

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Κατεύθυνση: Μελέτη Και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων, Εργαστήριο
Γενικής Χημείας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου μελιού
κουμαριάς

Ελισάβετ Ι. Λαζάρου

Επιβλέπων Καθηγητής:
Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Αθήνα 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου μελιού
κουμαριάς

“Chromatographic and spectroscopic study of the chemotypic Arbutus
honey”

Ελισάβετ Ι. Λαζάρου

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α (επιβλέπων)

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Γεώργιος Γκόρας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Χρωματογραφική και φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου μελιού κουμαριάς

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε το μέλι κουμαριάς ελληνικής προέλευσης. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός χημικών ενώσεων, με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών (GC-MS, HPLC-MS) και με φασματοσκοπική μελέτη (FT-IR, Raman, φθορισμομετρία) για τον γρήγορο προσδιορισμό βασικών συστατικών του. Εκτός των υπολοίπων ουσιών που ανιχνεύθηκαν, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασε η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών, χαρακτηριστικών του φυτού της κουμαριάς, που θα μπορούσαν να χαρακτηρισθούν ως χημικοί δείκτες στο ελληνικό μέλι κουμαριάς.

Τα κύρια συστατικά των πτητικών ενώσεων που παρελήφθησαν με την τεχνική SPME και αναλύθηκαν με GC-MS, ήταν η α-ιζοφορόνη (2,50-8,12 μg/g), η 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη (0,20-4,62 μg/g), η 2-υδροξυιζοφορόνη (0,06-0,53 μg/g), η 4-οξοϊζοφορόνη (0,38-0,46 μg/g) και η β-ιζοφορόνη (0,02-0,43 μg/g). Τα κύρια πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν από το κλάσμα του άπολου και μεσαίας πολικότητας διαλύτη, εξανίου και ισοπροπανόλης, ήταν τα 1-αιθυλοβουτυλιοϋδροϋπεροξειδίο (3,60%), 1-μεθυλοπεντυλιοϋδροϋπεροξειδίο (3,52%), 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη (3,52%) και τα 3-μεθυλο-4- (1,3,3-τριμεθυλο-7-οξαδικυκλο [4.1.0]-επταν-1-υλο) -3-βουτεν-2-όνη (40,84%), η 5-υδροξυμεθυλοφουρουράλη (8,49%), η 5,5,8a-τριμεθυλο-3,5,6,7,8,8a-εξαϋδρο-2H-χρωμόνιο (4,62%), η 6-βουτυλο-3-μεθοξυ-2-κυκλοεξεν-1-όνη (3,12%), αντίστοιχα. Τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίζουν τα μέλια κουμαριάς ήταν κυρίως το 2,5-διυδροξυφαινολοξικό οξύ, 2-(1,2-διυδροξυπροπυλο)-4,8,8-τριμεθυλο-1-οξασπιρο[2.5]οκτεν-4-εν-6-όνη (unedone-UD) και το αμψισικό οξύ.

Η φασματοσκοπική μελέτη (FT-IR, Raman) παρείχε πληροφορίες τόσο για τις λειτουργικές ομάδες όσο και για τον σκελετό των μορίων. Συγκεκριμένα, έδωσε πληροφορίες για τα σάκχαρα, το νερό, τα αμινοξέα, τα οργανικά οξέα και τα φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στο μέλι κουμαριάς. Από τη μελέτη των τρισδιάστατων φασμάτων φθορισμού (εκπομπής και διέγερσης), αξιολογήθηκαν οι πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των συστατικών του μελιού που φθορίζουν.

Επιστημονική περιοχή: Ενόργανη χημεία τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Μέλι – Κουμαριά – Υγρή χρωματογραφία – Αέρια χρωματογραφία – Φασματοσκοπία IR – Raman – Φθορίζομετρία.

Chromatographic and spectroscopic study of the chemotypic *Arbutus* honey

Department of Food Science and Human Nutrition

Laboratory of general chemistry

ABSTRACT

In the present postgraduate thesis, arbutus honey of Greek origin was studied. The purpose is to determine the chemical compounds in arbutus honey, using chromatographic techniques (GC-MS, HPLC-MS) and the spectroscopic study (FT-IR, Raman, fluorescence) for the rapid identification of its basic components. Apart from the other substances that were detected, the isolation of secondary metabolites, characteristics of the arbutus plant, which could be characterized as chemical indicators in Greek arbutus honey, was of great interest.

The main components of the volatile compounds obtained by the SPME technique and analyzed by GC-MS, were α -isoforone (2,50-8,12 $\mu\text{g/g}$), 3,4,5-trimethylphenol (0,20-4,62 $\mu\text{g/g}$), 2-hydroxyisoforone (0,06-0,53 $\mu\text{g/g}$), 4-oxoisoforone (0,38-0,46 $\mu\text{g/g}$) and β -isoforone (0,02-0,43 $\mu\text{g/g}$). The major volatiles identified by the apollo and medium polarity fractions of hexane and isopropanol were 1-ethylbutylhydroperoxide (3,60%), 1-methylpentylhydroperoxide (3,52%), 3,4,5-trimethylphenol (3,52%) and 3-methyl-4-(1,3,3-trimethyl-7-oxadicyclo [4.1.0] -heptan-1-yl)-3-buten-2-one (40,84%), 5-hydroxymethylfurfural (8,49%), 6-butyl-3-methoxy-2-cyclohexen-1-one (3,12%), respectively. The phenolic components identified, and characterizing arbutus honeys were mainly 2,5-dihydroxyphenylacetic acid, UD and absisic acid.

FT-IR and Raman spectroscopy gave information both for the functional groups and for the skeleton of the molecules. Specifically, it gave us information about the sugars, water, amino acids, organic acids and phenolic components present in honey. From the three-dimensional shapes (3D) of the emission and excitation spectra, the information on the number of fluorescent substances in the honey was evaluated.

Scientific area: Instrumental food chemistry

Key words: Honey - *Arbutus unedo* - Liquid chromatography - Gas chromatography - IR spectroscopy - Raman - Fluorescence.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο Γενικής Χημείας, του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2020.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον εισηγητή της παρούσας διπλωματικής, τον κ. Παππά Χρήστο, Αναπληρωτή Καθηγητή. Τον ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή του και το ενδιαφέρον που έδειξε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μου, καθώς με το άρτιο επιστημονικό υπόβαθρό του, την ακρίβεια και τη σαφήνεια του λόγου του, με βοήθησε να υπερνικήσω τις δυσκολίες που αντιμετώπισα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Ταραντίλη Πέτρο για την πολύτιμη βοήθειά του, τις συμβουλές και την καθοδήγησή του για την ορθή εκπόνηση της μελέτης μου.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον Ξαγοράρη Μαρίνο, υποψήφιο διδάκτορα του Γ.Π.Α., για την πολύτιμη συμβολή τους και τις γνώσεις του, οι οποίες αποτέλεσαν σημαντική βοήθεια για την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Επίσης, νιώθω χρέος μου να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της Κατεύθυνσης της Μελέτης και Αξιοποίησης Φυσικών Προϊόντων, τόσο για τις γνώσεις που απλόχερα μου προσέφεραν και συνέβαλαν στην επιστημονική μου κατάρτιση, όσο και για το ήθος τους που συνέβαλε στην πνευματική μου εξέλιξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένεια μου για την ενθάρρυνση και αμέριστη υποστήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει διασταυρωθεί από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής, με τη συναίνεση και την έγκριση της συγγραφέως, που διαθέτει το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α.....	11
A.1 Η μέλισσα.....	11
A.2 Το νέκταρ.....	11
A.3 Η ιστορία του μελιού.....	12
A.4 Μέλι και νομοθεσία.....	13
A.5 Στατιστικά στοιχεία παραγωγής μελιού.....	13
A.5.1 Στατιστικά στοιχεία Ελληνικής παραγωγής μελιού.....	13
A.6 Διάκριση και τύποι μελιών.....	14
A.7 Μέλι από κουμάρι ή κουμαριά.....	14
A.7.1 Ετυμολογία.....	14
A.7.2 Κατανομή κουμαριάς.....	15
A.7.3 Μέλι από κουμαριά.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β.....	18
B.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιών.....	18
B.1.1 Χρώμα.....	18
B.1.2 Πυκνότητα.....	18
B.1.3 Ιξώδες.....	18
B.1.4 Υγρασία.....	19
B.1.5 Κρυστάλλωση.....	19
B.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιού κουμαριάς.....	19
B.3 Χημική προσέγγιση μελιού κουμαριάς.....	20
B.3.1 Άρωμα κουμαριάς.....	20
B.3.2 Πτητικά συστατικά κουμαριάς.....	21
B.3.3. Φουρφουράλες και φουρανικές ενώσεις στην κουμαριά.....	21
B.3.4 Φαινολικά συστατικά.....	21
Γ.1 Σκοπός και αντικείμενο της Μελέτης.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.....	24
Γ.2 Δείγματα Κουμαριάς.....	24
Γ.3 Παραλαβή συστατικών του αρώματος μελιού κουμαριάς με SPME και ανάλυση με GC-MS.....	25
Γ.3.1 Πειραματική πορεία.....	25

Γ.3.2 Πειραματική πορεία	26
Γ.3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	27
Γ.4 Εκχύλιση πτητικών συστατικών μελιού κουμαριάς και ανάλυση με GC-MS	33
Γ.4.1 Πειραματική πορεία	33
Γ.4.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	34
Γ.5 Χρωματογραφική μελέτη φαινολικών συστατικών μελιών κουμαριάς με LC- QTOF-HRMS	39
Γ.5.1 Πειραματική πορεία	40
Γ.5.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	42
Γ.6 Φασματοσκοπική μελέτη μελιού κουμαριάς με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR	46
Γ.6.1 Πειραματική πορεία	46
Γ.6.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	47
Γ.7 Φασματοσκοπική μελέτη μελιών κουμαριάς με χρήση της φασματοσκοπίας Raman	51
Γ.7.1 Πειραματική πορεία	51
Γ.7.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	51
Γ.8 Φασματοσκοπική μελέτη μελιών κουμαριάς με χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού	54
Γ.8.1 Πειραματική πορεία	54
Γ.8.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	55
Συμπεράσματα.....	60
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62
Παράρτημα 1	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η μέλισσα.	11
Εικόνα 2: Η συλλογή νέκταρ από την εργάτρια μέλισσα.	12
Εικόνα 3: Μέλισσα στα άνθη της κουμαριάς, <i>Arbutus unedo</i>	15
Εικόνα 4: Γεωγραφική εξάπλωση κουμαριάς.	16
Εικόνα 5: Μέλι κουμαριάς.	17
Εικόνα 6: Χρωματική κλίμακα μελιού.	18
Εικόνα 7: Κλίμακα χρώματος για το κρυσταλλικό μέλι.	19
Εικόνα 8: Σύστημα SPME.	25
Εικόνα 9: Αέριος χρωματογράφος (GC-MS).	26
Εικόνα 10: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.	27
Εικόνα 11: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-σεττ-2) μελιού κουμαριάς, από την περιοχή της Σέττας.	28
Εικόνα 12: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-λεω-3) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου.	28
Εικόνα 13: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.	29
Εικόνα 14: Τα κυριότερα συστατικά του πτητικού κλάσματος, που παραλήφθηκε με την τεχνική SPME από δείγματα μελιών κουμαριάς.	31
Εικόνα 15: Αεριοχρωματογράφημα πτητικών συστατικών δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς, του κλάσματος του εξανίου.	34
Εικόνα 16: Αεριοχρωματογράφημα πτητικών συστατικών δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς, του κλάσματος της ισοπροπανόλης.	36
Εικόνα 17: Σύστημα SPE.	40
Εικόνα 18: Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του μελιού κουμαριάς με SPE.	40
Εικόνα 19: Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης συζευγμένος με φασματοόμετρο μαζών. ..	41
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.	42
Εικόνα 21: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-σεττ-2) μελιού κουμαριάς, από την περιοχή της Σέττας.	42
Εικόνα 22: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-λεω-3) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου.	43
Εικόνα 23: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.	43
Εικόνα 24: Το φασματοφωτόμετρο FT-IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.	47
Εικόνα 25: Υποδοχέας δείγματος, παράθυρο ZnSe.	47
Εικόνα 26: FT-IR φάσμα του δείγματος (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.	48
Εικόνα 27: FT-IR φάσμα του δείγματος μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Σέττας, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.	48
Εικόνα 28: FT-IR φάσμα του δείγματος μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.	48
Εικόνα 29: FT-IR φάσμα του δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.	49
Εικόνα 30: Με πράσινο χρώμα φαίνεται η περιοχή $1500-750\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR, ενώ με κόκκινο χρώμα η δεύτερη παράγωγος του ίδιου φάσματος.	49
Εικόνα 31: Το φασματοφωτόμετρο Raman που χρησιμοποιήθηκε.	51
Εικόνα 32: Φάσμα Raman μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Σέττας.	52

Εικόνα 33: Φάσμα Raman (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής.	52
Εικόνα 34: Φάσμα Raman μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου.	52
Εικόνα 35: Φάσμα Raman μελιού κουμαριάς (κουμ-αττ-4) προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής.	53
Εικόνα 36: Φθοριζόμετρο FluroMate FS-2.	55
Εικόνα 37: Φάσματα εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης, μελιού κουμαριάς.	55
Εικόνα 38: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Σέττας.	56
Εικόνα 39: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής-01. .	56
Εικόνα 40: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου.	57
Εικόνα 41: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής.	57
Εικόνα 42: Απόδοση διεγέρσεων/ εκπομπών σε συστατικά που φθορίζουν σε μελί κουμαριάς.	58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιού κουμαριάς.	20
Πίνακας 2: Πληροφορίες δειγμάτων μελιών.	24
Πίνακας 3: Αρωματικά συστατικά μελιών κουμαριάς.	29
Πίνακας 4: Πτητικά συστατικά μελιών κουμαριάς του κλάσματος εξανίου.	34
Πίνακας 5: Πτητικά συστατικά μελιών κουμαριάς του κλάσματος ισοπροπανόλης.	36
Πίνακας 6: Φαινολικά συστατικά μελιών κουμαριάς.	44
Πίνακας 7: Οι βασικές κορυφές του φάσματος FT-IR δείγματος μελιού.	50
Πίνακας 8: Οι βασικές κορυφές του φάσματος Raman μελιού.	54

ΜΕΛΙΣΣΑ – ΜΕΛΙ -ΜΕΛΙ ΚΟΥΜΑΡΙΑΣ

A.1 Η μέλισσα

Η μέλισσα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, αποτελείται από τρία μέρη (το κεφάλι, τον θώρακα και την κοιλιά). Η βασίλισσα είναι το μόνο τέλειο θηλυκό, ικανό για τη λειτουργία της αναπαραγωγής (Δερματόπουλος Β., 1984). Οι εργάτριες είναι τα ατελή θηλυκά της κυψέλης, εκτελούν όλες τις εργασίες μέσα και έξω από την κυψέλη, εκτός της διαδικασίας της αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα εφοδιάζουν με νέκταρ, γύρη, πρόπολη και νερό την κυψέλη και διαθέτουν τα ένζυμα που χρειάζονται για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι (Δερματόπουλος Β., 1984).

Οι μέλισσες οδηγούνται στην επιλογή ή όχι ενός φυτού από την ποσότητα και από τον συνδυασμό των σακχάρων του νέκταρος και γενικά προτιμούν άνθη, το νέκταρ των οποίων έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σουκρόζη. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι μέλισσες διαλέγουν τη γύρη ανάλογα με τη διατροφική της αξία. Αυτό γίνεται προκειμένου να εξασφαλίσουν τα απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και την ομοίωσή τους (Zarchin et al., 2017).



Εικόνα 1: Η μέλισσα.

A.2 Το νέκταρ

Το νέκταρ είναι ένα σακχαρούχο υγρό που οι μέλισσες συλλέγουν από τα άνθη των διαφόρων φυτών, θάμνων και δέντρων (Εικ.2). Συνίσταται κυρίως από ένα διάλυμα σακχάρων μέσα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες ή αιωρούμενες κι άλλες ουσίες. Περιέχει 40-80% υγρασία. Τα στερεά συστατικά του που κυμαίνονται από 50-60%

αποτελούνται κυρίως από ένα μείγμα σακχάρων. Τα σάκχαρα αυτά είναι συνήθως φρουκτόζη, γλυκόζη και μαλτόζη. Η φρουκτόζη βρίσκεται συνήθως σε μεγαλύτερη αναλογία από τη γλυκόζη. Σε σπάνιες περιπτώσεις η γλυκόζη υπερτερεί σε ποσότητα της φρουκτόζης. Οι αναλογίες στις οποίες τα τρία αυτά κύρια σάκχαρα βρίσκονται στο νέκταρ (και κατά ακολουθία στο μέλι), χαρακτηρίζουν τα φυτικά είδη και πολλές φορές ολόκληρες οικογένειες φυτών (Πίκουλας Ε, 1986).



Εικόνα 2: Η συλλογή νέκταρ από την εργάτρια μέλισσα.

A.3 Η ιστορία του μελιού

Η μέλισσα εμφανίστηκε στον πλανήτη μας την Τριτογενή περίοδο στην αρχή της Καινοζωικής εποχής, δηλαδή πριν 65 εκατομμύρια χρόνια, πολύ νωρίτερα από την εμφάνιση του ανθρώπου. Αν υποθέσουμε ότι μαζί με τις μέλισσες εμφανίστηκε και το μέλι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι από τότε μέχρι σχεδόν τον 16ο μ.Χ. αιώνα, το μέλι ήταν το μοναδικό σακχαρώδες μη επεξεργασμένο τρόφιμο στον τότε "γνωστό" κόσμο (Eva Crane, *The world History of Beekeeping and honey hunting*, Taylor & Francis, 1999).

Ιστορικά, το μέλι συναντάται στις σφηνοειδείς γραφές των Βαβυλωνίων και των Σουμερίων, στον κώδικα των Χετταίων στις Ιερές Βέδες της Ινδίας καθώς και στην ιερογλυφική γραφή των Αιγυπτίων. Στην αρχαία Αίγυπτο τον 4ο αιώνα π.Χ., το μέλι αποτελούσε την μοναδική γλυκαντική ύλη, προσφερόταν ως τροφή των ιερών ζώων και το χρησιμοποιούσαν ως μονάδα υψηλής ανταλλακτικής αξίας.

Η τέχνη της μελισσοκομίας ήταν πολύ ανεπτυγμένη στην Ελλάδα κατά την κλασική εποχή. Η πρώτη κυψέλη που βρέθηκε στην Ελλάδα προέρχεται από το Ακρωτήρι, που καταστράφηκε από την έκρηξη του ηφαιστείου της Θήρας το 1628 π.Χ.

Ο πρώτος ο οποίος μελέτησε επιστημονικά την μέλισσα ήταν ο Αριστοτέλης. Το 322 π.Χ., τα συγγράμματα του Αριστοτέλη αποτελούν σπουδαίο σταθμό για τη μελισσοκομία,

τόσο της αρχαίας Ελλάδας, αλλά και όλου του τότε πολιτισμένου κόσμου. Το μέλι ήταν σημαντικό στη μαγειρική, ειδικά μάλιστα στην ζαχαροπλαστική, αφού αποτελούσε την βασικότερη γλυκαντική ουσία. Στην αγορά της Αθήνας, το μέλι πουλιόταν με τις κηρήθρες.

