράγματα διασποράς. Σήμερα τα όργανα αυτά έχουν αντικατασταθεί από φασματόμετρα μετασχηματισμού Fourier (FTIR). Τα φασματόμετρα αυτά υπερτερούν λόγω της ταχύτητας, της αξιοπιστίας, της εύκολης χρήσης τους και του ευνοϊκού λόγου σήματος προς θόρυβο. Η κωδικοποίηση στο φασματόμετρο FT επιτυγχάνεται με διαμοιρασμό της ακτινοβολίας της πηγής σε δύο δέσμες των οποίων το μήκος της οπτικής διαδρομής μπορεί να μεταβάλλεται περιοδικά για να παραχθεί το συμβολόγραμμα. Έπειτα πραγματοποιείται επεξεργασία των δεδομένων με μετασχηματισμό Fourier. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η οργανολογία ενός φασματομέτρου μετασχηματισμού Fourier. [23]



Εικόνα 9: Οργανολογία ενός φασματομέτρου FTIR. [49]

Η πραγματοποίηση των μετρήσεων στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έγινε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ από αρμόδιο υπεύθυνο του οργάνου. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν φασματόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), εξοπλισμένο με κυψελίδα βρωμιούχου καλίου (KBr). Το εν λόγω όργανο ήταν το μοντέλο Jasco 4200 της εταιρίας JASCO. Το όργανο αυτό απεικονίζεται στη παρακάτω εικόνα. [48]



Εικόνα 10: Φασματόμετρο υπερώθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).

Το φασματόμετρο FTIR Jasco 4200 έχει σχεδιαστεί για να παρέχει επίπεδα ευαισθησίας που συναντώνται μόνο σε πιο ακριβά όργανα. Η καινοτόμος τεχνολογία που ενσωματώνεται σε αυτό το όργανο έχει ως αποτέλεσμα εξαιρετικά υψηλές προδιαγραφές αναλογίας σήματος προς θόρυβο. Το συγκεκριμένο μοντέλο προσφέρει εξαιρετική ευελιξία και μπορεί εύκολα να αναβαθμιστεί ώστε να ανταποκρίνεται στις νέες απαιτήσεις. Η προαιρετική δυνατότητα επέκτασης περιλαμβάνει μικροανάλυση με μικροσκόπιο IR. Το σύστημα γρήγορης εκκίνησης Jasco επιτρέπει στους χρήστες όλων των επιπέδων εμπειρίας να μετρούν δείγματα και να εκτελούν λειτουργίες επεξεργασίας δεδομένων γρήγορα και εύκολα με το πάτημα ενός κουμπιού. Είναι κατάλληλο για εφαρμογές έρευνας, ανάπτυξης και ποιοτικού ελέγχου όπου απαιτούνται υψηλά επίπεδα ακρίβειας. Το FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μέτρηση τόσο στερεών, όσο και αέριων δειγμάτων. [48]

2.4 Πειραματική διαδικασία

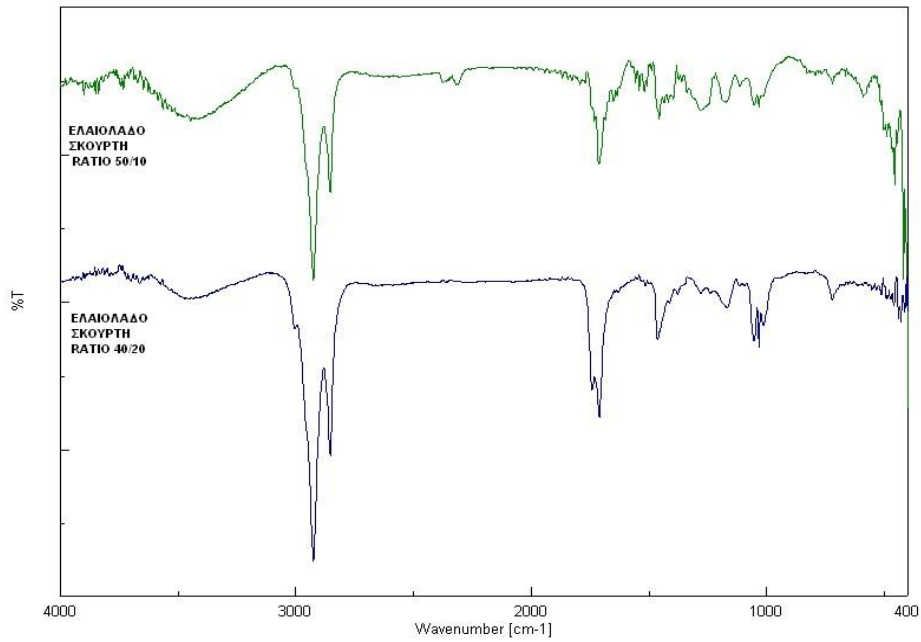
Έπειτα από την εκτέλεση των προκαταρκτικών πειραμάτων προέκυψαν τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που θα ακολουθηθεί. Μία συνοπτική παρουσίαση των σταδίων θα αναφερθεί ακολούθως. Αρχικά παρασκευάζεται το εκχύλισμα του ελαίου που πρόκειται να αναλυθεί με ειδική διάταξη που συναρμολογείται από τον αναλυτή. Έπειτα συλλέγεται επαρκής ποσότητα του εκχυλίσματος και διατηρείται σε ξηραντήρα έως ότου να αναλυθεί. Έχουν ακόμα παρασκευαστεί εργαστηριακά δισκία από KBr με τη χρήση πρέσας. Τα δισκία χρησιμοποιούνται για να γίνει η μέτρηση του δείγματος στο φασματόμετρο FTIR. Τα δισκία παρουσιάζουν ορισμένα

πλεονεκτήματα έναντι της απευθείας ανάλυσης του δείγματος, τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια. Τέλος πραγματοποιείται ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση φασματομέτρου FTIR. Τα στάδια αυτά θα παρουσιαστούν αναλυτικότερα στις επόμενες παραγράφους.

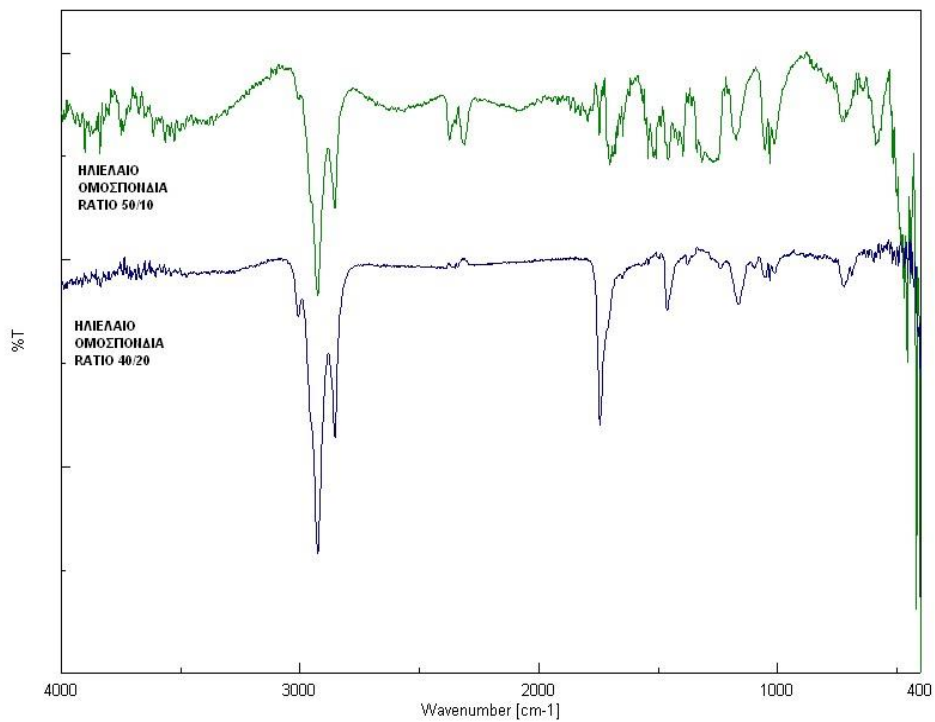
2.4.1 Εκχύλιση των ελαίων

Το πρώτο βήμα της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας διπλωματικής είναι η εκχύλιση των ελαίων που θα χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή του χημειομετρικού μοντέλου που θα μπορεί να ανιχνεύει τη νοθεία του παρθένου ελαιόλαδου με άλλα έλαια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 47 έλαια (25 παρθένα ελαιόλαδα, 5 ηλιέλαια, 4 αραβοσιτέλαια, 6 σογιέλαια και 7 πυρηνέλαια). Από τα έλαια αυτά παρασκευάστηκαν εργαστηριακά μεθανολικά εκχυλίσματα.