A.4 Μέλι και νομοθεσία

Σύμφωνα με τον F.A.O. (Διεθνή Οργανισμό Γεωργίας και Τροφίμων), αλλά και το Προεδρικό Διάταγμα αρ.498 του 1983: «μέλι είναι το παχύρευστο γλυκό προϊόν το οποίο προκύπτει από το νέκταρ ή άλλους φυτικούς χυμούς ή εκκρίσεις από ζωντανά μέρη φυτών ή εκκρίσεις εντόμων μετά από επεξεργασία από τον οργανισμό των μελισσών και περαιτέρω ωρίμανση μέσα στις κηρήθρες της κυψέλης».

Πολλά προβλήματα που αφορούν την ποιότητα του μελιού μπορούν να αντιμετωπισθούν με κανονισμούς που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση, όπως ο Κανονισμός (ΕΟΚ) 2081/92 του Συμβουλίου για τα προϊόντα Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) ή Προϊόντα Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.), ο Κανονισμός (ΕΟΚ) 2082/92 για τις ιδιοτυπίες, ο Κανονισμός (ΕΕ) 2001/110 για τη βελτίωση των συνθηκών παραγωγής και εμπορίας του μελιού.

A.5 Στατιστικά στοιχεία παραγωγής μελιού

Μελισσοκομία είναι ο κτηνοτροφικός τομέας που ασχολείται με τη φροντίδα και τη διαχείριση των αποικιών των μελισσών (Υπ.Α.Α.Τ., 2007). Η Ελλάδα, μαζί με την Ισπανία και τη Γαλλία, είναι οι χώρες με τον μεγαλύτερο αριθμό μελισσιών στην Ευρώπη και οι μοναδικές αυτάρκεις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε μέλι.

A.5.1 Στατιστικά στοιχεία Ελληνικής παραγωγής μελιού

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της κατανάλωσης και του γενικότερου ενδιαφέροντος προς το μέλι. Οι Έλληνες είναι οι πρώτοι σε κατανάλωση μελιού με 1,6 kg/άτομο ετησίως, οι Αυστριακοί, οι Πορτογάλοι, οι Γερμανοί καταναλώνουν γύρω στα 1,1 kg/άτομο, ενώ οι Ιρλανδοί καταναλώνουν ετησίως την μικρότερη ποσότητα μελιού γύρω στα 0,3 kg/άτομο (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).

Στην Ευρώπη η παραγωγή μελιού ανέρχεται στους 130.000 τόνους ετησίως από τους οποίους οι 31.000 τόνοι παράγονται από την Γαλλία και την Ισπανία συνολικά, οι 15.000 τόνοι από την Ελλάδα και οι 11.000 τόνοι από την Πορτογαλία και την Ιταλία συνολικά. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι από τους 15.000 τόνους μελιού ετησίως που παράγονται

από την Ελλάδα, το 70% είναι μέλι κωνοφόρων, το 20% ανθόμελο και μόλις το 10% θυμαρίσιο μέλι, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των ανθόμελων (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).

Σήμερα στη χώρα μας εκτρέφονται περίπου 1.380.000 μελισσοσμήνη εγκατεστημένα σχεδόν στο σύνολό τους σε ευρωπαϊκές κυψέλες τύπου Langstroth. Ο συνολικός αριθμός των μελισσιών της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι 8.777.000 και η χώρα μας κατέχει την τρίτη θέση με 15,72% μετά την Ισπανία και τη Γαλλία. Με τον κλάδο αυτό ασχολούνται περίπου 23.500 μελισσοκόμοι από τους οποίους οι 3.000 περίπου είναι επαγγελματίες. Σήμερα έχουν συμβάλει ουσιαστικά στη διάδοση της μελισσοκομίας τόσο οι Συνεταιριστικές, όσο και οι Συνδικαλιστικές Οργανώσεις των μελισσοκόμων (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).

Οι περισσότερες εκμεταλλεύσεις είναι αρκετά εκσυγχρονισμένες. Η μελισσοκομία είναι διαδεδομένη σε όλη την χώρα, υπάρχουν όμως περιοχές με περισσότερο μελισσοκομικό ενδιαφέρον.

A.6 Διάκριση και τύποι μελιών

Η διάκριση του μελιού στηρίζεται στην προέλευση ή τον τρόπο παραλαβής του. Το μέλι ανάλογα με την προέλευση του διακρίνεται σε μέλι ανθέων και μέλι μελιτώματος.

Το μέλι ανθέων λαμβάνεται από το νέκταρ των φυτών. Το μέλι ανθέων όταν έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά λαμβάνει το όνομα του φυτού από το οποίο προέρχεται. Έτσι, έχουμε μέλι κουμαριάς, θυμαριού, πορτοκαλιάς, ηλίανθου, ερείκης, καστανιάς, βαμβακιού, αγριορίγανης, αγριολεβάντας, σάλβιας, φλαμουριάς, ψευδοακακίας κ.α.

Το μέλι μελιτώματος λαμβάνεται από εκκρίματα εντόμων (Hemiptera), τα οποία βρίσκονται πάνω στα ζωντανά μέρη των φυτών ή εκκρίσεις προερχόμενες από ζώντα μέρη των φυτών. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μέλι πεύκου, ελάτου, βελανιδιάς και κωνοφόρων.

Οι βασικές κατηγορίες αμιγών ελληνικών μελιών είναι οχτώ: μέλι πεύκου, ελάτης, καστανιάς, ερείκης, θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλίανθου. Οι κατηγορίες έχουν χαρακτηριστεί με βάση φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (EU 2004/ 127).

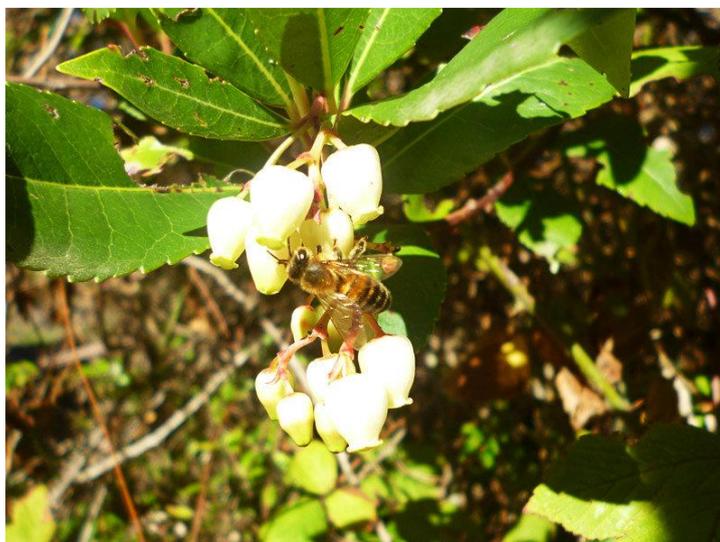
A.7 Μέλι από κουμάρι ή κουμαριά

A.7.1 Ετυμολογία

Η κουμαριά (*Arbutus unedo*) ανήκει στην οικογένεια των ερικοειδών (Ericaceae). Το όνομα του γένους προέρχεται από το λατινικό '*arbutus*', που σημαίνει 'θάμνος ή δέντρο', ενώ του είδους '*unedo*' οφείλεται στο λατινικό '*unum tantum edo*', φράση η οποία

αποδίδεται στον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο (Gaius Plinius Secundus) και σημαίνει ‘τρώω μόνο ένα’. Η κοινή ονομασία αυτού του φυτού είναι και strawberry tree καθώς ο καρπός ομοιάζει με φράουλα (Euro+Med PlantBase).

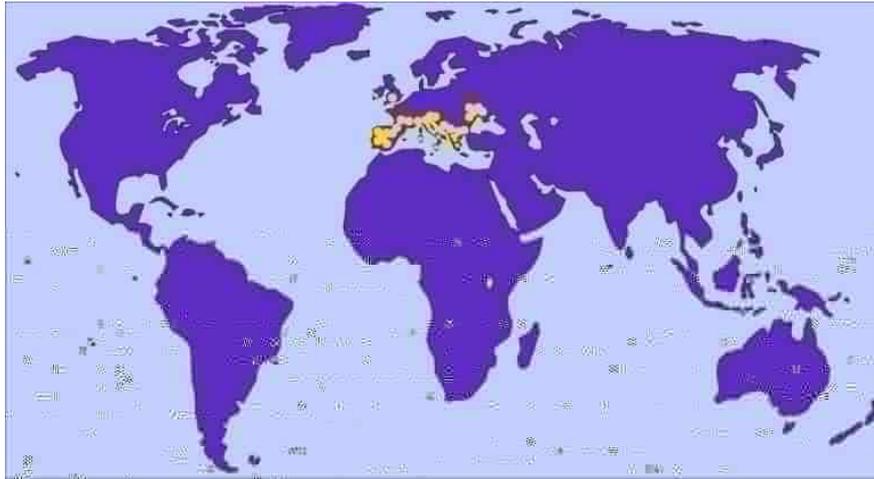
Η κουμαριά είναι θάμνος αειθαλής, φτάνει περίπου τα 3 m, μερικές φορές μπορεί να γίνει και μικρό δένδρο έως 4 m. Έχει φλοιό κοκκινοσταχτί χρώματος, με σχισμές που ξεφλουδίζεται σε μικρές λωρίδες. Τα φύλλα της είναι δερματώδη, συνήθως πριονωτά, λεία σκουροπράσινα στην επάνω επιφάνεια τους και ανοικτό πράσινο στην κάτω. Τα άνθη της, όπως φαίνονται και στην Εικόνα 3, είναι σφαιρικά, λευκά ή ρόδινα και φύονται σε επάκριους κρεμάμενους βότρυες που ανθίζουν το φθινόπωρο. Απαντάται σε θαμνότοπους και δάση, σε ξηρές και πετρώδεις πλαγιές σε όλη την χώρα και σε υψόμετρο μέχρι τα 800 m (<http://votaniki.gr/>).



Εικόνα 3: Μέλισσα στα άνθη της κουμαριάς, *Arbutus unedo*.

A.7.2 Κατανομή κουμαριάς

Η κουμαριά είναι ευρέως διαδεδομένη στην περιοχή της Μεσογείου: στην Πορτογαλία, την Ισπανία, την Γαλλία, την Αλγερία, το Μαρόκο, τη Λιβύη, στην Ιταλία, την Ελλάδα, την Τουρκία, τη Συρία και το Ισραήλ (Εικ.4). Βρίσκεται επίσης σε παραμεσόγειες περιοχές. Είναι θάμνος/δέντρο πλήρως προσαρμοσμένος στις μεσογειακές συνθήκες και στις δασικές πυρκαγιές, διότι αμέσως μετά τις φωτιές αναβλαστάνει. Τέλος, είναι αρκετά ανθεκτική στην ξηρασία.



Εικόνα 4: Γεωγραφική εξάπλωση κουμαριάς.

A.7.3 Μέλι από κουμαριά

Η ανθοφορία της κουμαριάς ξεκινάει στα μέσα Οκτωβρίου και διαρκεί συνήθως μέχρι τον Δεκέμβριο. Στις μέλισσες αρέσει να επισκέπτονται τα άνθη της κουμαριάς. Θα πρέπει να σημειωθεί πως αυτά δεν επηρεάζονται από τις καιρικές μεταβολές, όπως είναι η βροχή και οι άνεμοι λόγω του σχήματος τους που είναι καμpanοειδές. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για ένα φυτό που ανθίζει στο τέλος του φθινοπώρου.

Το μέλι της κουμαριάς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, έχει σκουροχάλκινο χρώμα με γκριζωπές αποχρώσεις και άρωμα μέτριο έως δυνατό. Αφού κρυσταλλώσει αποκτά μια βουτυρένια υφή. Έχει υπόπικρη, πολύ ιδιαίτερη γεύση που το κάνει να ξεχωρίζει απ' όλα τα άλλα μέλια. Ό,τι άλλο μέλι (π.χ. ρείκι) κι αν έχουν συλλέξει οι μέλισσες πριν, αν μπει κουμαριά μέσα στην κυψέλη θα το καλύψει σε τέτοιο βαθμό που είναι αδύνατη η αναγνώρισή του με οργανοληπτικό έλεγχο. Το μέλι από κουμαριά λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών συστατικών του δεν είναι ιδιαίτερα δημοφιλές. Συνήθως οι μελισσοκόμοι το αφήνουν μέσα στην κυψέλη για το ξεχειμώνιασμα του μελισσιού. Το μέλι από κουμαριά χαρακτηρίζεται από τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέλια (<http://votaniki.gr/>). Έχει μεγάλη διατροφική αξία, παρόλα αυτά έχει μελετηθεί σε μικρό βαθμό με μόνο μερικά άρθρα να υπάρχουν στην βιβλιογραφία, από τα οποία τα περισσότερα αναφέρονται στην βοτανική κατάταξη, στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του.



Εικόνα 5: Μέλι κουμαριάς.

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΛΙΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΙΟΥ ΚΟΥΜΑΡΙΑΣ

B.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιών

Το μέλι έχει φυσικά χαρακτηριστικά που σε μεγάλο βαθμό σχετίζονται με τη χημική του σύσταση. Αυτά μπορούν να συνδυαστούν για τον προσδιορισμό σημαντικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων και μπορούν να εξεταστούν με βάση την κριτική του κάθε καταναλωτή (Contessi, 2005).

B.1.1 Χρώμα

Το χρώμα, είναι το πιο έντονο χαρακτηριστικό των μελιών μεταξύ των φυσικών ιδιοτήτων του (Εικ.6). Αυτό εξαρτάται από την παρουσία φυτικών χρωστικών που περιλαμβάνουν το καροτένιο, την ξανθοφύλλη, τις ανθοκυανίνες, τα φλαβονοειδή, τις πολυφαινόλες, καθώς και τα ανόργανα συστατικά του. Το χρώμα του μελιού παρουσιάζει πολλές αποχρώσεις, από ανοιχτό κίτρινο έως κεχριμπαρένιο, από σκούρο κεχριμπάρι έως σχεδόν μαύρο (Terrab *et al.*, 2004).



Εικόνα 6: Χρωματική κλίμακα μελιού.

B.1.2 Πυκνότητα

Η πυκνότητα του μελιού, είναι μεγαλύτερη από την πυκνότητα του νερού, αλλά εξαρτάται επίσης από την περιεκτικότητα του μελιού σε υγρασία. Η πυκνότητα κυμαίνεται μεταξύ 1,39 και 1,44 g/mL στους 20 °C.

B.1.3 Ιξώδες

Το μέλι, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, έχει υψηλές τιμές ιξώδους. Συνεπώς, η αξιολόγηση των ρεολογικών ιδιοτήτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη

διάρκεια των σταδίων επεξεργασίας, από την εκχύλιση στην τελική συσκευασία (Singh and Bath, 1998).

B.1.4 Υγρασία

Η περιεκτικότητα του μελιού σε υγρασία αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του και εξαρτάται από τη επεξεργασία, την περίοδο συγκομιδής και τις περιβαλλοντικές και κλιματολογικές συνθήκες. Μπορεί να διαφέρει από έτος σε έτος. Ένα ώριμο μέλι περιέχει υγρασία συνήθως κάτω από 18,5%. Η προτιμητέα περιεκτικότητα του είναι κάτω από 17%. Όταν η υγρασία είναι κάτω του 17% η πιθανότητα ζύμωσης γίνεται εξαιρετικά μικρή. Η τάση κρυστάλλωσης, αντίθετα με την τάση ζύμωσης είναι συνδεδεμένη με την αναλογία γλυκόζης/ υγρασίας. Όσο μικρότερη η υγρασία ή όσο περισσότερη η γλυκόζη, τόσο ευκολότερα κρυσταλλώνει το μέλι (Πίκουλας, 1986).

B.1.5 Κρυστάλλωση

Οποιαδήποτε αιτία τείνει να διαταράξει την ισορροπία υγρασίας και σακχάρων αποτελεί και αιτία κρυστάλλωσης (Εικ.7). Από τα σάκχαρα του μελιού, η γλυκόζη είναι αυτή που έχει τη μεγαλύτερη τάση κρυστάλλωσης (και σε αυτήν οφείλεται το σακχάρωμα). Από τις δύο μορφές της γλυκόζης (άνυδρη, μονοϋδρική), η μονοϋδρική είναι εκείνη που δημιουργεί το πρόβλημα λόγω της μικρότερης διαλυτότητας της (Πίκουλας, 1986).



Εικόνα 7: Κλίμακα χρώματος για το κρυσταλλικό μέλι.

B.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιού κουμαριάς

Στον Πίνακα 1 φαίνονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μελιών κουμαριάς σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης το μέλι κουμαριάς κρυσταλλώνει γρήγορα, ενώ το μεγάλο ποσοστό υγρασίας δεν του επιτρέπει να κρατάει τη σωστή σύσταση για πολύ καιρό (Prota et al, 1997).

Πίνακας 1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιού κουμαριάς.

	Ευρωπαϊκή νομοθεσία	Μέλι από κουμαριά	Παρατηρήσεις
Χρώμα	Όχι επαρκή	83-118	Κεχριμπαρένιο
Υγρασία (%w/w)	≤21	18-20	Σχετικά υψηλή
Ελεύθερα οξέα (meq/kg)	≤40	30-36	Σχετικά οξύ
Αναλογία γλυκόζης/ φρουκτόζης (%w/w)	Όχι επαρκή	0,82-0,87	Υψηλή
Γλυκονικό οξύ (g/ kg)	Όχι επαρκή	10	Υψηλή συγκέντρωση
Ένζυμο διαστάσης (κλίμακα schade)	≥8	6-9	Σχετικά χαμηλό
5-υδροξυμεθυλοφουρουράλη (mg/Kg)	≤40	≤15	-

B.3 Χημική προσέγγιση μελιού κουμαριάς

Όπως όλα τα μέλια, έτσι και το μέλι κουμαριάς είναι ένα υπέρκορο διάλυμα από φρουκτόζη, γλυκόζη, ιχνοστοιχεία, πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, ένζυμα και φαινολικά συστατικά (Rosa et al, 2011). Το μέλι κουμαριάς διαθέτει μικρό ποσοστό γυρεόκοκκων. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει τη γυρεοσκοπική μελέτη όσον αφορά τη βοτανική κατάταξη. Γι' αυτό το λόγο γίνεται προσπάθεια ώστε να βρεθούν κάποιες ενώσεις που να είναι χαρακτηριστικές του μελιού (Tuberoso et al, 2010).

B.3.1 Άρωμα κουμαριάς

Τα συστατικά του αρώματος στο μέλι προέρχονται από τη βοτανική του προέλευση, τη φυσιολογία και τις συνήθειες των μελισσών (Montenegro *et al.*, 2003; Ramírez and Montenegro 2004; Muñoz *et al.*, 2007). Το μέλι της κουμαριάς μπορεί να έχει ελαφρύ ή έντονο άρωμα πάντα όμως αυτό εξαρτάται από τη συνεισφορά από άλλα μέλια. Στο σύμπλεγμα γεύσης-αρώματος συνεισφέρουν όχι μόνο τα σάκχαρα και τα οξέα του μελιού, αλλά και διάφορες ταννίνες, γλυκοζίτες, αλκαλοειδή κ.λ.π.

Τα μέλια από κουμαριά έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε ισοπρενοειδή. Οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζουν το αρωματικό του προφίλ. Η βιβλιογραφία αναφέρει πως τα κύρια ισοπρενοειδή που συναντάμε στα μελιά κουμαριάς είναι η α- ισοφορόνη, η β-ιζοφορόνη και η 4-οξοϊσοφορόνη. Η αναλογία α-ιζοφορόνης/ β- ιζοφορόνης κυμάνθηκε από τέσσερα έως οκτώ και η αναλογία α-ιζοφορόνης/ 4-οξοϊσοφορόνης από έντεκα έως είκοσι. Οι αναλογίες αυτές προέκυψαν από μελέτη 10 μελιών από κούμαρα από τη Σαρδηνία, με τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (Bianchi et al, 2005).

B.3.2 Πτητικά συστατικά κουμαριάς

Οι πτητικές ουσίες καθορίζουν κατά κύριο λόγο το άρωμα του μελιού και τέτοιες είναι διάφορες αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, καθώς και εστέρες. Σε μελέτη 10 δειγμάτων μελιού κουμαριάς από τη Σαρδηνία ανιχνεύθηκαν πάνω από 28 πτητικά συστατικά με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας (Bianchi et al, 2005). Μερικά από αυτά είναι τα παρακάτω: 2-βουτανόνη, βουτανοδιόνη, 2,4,4-τριμεθυλοκυκλοπεντανόνη, 3-(1-μεθυλοαιθυλο)-2-κυκλοπεντεν-1-όνη, βενζαλδεΐδη, φουρφουράλη, 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη, 3-φουρανοκαρβοξαλδεΐδη, 3,5,5-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξανοδιόνη.

B.3.3. Φουρφουράλες και φουρανικές ενώσεις στην κουμαριά

Η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (5-hydroxymethylfurfural, HMF) είναι μια χημική ένωση που απουσιάζει από τα μέλια που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, αλλά η συγκέντρωσή της τείνει να αυξάνεται ως αποτέλεσμα θερμικών διαδικασιών. Γι' αυτό το λόγο, αποτελεί μια ένδειξη της φρεσκάδας και της ποιότητας του μελιού κουμαριάς. Επίσης, αποτελεί παράμετρο υποβάθμισης ενός προϊόντος. Το μέγιστο επίπεδο της 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης στα μέλια γενικά, και ειδικά στην κουμαριά είναι 40 mg/kg, με εξαίρεση για τα μέλια με χαμηλό ενζυματικό προφίλ (15 mg/kg). HMF έχει ανιχνευτεί σε μελέτη 15 μελιών κουμαριάς, από τις περιοχές της Γαλλίας και της Ιταλίας (Spano et al, 2006).

B.3.4 Φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα μέλια κουμαριάς διακρίνονται σε δυο ομάδες: στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες και στις φλαβονοειδείς φαινόλες.

Το μέλι της κουμαριάς, σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε διάφορα είδη μελιού από διαφορετικές χώρες, βρέθηκε να είναι το πλουσιότερο σε ολικά φαινολικά (789,6 mg/kg σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος, GAE) (Beretta et al, 2005). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από άλλη μελέτη, στην οποία μέλι κουμαριάς της Σαρδηνίας βρέθηκε να περιέχει (972 mg/kg GAE) φαινολικά συστατικά (Tuberoso et al, 2013).

B.3.4.1 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

Τα μέλια από κουμαριά, όπως και κάθε μέλι, περιέχουν διάφορα αρωματικά και άρυλο-αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα, κυρίως υδροξυλικά και μεθοξυ-παράγωγα βενζοϊκού και κινναμωνικού οξέος που συμβάλλουν στις οργανοληπτικές του ιδιότητες (Anklam, 1998). Μεταξύ άλλων, η παρουσία βενζοϊκού, υδροξυβενζοϊκού, σαλικυλικού,

γαλλικού, βανιλικού, συριγγικού, πρωτοκατεχικού, φερουλικού και χλωρογενικού οξέος έχουν ανιχνευτεί στο μέλι (Dimitrova *et al.*, 2007; Trautvetter *et al.*, 2009).

B.3.4.2 Φλαβανοειδείς φαινόλες

Οι φλαβανοειδείς φαινόλες είναι ενώσεις με βασικό τύπο C₆-C₃-C₆. Η βασική δομή των ενώσεων αυτών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια αλειφατική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Στο μέλι έχουν αναγνωρισθεί κυρίως φλαβανόνες, φλαβόνες, φλαβονόλες και διϋδροφλαβονόλες (Tomás-Barberán *et al.*, 2001). Στο μέλι υπάρχουν επίσης φαινολικοί γλυκοζίτες (Truchado *et al.*, 2011).

Οι φαινολικές ενώσεις, είναι ευαίσθητες στην οξείδωση παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου που υπάρχει στο μέλι (Truchado *et al.*, 2008).

Γ.1 Σκοπός και αντικείμενο της Μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι ο προσδιορισμός χημικών ενώσεων σε μέλι κουμαριάς, με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών (GC-MS, HPLC-MS) και τον προσδιορισμό του χημειότυπού του. Επιπλέον, σκοπός είναι η φασματοσκοπική μελέτη (FT-IR, Raman, φθορισμομετρία) των δειγμάτων μελιού κουμαριάς προκειμένου να επιτευχθεί ο γρήγορος προσδιορισμός βασικών συστατικών του.

Στοιχεία πρωτοτυπίας

Το μέλι κουμαριάς διαθέτει ιδιαίτερες οργανοληπτικές ιδιότητες και δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, ενώ έχει μεγάλη ζήτηση ιδιαίτερα στο εξωτερικό. Η εργασία θα εμπλουτίσει τη βιβλιογραφία.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γ.1 Μεθοδολογία

Συλλέχτηκαν δείγματα μελιού κουμαριάς. Στη συνέχεια:

- Παρελήφθησαν πτητικά συστατικά με χρήση της τεχνικής της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματοόμετρο μαζών (GC-MS).
- Εκχυλίστηκαν τα δείγματα με άπολους και μεσαίας πολικότητας οργανικούς διαλύτες και μελετήθηκαν τα παραληφθέντα πτητικά συστατικά με GC-MS.
- Εκχυλίστηκαν τα φαινολικά συστατικά με ακετονιτρίλιο και μελετήθηκαν με χρήση HPLC και ανιχνευτές DAD και QTOF.
- Καταγράφηκαν τα φάσματα FT-IR και Raman και συνδυάστηκαν τα χρωματογραφικά και φασματοσκοπικά δεδομένα.
- Προσδιορίστηκαν φθορίζουσες χημικές ενώσεις με χρήση της φθορισμομετρίας.

Γ.2 Δείγματα Κουμαριάς

Τέσσερα δείγματα μονοποικιλιακών μελιών κουμαριάς από τρεις γεωγραφικές περιοχές παρελήφθησαν απευθείας από Έλληνες μελισσοκόμους. Τα μέλια τρυγήθηκαν το 2019. Τα δείγματα παραδόθηκαν στο εργαστήριο και διατηρήθηκαν στο σκοτάδι στους 25 °C μέχρι να αναλυθούν (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Πληροφορίες δειγμάτων μελιών κουμαριάς.

Αρίθμηση δείγματος	Κωδικός δείγματος	Ποικιλία	Περιοχή	Χρονολογία
1	Κουμ-αττ-1	Κουμαριά	Αττική (Στερεά Ελλάδα)	2019
2	Κουμ-σετ-2	Κουμαριά	Σέτα (Εύβοια)	2019
3	Κουμ-λεω-3	Κουμαριά	Πελέτα Λεωνιδίου (Πελοπόννησος)	2019
4	Κουμ-αττ-4	Κουμαριά	Αττική (Στερεά Ελλάδα)	2019

Γ.3 Παραλαβή πτητικών συστατικών μελιού κουμαριάς με SPME και ανάλυση με GC-MS

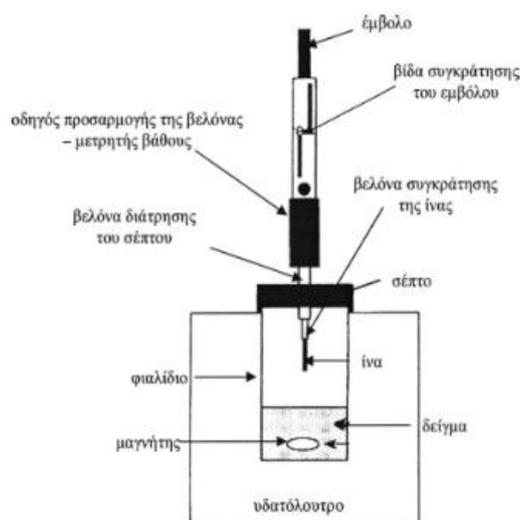
Γ.3.1 Πειραματική πορεία

Γ3.1.1 Εκχύλιση με την τεχνική SPME

Για την πραγματοποίηση της παραλαβής και ανάλυσης των πτητικών συστατικών του μελιού διεξήχθησαν δοκιμές από τα αποτελέσματα των οποίων οριστικοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και ανάλυσης με αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών (GC-MS).

Για την SPME χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της Εικόνας 8 (Supelco (Bellefonte, USA)).

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 8 στο σύστημα SPME προσαρμόζεται ίνα η οποία απορροφά πτητικά συστατικά του δείγματος. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριπλής φάσης DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane). Η διαφορετική πολικότητα της κάθε φάσης έδωσε τη δυνατότητα απομόνωσης άπολων (PDMS), μέτριας πολικότητας (DVB) και πολικών πτητικών ουσιών (CAR).



Εικόνα 8: Σύστημα SPME.

Γ.3.1.2 Αεριοχρωματογραφική μελέτη

Η μελέτη των χημικών ενώσεων του πτητικού κλάσματος μετά την παραλαβή με SPME έγινε με GC-MS (Εικ.9). Η ταυτοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη

σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και των φασμάτων μαζών με αυτά που υπάρχουν καταχωρημένα στις βιβλιοθήκες του GC-MS (Nist, Adams, Excalibur). Οι συνθήκες της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης ήταν οι ακόλουθες:

- Θερμοκρασία εγχυτή: 250 °C.
- Στήλη: Restek (μήκος 30m, διάμετρος 0,25 mm και πάχος επένδυσης 0,25 μm).
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 40 °C για 6 min, άνοδος της θερμοκρασίας 5 °C/min μέχρι τους 120 °C για 0 min, άνοδος της θερμοκρασίας 3 °C/min μέχρι τους 160 °C για 0 min, άνοδος της θερμοκρασίας 15 °C/min μέχρι τους 250 °C για 1 min (Συνολικός χρόνος προγράμματος 42,33 min).
- Θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς (transfer line): 290 °C.
- Φέρον αέριο: ήλιο (He) καθαρότητας 99,999% με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min.
- Τεχνική: Χωρίς διαμοιρασμό (splitless) για 3min και στη συνέχεια με διαμοιρασμό (split) με λόγο 1:50.

Συνθήκες φασματομέτρου μαζών:

- Ανιχνευτής: Θερμοκρασία πηγής 240 °C.
- Εύρος μαζών σάρωσης (mass range): $m/z = 35-650$.
- Σαρώσεις (Scan)/sec: 0,7974.
- Τεχνική θετικών ιόντων.



Εικόνα 9: Αέριος χρωματογράφος (GC-MS).

Γ.3.2 Πειραματική πορεία

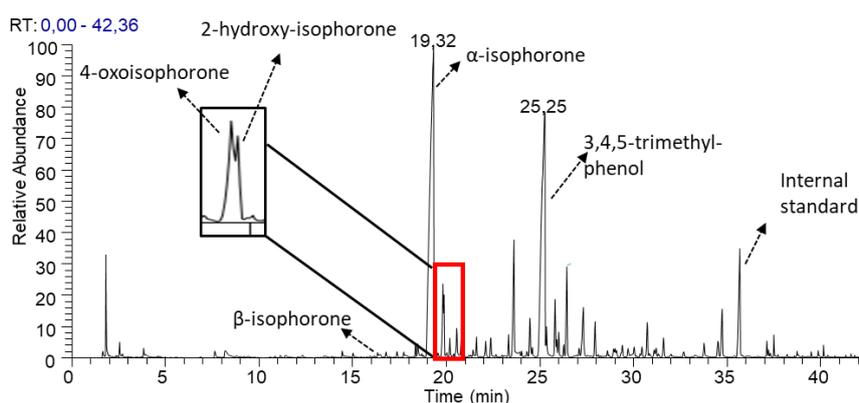
Ζυγίστηκαν 7,0 g μελιού κουμαριάς σε φιαλίδιο των 50 mL και προστέθηκαν 3110 μL απιονισμένου νερού με αριθμημένο σιφόνιο. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε και στη

συνέχεια μεταφέρθηκαν 6 mL του μίγματος σε φιαλίδιο των 15 mL με βιδωτό πώμα και διάφραγμα (septum) PTFE/σιλικόνης. Προστέθηκαν 20 μ L διαλύματος βενζοφαινόνης συγκέντρωσης 300 μ g/mL (εσωτερικό πρότυπο) με αυτόματη πιπέτα. Το δείγμα θερμάνθηκε υπό ανάδευση σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο στους 60 °C για 30 min (χρόνος επώασης). Παράλληλα η ίνα SPME εισήχθη στο GC-MS και ενεργοποιήθηκε για 30 min στους 260°C. Στη συνέχεια, εισήχθη στο φιαλίδιο με το δείγμα για 30 min (χρόνος δειγματοληψίας) για την εκχύλιση του πτητικού κλάσματος. Στη συνέχεια η ίνα εισήχθη στο GC-MS για ανάλυση των πτητικών συστατικών.

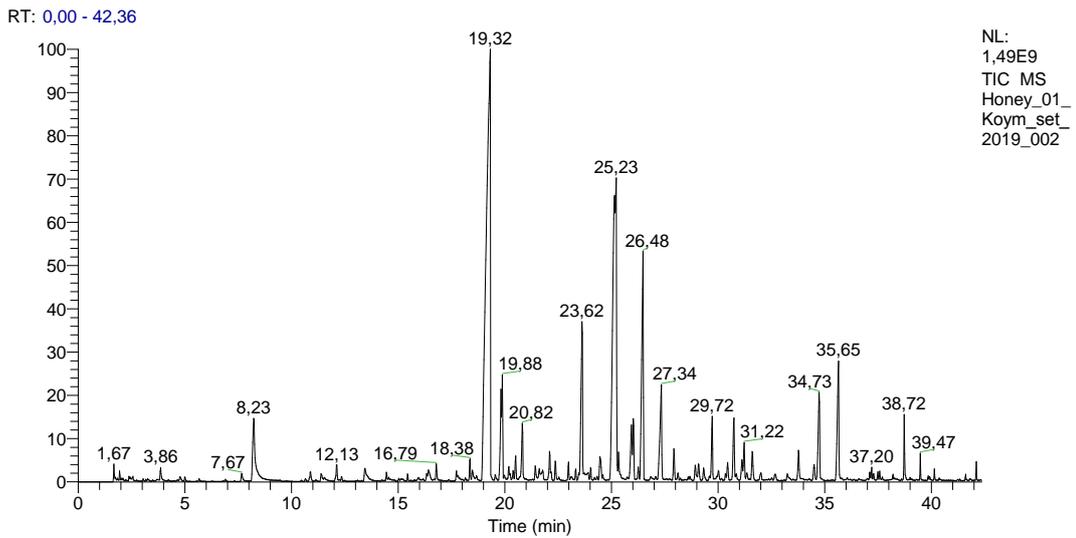
Γ.3.3 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η τεχνική αυτή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων παραλαβής, καθώς παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα στην παραλαβή πτητικών συστατικών και επιπλέον δεν γίνεται χρήση διαλύτη. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικό, γιατί στο χρωματογράφημα που λαμβάνεται από το GC-MS ο χρόνος συγκράτησης του διαλύτη συνήθως συμπίπτει με το χρόνο συγκράτησης άλλων πτητικών ενώσεων οι οποίες τελικά δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν.

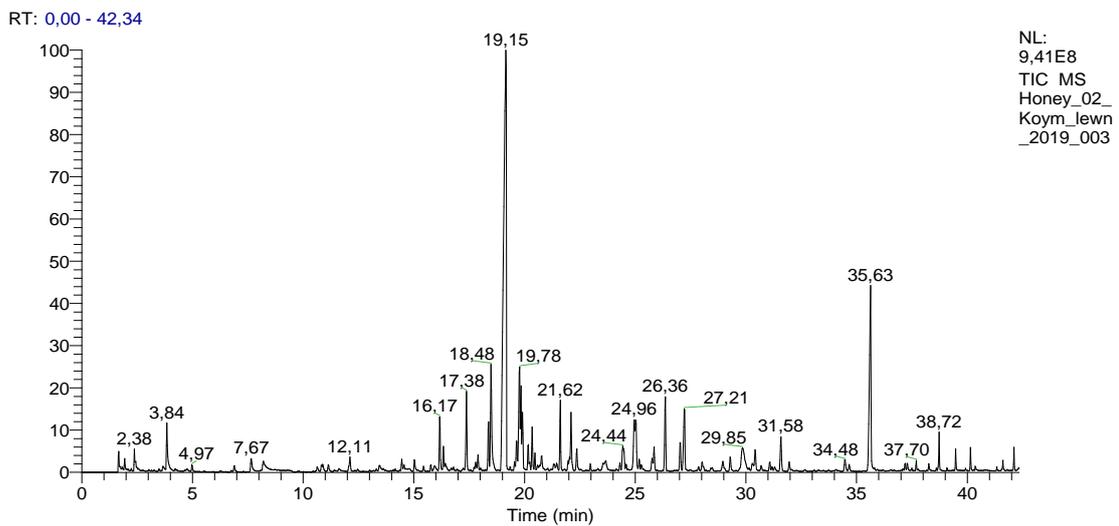
Στις Εικόνες 10, 11, 12 και 13 φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα GC-MS δειγμάτων μελιού κουμαριάς. Παρατηρούμε ότι τα χρωματογραφήματα παρουσιάζουν διαφορές στην ένταση και στο εύρος των κορυφών. Οι κυριότερες χημικές ενώσεις καθώς και η περιεκτικότητά τους σε μ g/g δείγματος μελιού παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.



Εικόνα 10: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.

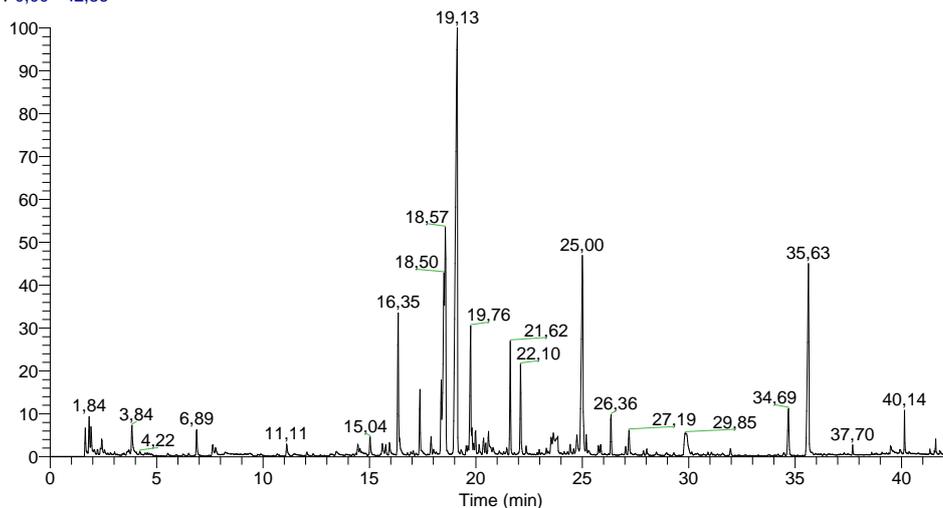


Εικόνα 11: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-σεττ-2) μελιού κουμαριάς, από την περιοχή της Σέττας.