Αρχικά προτάθηκε να γίνει εκχύλιση υγρού-υγρού των ελαίων με διαλύτη μεθανόλη και αναλογίες όγκων 50mL/10mL (ελαίου/μεθανόλη). Η αναλογία αυτή ύστερα από λίγες μετρήσεις απορρίφθηκε, διότι παρατηρήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις κορεσμός της μεθανολικής φάσης στη φάση του ελαίου, με αποτέλεσμα η ποσότητα του εκχυλίσματος να μην είναι επαρκής για προσδιορισμό. Ακόμα το φάσμα των εκχυλισμάτων τόσο των ελαιόλαδων, όσο και των σπορέλαιων παρουσιάζει έντονο θόρυβο. Ο λόγος 40mL/20mL επιλέχθηκε ως καλύτερος, καθώς παρουσιάζεται βελτίωση της έντασης των χαρακτηριστικών κορυφών με αποτέλεσμα να είναι πιο διακριτές, σε αντίθεση με το λόγο 50mL/10mL, όπου όπως παρατηρήθηκε ήταν συγκρίσιμες με το θόρυβο. Στη συνέχεια παρουσιάζονται δύο συγκριτικά διαγράμματα για ένα παρθένο ελαιόλαδο και ένα σπορέλαιο για τις αναλογίες 50mL/10mL και 40mL/20mL.

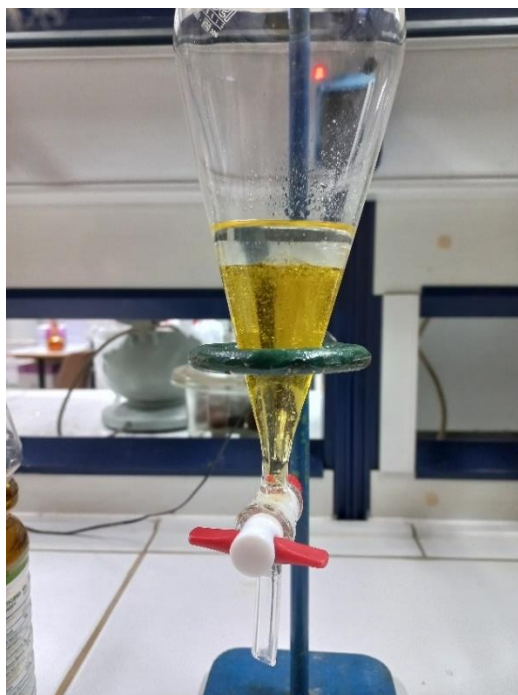


Εικόνα 11: Συγκριτικό διάγραμμα φάσματος IR παρθένου ελαιόλαδου για τις αναλογίες όγκων 40/20 και 50/10.



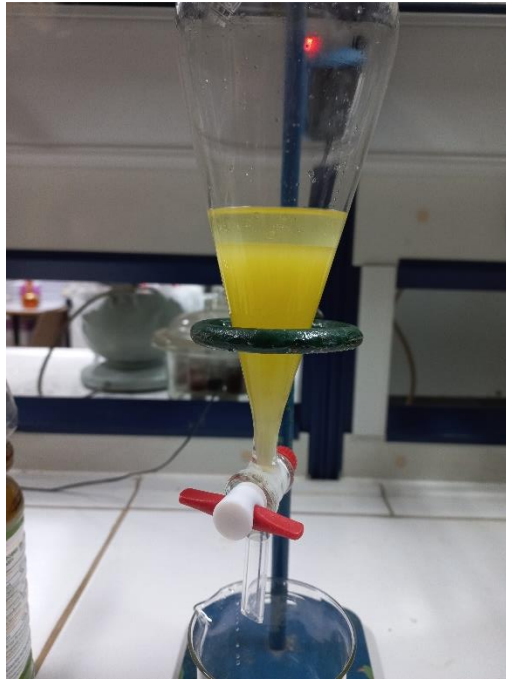
Εικόνα 12: Συγκριτικό διάγραμμα φάσματος IR ηλιέλαιου για τις αναλογίες 40/20 και 50/10.

Αφού διερευνήθηκε η αναλογία έλαβαν χώρα τα πειράματα της εκχύλισης. Η συσκευή εκχύλισης αποτελείται από ένα στατώ, μία διαχωριστική χοάνη χωρητικότητας 500mL και ένα ποτήρι ζέσεως. Αρχικά προστίθεται στη διαχωριστική χοάνη ποσότητα 40mL ελαίου και έπειτα 20mL μεθανόλης. Η μεθανόλη και το έλαιο σχηματίζουν ένα διφασικό μείγμα. Η φάση της μεθανόλης είναι υπερκείμενη της ελαιώδους φάσης. Το σύστημα ελαίου/μεθανόλης αμέσως μετά την προσθήκη τους στη διαχωριστική χοάνη απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 13: Η διάταξη της εκχύλισης πριν την ανάδευση.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται έντονη ανάδευση του μείγματος. Η ανάδευση επιτυγχάνεται με έντονη ανακίνηση της διαχωριστικής χοάνης ώστε οι δύο φάσεις να έρθουν σε επαφή. Με την ανάδευση πραγματοποιείται κορεσμός της ελαιώδους φάσης με μεθανόλη και της φάσης της μεθανόλης με ουσίες του ελαίου που είναι διαλυτές στη μεθανόλη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται θόλωμα των δύο φάσεων. Αφού ολοκληρωθεί η ανάδευση, το σύστημα ακινητοποιείται για χρονικό διάστημα 15min ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας απεικονίζεται στη συνέχεια.



Εικόνα 14: Η διάταξη της εκχύλισης μετά την ανάδευση.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για κάθε ένα από τα υπό προσδιορισμό έλαια. Το εκχύλισμα συλλέγεται σε ένα μικρό φιαλίδιο, σκεπάζεται με παραφίλμ και τοποθετείται σε ξηραντήρα. Προσέχεται ο χρόνος από τη λήψη του εκχυλίσματος έως την ανάλυσή του να μην υπερβαίνει τις 24h, ώστε να μην εξατμίζεται ποσότητα μεθανόλης. Παρακάτω απεικονίζονται δείγματα από την εκχύλιση διάφορων ελαίων.



Εικόνα 15: Φιαλίδια με εκχυλίσματα παρθένου ελαιόλαδου (ανοιχτό πράσινο χρώμα), πυρηνέλαιου (διαφανές), ηλιέλαιου (διαφανές), αραβοσιτέλαιου (διαφανές), σογιέλαιο (διαφανές).

2.4.2 Παρασκευή δισκίων KBr

Αρχικά έγινε απευθείας προσθήκη ποσότητας του δείγματος στην υποδοχή του οργάνου FTIR. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να γίνεται επιμόλυνση του κρύσταλλου του φασματόμετρου FTIR. Ακόμα απαιτούνταν πολύς χρόνος μεταξύ των μετρήσεων ώστε να εξατμιστεί η μεθανόλη από την υποδοχή του οργάνου και να καθαριστεί το όργανο, γεγονός που καθυστερούσε σημαντικά την εκτέλεση των μετρήσεων. Για το λόγο κατασκευάστηκαν εργαστηριακά δισκία από KBr με ειδική πρέσα. Στα δισκία αυτά τοποθετήθηκε ποσότητα 50μL του εκχυλίσματος με διαδικασία που θα αναλυθεί ακολούθως.

Λειτουργείται μικρή ποσότητα KBr σε ένα γουδί. Μία μικρή ποσότητα από το KBr τοποθετείται στην υποδοχή της πρέσας, την οποία προηγουμένως έχουμε συναρμολογήσει. Έπειτα στην πρέσα δημιουργείται κενό, στο οποίο αφήνεται το δισκίο για 1-2min. Στη συνέχεια αποσυναρμολογείται η πρέσα και παραλαμβάνεται το δισκίο. Προσέχεται ώστε τόσο τα δισκία αμέσως μετά την παρασκευή τους, όσο και το KBr να φυλάσσονται εντός ξηραντήρα, καθώς το KBr είναι μία έντονα υγροσκοπική ουσία και δε πρέπει να έρχεται σε επαφή με την υγρασία της ατμόσφαιρας. Συνολικά παρασκευάστηκαν 47 δισκία, όσα και τα δείγματα των ελαίων που αναλύθηκαν.



Εικόνα 16: Η διάταξη της πρέσας και τα σύνεργα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δισκίων.

2.4.3 Πραγματοποίηση των μετρήσεων

Αφού παρασκευαστούν τα εκχυλίσματα και τα δισκία KBr, πραγματοποιείται η εκτέλεση των μετρήσεων. Πρώτο βήμα αποτελεί η προσθήκη μικρής ποσότητας (50μL) εκχυλίσματος στο δισκίο KBr. Η μεθανόλη του εκχυλίσματος είναι μία ουσία η οποία επηρεάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Ακόμα είναι μία αρκετά πτητική ουσία. Για το λόγο αυτό αφήνεται το δισκίο για χρονικό διάστημα 5min, ώστε να εξατμιστεί η μεθανόλη. Έπειτα τοποθετείται το δισκίο στην ειδική υποδοχή του οργάνου και πραγματοποιείται η μέτρηση. Παρακάτω απεικονίζεται ένα δισκίο αφού προστεθεί ποσότητα εκχυλίσματος και εξατμιστεί η μεθανόλη.



Εικόνα 17: Δισκίο KBr αφού προστεθεί εκχύλισμα και εξατμιστεί η μεθανόλη. [50]

Στο φασματόμετρο ρυθμίστηκαν οι παράμετροι που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και πραγματοποιήθηκε η εκτέλεση των μετρήσεων.

Πίνακας 8: Οι παράμετροι των μετρήσεων με το φασματόμετρο FTIR.

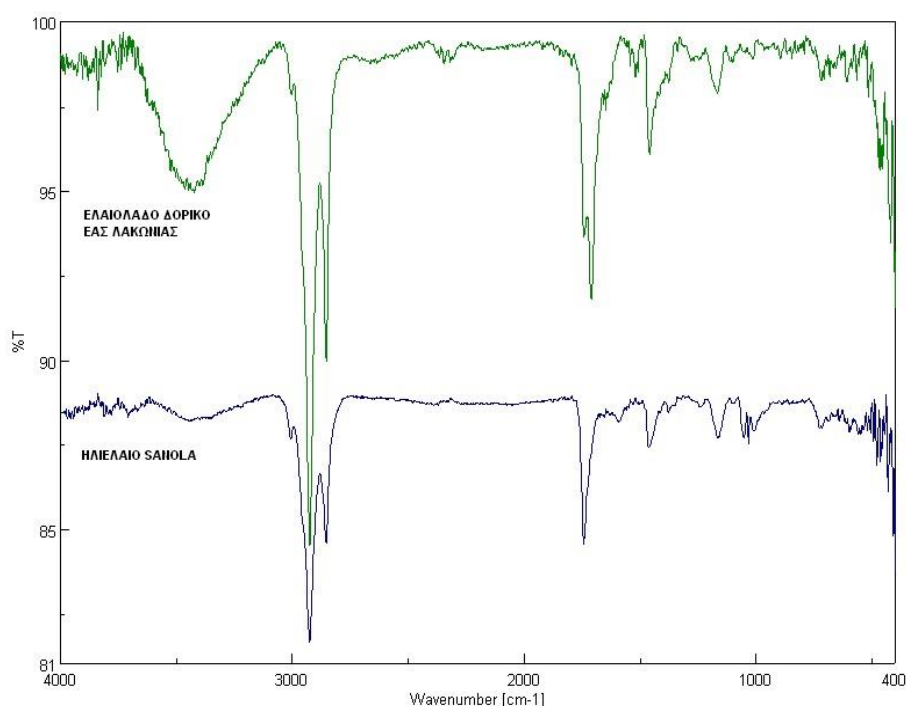
Παράμετροι	Πληροφορίες
Scan Range	4000-400 cm^{-1}
Accumulation	32
Resolution	4,0 cm^{-1}
VerticalAxis (Smp)	%T
VerticalAxis(Bkg)	Single
Gain	Auto
Aperture	7,1 mm
ScanSpeed	2 mm/sec
Filter	Auto
Apodization	Triangle
ZeroFilling	OFF
Detector	Standard

2.4.4 Υπολογιστικά εργαλεία

Η χημειομετρική επεξεργασία των δεδομένων με τις μεθόδους PCA και Class Modeling μετά την εξαγωγή των φασμάτων υπό την μορφή σημείων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SIMCA-P 10.5 (Umetrics, USA).

2.5 Αποτελέσματα

Ακολουθήθηκαν τα βήματα που περιεγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους και μετρήθηκαν με το φασματόμετρο FTIR και τα 47 εκχυλίσματα ελαίων που συλλέχθηκαν. Το φάσμα κάθε ελαίου που άνηκε σε μία συγκεκριμένη ομάδα ελαίων παρουσίαζε ορισμένες διαφοροποιήσεις από τις υπόλοιπες ομάδες ελαίων. Πιο συγκεκριμένα το φασματομετρικό αποτύπωμα των παρθένων ελαιόλαδων διέφερε από αυτό των υπόλοιπων ελαίων. Παρατίθεται στη συνέχεια ένα συγκριτικό φασματομετρικό διάγραμμα για κάθε τύπο ελαίου με το ελαιόλαδο. Από αυτά τα διαγράμματα θα γίνει προσπάθεια να εντοπιστούν και να ερμηνευτούν οι κυριότερες διαφορές των σπορέλαιων και του πυρηνέλαιου με το ελαιόλαδο.



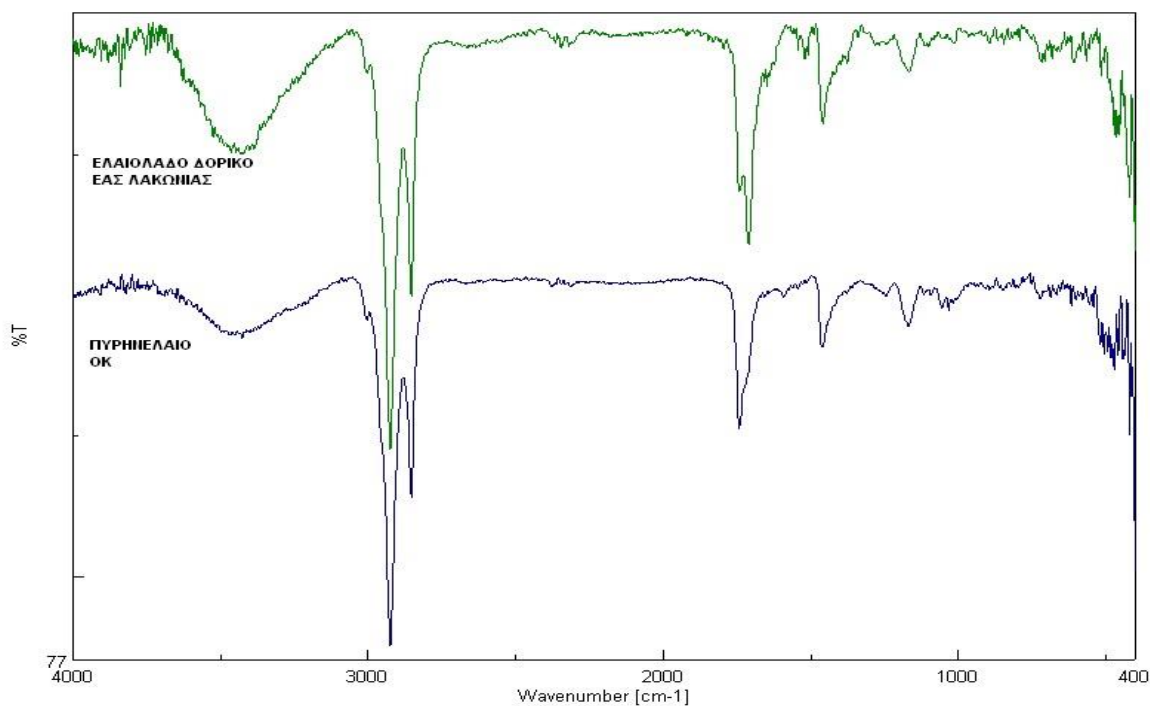
Εικόνα 18: Συγκριτικό φασματομετρικό διάγραμμα IR μεταξύ ενός ελαιόλαδου και ενός σπορέλαιου.

Από την παρατήρηση της εικόνας προκύπτουν οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ του φάσματος IR των παρθένων ελαιόλαδων και των σπορέλαιων. Τα ελαιόλαδα εμφανίζουν μία έντονη και πεπλατυσμένη κορυφή στα $3421,1 \text{ cm}^{-1}$, την οποία δεν εμφανίζουν τα σπορέλαια. Ακόμα στα $1743,3 \text{ cm}^{-1}$ και $1710,6 \text{ cm}^{-1}$ τα ελαιόλαδα εμφανίζουν μία διπλή κορυφή, ενώ τα σπορέλαια μία μονή στα $1745,3 \text{ cm}^{-1}$. Τα ελαιόλαδα δίνουν μια κορυφή στα $1515,8 \text{ cm}^{-1}$ που δε δίνουν τα σπορέλαια. Επιπλέον τα ελαιόλαδα παρουσιάζουν μία κορυφή στα $1168,7 \text{ cm}^{-1}$, ενώ τα σπορέλαια στα

1160,9 cm^{-1} . Στα 1095,4 cm^{-1} μόνο τα σπορέλαια εμφανίζουν κορυφή. Τέλος τα ελαιόλαδα στα 717,4 cm^{-1} και τα σπορέλαια στα 727,0 cm^{-1} .