Εικόνα 12: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-λεω-3) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου.

RT: 0,00 - 42,36


 NL:
 8,70E8
 TIC MS
 Honey_198
 _Koum_att_
 2019_286

Εικόνα 13: Αεριοχρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.

Πίνακας 3: Ποιοτική και ποσοτική σύσταση του πτητικού κλάσματος μελιών κουμαριάς, παραλήφθηκε με την τεχνική SPME.

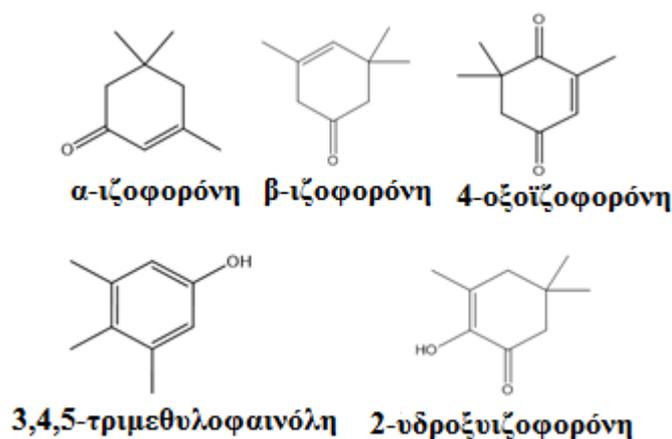
Χημική ένωση	Χρόνοι συγκράτησης	μg ένωσης/g μελιού			
		Κουμ-αττ-1	Κουμ-σετ-2	Κουμ-λεω-3	Κουμ-αττ-4
2-βουτανόνη	2,4	-	-	0,06	-
εξάνιο	2,4	0,08	-	-	-
2,5-διμεθυλοφουράνιο	3,8	0,16	0,10	0,19	0,04
οξικός βουτυλεστέρας	2,8	0,02	-	0,01	-
2-μεθυλο-2-βουτενάλη	2,9	-	0,04	-	-
3-μεθυλο-2-βουτενάλη	3,0	0,02	-	-	-
οκτάνιο	6,9	0,09	-	0,02	-
φουρφουράλη	8,2	0,05	0,87	0,13	0,13
5-μεθυλο-4-εξεν-3-όνη	7,4	-	-	0,04	-
επτανάλη	11,4	0,05	-	0,03	0,02
εννιάνιο	11,1	0,05	-	-	-
μεθοξυφαινυλοξίμη	12,3	0,02	-	0,02	0,02
2,4,4-τριμεθυλο-κυκλοπεντανόνη	12,5	-	0,10	0,05	-
βενζαλδεΰδη	13,4	0,03	0,18	0,04	0,02
οκτανάλη	15,0	0,06	-	0,05	-
λεμονένιο	15,9	0,05	-	-	-
π-κυμένιο	15,8	0,02	-	0,02	-
3,5-διμεθυλοανισόλη	16,2	-	-	0,17	-
3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξεν-3-όνη (β-ιζοφορόνη)	16,3	0,43	0,04	0,07	0,02
φαινυλακεταλδεΰδη	16,4	-	0,11	0,05	0,04
trans-οξείδιο της λιναλοόλης	17,4	0,18	-	0,24	0,03
cis- οξείδιο της λιναλοόλης	19,7	0,05	-	0,05	-
χοτριενόλη	18,6	0,80	-	-	-
εντεκάνιο	18,4	0,18	0,10	0,14	0,07
εννιανάλη	18,5	0,70	0,09	0,42	0,10
3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξεν-2-όνη (ιζοφορόνη)	19,3	2,50	8,12	3,42	6,06

2-(τετραϋδρο-5-μεθυλο-5-βινυλοφουραν-2-υλο) – προπανάλη (λιλακαλδεϋδη) ισομερές 1	19,6	-	-	0,11	-
2-(τετραϋδρο-5-μεθυλο-5-βινυλοφουραν-2-υλο)-προπανάλη (λιλακαλδεϋδη) ισομερές 2	19,9	-	-	0,20	-
2-(τετραϋδρο-5-μεθυλο-5-βινυλοφουραν-2-υλο)-προπανάλη (λιλακαλδεϋδη) ισομερές 3	20,3	-	-	0,12	-
νερολιδόλη	20,0	0,06	-	-	-
4-οξο-3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξεν-2-όνη (4-οξοϊζοφορόνη)	19,8	0,46	0,43	0,38	0,64
2-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξεν-2-όνη (2-υδροξυϊζοφορόνη)	19,9	-	0,53	0,23	-
2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-ενι-1-καρβαλδεϋδη	20,2	0,03	-	0,11	0,09
2,2,6-τριμεθυλο-1,4-κυκλοεξανοδιόνη	20,5	0,02	-	0,05	-
βενζοϊκός αιθυλεστέρας	20,6	-	-	-	0,19
1-εννιανόλη	20,6	0,10	-	-	-
2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ1.3-διεν-1-καρβαλδεϋδη	20,2	-	0,09	-	0,09
δωδεκάνιο	21,3	-	-	0,04	-
δεκανάλη	21,6	0,28	-	0,19	-
εννεανοϊκός μεθυλεστέρας	22,1	0,24	0,20	0,18	0,09
1,3,5,5,6,6-εξαμεθυλο-1,3-κυκλοεξαδιένιο	22,4	-	-	-	0,11
2,4,6-τριμεθυλοφαινόλη	23,6	0,06	1,14	-	-
θυμόλη	24,4	-	-	0,15	-
εννεανοϊκό οξύ	22,1	0,19	0,08	0,08	0,06
α-ιονόλη	25,0	-	0,20	0,23	-
3-ακετυλο-2,4,4-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη	23,3	-	-	-	0,10
2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ1-1έν-1-προπανάλη	24,5	-	0,19	-	-
2-αμινο-4-ακεταμιδοανισόλη	24,5	-	-	-	0,22
2,6,6-τριμεθυλο-4-οξοκυκλοεξ-1-ενο-1-καρβοξαλδεϋδη	24,8	0,06	-	-	-
3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη	25,2	0,95	5,21	0,20	4,62
δεκανοϊκός μεθυλεστέρας	25,4	0,04	-	0,04	-
α, β-δίυδρο-β-ιονόνη	25,3	0,03	-	-	0,19
υδροκινόνη	25,8	-	-	-	0,31
2,4,5,6,7,7α-εξαϋδρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-7α-μεθυλο-1Η-2-ινδενόνη	26,4	0,12	-	-	-
3-μεθυλο-4-(1,3,3-τριμεθυλο-7-οξαδικυκλο [4.1.0] επταν-1-υλ)-3-βουτεν-2-όνη	25,9	-	0,39	-	-
5-μεθυλο-2 (2-οξο-4-επτυλο) φουράνιο	26,0	-	0,33	-	0,14
(E)-β-δαμασκινόνη	27,0	0,03	-	0,10	0,05
2,4,5,6,7,7α-εξαϋδρο-3-(1-μεθυλοιαιθυλο)-7α-μεθυλο 1Η-2-ινδενόνη	26,5	-	1,69	-	0,53
2,4,4-τριμεθυλο-3-καρβοξαλδεϋδη-5-υδροξυ-2,5-κυκλοεξαδιεν-1-όνη	27,3	0,08	0,78	0,27	0,41
3,3,4,7-τετραμεθυλο-Βενζο [c] φουρανόνη	27,9	-	0,17	-	0,18
2,5,8-τριμεθυλο-1-ναφθανόλη	29,7	-	0,34	-	0,07
δωδεκανάλη	28,0	0,02	-	0,04	-
4-υδροξυ-β-ιονόνη	29,0	-	-	0,06	-
3,4-διμεθυλοφαινυλεστέρας του βαλερικού οξέος	29,3	-	-	0,05	-
π-ανισικός μεθυλεστέρας	29,4	-	-	-	0,08
1-[3-[2-μεθυλο-2-(5-μεθυλο-2-φουρανυλο) προπυλο] οξυρανυλο]-αιθανόνη	29,9	0,18	-	0,26	-
2', 6'-διμεθυλο-4'-προπυλο ακετοφαινόνη	30,4	-	0,10	0,09	-
2,3-διμεθυλοκυκλοεξ1,3-διένιο	31,6	-	-	0,13	-
δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	32,0	0,02	-	0,03	-
1,3,5-τρις (1-μεθυλαιθυλο)-βενζόλιο,	34,5	-	-	0,05	-

τετραδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	37,7	0,02	-	0,02	-
2-αιθενυλο-1,3,5-τριμεθυλο-βενζόλιο	38,7	-	-	0,09	-
2,3-δωδρο-3,3,5,6-τετραμεθυλο-1H-ινδεν-1-όνη	30,7	-	0,38	-	0,04
φθαλικό διβουτύλιο	39,5	-	-	0,05	-
3,4,7-τριμεθυλο-1-ινδανόνη	30,7	-	-	-	0,21
4α, 5,8,8α-τετραϋδρο-1,1,4α-τριμεθυλο-, trans-ναφθαλένιο	31,6	-	0,19	-	0,12
1,2,4α, 5,8,8α-εξαϋδρο-4,7-διμεθυλο-1-(1-μεθυλαιθυλο) -, [1S-(1α, 4αβ, 8αα)]-ναφθαλένιο	34,7	0,18	0,62	-	0,31
2-αιθενυλο-1,3,5-τριμεθυλο-βενζόλιο	38,7	-	0,22	-	-
δεκαεξανοϊκός μεθυλεστέρας	40,1	0,07	-	0,04	-

Στα μέλια κουμαριάς ανιχνευτήκαν ενώσεις που προέρχονται από διάφορες βιοσυνθετικές οδούς. Αυτές περιλαμβάνουν: υδρογονάνθρακες, αλδεΐδες, αλκοόλες, κετόνες, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες, βενζολοπαράγωγα, νορισοπρενοειδή και τερπένια.

Τα συστατικά του πτητικού κλάσματος, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 14, τα οποία βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (μg/g) στα δείγματα μελιού κουμαριάς, ήταν η α-ιζοφορόνη (2,50-8,12), η 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη (0,20-4,62), η 2-υδροξυιζοφορόνη (0,06-0,53), η 4-οξοϊζοφορόνη (0,38-0,46) και η β-ιζοφορόνη (0,02-0,43). Αυτές οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.



Εικόνα 14: Τα κυριότερα συστατικά του πτητικού κλάσματος, που παραλήφθηκε με την τεχνική SPME από δείγματα μελιών κουμαριάς.

Τα νορισοπρενοειδή αποτελούν μια πολύ σημαντική ομάδα ενώσεων που συνεισφέρουν στο άρωμα πολλών φυτών και τη γεύση διαφόρων φρούτων και τροφίμων. Έχουν βρεθεί ως συστατικά αρώματος σε διαφορά φυτικά υλικά, όπως ο καπνός, το τσάι, ο κρόκος Κοζάνης, τα μπαχαρικά, τα σταφύλια και το κρασί (Winterhalter et al., 2002).

Τα νορισοπρενοειδή που υπάρχουν στο μέλι κουμαριάς προέρχονται από την αποδόμηση των καροτενοειδών, τα οποία είναι τετρατερπένια, με 40 άτομα άνθρακα.

Εξειδικευμένα ένζυμα που βρίσκονται σε αυτό σπάνε τους δεσμούς 6,7 - 7,8 - 8,9 και 9,10 με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενώσεων με ποικίλο αριθμό ατόμων άνθρακα. Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα μέλια κουμαριάς ανήκουν κυρίως σε αυτή την κατηγορία και έχουν προέλθει λόγω τις ενζυματικής δράσης και άλλων χημικών μεταβολών (οξειδώσεις, διασπάσεις, κυκλοποιήσεις κλπ.). Πιθανόν μερικές από αυτές τις ουσίες να προέρχονται και λόγω της επίδρασης του φωτός, της θερμοκρασίας ή ακόμα και λόγω αυτό-οξειδωσης (Bianchi et al., 2004).

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι νορισοπρενοειδείς ενώσεις είναι χαρακτηριστικές για το μέλι κουμαριάς της Σαρδηνίας και θεωρήθηκαν ως πιθανοί βοτανικοί δείκτες (Bianchi et al., 2004). Όμως έχουν απομονωθεί από μέλια διαφορετικής βοτανικής προέλευσης, όπως ο ευκάλυπτος (D'Arcy et al., 1997) και το φθινοπωρινό ερείκη (Guyot et al., 1999). Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνεται ότι είναι δύσκολο να ανιχνευτούν ενώσεις, ως χημικοί δείκτες, για μέλια που λαμβάνονται από διάφορες βοτανικές πηγές (Acevedo et al., 2017). Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι η χημική σύνθεση του μελιού εξαρτάται όχι μόνο από τη βοτανική πηγή, αλλά και από τη γεωγραφική προέλευση, την εποχή συγκομιδής, τις συνθήκες αποθήκευσης, τις πιθανές αντιδράσεις μεταξύ χημικών ενώσεων και τη θερμική επεξεργασία (De-melo et al., 2018). Κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας ή της παρατεταμένης αποθήκευσης, οι ασταθείς ενώσεις μπορεί να οξειδωθούν ή να καταστραφούν. Αποτέλεσμα αυτών είναι η παραγωγή ενώσεων λόγω αντιδράσεων Maillard και αποικοδόμησης Strecker (Jerkovic et al., 2014). Τα σάκχαρα και τα ελεύθερα αμινοξέα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή φουρανίων, πυρανίων και υδροξυμεθυλοφουρφουράλης (Jerkovic et al., 2014). Οι αντιδράσεις αποικοδόμησης Strecker εμφανίζονται μεταξύ αμινοξέων και ενώσεων δικαρβονυλίου και παράγουν αλειφατικές και αρωματικές αλδεϋδες (Manyi-Loh et al., 2011, Kaškonienė et al., 2010). Επιπλέον, διαφορετικές διαδικασίες παραλαβής των αρωματικών ενώσεων και διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα (Consonni et al., 2015). Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η τεχνική SPME για την παραλαβή του αρωματικού κλάσματος, έχει πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων που θα δούμε παρακάτω. Αυτό οφείλεται στο ότι είναι μια απλή τεχνική, χωρίς την χρήση διαλυτών, επιτρέποντας τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων και μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο παραλαβής (Pontes et al., 2007).

Παρόλες τις δυσκολίες, η χημική σύσταση του πτητικού κλάσματος, που παραλαμβάνεται με την τεχνική SPME, είναι πιθανό να αποτελεί αποτύπωμα του

προϊόντος και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της προέλευσής του (Radovic et al., 2001). Συγκρίνοντας την βιβλιογραφία υπάρχουν ενώσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να διακρίνουν τα μέλια κουμαριάς από άλλα αμιγή μέλια. Αυτές οι ενώσεις ανήκουν όπως αναφέρθηκε, στην κατηγορία των νορισοπρενοειδών.

Γ.4 Εκχύλιση πτητικών συστατικών μελιού κουμαριάς και ανάλυση με GC-MS

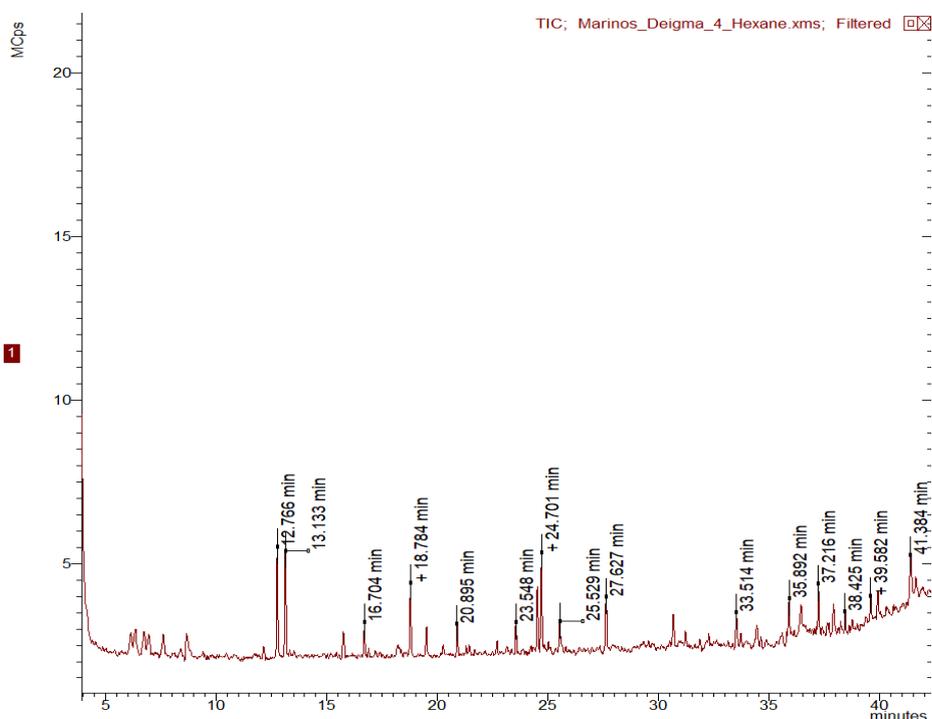
Η εκχύλιση των πτητικών συστατικών του μελιού κουμαριάς έγινε με την τεχνική της εκχύλισης υγρού - υγρού. Η ανάλυση των ουσιών έγινε με GC-MS (Scion 436-GC/MS, Bruker). Η ταυτοποίηση των ουσιών στα δείγματα μελιού έγινε με τη σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και των φασμάτων μαζών με αυτά που υπάρχουν καταχωρημένα στις βιβλιοθήκες του GC-MS (Nist, Adams, Excalibur). Οι αεριοχρωματογραφικές συνθήκες και οι συνθήκες του φασματομέτρου μαζών περιγράφονται στο υποκεφάλαιο Γ.3.1.2.

Γ.4.1 Πειραματική πορεία

Η εκχύλιση των πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε με την χρήση δυο διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης, της ισοπροπανόλης και του εξανίου. Αρχικά, ζυγίστηκαν 5,0 g μελιού σε φιαλίδιο των 50 mL και προστέθηκαν 6 mL απιονισμένου νερού με αριθμημένο σιφόνιο. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε καλά και στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL ισοπροπανόλης. Επιπλέον, προστέθηκαν 6,0 g άνυδρου θειϊκού μαγνησίου ($MgSO_4$), σε μικρές δόσεις, με σκοπό τη δέσμευση νερού. Το φιαλίδιο ψύχθηκε σε λουτρό κρύου νερού. Ακολούθησε ανάμιξη για 30 s χρησιμοποιώντας ανοξείδωτη σπάτουλα για να επιτευχθεί ένα ομοιογενές ελαιώδη. Ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος για 5 min στις 3000 rpm με σκοπό τον διαχωρισμό των δύο φάσεων. Η άνω φάση της ισοπροπανόλης μεταφέρθηκε σε άλλο φιαλίδιο. Το εκχύλισμα ξηράνθηκε επιπλέον με άνυδρο $MgSO_4$. Ομοίως, έγινε η εκχύλιση με διαλύτη το εξάνιο με τη διαφοροποίηση ότι δεν προστέθηκαν τα 6,0 g $MgSO_4$. Το εκχύλισμα της ισοπροπανόλης καθαρίστηκε με μη πολικά φίλτρα (PTFE), ενώ το εκχύλισμα του εξανίου με πολικά (PTFE). Στη συνέχεια αναλύθηκαν με GC-MS.