Τόσο στο παρθένο ελαιόλαδο, όσο και στα περισσότερα σπορέλαια τα κύρια λιπαρά οξέα που περιέχονται είναι ελαϊκό, το λινολεϊκό, το λινολενικό, το στεαρικό και το παλμιτικό οξύ. Ανάλογα τον τύπο του κάθε ελαίου, τα λιπαρά αυτά οξέα περιέχονται σε διαφορετικές αναλογίες. Για παράδειγμα το ελαιόλαδο αποτελείται σε ποσοστό περίπου 73% από ελαϊκό οξύ, 9% από λινολεϊκό και 0,3% από λινολενικό οξύ. Αντίθετα τα σπορέλαια ανάλογα με την προέλευσή τους αποτελούνται από 48-74% λινολεϊκού οξέος, 10-14% ολεϊκού οξέος, 1-7% στεαρικού οξέος και 4-9% παλμιτικού οξέος. Από τα σπορέλαια η μεγαλύτερη ποσότητα ελαϊκού οξέος, βασικού συστατικού του ελαιόλαδου, απαντάται στο ηλιέλαιο.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι φασματομετρικές κορυφές αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες δονήσεις και περιστροφές χημικών δεσμών στο δείγμα. Μπορούμε επομένως να λάβουμε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργικές ομάδες που περιέχονται στο δείγμα. Από την παραπάνω εικόνα για το διάγραμμα των ελαιόλαδων εξάγονται οι εξείς πληροφορίες. Η κορυφή στα 3421,1 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό O-H, η κορυφές στα 1743,3 cm^{-1} και 1710,6 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δεσμό C=O, η κορυφή στα 1515,8 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό N-H, η κορυφή στα 1168,7 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό C-O και η κορυφή στα 717,4 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό =C-H. Οι περισσότεροι από αυτούς του δεσμούς περιέχονται στο ελαϊκό οξύ αλλά και σε άλλα συστατικά του ελαιόλαδου. Όσο αναφορά τα σπορέλαια, η κορυφή στα 1745,3 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό C=O, η κορυφή στα 1160,9 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό C-O, η κορυφή στα 1095,4 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό C-O και τέλος η κορυφή στα 727,0 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμό =C-H. Τα λιπαρά οξέα των ελαιόλαδων και των σπορέλαιων εμφανίζουν δεσμούς ίδιου τύπου, αλλά το πλήθος τους ποικίλει ανάλογα με το είδος του ελαίου. Επομένως είναι αναμενόμενο να προκύπτουν κορυφές σε κοντινές τιμές κυματαριθμών με διαφορετική ένταση λόγω της διαφοράς στην αναλογία τους.



Εικόνα 19: Συγκριτικό φασματομετρικό διάγραμμα IR μεταξύ ενός παρθένου ελαιόλαδου και ενός πυρηνέλαιου.

Το φάσμα IR του πυρηνέλαιου, σε αντίθεση με τα σπορέλαια, δε παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με το φάσμα IR του παρθένου ελαιόλαδου. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι είναι δύο συγγενικά έλαια που προέρχονται από διαφορετικά μέρη του ίδιου καρπού. Συμπεραίνεται λοιπόν πως ενδεχομένως δε θα είναι εύκολη η ανίχνευση της νοθείας με πυρηνέλαιο.

Και στα δύο έλαια, το ελαϊκό οξύ είναι αυτό που απαντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο, σε αντίθεση με τα σπορέλαια, το φάσμα IR των ελαιόλαδων και των πυρηνέλαιων δε παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις. Η μοναδική σημαντική διαφοροποίηση είναι η διπλή κορυφή που δίνει το ελαιόλαδο στα $1743,3 \text{ cm}^{-1}$ και $1710,6 \text{ cm}^{-1}$ που αντιστοιχεί σε δεσμό C=O και η μονή κορυφή των πυρηνέλαιων στα $1741,4 \text{ cm}^{-1}$ που αντιστοιχεί και πάλι σε δεσμό C=O.

2.6 Επεξεργασία των μετρήσεων

2.6.1 Χημειομετρική επεξεργασία

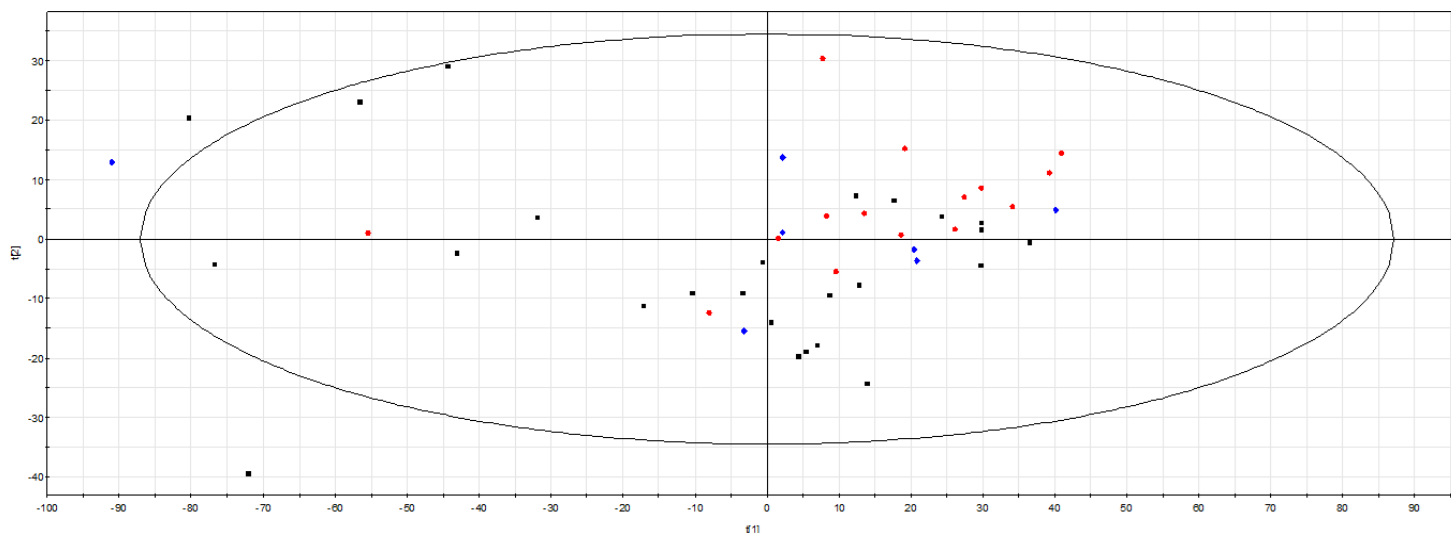
Τα σημεία των φασματομετρικών διαγραμμάτων που εξήχθησαν από την παραπάνω ανάλυση υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση με σκοπό να γίνει κατάταξή τους ανάλογα με την προέλευσή τους. Αρχικά έγινε ανάλυση του συνόλου των σημείων που λήφθηκαν από τη φασματομετρία FTIR (4000-400 cm^{-1}). Ο πίνακας των δεδομένων αποτελούνταν από 47 γραμμές, όσα και τα έλαια που εξετάστηκαν, και 1869 στήλες. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια εύρεσης της περιοχής του φάσματος IR με τις στατιστικά πιο σημαντικές διαφορές μεταξύ των διάφορων τύπων ελαίου.

2.6.1.1 PCA για 4000-400 cm^{-1}

Κατά την ανάλυση PCA αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από ολόκληρο το φάσμα IR (4000-400 cm^{-1}) και εξήχθησαν 23 κύριες συνιστώσες με συσσωρευτικό συντελεστή προσδιορισμού (όλων των κύριων συνιστωσών) $R^2_{(\alpha\theta\rho\iota\sigma\tau\iota\kappa\acute{o})}=0,981$ και διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης $Q^2_{(\alpha\theta\rho\iota\sigma\tau\iota\kappa\acute{o})}=0,852$. Στο διάγραμμα που προέκυψε φαίνεται πως δεν ήταν δυνατή η σαφής ταξινόμηση των ελαίων με βάση την προέλευσή τους. Το εν λόγω διάγραμμα παρουσιάζεται στη συνέχεια.

4000-400 cm⁻¹.M2 (PCA-X), Untitled
t[Comp. 1]/t[Comp. 2]
Colored according to classes in M2

■ Class
● Class
◆ Class



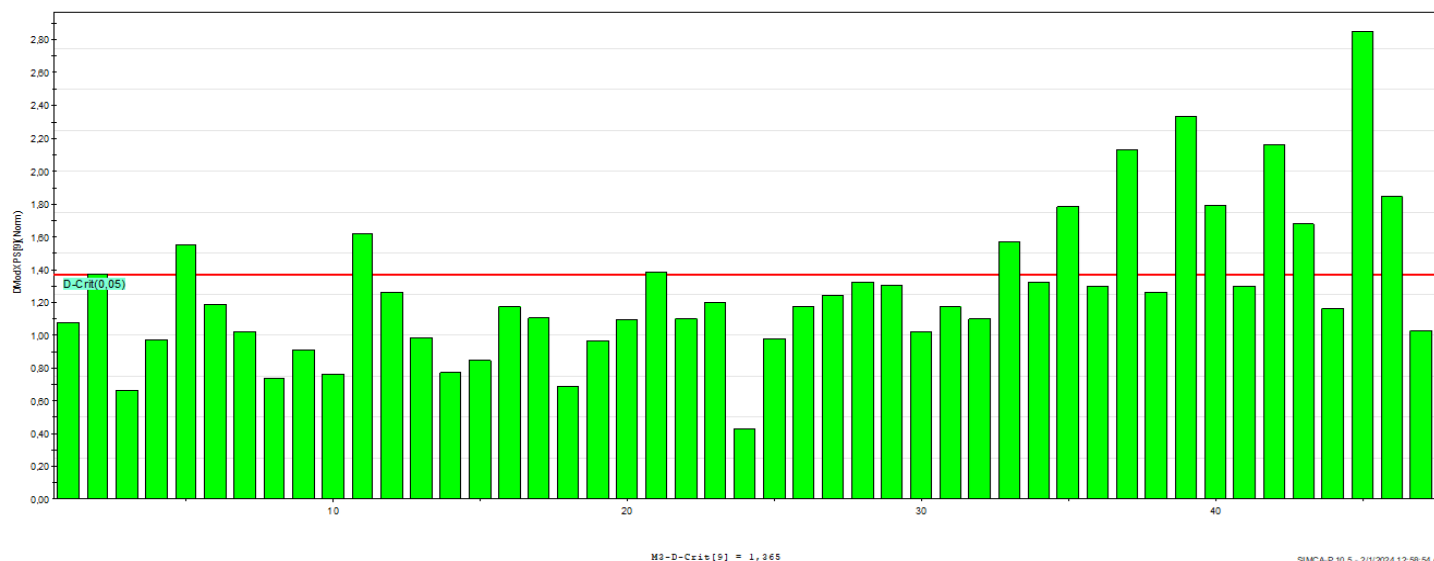
Ellipse: Hotelling T2 (0,95)

SIMCA-P 10.5 - 2/1/2024 12:54:19.61

Εικόνα 20: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την ανάλυση παρθένων ελαίων, σπορέλαιων και πυρηνέλαιων για την περιοχή (4000-400 cm⁻¹). Κλάση 1 (μαύρα σημεία): Παρθένα ελαιόλαδα, Κλάση 2 (κόκκινα σημεία): σπορέλαια, Κλάση 3 (μπλε σημεία): Πυρηνέλαια

2.6.1.2 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class modeling) για 4000-400 cm⁻¹

Η μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class modeling) είναι μία επιβλεπόμενη μέθοδος στην οποία πάλι γίνεται επεξεργασία ολόκληρου του φάσματος IR. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται εστίαση σε μία ομάδα/κλάση η οποία αυτή τη φορά είναι τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα. Ορίζεται η ομάδα των εξαιρετικά παρθένων ελαιόλαδων (ΟΜΑΔΑ 1) και κρατούνται εκτός μόνο 6 δείγματα ελαιόλαδων για να διαπιστωθεί εάν το μοντέλο θα τα προβλέψει σωστά. Τα 6 δείγματα θα χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση του μοντέλου (test set). Τα έλαια αυτά είναι το ελαιόλαδο Marata, το ελαιόλαδο Δολιανίτικο, το ελαιόλαδο Terra Creta, ελαιόλαδο Καλαμάτας 1 (χύμα), το ελαιόλαδο Βιολογικό Gaia και το ελαιόλαδο Terra Creta Estate. Όλα τα έλαια από τις υπόλοιπες κατηγορίες δίνονται ως άγνωστα δείγματα. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για ολόκληρη την περιοχή του φάσματος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.



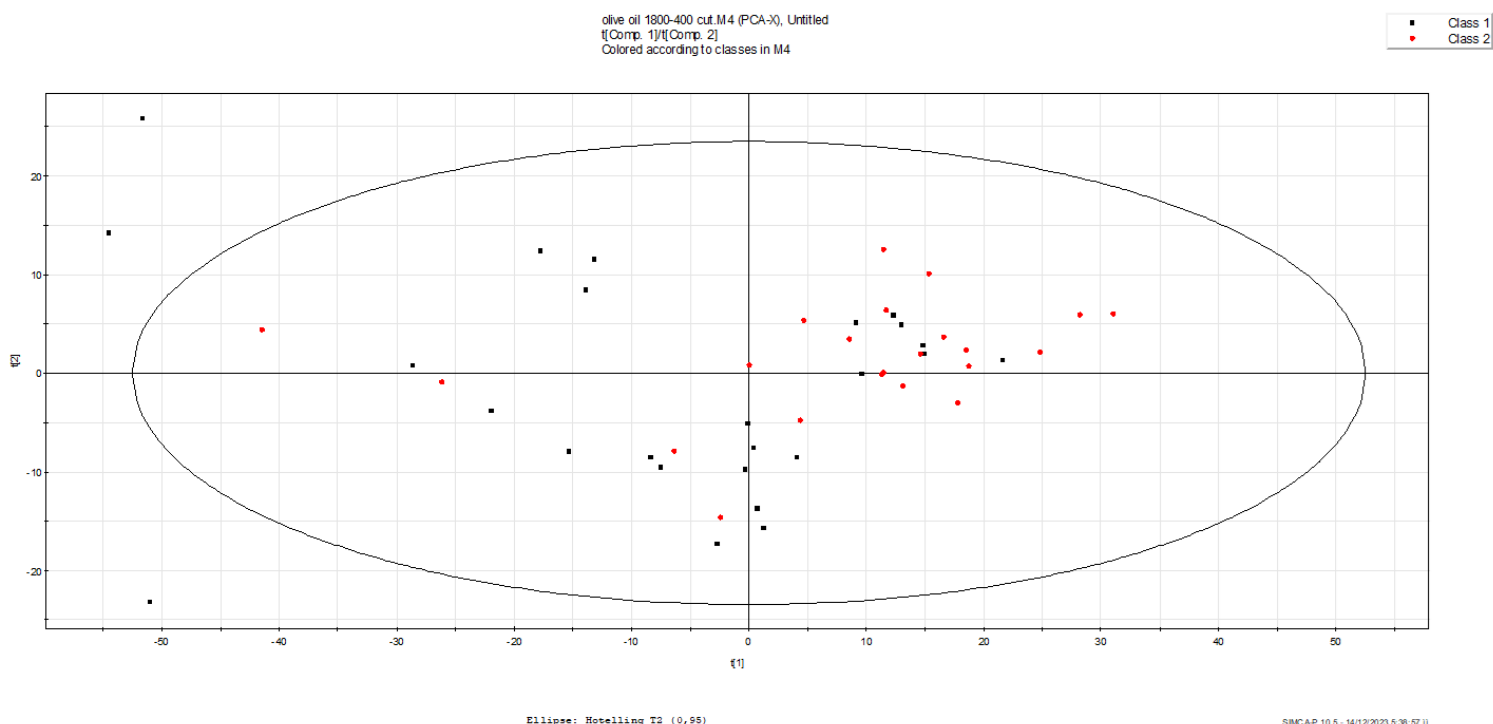
Εικόνα 21: Μοντελοποίηση μίας κλάσης για την περιοχή 4000-400 cm⁻¹.

Έχοντας 9 κύριες συνιστώσες προκύπτουν $R^2_{(\alphaθροιστικό)}=0,962$ και $Q^2_{(\alphaθροιστικό)}=0,777$. Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, από τα παρθένα ελαιόλαδα κατηγοριοποιήθηκαν από το μοντέλο ως γνήσια (δηλαδή βρίσκονται κάτω από την κόκκινη γραμμή της κρίσιμης απόστασης) 18/19 στα δεδομένα εκμάθησης (training set) και 4/6 στα δεδομένα ελέγχου (test set). Επιπλέον από τα έλαια που ανήκουν σε άλλες κατηγορίες βρίσκονται πάνω από την κόκκινη γραμμή 9/22 δείγματα. Τα έλαια αυτά επομένως απορρίπτονται από το μοντέλο. Τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι αρκετά ικανοποιητικά ώστε να γίνει δεκτό το μοντέλο. Για το λόγο αυτό επιχειρείται η βελτίωση του μοντέλου.