Γ.4.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στις Εικόνες 15 και 16 φαίνονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα GC-MS δειγμάτων μελιού κουμαριάς. Τα χρωματογραφήματα παρουσιάζουν διαφορές στην ένταση και στο εύρος των κορυφών. Οι κυριότερες κορυφές που αποδοθήκαν στα πτητικά συστατικά παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 4 και 5.

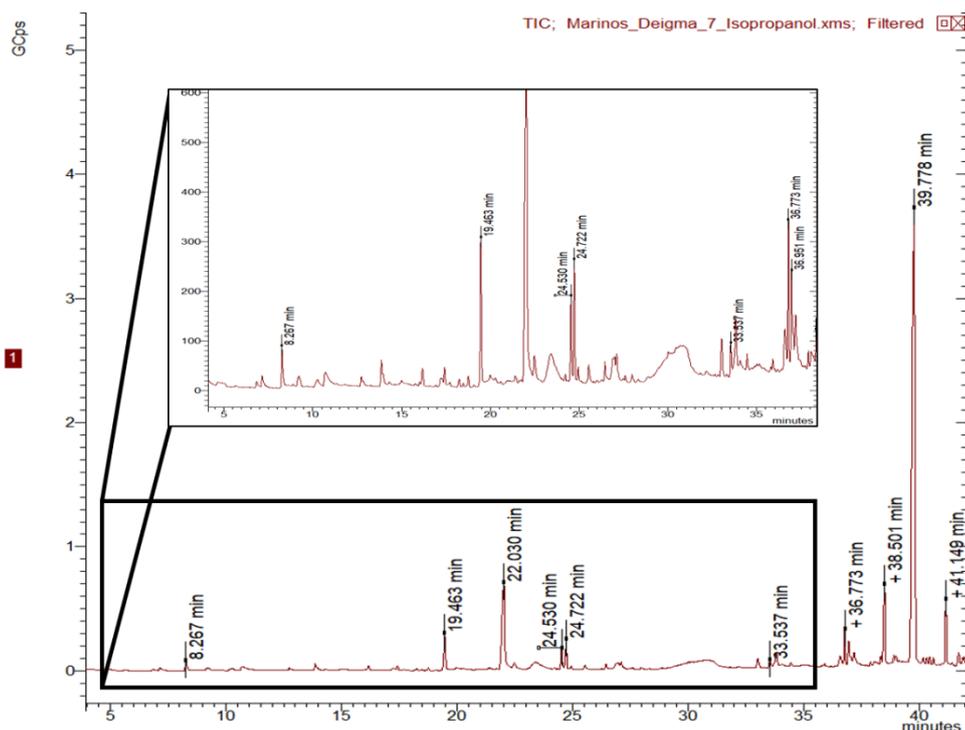


Εικόνα 15: Αεριοχρωματογράφημα πτητικών συστατικών δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς, του κλάσματος του εξανίου.

Πίνακας 4: Πτητικά συστατικά μελιών κουμαριάς του κλάσματος εξανίου.

	Χρόνος συγκράτησης (min)	Εμβαδόν κορυφής	Σχετικό Εμβαδόν (%)
3-εξανόνη	6,155	5371000,00	1,27
2-εξανόνη	6,362	6760000,00	1,59
3-εξανόλη	6,746	5455000,00	1,29
2-εξανόλη	6,955	4746000,00	1,12
2,4-διμεθυλοεξάνιο	7,618	4702000,00	1,11
4-μεθοξυ-2-πεντανόνη	8,674	6435000,00	1,52
2,3-διμεθυλοεξάνιο	10,040	905814,00	0,21
οκτανάλη	10,376	1012000,00	0,24
4-καρένιο	12,152	1951000,00	0,46
1-αιθυλοβουτυλιοϋδροπεροξειδίο	12,766	15260000,00	3,60
1-μεθυλοπεντυλιοϋδροπεροξειδίο	13,133	14940000,00	3,52
2-αιθυλο-1-εξανόλη	15,761	5560000,00	1,31
ενδεκάνιο	16,704	4370000,00	1,03

2-προπυλο-1-επτανόλη	18,217	2584000,00	0,61
2,6-διμεθυλο-1,7-οκταδιενιο-3,6-διόλη	18,272	714769,00	0,17
α-ιζοφορόνη	18,783	9837000,00	2,32
2,6,6-τριμεθυλο-2-κυκλοεξεν-1,4-διόνη	19,503	3858000,00	0,91
3-υδροξυ-δωδεκανοϊκό οξύ	20,162	363606,00	0,09
2,2,6-τριμεθυλο- 1,4-κυκλοεξανοδιόνη	20,265	1306000,00	0,31
3,7-διμεθυλο- 1,5,7-οκτατριεν-3-όλη	20,895	4097000,00	0,97
2-οκτυν-1-όλη	21,449	1789000,00	0,42
1,3-δισ (1,1-διμεθυλαιθυλο)-βενζόλιο	22,697	1708000,00	0,40
δεκαπεντάνιο	23,548	3679000,00	0,87
3,3,6-τριμεθυλοδικυκλο [3.1.0] εξαν-2-όνη,	24,512	9214000,00	2,17
3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη	24,701	14920000,00	3,52
2-μεθυλο-2- (3-μεθυλο-2-οξοβουτύλιο)-1-κυκλοεξανόνη	25,529	6995000,00	1,65
2,6,6-τριμεθυλο-1-κυκλοεξενιο-1-καρβοξυαλδεϋδη,	26,985	840251,00	0,20
δεκαεπτάνιο	27,627	8462000,00	1,99
5-μεθυλοδεκαοκτάνιο	29,323	1972000,00	0,47
δεκαεξάνιο	30,661	6478000,00	1,53
3,5-δισ (1,1-διμεθυλαιθυλο) -φαινόλη	31,213	2917000,00	0,69
δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	31,857	1821000,00	0,43
(3-δεκανυλο)- βενζόλιο	33,144	1661000,00	0,39
(1α,2,3,5,6α,6β-εξυδρο)-3,3,6α-τριμεθυλοοξινερο- [g]βενζοφουραν-5-υλο)-αιθιόνη	33,513	5868000,00	1,38
(1α,2,3,5,6α,6β-εξυδρο)-3,3,6α-τριμεθυλοοξινερο- [g]βενζοφουραν-5-υλο)-αιθανόνη	33,713	2921000,00	0,69
φθαλικός διβουτυλεστέρας	33,972	1238000,00	0,29
(1-βουτυλοεπτυλο) -βενζόλιο	35,587	3933000,00	0,93
1- (2,4,5-τριμεθυλοφαινυλο) -αιθανόνη	35,785	1693000,00	0,40
3-οξο-α-ιονόνη	35,892	6940000,00	1,64
2-μεθυλοδεκαεξανόλη	36,129	2888000,00	0,68
3-ενδεκανυλοβενζόλιο	36,433	10870000,00	2,56
4-δεκαοκτενάλη	36,555	2424000,00	0,57
11- (1-αιθυλοπροπυλο)-εικοσάνιο	37,139	1368000,00	0,32
(1,3,3-τριμεθυλοεννιαυλο)- βενζόλιο	37,215	7643000,00	1,80
(1-πεντυλοεπτυλο)- βενζόλιο	37,623	1991000,00	0,47
(1-βουτυλοκτυλο)- βενζόλιο	37,698	1566000,00	0,37
(1-αιθυλοδέκυλο) - βενζόλιο	38,229	1820000,00	0,43
4-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλο-4- (3-οξο-1-βουτενυλο) - 2- κυκλοεξεν-1-όνη	38,425	3019000,00	0,71
(1-μεθυλοδεκυλο)- βενζόλιο	38,749	2235000,00	0,53



Εικόνα 16: Αεριοχρωματογράφημα πτητικών συστατικών δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς, του κλάσματος της ισοπροπανόλης.

Πίνακας 5: Πτητικά συστατικά μελιών κουμαριάς του κλάσματος ισοπροπανόλης.

	Χρόνος ελκούσης (min)	Εμβαδόν κορυφής	Εμβαδόν επι τις εκατό του συνόλου (%)
2,3-βουτανοδιόλη, ισομερές 1	6,837	75940000	0,1
2,3-βουτανοδιόλη, ισομερές 2	7,144	168600000	0,21
φουρφουράλη	8,267	452900000	0,58
2-φουρανομεθανόλη	9,234	213100000	0,27
2-μεθοξυαιθανόλη	10,273	194800000	0,25
1,3-διδροξυπροπανόνη	10,712	417200000	0,53
2,4,5-τριμεθυλο- 1,3-διοξολάνη	12,735	95660000	0,12
1-(1-μεθυλαιθοξυ)-βουτάνιο	12,845	61520000	0,08
μεθυλομηλονικό οξύ	13,864	261900000	0,33
2,4-διδροξυ-2,5-διμεθυλο-3 (2H) -φουραν-3-όνη	13,966	153600000	0,2
τετρονικό οξύ	14,303	65680000	0,08
διδρο-3-υδροξυ-4,4-διμεθυλο-2 (3H) -φουρανόνη,	16,020	33520000	0,04
2-φαινυλοακεταλδεΐδη	16,177	214200000	0,27
cis-οξείδιο της λιναλοόλης	17,209	99460000	0,13
3-υδροξυ-2-μεθυλο- 4H-πυραν-4-όνη	17,277	64690000	0,08
1-(φουραν-2-υλο)-2-υδροξυαιθαν-1-όνη	17,422	163500000	0,21
3,7-διμεθυλο-1,5,7-οκτατριεν-3-όλη	18,246	90090000	0,11
α-ισοφορόνη	18,767	122900000	0,16
2,3-διδρο-3,5-διδροξυ-6-μεθυλο- 4H-πυραν-4-όνη	19,463	1447000000	1,84

βενζοϊκό οξύ	19,997	84470000	0,11
βενζυλοϊσοβουτυλο κετόνη	21,732	19790000	0,03
5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη	22,030	6694000000	8,49
1-μεθοξυ-4-προπυλοβενζόλιο	24,215	85240000	0,11
3,3,6-τριμεθυλοδικυκλο [3.1.0]- εξαν-2-όνη	24,530	761500000	0,97
2,4,6-τριμεθυλοφαινόλη	24,721	1029000000	1,31
2,6-διμεθυλο- 7-οκτεν-2-όλη,	24,946	1679000000	0,21
2-μεθυλο-2- (3-μεθυλο-2-οξοβουτυλο)-κυκλοεξανόνη	25,537	243500000	0,31
2,5-διμεθυλο-2- (1-μεθυλαιθενυλο) - κυκλοεξανόνη	26,453	309300000	0,39
2-αιθυλο-5-μεθυλο- 1,4-διοξάνιο	26,905	409400000	0,52
1-μεθυλο-4- (1-μεθυλοαιθυλενυλο) - 1,2-κυκλοεξανοδιόλη	26,984	284000000	0,36
trans- οξείδιο της λιναλοόλης	27,103	469800000	0,6
2,5-διυδροξυβενζαλδεΐδη	27,476	60970000	0,08
α-προπυλοβενζοαιθανόλη	27,597	81070000	0,1
α-αιθυλοβενζολοαιθανόλη	27,976	120800000	0,15
4-υδροξυβενζολοαιθανόλη	28,325	58210000	0,07
4-μεθοξυβενζολοξικό οξύ	30,457	612300000	0,78
α-υδροξυ-4-μεθοξυακετοφαινόνη	32,154	270200000	0,34
4-μεθοξυφαινυλαιθυλενογλυκόλη	33,021	496200000	0,63
1-φαινυλιο- 1,2-αιθανοδιόλη	33,298	37310000	0,05
(1a,2,3,5,6a,6b-εξαΰδρο)-3,3,6a-τριμεθυλοξινερο-[g]βενζοφουραν-5-υλο)-αιθανόνη	33,537	335100000	0,43
2,5-διυδροξυβενζολοξικό οξύ	33,823	1023000000	1,3
6- (5-μεθυλο-φουραν-2-υλο) -2-εξανόνη	34,452	334100000	0,42
5- (1-υδροξυ-2-προπενυλ) -2,2-διμεθυλοκυκλοεξανόνη	35,008	171900000	0,22
1,3-δισ (1-μεθυλαιθυλο) - βενζόλιο	35,799	93480000	0,12
3-οξο-α-ιονόνη	35,901	139600000	0,18
1-ισοβουτυλο-7,7-διμεθυλοκταΰδροϊσοβενζοφουραν-3α-όλη	36,583	727900000	0,92
2-μεθοξυ-α,5-διμεθυλοβενζοακεταλδεΐδη	36,774	1319000000	1,67
1-ισοβουτυλο-7,7-διμεθυλοκταΰδροϊσοβενζοφουραν-3α-1-όλη	37,184	1077000000	1,37
2-μεθοξυ- 5-διμεθυλοβενζοακεταλδεΐδη	37,627	72910000	0,09
1-ισοβουτυλο-7,7-διμεθυλοκταΰδροϊσοβενζοφουραν-3α-όλη	37,895	214700000	0,27
2-μεθυλο-4-(1,3,3-τριμεθυλο-7-οξαδικυκλο[4.1.0]-2-επτανυλο)-3-βουτεν-2-όλη.	38,343	410800000	0,52
5,5,8a-τριμεθυλο-3,5,6,7,8,8a-εξαΰδρο-2H-χρωμόνιο	38,501	3641000000	4,62
4- (2,6,6-τριμεθυλο-κυκλοεξ-1-ενυλο) -2-βουτανόλη	38,916	421800000	0,54
2,4,5,6,7,7a-εξαΰδρο-4,4,7a-τριμεθυλο- 1H-ινδεν-1-όλη	38,999	435700000	0,55
3-μεθυλο-4- (1,3,3-τριμεθυλο-7-οξαδικυκλο [4.1.0]- επταν-1-υλο) -3-βουτεν-2-όνη	39,779	32190000000	40,84
4- (1,3,3-τριμεθυλ-7-οξαδικυκλο [4.1.0]- επτ-2-υλο) - 2-πεντανόνη	40,174	477800000	0,61
εξαδεκανοϊκό οξύ	40,318	330500000	0,42
6-βουτυλο-3-μεθοξυ- 2-κυκλοεξεν-1-όνη	41,151	2457000000	3,12
αμπισισικό οξύ	41,914	555600000	0,71

Από την ανάλυση του εκχυλίσματος μελιού κουμαριάς που προέκυψε από το κλάσμα εξανίου ανιχνευθήκαν 269 πτητικές ουσίες. Οι περισσότερες από αυτές ήταν σε ίχνη, με αποτέλεσμα να δυσκολέψει αρκετά η ταυτοποίηση τους. Από αυτές, οι 54 ουσίες ταυτοποιήθηκαν και αποτελούν περίπου το 60% του συνολικού εμβαδού, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.

Αντίστοιχα, από το κλάσμα της ισοπροπανόλης ανιχνεύθηκαν 108 πτητικές ουσίες. Από αυτές, οι 65 ουσίες ταυτοποιήθηκαν και αποτελούν περίπου το 82% του συνολικού εμβαδού, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.

Τα κύρια συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα μελιού κουμαριάς από το κλάσμα εξανίου ήταν το 1-αιθυλοβουτυλοδρωπεροξείδιο σε ποσοστό επί του συνόλου (3,60%), το 1-μεθυλοπεντυλοδρωπεροξείδιο (3,52%), η 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη (3,52%), το (1-αιθυλονυλο)-βενζόλιο (2,56%), η α-ιζοφορόνη (2,32%), η 3,3,6-τριμεθυλοδικυκλο[3.1.0]-2-εξανόνη (2,17%), (1,3,3-τριμεθυλο-εννεανυλο)-βενζόλιο (1,80%), και η 3-οξο-α-ιονόνη (1,64%).

Στο κλάσμα της ισοπροπανόλης τα κύρια συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ήταν η 1,3,3-τριμεθυλο-7-οξαδικυκλο-[4.1.0]-επτανο-2,5-διόνη (40,84%), η 5-υδροξυ-μεθυλοφουρφουράλη (8,49%), η 5,5,8a-τριμεθυλο-3,5,6,7,8,8a-εξαϋδρο-2H-χρωμόνιο (4,62%), η 6-βουτυλο-3-μεθοξυ-2-κυκλοεξεν-1-όνη (3,12%), η 2,3-διϋδρο-3,5-διϋδροξυ-6-μεθυλο-4H-πυραν-4-όνη (1,84%), η 2-μεθοξυ-α,5-διμεθυλοβενζοακεταλδεΐδη (1,67%), η 1-ισοβουτυλο-7,7-διμεθυλο-οκταϋδρο-ισοβενζοφουραν-3α-όλη (1,37%), η 2,4,6-τριμεθυλοφαινόλη (1,31%) και το 2,5-διϋδροξυφαινυλοξικό οξύ (1,30%).

Πολλές από τις σημαντικότερες πτητικές ουσίες των μελιών κουμαριάς που ταυτοποιήθηκαν έχουν αναφερθεί και σε άλλα μέλια. Ως χαρακτηριστικές πτητικές ενώσεις του μελιού ευκαλύπτου αναφέρθηκαν η εννιανάλη και η 3-οξο-α-ιονόλη (Piasenzotto et al., 2002). Το αμψισικό οξύ έχει βρεθεί σε διάφορα μέλια. Στο μέλι από ιτιά υπήρχαν κάποια νορισοπρενοειδή, ενώ κυρίαρχα συστατικά ήταν δύο ισομερή του αμψισικού οξέος, το trans, cis- και το trans, trans- αμψισικό οξύ. (Tan et al., 1989, Yao et al., 2004). Η δεϋδροβομιφολιόλη [4-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλο-4-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλο)κυκλοεξ-2-εν-1-όνη], ένα νορισοπρενοειδές, είναι χαρακτηριστική ένωση του μελιού ερείκης της Νέας Ζηλανδίας, (*Calluna vulgaris*) (Guyot et al., 1999), ενώ υπάρχει και σε πολύ μικρότερες ποσότητες και στο μέλι ευκαλύπτου (D' Arcy et al., 1997). Το μέλι από θυμάρι της Νέας Ζηλανδίας χαρακτηρίζεται από την (E)-4-(1,2,4-τριϋδροξυ-2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξυλο)-3-βουτεν-2-όνη (Broom et al., 1992).

Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πτητικών συστατικών του μελιού εξαρτώνται κατά πολύ από τις τεχνικές παραλαβής και ταυτοποίησης. Γενικότερα θα πρέπει να αναφερθεί πως η παραλαβή των πτητικών συστατικών από το μέλι είναι πολύ δύσκολη λόγω της φύσης του. Προσπάθειες παραλαβής των συστατικών της γεύσης του μελιού έχουν γίνει με απόσταξη (Dörrscheidt & Friedrich, 1962), απόσταξη υπό κενό (Hoopen & Ten, 1963) ή εκχύλιση με κάποιο διαλύτη (Merz, 1963). Από την άλλη, έχουν το σημαντικό μειονέκτημα ότι δημιουργούνται παραπροϊόντα λόγω της θέρμανσης. Αυτά εμφανίζονται σαν συστατικά του αρώματος του μελιού, όμως δε σχετίζονται με τη βοτανική πηγή προέλευσης αυτού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, ήταν η ανίχνευση φουρυλο-παραγώγων, όπως η 5-υδροξυ-μεθυλοφουρφουράλη (5-HMF) σε υψηλό ποσοστό, στα μέλια κουμαριάς που αναλύθηκαν. Έτσι, παρότι αποτελούν πτητικά συστατικά του μελιού δε μπορούν να θεωρηθούν δείκτες της πηγής προέλευσης αυτού.

Πιο σύγχρονες, μη καταστρεπτικές μεθόδους παραλαβής ακολούθησαν νεότερες ερευνητικές μελέτες. Η εκχύλιση υγρού/ υγρού και η εκχύλιση με προσροφητική στήλη ήταν κάποιες από αυτές (Piotr M. Ku's et al., 2018; Izabela Jasicka- Misiak et al., 2018). Μια εμπειριστωμένη μελέτη έγινε αναφορικά με την παραλαβή των νορισοπρενοειδών (Guyot-Declerck et al., 2002). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πορώδες υλικό Amberlite XAD-16, το οποίο αποδείχτηκε πολύ αποτελεσματικό στην προσρόφηση πολικών ουσιών, όπως είναι τα νορισοπρενοειδή, από ένα υλικό τόσο πλούσιο σε σάκχαρα, όπως είναι το μέλι.

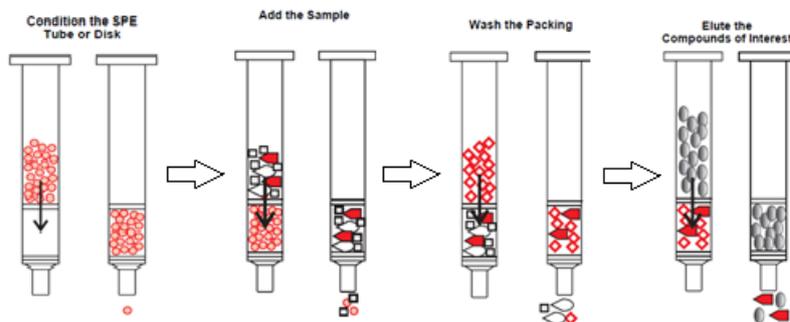
Μια προσεκτική ανάλυση των πτητικών ουσιών του μελιού μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τον καθορισμό της βοτανικής πηγής προέλευσης. Ουσίες χαρακτηριστικές για τα αμιγή μέλια έχουν βρεθεί. Όμως, το προφίλ των αρωματικών συστατικών του μελιού θα πρέπει να συνδυάζεται και με ανάλυση άλλων συστατικών αυτού, καθώς και με γυρεοσκοπική μελέτη.

Γ.5 Χρωματογραφική μελέτη φαινολικών συστατικών μελιών κουμαριάς με LC-QTOF-HRMS

Για την πραγματοποίηση της εκχύλισης και ανάλυσης των φαινολικών συστατικών του μελιού διεξήχθησαν δοκιμές από τα αποτελέσματα των οποίων οριστικοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE) και ανάλυσης με LC-QTOF-HRMS.

Γ.5.1 Πειραματική πορεία

Από το κάθε δείγμα παρελήφθησαν 30 g μελιού και διαλύθηκαν σε 10 mL υπερκάθαρου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή 2 με υδροχλωρικό οξύ 0,1 M. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε λουτρό υπέρηχων για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό για να απομακρυνθούν τυχόν στερεά σωματίδια που υπάρχουν πολλές φορές στο μέλι. Ακολούθησε η παραλαβή των φαινολικών συστατικών με χρήση της τεχνικής της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Οι στήλες ήταν Isolute C18 (EC) 2 g/15 mL συζευγμένες με αντλία κενού (Εικ.17 και 18). Αρχικά οι στήλες ενεργοποιήθηκαν με 3 mL ακετονιτρίλιο και 9 mL υπερκάθαρου νερού. Έπειτα τοποθετήθηκε το δείγμα μελιού, στην συνέχεια ξεπλύθηκε κάθε στήλη με 12 mL οξινισμένου νερού με σκοπό να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και άλλα πολικά συστατικά. Τα φαινολικά συστατικά παρελήφθησαν με 1,5 mL ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα των φαινολικών καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα Millex-LCR (PTFE) 0,45 μm και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι την ανάλυση του.



Εικόνα 17: Σύστημα SPE.



Εικόνα 18: Εκχύλιση των φαινολικών συστατικών του μελιού κουμαριάς με SPE.

Η χημική ανάλυση των φαινολικών ενώσεων μετά την εκχύλιση με SPE πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης (HPLC) συζευγμένου με φασματόμετρο μαζών (Χρόνου πτήσης) (QTOF-MS) της εταιρίας Agilent Series 1260), (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Εικ. 18).

- Στήλη αντίστροφης φάσης Supelco Discovery HS C18 (μήκος 250 mm, διάμετρος 4 mm και πάχος επένδυσης 5 μm)
- Σύστημα διαλυτών: Οξινοσμένο (φορμικό οξύ) νερό 0,1% LC-MS (διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο LC-MS (διαλύτης B).
- Πρόγραμμα έκλουσης: 0-20 min, 10-30 % διαλύτης (B), 20- 30 min, 30-40% διαλύτης (B), 30- 40 min, 40- 50% διαλύτης (B), 40- 45 min 50- 10% διαλύτης (B), 45- 60 min 10% ο διαλύτης (B).
- Όγκος ένεσης 5 μL
- Ο ρυθμός ροής 1 mL/min
- Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 280, 340, 360 και 520 nm.

Οι συνθήκες λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών ήταν:

- Τεχνική ηλεκτροψεκασμού (ESI) σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού
- Τριχοειδής τάση 3000 V
- Πίεση εκνεφωτή 2 bar (N_2)
- Αέριο ξήρανσης 8 L/ min (N_2) και θερμοκρασία ξήρανσης 200 $^{\circ}\text{C}$.

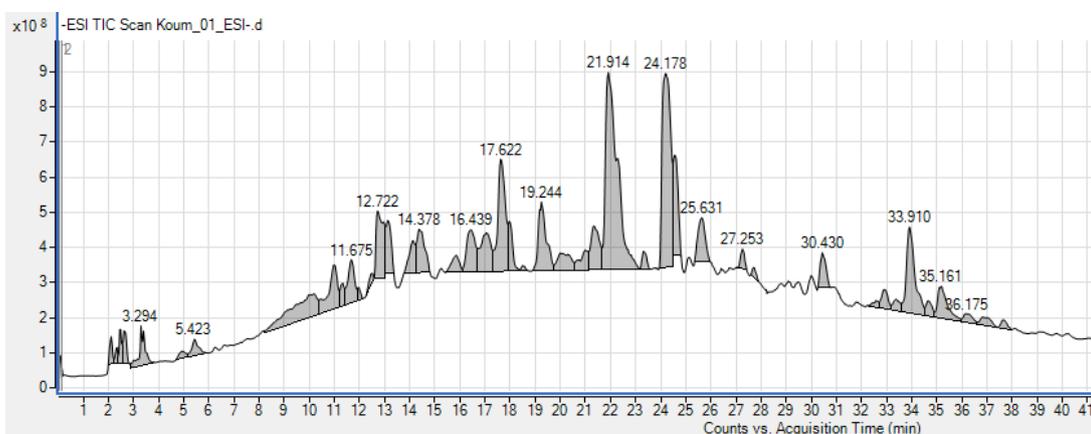


Εικόνα 19: Υγρός χρωματογράφος υψηλής πίεσης συζευγμένος με φασματόμετρο μαζών.

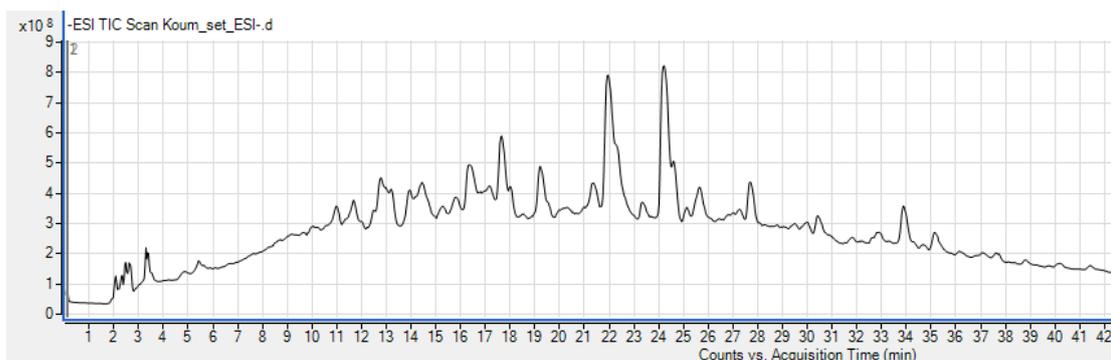
Γ.5.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Η τεχνική SPE έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων παραλαβής, καθώς παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα εκχύλισης των φαινολικών συστατικών. Επιπλέον, γίνεται χρήση μικρής ποσότητας διαλυτών.

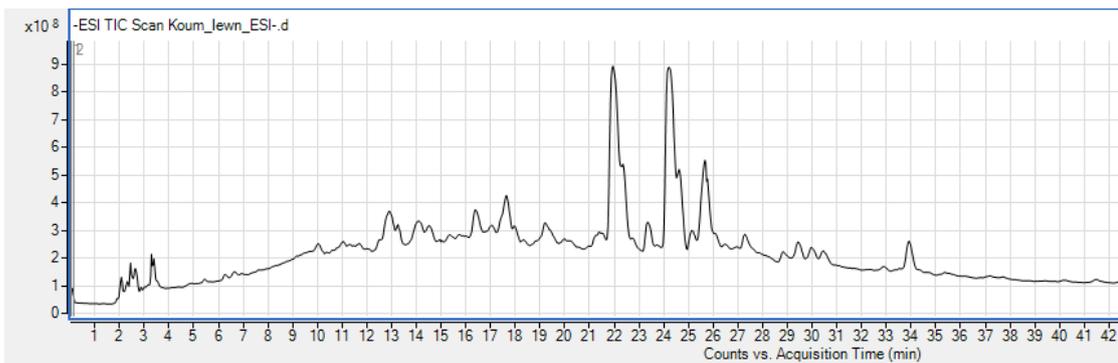
Στις Εικόνες 20, 21, 22, 23 φαίνονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα. Παρατηρούμε ότι τα χρωματογραφήματα δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Τα φαινολικά συστατικά που απομονώθηκαν από τα μέλια κουμαριάς παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6, ενώ περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα φάσματα μαζών υπάρχουν στο Παράρτημα 1.



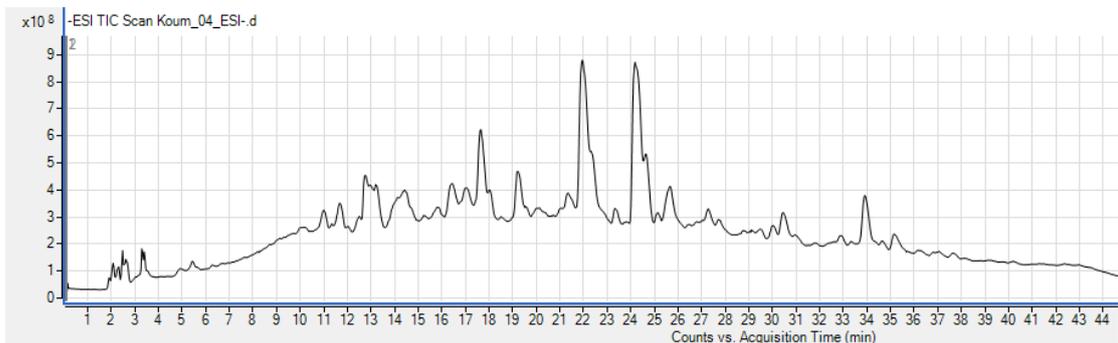
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.



Εικόνα 21: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-σεττ-2) μελιού κουμαριάς, από την περιοχή της Σέττας.



Εικόνα 22: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-λεω-3) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου.



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα του δείγματος (κουμ-αττ-4) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής.

Πίνακας 6: Φαινολικά συστατικά μελιών κουμαριάς.

No	Φαινολικά συστατικά	Χρόνος έκλουσης	Μοριακός τύπος, [M-H] ⁻	Πειραματικό [M-H] ⁻	Θεωρητικό [M-H] ⁻	Δ / ppm	Score
1	γαλλικό οξύ	3,476	C ₇ H ₆ O ₅	169,0137	170,0210	-3,24	78,37
2	βανιλικό οξύ	4,929	C ₈ H ₈ O ₄	167,0348	168,0421	-1,08	99,73
3	ομογεντιστικό οξύ	5,436	C ₈ H ₈ O ₄	167,0346	168,0419	-2,02	99,27
4	πρωτοκατεχικό οξύ	7,97	C ₇ H ₆ O ₄	153,0267	154,0267	0,86	84,75
5	σαλικιλικό οξύ	9,66	C ₇ H ₆ O ₃	137,0242	138,0315	-0,80	96,92
6	γεντιστικό οξύ	10,268	C ₇ H ₆ O ₄	153,0189	154,0262	-2,63	85,41
7	υδροξυτυροσόλη	12,059	C ₈ H ₁₀ O ₃	153,0557	154,0630	0,16	87,57
8	τυροσόλη	12,836	C ₈ H ₁₀ O ₂	183,0661	138,0678	-2,20	86,86
9	π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	13,715	C ₇ H ₆ O ₃	137,0242	138,0315	-1,23	99,79
10	κατεχίνη	14,357	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0719	290,0792	0,62	85,58
11	φουρουλικό οξύ	14,560	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193,0503	194,0575	-2,07	81,99
12	π-κουμαρικό οξύ	14,627	C ₉ H ₈ O ₃	163,0399	164,0474	0,28	80,42
13	βανιλίνη	17,060	C ₈ H ₈ O ₃	152,0398	152,0476	1,93	99,25
14	γλυκοζίδιο του κουμαρικού οξέος	17,398	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325,0930	326,1003	0,27	85,07
15	αιθυλική βανιλίνη	17,872	C ₉ H ₁₀ O ₃	165,0556	166,0630	0,14	86,17
16	συριγγικό οξύ	18,074	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0457	198,0530	0,87	86,55
17	2-(1,2-διυδροξυπροπυλο)-4,8,8-τριμεθυλο-1-οξασπιρο[2.5]οκτεν-4-εν-6-όνη	19,257	C ₁₃ H ₂₀ O ₄	299,1489	240,1351	-4,46	96,15
18	αμπισισικό οξύ	24,191	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,1278	264,1351	-4,11	95,38
19	κουερσετίνη	25,509	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0357	302,0430	1,14	84,93
20	μεθυλεστέρας του π-κουμαρικού οξέος	26,962	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	177,0554	178,0626	-2,29	85,96
21	κινναμικό οξύ	27,671	C ₉ H ₈ O ₂	147,0449	148,0523	-0,94	84,28
22	απιγενίνη	29,395	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0461	270,0535	2,59	79,18
23	ισορχαμετίνη	30,206	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315,0520	316,0593	3,23	81,22
24	καμφερόλη	30,442	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0398	286,0472	-2,01	83,34
25	ναριγενίνη	30,645	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0613	272,0688	1,13	82,85
26	ραμνετίνη	31,152	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315,0517	316,0590	2,20	82,94
27	κωνοφεριλυκή αλδεϋδη	33,923	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177,0551	178,0624	-3,33	81,95
28	χρυσίνη	40,107	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253,0502	254,0575	-1,52	98,59
29	πινοσεμπρίνη	41,459	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255,0661	256,0733	-0,85	85,62
30	γαλανγίνη	41,763	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0451	270,0524	-1,57	84,2

Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν μια σημαντική ομάδα ενώσεων, η οποία περιλαμβάνει πολλές ουσίες που έχουν αναγνωρισθεί ως δείκτες της βοτανικής προέλευσης αμιγών μελιών. Οι συγκεντρώσεις τους στα μέλια και ειδικά στην κουμαριά εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος των ανθέων ή των μελιτωδών

εκκρίσεων, της υγείας των φυτών συλλογής, της γεωγραφικής προέλευσης και των κλιματικών χαρακτηριστικών.

Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στο μέλι δεν βρίσκονται, συνήθως, υπό την μορφή γλυκοζιτών. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες υπόκεινται το μέλι. Συγκεκριμένα, ορισμένοι φλαβονοειδείς γλυκοζίτες δεν είναι σταθεροί και αποικοδομούνται υπό ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες (Truchado et al. 2008). Επιπλέον, είναι ευαίσθητοι στην οξείδωση, παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου που υπάρχει στο μέλι (Escriche et al. 2014).

Η απομόνωση των φαινολικών συστατικών από μέλι έχει απασχολήσει αρκετά, λόγω της φύσης του. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η αυξημένη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων θα πρέπει να απομακρυνθούν τυχόν δυνητικά παρεμποδιστικές ενώσεις, ιδίως σάκχαρα και άλλα πολικά συστατικά (Ciulu et al., 2016). Η απομόνωση των φαινολικών συστατικών πραγματοποιείται με εκχύλιση υγρού-υγρού (Kečkež et al. 2013). Πρόσφατα, διάφοροι συγγραφείς έχουν χρησιμοποιήσει μικρο-εκχύλιση υγρού-υγρού, επιτυγχάνοντας ανακτήσεις υψηλότερες από 70% (Camprone et al. 2014; Campillo et al. 2015). Υπάρχουν επίσης παραδείγματα στη βιβλιογραφία που περιγράφουν τη χρήση εκχύλισης με υπερήχους (Biesaga και Pyrzyńska, 2013). Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι ένας από τους πιο δημοφιλείς τρόπους απομόνωσης φαινολικών συστατικών από το μέλι. Η διέλευση του μελιού από τη στήλη ρητίνης, απομακρύνει τα σάκχαρα και άλλα πολικά συστατικά, ενώ επιτρέπει την εκλεκτική εκχύλιση των φαινολικών συστατικών (Michalkiewicz et al., 2008; Truchado et al., 2015).

Η βοτανική προέλευση των μελιών μπορεί να επηρεάσει το προφίλ των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών και επιτρέπει την διάκριση τους λόγω της επικράτησης ορισμένων συστατικών. Σε ελληνικά μέλια έχουν απομονωθεί φαινολικά συστατικά, όπως βενζοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ, 3-υδροξυβενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, προτοκατεχικό οξύ, συριγγικό οξύ, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, φαινυλοξικό οξύ, κουμαρικό οξύ (Tsiapara et al., 2009; Melliou & Chinou, 2011; Karabagias et al., 2014; Spilioti et al., 2014). Επίσης, κάποια φαινολικά προέρχονται από την πρόπολη. Η πινοκεμπρίνη, η πινομπανκσίνη και η χρυσίνη, που συχνά απαρτίζουν το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού δυναμικού των φλαβονοειδών στα μέλια είναι συστατικά της πρόπολης (Martos et al., 1997).

Για την κουμαριά όμως, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στην βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, από τα φαινολικά οξέα, το ομογεντιστικό οξύ (2,5-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ) (Homogentisic Acid, HA) φαίνεται να αποτελεί βοτανικό δείκτη του μελιού από

κουμαριά (Cabras et al., 1999). Είναι υπεύθυνο για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του συγκεκριμένου μελιού (Rosa et al, 2011), ενώ σε μελέτη 25 μελιών κουμαριάς από τη Σαρδηνία, βρέθηκε ότι είναι το πιο άφθονο φαινολικό συστατικό με μέση συγκέντρωση $414 \pm 69,8$ mg/kg εκφρασμένη ως γαλλικό οξύ (GAE) (Tuberoso et al, 2010). Άλλη μελέτη σε εννέα μέλια κουμαριάς από την Κροατία, έδειξε επίσης σε αφθονία το HA με εύρος 314,0-522,0 mg/kg GAE (Lovakovic et al, 2018). Η ουσία αυτή έχει βρεθεί επίσης σε μελέτη 22 μελιών κουμαριάς από τη Σαρδηνία με RP-HPLC (Scanu et al, 2005). Τέλος, σε μελέτη επτά μελιών κουμαριάς από την Κροατία επιβεβαιώθηκε η παρουσία του HA και με τη μέθοδο GC-MS (Karaconji et al, 2017).

Οι ουσίες 2-(1,2-διυδροξυπροπυλο)-4,8,8-τριμεθυλο-1-οξασπιρο[2.5]οκτεν-4-εν-6-όνη (unedone-UD), (\pm)-2-cis, 4-trans- αμπισικό οξύ (c,t-ABA), (+/-)-2-trans,4-trans- αμπισικό οξύ (t,t-ABA) είναι ουσίες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο μέλι κουμαριάς και αποτελούν και αυτές χαρακτηριστικούς χημικούς δείκτες του συγκεκριμένου μελιού. Η UD είναι ένα εποξειδίο παράγωγο των άλλων δύο. Οι συγκεντρώσεις για τις (c,t-ABA), (t,t-ABA), unedone βρέθηκαν σε μελέτη 25 μελιών κουμαριάς από τη Σαρδηνία σε συγκεντρώσεις 176,2 - 162,3 - 32,9 mg/kg αντίστοιχα (Tuberoso et al, 2010).

Γ.6 Φασματοσκοπική μελέτη μελιού κουμαριάς με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR

Γ.6.1 Πειραματική πορεία

Τα FT-IR φάσματα των δειγμάτων μελιού καταγράφηκαν με χρήση της τεχνικής των παραθύρων ZnSe, εις πενταπλούν. Ως φάσμα υποβάθρου (background) χρησιμοποιήθηκε κενό παράθυρο ZnSe. Το φάσμα υποβάθρου καταγραφόταν πριν από τη λήψη των πέντε φασμάτων κάθε δείγματος. Οι παράμετροι λήψης των φασμάτων ήταν: 100 σαρώσεις, διαχωριστική ικανότητα 4 cm^{-1} και ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν $0,3165 \text{ mm/s}$. Στις Εικόνες 24 και 25 φαίνεται το φασματοφωτόμετρο FT-IR (Thermo Nicolet 7600) της εταιρείας Thermo Scientific) και ο υποδοχέας δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

Από τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων, αποκόπηκε η κορυφή του διοξειδίου του άνθρακα, εξομαλύνθηκαν (λειτουργία αυτόματης εξομάλυνσης) και έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής (λειτουργία αυτόματης διόρθωσης). Τέλος, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των φασμάτων κάθε δείγματος. Όλες οι επεξεργασίες των φασμάτων

πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού (OMNIC 9.1) που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο.



Εικόνα 24: Το φασματοφωτόμετρο FT-IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

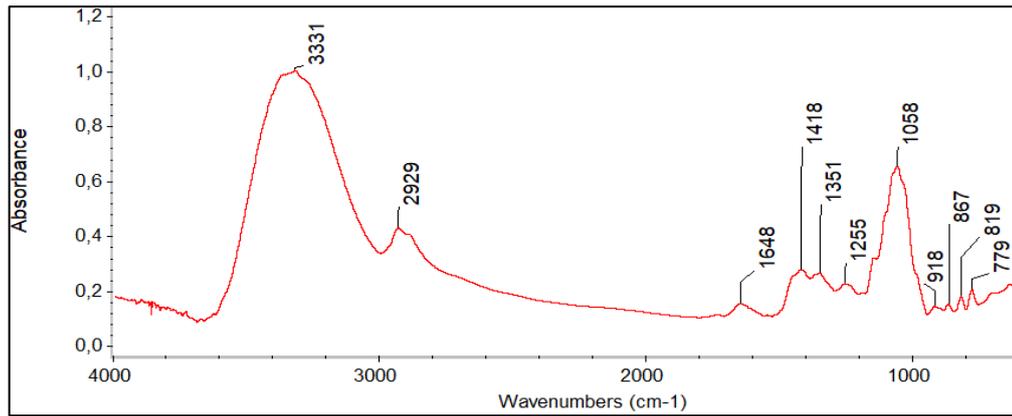


Εικόνα 25: Υποδοχέας δείγματος, παράθυρο ZnSe.

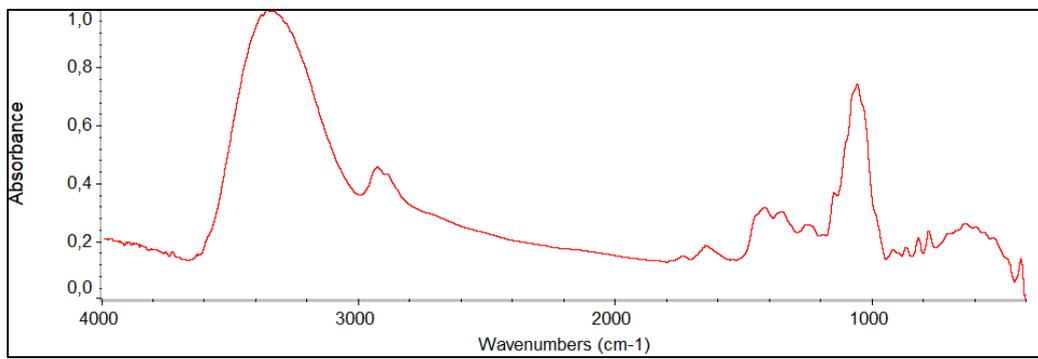
Γ.6.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στις Εικόνες 26, 27, 28 και 29 φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά FT-IR φάσματα δειγμάτων μελιού κουμαριάς. Συγκριτικά παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα παρουσιάζουν παρόμοια υφή, ενώ μικρές διαφορές παρουσιάζονται στην ένταση και στο εύρος των κορυφών.

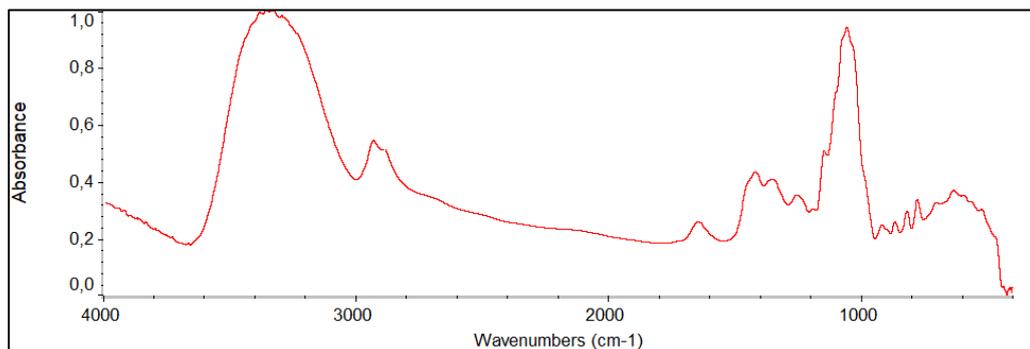
Στον Πίνακα 7 φαίνονται οι αποδόσεις των κορυφών των παραπάνω αντιπροσωπευτικών φασμάτων.



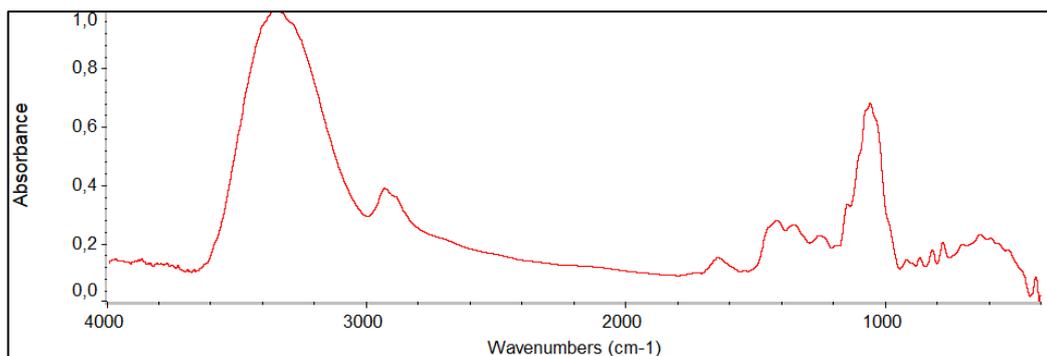
Εικόνα 26: FT-IR φάσμα του δείγματος (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.



Εικόνα 27: FT-IR φάσμα του δείγματος μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Σέττας, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.

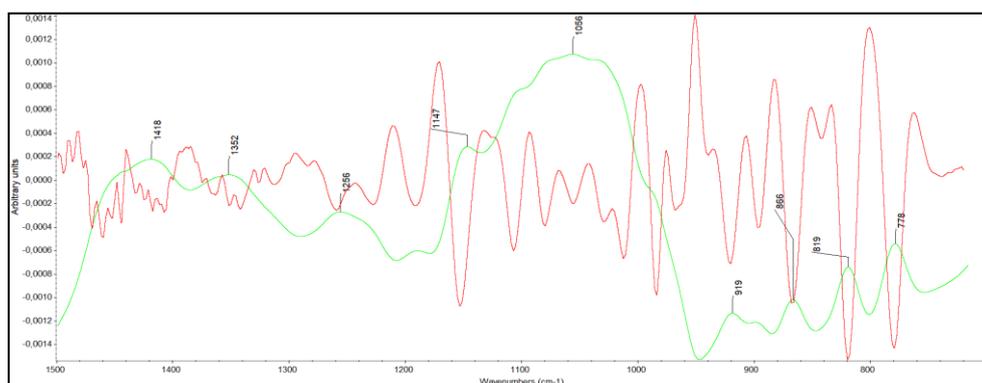


Εικόνα 28: FT-IR φάσμα του δείγματος μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Πελέτας Λεωνιδίου, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.



Εικόνα 29: FT-IR φάσμα του δείγματος (κουμ-απτ-4) μελιού κουμαριάς από την περιοχή της Αττικής, ληφθέντος με την τεχνική παραθύρων ZnSe.

Τα φάσματα FT-IR αποτελούνται από δυο κύριες περιοχές. Η πρώτη περιοχή κυμαίνεται μεταξύ 4000 και 1500 cm^{-1} (περιοχή χαρακτηριστικών ομάδων). Η δεύτερη περιοχή κυμαίνεται μεταξύ 1500-750 cm^{-1} και αποτελεί την περιοχή των «δακτυλικών αποτυπωμάτων», διότι είναι χαρακτηριστική για κάθε δείγμα. Στη περιοχή αυτή απορροφούν πλήθος χημικών ενώσεων, οι οποίες περιέχονται στο μέλι. Επομένως, κάθε παρατηρούμενη κορυφή δεν οφείλεται μόνο σε μια χημική ένωση, αλλά και σε ένα είδος μοριακής δόνησης. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη παράγωγος του φάσματος (Εικ.30). Η δεύτερη παράγωγος αποκάλυψε 11 ελάχιστα τα οποία οφείλονται στην ύπαρξη 11 κορυφών οι οποίες αλληλεπικαλύπτονταν.



Εικόνα 30: Με πράσινο χρώμα φαίνεται η περιοχή 1500-750 cm^{-1} του φάσματος FT-IR, ενώ με κόκκινο χρώμα η δεύτερη παράγωγος του ίδιου φάσματος.

Η κορυφή στα 779 cm^{-1} και στα 819 cm^{-1} αποδόθηκε στην παραμόρφωση του δακτυλίου της φρουκτόζης και στην δόνηση τάσης C-C-H της φρουκτόζης, αντίστοιχα. Επίσης, η κορυφή στα 867 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση τάσης C-C η οποία οφείλεται στην β-φρουκτόζη. Η ασθενής κορυφή στα 918- 927 cm^{-1} αποδόθηκε στην συμμετρική

δόνηση κάμψης του C-H των σακχάρων και κυρίως της γλυκόζης (Lidija Svecnjak *et al.*, 2017). Σε μερικές περιπτώσεις δειγμάτων η απορρόφηση στα 994 cm^{-1} οφείλεται στη σακχαρόζη και συγκεκριμένα σχετίζεται με τη γλυκοζιδική σύνδεση (Lidija Svecnjak *et al.*, 2017). Η κορυφή στα 1058 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση τάσης του C-O του (C-OH) αλλά και του σκελετού των σακχάρων (Ofelia Anjos *et al.*, 2015; Gulzar Ahmad Nayik *et al.*, 2015; Kuan Wei Se *et al.*, 2018). Επιπλέον, η κορυφή στα 1058 cm^{-1} έχει αποδοθεί στην τάση C-O της φρουκτόζης.

Η κορυφή στα 1255 cm^{-1} αντιστοιχεί στην δόνηση κάμψης του $-\text{CH}_2$ της γλυκόζης, στη δόνηση «λίκνισης» του δακτυλίου της φρουκτόζης (Lidija Svecnjak *et al.*, 2017), και στη δόνηση τάσης του C-C του σκελετού των σακχάρων (Ofelia Anjos *et al.*, 2015; Gulzar Ahmad Nayik *et al.*, 2015).

Οι κορυφές στα 1351 cm^{-1} και στα 1418 cm^{-1} αποδόθηκαν στην δόνηση κάμψης του -OH και στην συμμετρική δόνηση του C-O-H. Οι προηγούμενες κορυφές έχουν συνδεθεί με την ύπαρξη φρουκτόζης και γλυκόζης, αντίστοιχα (Lidija Svecnjak *et al.*, 2017). Επιπλέον, η κορυφή στα 1418 cm^{-1} αποδόθηκε και στην δόνηση τάσης του $-\text{CH}_2$ και στην ασύμμετρη τάση του C-H των αλκενίων (Ofelia Anjos *et al.*, 2015; Gulzar Ahmad Nayik *et al.*, 2015).

Οι δύο κορυφές στα 3310 cm^{-1} και στα 1648 cm^{-1} οφείλονται, κυρίως, στην τάση του O-H και στην παραμόρφωση του O-H του νερού, αντίστοιχα. Επίσης, η απορρόφηση στα 2929 cm^{-1} οφείλεται στην τάση του C-H των καρβοξυλικών οξέων και στην τάση του NH_2 των ελεύθερων αμινοξέων (Ofelia Anjos *et al.*, 2015).

Πίνακας 7: Οι βασικές κορυφές του φάσματος FT-IR δείγματος μελιού.

Κυματριθμοί (cm^{-1})	Λειτουργική Ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης
~ 3331	O-H	Σάκχαρα, Νερό, Φαινολικά	Τάση
~ 2929	C-H, C-N	Καρβοξυλικά οξέα, Αμινοξέα	Τάση
~ 1648	O-H	Νερό	Παραμόρφωση
~ 1418	$-\text{CH}_2$, C-H,	Αλκένια	Τάση, Ασύμμετρη τάση
~ 1418	C-O-H	Γλυκόζη	Συμμετρική τάση
~ 1351	O-H (C-OH)	Φρουκτόζη	Κάμψη
~ 1255	$-\text{CH}_2-$	Γλυκόζη, Φρουκτόζη	Εκτός επιπέδου κάμψη
~ 1255	C-C	Αλκένια	Τάση
~ 1147	C-O, C-O-C	Σάκχαρα	Κάμψη, Τάση
~ 1058	C-O (C-OH), C-O	Σκελετός σακχάρων, Φρουκτόζη	Τάση
~ 918	C-H	Σάκχαρα, Γλυκόζη	Συμμετρική κάμψη
~ 867	C-C	Φρουκτόζη	Τάση
~ 819	C-C-H	Φρουκτόζη	Τάση
~ 779	C-C-H	Δακτυλίου φρουκτόζης	Παραμόρφωση

Γ.7 Φασματοσκοπική μελέτη μελιών κουμαριάς με χρήση της φασματοσκοπίας Raman

Γ.7.1 Πειραματική πορεία

Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Vis-Raman DeltaNu (εταιρία Advantage NIR) (Εικ.31) το οποίο συνοδευόταν με το λογισμικό NuSpec. Η πηγή του οργάνου εκπέμπει στα 768 nm. Μικρή ποσότητα μελιού κουμαριάς τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για 20 min με σκοπό την αποκρυστάλλωση των σακχάρων. Στη συνέχεια μέρος του τοποθετήθηκε σε σωλήνες δειγμάτων Widmad WG-SM τύπου NMR tubes 4,97 mm, με πάχος τοιχώματος 0,38 mm και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου πριν την ανάλυση με σκοπό την απομάκρυνση των φυσαλίδων.

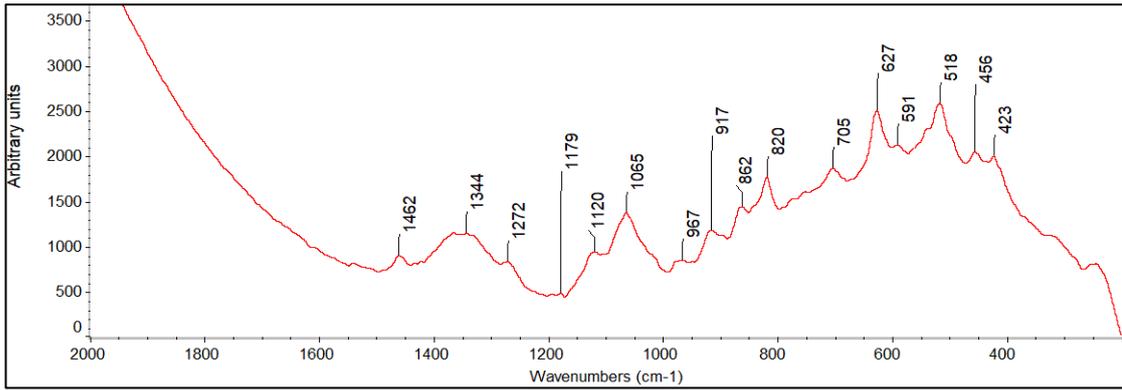
Οι παράμετροι καταγραφής των φασμάτων ήταν ο χρόνος ολοκλήρωσης καταγραφής του φάσματος 3 s και ο απαιτούμενος αριθμός φασμάτων ήταν 10. Για κάθε δείγμα μελιού κουμαριάς ελήφθησαν εννέα φάσματα. Όλα τα φάσματα Raman που ελήφθησαν, εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής. Οι επεξεργασίες αυτές έγιναν με τη βοήθεια των λειτουργιών «αυτόματης εξομάλυνσης» και της «αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής». Τέλος, με χρήση της λειτουργίας Statistical Spectra, λήφθηκε ο μέσος όρος των εννέα φασμάτων για κάθε δείγμα και το μέσο φάσμα κανονικοποιήθηκε. Οι επεξεργασίες των φασμάτων έγιναν με χρήση του λογισμικού OMNIC 9.1.