2.6.1.3 PCA για 1800-400 cm⁻¹

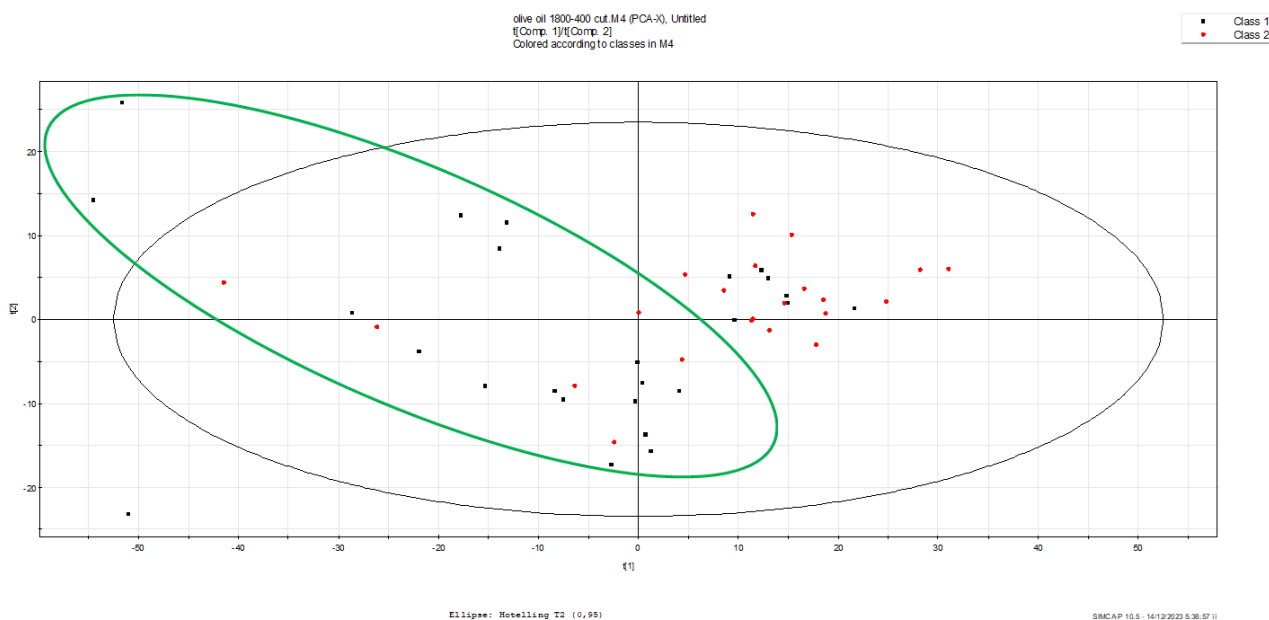
Από τους πίνακες με τα συγκριτικά φασματομετρικά διαγράμματα μεταξύ παρθένων ελαιόλαδων, σπορέλαιων και πυρηνέλαιων παρατηρείται ότι η δεξιά περιοχή του φάσματος IR είναι αυτή που διαφοροποιείται εντονότερα μεταξύ των διαφορετικών ελαίων. Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στο διάστημα κυματαριθμών 1800-400 cm⁻¹. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε αυτό το διάστημα για χημειομετρική επεξεργασία. Το αποτέλεσμα αυτής της επεξεργασίας προσδοκείται να έχει καλύτερα αποτελέσματα από την προηγούμενη επεξεργασία.

Κατά την ανάλυση PCA χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από το διάστημα του φάσματος IR (1800-400 cm⁻¹) και εξήχθησαν 23 κύριες συνιστώσες με συσσωρευτικό συντελεστή προσδιορισμού (όλων των κύριων συνιστωσών) $R^2_{\text{(αθροιστικό)}}=0,979$ και διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης $Q^2_{\text{(αθροιστικό)}}=0,824$. Το διάγραμμα της PCA επεξεργασίας παρουσιάζεται στη συνέχεια.



Εικόνα 22: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την ανάλυση παρθένων ελαίων, σπορέλαιων και πυρηνέλαιων για την περιοχή (1800-400 cm⁻¹). Κλάση 1 (μαύρα σημεία): Παρθένα ελαιόλαδα, Κλάση 2 (κόκκινα σημεία): Μη ελαιόλαδα.

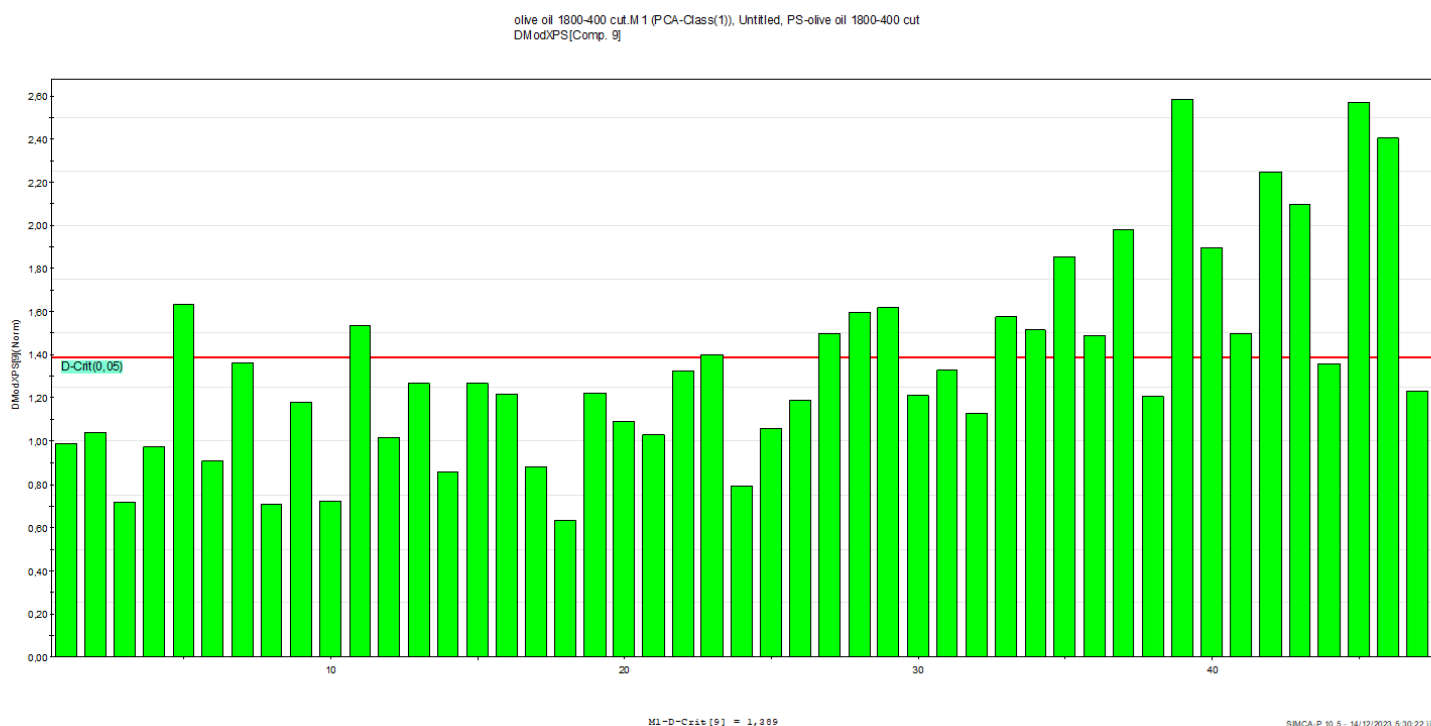
Στο διάγραμμα της παραπάνω εικόνας παρατηρείται μία τάση των ελαιόλαδων να συγκεντρώνονται σε μία συγκεκριμένη περιοχή του χώρου. Αυτή η τάση των ελαιόλαδων καθιστά εφικτή την ανίχνευση της νοθείας του ελαιόλαδου με άλλα μη συγγενικά έλαια. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς όποιο έλαιο θα αναλύεται στη συνέχεια και ανήκει σε αυτή την περιοχή του χώρου, εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά με τα παρθένα ελαιόλαδα και κατ' επέκταση δεν είναι νοθευμένο. Η περιοχή αυτή του χώρου σημαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 23: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την ανάλυση παρθένων ελαιόλαδων και μη ελαιόλαδων για την περιοχή ($1800-400\text{ cm}^{-1}$). Επισημαίνεται η περιοχή των παρθένων ελαιόλαδων. Κλάση 1 (μαύρα σημεία): Παρθένα ελαιόλαδα, Κλάση 2 (κόκκινα σημεία): Μη ελαιόλαδα.

2.6.1.4 Μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class modeling) για 1800-400 cm⁻¹

Για το διάστημα 1800-400 cm⁻¹ εκτός από ανάλυση PCA πραγματοποιήθηκε και μοντελοποίηση μίας κλάσης (Class modelling) όπως και προηγουμένως. Πιο συγκεκριμένα ορίζεται η ομάδα των παρθένων ελαιόλαδων (ΟΜΑΔΑ 1) και κρατούνται εκτός μόνο 6 δείγματα ελαιόλαδων. Τα 6 δείγματα θα χρησιμοποιηθούν για την επικύρωση του μοντέλου (test set) και ήταν το ελαιόλαδο Marata, το ελαιόλαδο Δολιανίτικο, το ελαιόλαδο Terra Creta, ελαιόλαδο Καλαμάτας 1 (χύμα), το ελαιόλαδο Βιολογικό Gaea και το ελαιόλαδο Terra Creta Estate.



Εικόνα 24: Μοντελοποίηση μίας κλάσης για την περιοχή 1800-400 cm⁻¹.

Έχοντας 9 κύριες συνιστώσες προκύπτουν $R^2_{(\alphaθροιστικό)}=0,886$ και $Q^2_{(\alphaθροιστικό)}=0,740$. Σε αυτή την περίπτωση το μοντέλο έδωσε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς από τα παρθένα ελαιόλαδα κατηγοριοποιήθηκαν σωστά (δηλαδή βρίσκονται κάτω από την κόκκινη γραμμή της κρίσιμης κατάστασης) 19/19 δείγματα. Τέλος από τα υπόλοιπα έλαια απορρίφθηκαν από το μοντέλο (δηλαδή βρίσκονταν πάνω από την κόκκινη γραμμή της κρίσιμης απόστασης) 15/22 έλαια. Το μοντέλο αυτό επομένως είχε μία καλύτερη ικανότητα διάκρισης των διαφορετικών τύπων ελαίων σε σχέση με το μοντέλο για την περιοχή 4000-400 cm^{-1} .

Συμπεράσματα

Η φασματομετρία υπερύθρου FTIR αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό του νοθευμένου ελαιόλαδου. Είναι μία τεχνική η οποία έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για το σκοπό αυτό. Η πρώτη προσέγγιση περιλάμβανε την απευθείας ανάλυση ελαίων με φασματομετρία IR. Δεν αποδείχτηκε ωστόσο ικανή μέθοδος για τον προσδιορισμό της νοθείας. Η ανάλυση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των ελαίων που ακολουθήθηκε στην προκειμένη πειραματική διαδικασία, παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Ένας παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου να διακρίνει τα νοθευμένα ελαιόλαδα από τα μη νοθευμένα είναι η παλαιότητα των ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν. Όλα τα έλαια που αναλύθηκαν αν και ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης, στο διάστημα που μεσολάβησε υπάρχει περίπτωση να συνέβησαν αλλοιώσεις οι οποίες επηρέασαν το αποτέλεσμα. Παρόλα αυτά όπως προέκυψε από τη χημειομετρική επεξεργασία κατέστη δυνατή κατηγοριοποίηση των ελαίων που μελετήθηκαν σε σημαντικό βαθμό.

Αξίζει ακόμα να σημειωθεί πως το χημειομετρικό μοντέλο αναγνωρίζει τα πυρηνέλαια ως μη ελαιόλαδα σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τα σπορέλαια. Το πυρηνέλαιο είναι ένα έλαιο που προτιμάται για τη νοθεία του ελαιόλαδου, καθώς οργανοληπτικά εμφανίζει κάποιες ομοιότητες με το ελαιόλαδο, σε αντίθεση με τα σπορέλαια. Ακόμα είναι ένα οικονομικό έλαιο. Συνολικά στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 7 πυρηνέλαια εκ των οποίων, όπως φαίνεται από την ανάλυση Class modeling για $1800-400\text{ cm}^{-1}$, τα 5 πυρηνέλαια αναγνωρίστηκαν από το μοντέλο ως μη ελαιόλαδα. Αντίθετα στα σπορέλαια αναγνωρίστηκαν 10 από τα 15 που συνολικά αναλύθηκαν.

Τέλος παρατηρήθηκε πως η ικανότητα του μοντέλου να κατηγοριοποιεί τα ελαία εξαρτήθηκε και από το διάστημα κυματαριθμών που επεξεργάστηκε με χημειομετρία. Όταν αρχικά επιλέχθηκε ολόκληρο το διάστημα κυματαριθμών ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), η χημειομετρική επεξεργασία δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αντίθετα όταν επιλέχθηκε η περιοχή $1800-400\text{ cm}^{-1}$, τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν σημαντικά. Αυτό συνέβη καθώς το διάστημα $1800-400\text{ cm}^{-1}$ περιέχει τις περισσότερες στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διάφορων τύπων ελαίων. Επιχειρήθηκε να περιοριστεί ακόμα περισσότερο το διάστημα που επεξεργάστηκε χημειομετρικά, ωστόσο τα αποτελέσματα αντί να βελτιώνονται, γίνονταν λιγότερο αποδεκτά. Αυτό πιθανώς συνέβη καθώς όσο μειώνονταν τα διαστήματα, διαφορές που οφείλονταν στο θόρυβο ερμηνεύονταν από τη χημειομετρία ως στατιστικά σημαντικές. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα αποτελέσματα της χημειομετρίας να είναι παραπλανητικά.

Προτάσεις

Από την παρούσα διπλωματική εργασία καταδεικνύονται σημαντικές προοπτικές περαιτέρω βελτίωσης της πειραματικής διαδικασίας. Αρχικά ο παράγοντας της παλαιότητας των ελαίων έπαιξε ρόλο στην ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Σημαντικό μέρος των ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν παρήχθησαν κατά τα έτη 2017-2021 και επομένως δεν είναι φρέσκα. Είναι πιθανό λοιπόν να έχουν υποστεί αλλοιώσεις. Τα έλαια αυτά είχαν χρησιμοποιηθεί και παλαιότερα στο εργαστήριο για τη διεξαγωγή άλλων πειραματικών διαδικασιών. Ήταν επομένως οικονομικά ασύμφορη η χρήση μόνο φρέσκων ελαίων. Κάτι ακόμα που θα μπορούσε να βελτιωθεί και να βοηθήσει στην εξαγωγή ακόμα καλύτερων αποτελεσμάτων είναι η τροποποίηση των συνθηκών εκχύλισης. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ψυχρής εκχύλισης υγρού-υγρού. Θα μπορούσε να γίνει ήπια θέρμανση του μείγματος μεθανόλης-ελαίου προτού πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Με αυτό τον τρόπο ενδεχομένως να γίνονταν περισσότερο ευδιάλυτες ενώσεις των ελαίων στη μεθανόλη και να βελτιώνονταν τα αποτελέσματα. Σε αυτή την περίπτωση ωστόσο πρέπει να δοθεί προσοχή στο να μη γίνει έντονη θέρμανση του διαλύματος, καθώς ενδεχομένως να πραγματοποιηθούν αλλοιώσεις που θα επηρεάσουν αρνητικά το αποτέλεσμα. Μία άλλη πρόταση που στόχο έχει την εξαγωγή καλύτερων αποτελεσμάτων αφορά την επιλογή διαφορετικού διαλύτη κατά την εκχύλιση. Εκτός από τη μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη αλκοόλη όπως η αιθανόλη, αλλά και κάποιος άλλος οργανικός διαλύτης όπως η προπανόνη, ο οξικός μεθυλεστέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας. Πρέπει να ωστόσο να τονιστεί πως ο διαλύτης που θα επιλεγεί δε θα πρέπει να επηρεάζει τις μετρήσεις του φασματομέτρου FTIR. Τέλος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη φασματομετρική μέθοδος όπως η φασματομετρία Raman. Η φασματομετρία Raman είναι μία μέθοδος που λειτουργεί συμπληρωματικά με τη φασματομετρία υπεράυθρου. Είναι επομένως πιθανό να εξαχθούν σημαντικά αποτελέσματα από αυτή τη μέθοδο.

Βιβλιογραφία

- [1] Αμβρατζή Ε. , (2007), «Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας και εφαρμογής της στον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στην ελιά και το ελαιόλαδο κατά τη διαδικασία παραγωγής του», Διδακτορική Διατριβή
- [2] "Maps on the Web," [Online]. Available: <https://mapsontheweb.zoom-maps.com/post/171656733011/olive-oil-producing-countries-via-reddit> . [Accessed 6 January 2024]
- [3] Miyake Y., Yokomizo K. & Matsuzaki N. , "Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy," J Amer Oil Chem Soc , vol. 75, pp. 1091–1094, 1998
- [4] "Carl Roth," [Online]. Available: <https://www.carlroth.com/com/en/fatty-acids-derivatives/oleic-acid/p/7213.2> . [Accessed 24 December 2023]
- [5] Κυριτσάκης Α., «Ελαιόλαδο. Συμβατικό & Βιολογικό. Βρώσιμη ελιά-Πάστα ελιάς », 4^η Έκδοση. Θεσσαλονίκη: Copy City. pp. 65-66, 71-72, 74-75, 77-78, 83, 85-87, 2007
- [6] «ΕΦΕΤ,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://www.efet.gr/files/F3406_odel.pdf . [Πρόσβαση 24 Δεκεμβρίου 2023]
- [7] "International Olive Council," [Online]. Available: <https://www.internationalolive.org/> . [Accessed 24 December 2023]
- [8] Trichopoulou A, Lagiou P. , "Healthy traditional Mediterranean diet: An expression of culture, history and lifestyle," Nutr. Rev. , vol. 55, pp. 383-389, 1997
- [9] "Australian Bureau of Statistics," [Online]. Available: <https://www.abs.gov.au/> . [Accessed 12 January 2024]
- [10] «Εθνική Τράπεζα,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.nbg.gr/el/omilos/meletes-oikonomikes-analuseis/reports/kladiki-meleti-elaiolado-maios-2015-> . [Πρόσβαση 24 Δεκεμβρίου 2023]
- [11] "Fred Economic Data," [Online]. Available: <https://fred.stlouisfed.org/series/POLVOILUSDM> . [Accessed 24 December 2023]
- [12] "European Union Law," [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html> . [Accessed 24 December 2023]
- [13] «Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.minagric.gr/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07/ellinikaproionta/1182-elaioladaelies-2> . [Πρόσβαση 13 Ιανουαρίου 2024]
- [14] Γιάννης Ματσατσίνης, «Προϊόντα επεξεργασίας ελαιόκαρπου,» pp. 138-139, 2004

- [15] Stahl E., Schuetz E., & Mangold H. K. , "Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 28(6), pp. 1153-1157, 1980
- [16] Xiangru Meng, Chunling Yin, Libo Yuan, Yan Zhang, Ying Ju, Kehui Xin, Wenbo Chen, Kaidi Lv, Leqian Hu, "Rapid detection of adulteration of olive oil with soybean oil combined with chemometrics by Fourier transform infrared, visible-near-infrared and excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy: A comparative study," *Food Chemistry*, vol. 405, Part A, 2023
- [17] Cong-Hui Lu, Bao-Qiong Li, Quan Jing, Dong Pei, Xin-Yi Huang, "A classification and identification model of extra virgin olive oil adulterated with other edible oils based on pigment compositions and support vector machine," *Food Chemistry*, vol. 420, 2023
- [18] «ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.elgo.gr/> . [Πρόσβαση 6 Ιανουαρίου 2024]
- [19] "European Commission," [Online]. Available: <https://ec.europa.eu/research/participants/portal/desktop/en/opportunities/h2020/topics/sfs-14a-2014.html> . [Accessed 6 January 2024]
- [20] Gómez-Caravaca A. M., Maggio R. M., & Cerretani L. , " Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 913, pp. 1–21, 2016
- [21] COI: Conseil Oléicole International, "International Global Method for the Detection of extraneous oils in olive oils," T.20/Doc. No 25/Rev. 1., 2013. 25.
- [22] Amr A.S. and Abu-Al-Rub A.I. , "Evaluation of the bellier test in the detection of olive oil adulteration with vegetable oils," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 61, 435-437 , 1993
- [23] D. Skoog, F. Holler και T. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΩΣΤΑΡΑΚΗΣ, 2002.
- [24] Townshen A. (1983), *Principles of Instrumental Analysis*, *Analytica Chimica Acta* (τ. 152)
- [25] Ali H. El-Hamdy, Naima K. El-Fizga, "Detection of olive oil adulteration by measuring its authenticity factor using reversed-phase high-performance liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 708, Issue 2, pp. 351-355, 1995
- [26] Bagur-González M. G., Pérez-Castaño E., Sánchez-Viñas M., & Gázquez-Evangelista D. , "Using the liquid-chromatographic-fingerprint of sterols fraction to discriminate virgin olive from other edible oils," *Journal of Chromatography A*, 1380, pp. 64–70, 2015
- [27] Srigley C. T., Oles C. J., Kia A. R. F., & Mossoba M. M. , "Authenticity Assessment of Extra Virgin Olive Oil: Evaluation of Desmethylsterols and Triterpene Dialcohols," *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 93(2), pp. 171–181, 2016

- [28] I.A. van Wetten, A.W. van Herwaarden, R. Splinter, R. Boerrigter-Eenling, S.M. van Ruth, "Detection of sunflower oil in extra virgin olive oil by fast differential scanning calorimetry," *Thermochimica Acta*, vol. 603, pp. 237-243, 2015
- [29] Peter T. Kissinger and William R. Heineman, "Cyclic voltammetry," *Journal of Chemical Education*, vol. 60 (9), pp. 702, 1983
- [30] Fotios Tsopelas, Dimitris Konstantopoulos, Anna Tsantili Kakoulidou, "Voltammetric fingerprinting of oils and its combination with chemometrics for the detection of extra virgin olive oil adulteration," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1015, pp. 8-19, 2018
- [31] Thaís Karine de Lima, M. Musso, D. Bertoldo Menezes, "Using Raman spectroscopy and an exponential equation approach to detect adulteration of olive oil with rapeseed and corn oil," *Food Chemistry*, vol. 333, 2020
- [32] Karla Danielle Tavares Melo Milanez, Thiago César Araújo Nóbrega, Danielle Silva Nascimento, Matías Insausti, Beatriz Susana Fernández Band, Márcio José Coelho Pontes, "Multivariate modeling for detecting adulteration of extra virgin olive oil with soybean oil using fluorescence and UV–Vis spectroscopies: A preliminary approach," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 85, Part A, 2017
- [33] Μ. Όξενκιουν – Πετροπούλου, *Φασματομετρικές Μέθοδοι*, Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία, 2012
- [34] Ιωάννης Καπόλος, (2008), «Μελέτη νοθείας ελαιόλαδου με βάση την ανάλυση φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Ftir)»
- [35] Θεοδωρικού Δάφνη - Βασιλική Ν., (2022), «Γεωγραφική διαφοροποίηση ελαιόλαδου ποικιλίας Αμφίσσης με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους»
- [36] P.K. Hopke, "The Evolution of Chemometrics, review," *Analytica Chimica Acta*, 500, 365, 2003
- [37] Bayne C. K., & Haswell S. J., "Practical Guide to Chemometrics," *Technometrics* (τ. 37, Τεύχος 2), 1995
- [38] O. Christie, "Introduction to multivariate methodology , an alternative way?," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 29, pp. 177-188, 1995
- [39] Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου, *Σημειώσεις Στατιστικής- Χημειομετρίας, Πολυπαραμετρικές Στατιστικές Μέθοδοι, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων»*, 2016
- [40] Manly B. F. J., *Multivariate Statistical Methods*, 2004
- [41] Oliveri P., "Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues – A tutorial," *Analytica Chimica Acta*, vol. 982, pp. 9–19, 2017

[42] Wold S., Sjöström M., & Eriksson L., "PLS-regression: A basic tool of chemometrics. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems," vol. 58(2), pp. 109–130., 2001

[43] "SCHRÖDINGER - What is the meaning of increasing R-squared and Q-squared values with increasing number of PLS factors?," [Online]. Available: <https://www.schrodinger.com/kb/264> . [Accessed 21 December 2023]

[44] Σταυρινίδης Σταύρος-Κωνσταντίνος Μ. , Παλινδρόμηση μερικών ελάχιστων τετραγώνων

[45] Πέτρος Λ. Καρκαλούσος, Συμπληρωματικές Σημειώσεις για το μάθημα «Διαπίστευση Βιοϊατρικών Εργαστηρίων» - «Επαλήθευση μεθόδων, υπολογισμός αβεβαιότητας, υπολογισμός τιμών αναφοράς,» Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων

[46] "Methanex Corporation," [Online]. Available: <https://www.methanex.com/sites/default/files/safety/what-is-methanol/Mx-Safe-Handling-Eng.pdf> . [Accessed 6 January 2024]

[47] Karkoula E., Skantzari A., Melliou E., Magiatis P., "Direct Measurement of Oleocanthal and Oleacein Levels in Olive Oil by Quantitative (1) H NMR. Establishment of a New Index for the Characterization of Extra Virgin Olive Oils," J. Ag. Food Chem., vol. 60, pp. 11696–11703, 2012

[48] "Evisa," [Online]. Available: <https://speciation.net/Database/Instruments/Jasco-Inc/FTIR4200-;i996> . [Accessed 6 January 2024]

[49] "Oregon State University," [Online]. Available: <http://sites.science.oregonstate.edu/chemistry/courses/ch361-464/ch362/irinstrs.htm> . [Accessed 6 January 2024]

[50] "Aliexpress," [Online]. Available: <https://www.aliexpress.com/item/1005003614886326.html> . [Accessed 6 January 2024]