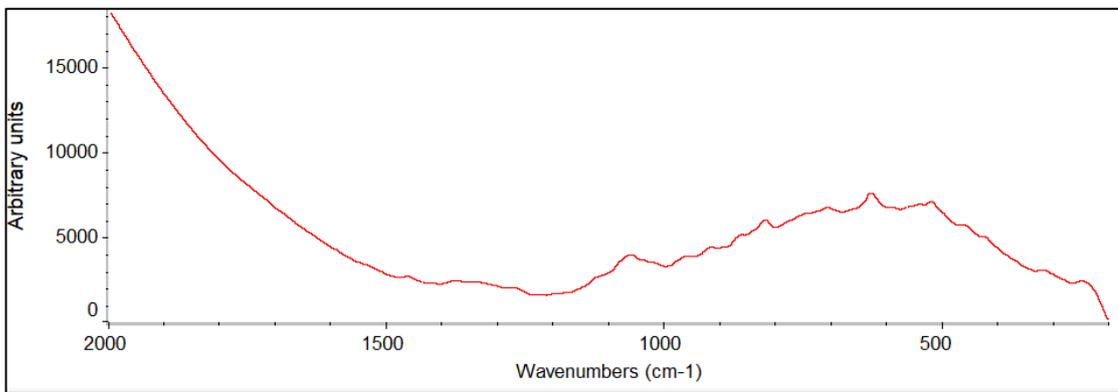
Εικόνα 31: Το φασματοφωτόμετρο Raman που χρησιμοποιήθηκε.

Γ.7.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση

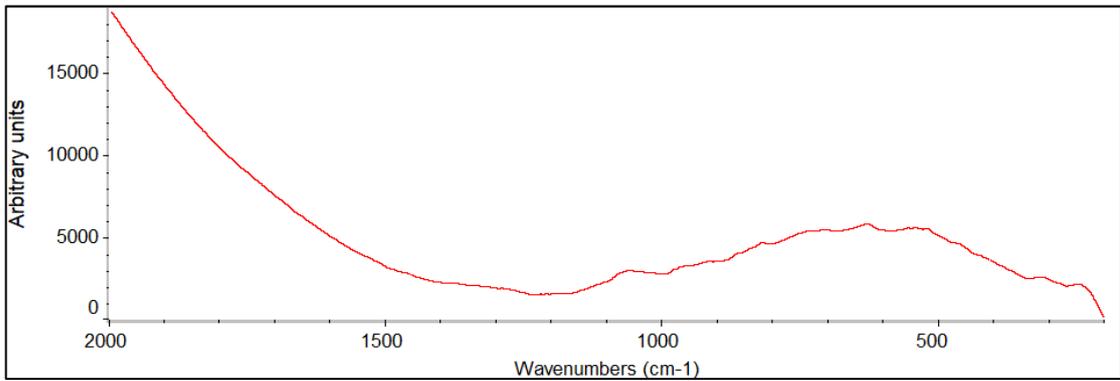
Στις Εικόνες 32, 33, 34, και 35 φαίνονται αντιπροσωπευτικά φάσματα Raman μελιών κουμαριάς.



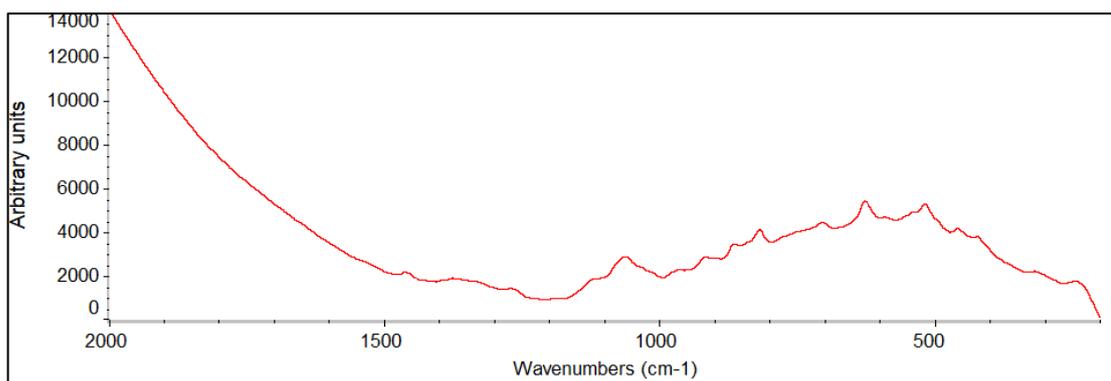
Εικόνα 32: Φάσμα Raman μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Σέττας.



Εικόνα 33: Φάσμα Raman (κουμ-αττ-1) μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής.



Εικόνα 34: Φάσμα Raman μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Πελότας Λεωνιδίου.



Εικόνα 35: Φάσμα Raman μελιού κουμαριάς (κουμ-αττ-4) προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής.

Στον Πίνακα 8 φαίνονται αναλυτικά οι κυριότερες κορυφές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα Raman, καθώς και οι αποδόσεις τους. Γενικά παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους με κορυφές σε όλες τις κύριες φασματικές περιοχές.

Η πιο σημαντική περιοχή του φάσματος βρίσκεται μεταξύ $1700-700\text{ cm}^{-1}$, διότι σε εκείνη την περιοχή εκπέμπουν οι περισσότερες χαρακτηριστικές ομάδες και τα σάκχαρα. Πιο αναλυτικά παρατηρούμε κορυφές στα 423, 456, 518, 627, 705, 820, 862, 917, 967, 1065, 1120, 1272, 1344, και 1460 cm^{-1} .

Η εκπομπή στα 423 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση κάμψης των C-C-O και C-C-C του σκελετού της φρουκτόζης και της γλυκόζης. Η εκπομπή στα 456 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση τάσης του σκελετού των σακχάρων (Mircea Orian *et al.*, 2018). Η κορυφή στα 518 cm^{-1} προήλθε από την ισχυρή παραμόρφωση του C-C-C και C-C-O (Harron Elrashied Tahir *et al.*, 2017) εξαιτίας της δόνησης του σκελετού της φρουκτόζης και της γλυκόζης (Batsoulis *et al.*, 2005). Η ισχυρή κορυφή στα 627 cm^{-1} οφείλεται σε παραμόρφωση του δακτυλίου της φρουκτόζης (Goodacre *et al.*, 2002; Ofélia *et al.*, 2015; Frausto Reyes *et al.*, 2017). Η ασθενής κορυφή στα 705 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση τάσης των C-O και C-C-O και επιπλέον αποδόθηκε στην κάμψη του O-C-O (Harron Elrashied Tahir *et al.*, 2017; Mircea Orian *et al.*, 2018). Η κορυφή στα 820 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση τάσης του C-H, ενώ η κορυφή στα 862 cm^{-1} στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης των C-H, C-O-H και CH₂ (Corbett *et al.*, 1991; Mircea Orian *et al.*, 2018). Η ασθενής κορυφή στα 917 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση κάμψης των C-H και C-O-H (Harron Elrashied Tahir *et al.*, 2017; Mircea Orian *et al.*, 2018). Η κορυφή στα 967 cm^{-1} αποδίδεται στην κάμψη C-C-H της φρουκτόζης (Jandrić *et al.*, 2015). Η κορυφή στα 1065 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση τάσης του C-O των σακχάρων

(Paradkar *et al*, 2001; Mircea Orian *et al.*, 2018). Η κορυφή στα 1120 cm^{-1} αποδόθηκε στον συνδυασμό δόνησης τάσης του δεσμού C-O και της δόνησης τάσης του δεσμού C-N των σακχάρων και των αμινοξέων, αντίστοιχα (Harron Elrashied Tahir *et al*, 2017). Η κορυφή στα 1272 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του C-OH των πρωτεϊνών και του αμιδίου (III). Η εκπομπή που παρατηρήθηκε στα 1344 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση του CH_2 , των σακχάρων (Kacurakova *et al*, 1996; Paradkar *et al*, 2001; Mircea Orian *et al.*, 2018). Τέλος, η κορυφή στα 1460 cm^{-1} αποδόθηκε στον συνδυασμό δονήσεων κάμψης του CH_2 και της δόνησης τάσης της ομάδας COO^- . Επιπροσθέτως, αυτή η φασματική περιοχή έχει αποδοθεί στις φλαβονόλες και στα οργανικά οξέα (Paradkar *et al.*, 2001; Nickless *et al.*, 2014; Ofelia Anjos *et al.*, 2018).

Πίνακας 8: Οι βασικές κορυφές του φάσματος Raman μελιού κουμαριάς.

Κυματαριθμοί (cm^{-1})	Λειτουργική Ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης
~423	C-C-O και C-C-C	Γλυκόζη και φρουκτόζη	Κάμψη
~456	Σκελετός	Σάκχαρα	Τάση
~518	C-C-O και C-C-C	Γλυκόζη και φρουκτόζη	Κάμψη
~627	Σκελετός	Σάκχαρα	Τάση
~705	C-O, C-C-O και O-C-O	Σάκχαρα	Τάση και Κάμψη
~820	C-H	Σάκχαρα	Τάση
~862	C-H, C-O-H και CH_2	Σάκχαρα	Τάση
~917	C-H και C-O-H	Σάκχαρα	Κάμψη
~967	C-C-H	Φρουκτόζη	Κάμψη
~1065	C-O	Σάκχαρα	Τάση
~1120	C-N	Πρωτεΐνες- Αμινοξέα	Τάση
~1272	C-OH	Πρωτεΐνες- Αμιδίου (III)	Τάση
~1344	CH_2	Σάκχαρα	Δόνηση
~1460	CH_2 και COO^-	Φλαβονόλες και Οργανικά οξέα	Κάμψη και Τάση

Γ.8 Φασματοσκοπική μελέτη μελιών κουμαριάς με χρήση της φασματοσκοπίας φθορισμού

Γ.8.1 Πειραματική πορεία

Η καταγραφή των φασμάτων φθορισμού διέγερσης και εκπομπής έγινε με φθορισμόμετρο FluoroMate FS-2 (εταιρία CE Mark, Scinco) συνδεδεμένο με H/Y συνοδευόμενο από το λογισμικό FluoroMasterPlus (Εικ.36). Τα δείγματα των μελιών κουμαριάς θερμάνθηκαν στους 55 °C και τοποθετήθηκαν σε κυψελίδες χαλάζια. Έπειτα, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 25 °C πριν την ανάλυση. Στην συνέχεια τα φάσματα των δειγμάτων μελιού καταγράφηκαν σε εύρος διέγερσης 240-500 nm (με

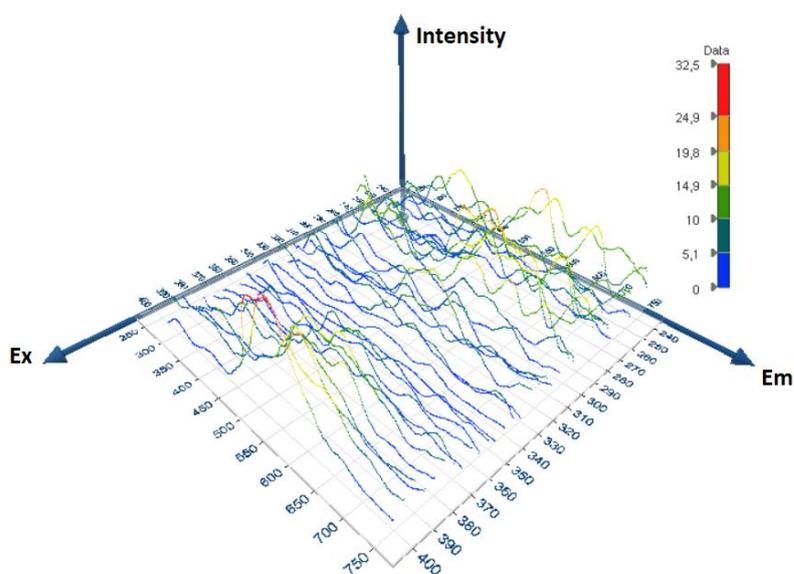
διαστήματα 5 nm) και κλίμακα εκπομπής 270-750 nm (σε διαστήματα 1 nm και 5 nm). Η ένταση ρυθμίστηκε στα 500 W από το όργανο.



Εικόνα 36: Φθορίζομετρο FluoroMate FS-2.

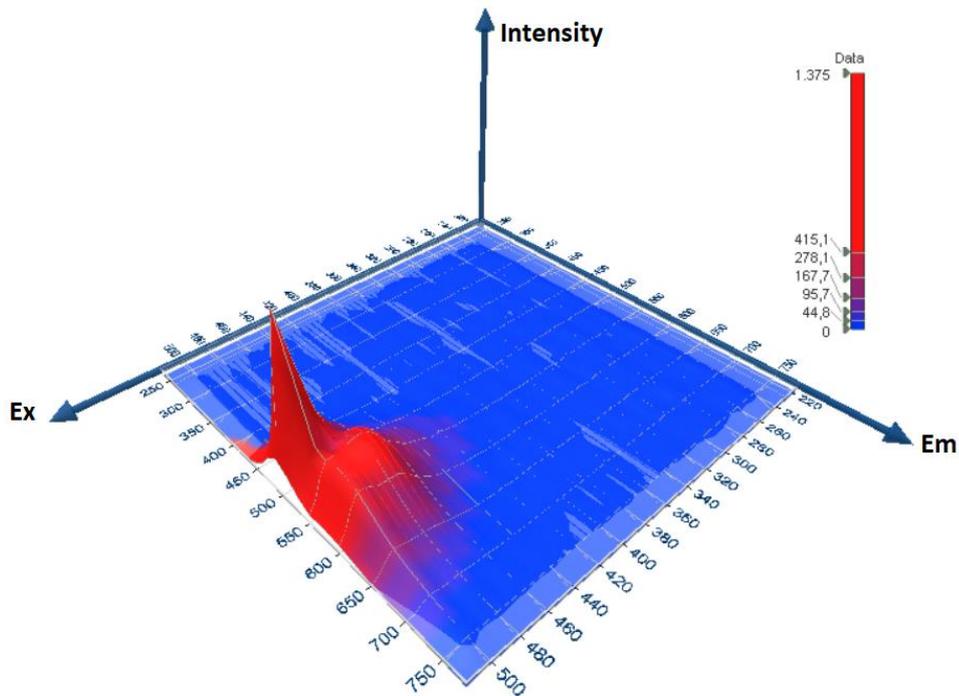
Γ.8.2 Αποτελέσματα - Συζήτηση

Το μέλι κουμαριάς περιέχει πολλές ουσίες που φθορίζουν, για αυτό τον λόγο δεν αρκεί η καταγραφή του φάσματος μόνο σε ένα μήκος κύματος, αλλά σε πολλά όπως φαίνεται στην Εικόνα 37. Επομένως, απαιτείται η λήψη των φασμάτων εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης. Έτσι λαμβάνεται ένας τρισδιάστατος πίνακας εκπομπών διέγερσης (excitation emission matrix, EEM). Το EEM αντιπροσωπεύει ένα μοναδικό δακτυλικό αποτύπωμα του δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον χαρακτηρισμό των μελιών.

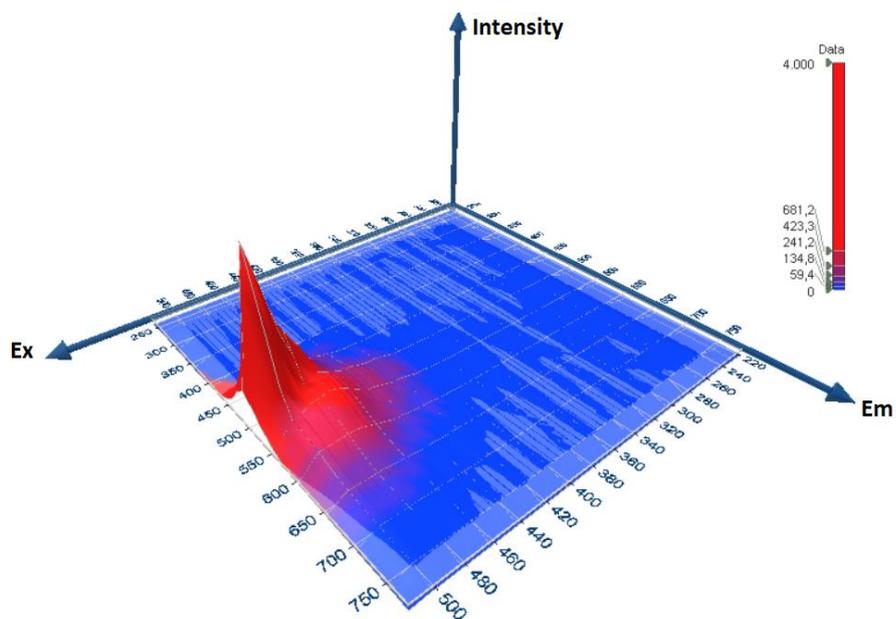


Εικόνα 37: Φάσματα εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης, μελιού κουμαριάς.

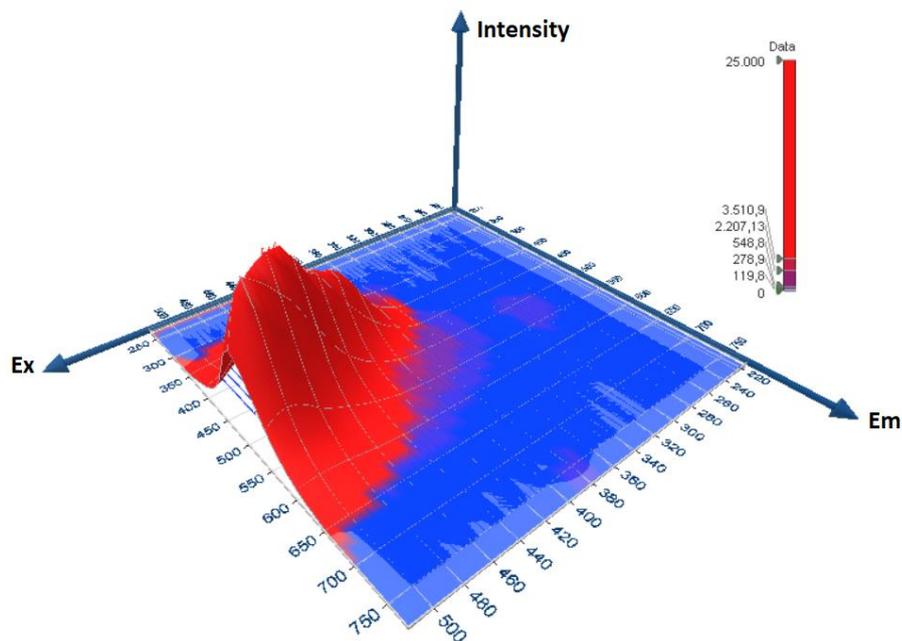
Από το σχήμα (3D) των φασμάτων εκπομπής και διέγερσης, αξιολογήθηκαν οι πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των ουσιών που φθορίζουν στο μέλι. Στις παρακάτω Εικόνες 38, 39, 40, 41 φαίνονται τα φάσματα EEM των μελιών κουμαριάς μετά την αφαίρεση της σκέδασης Rayleigh.



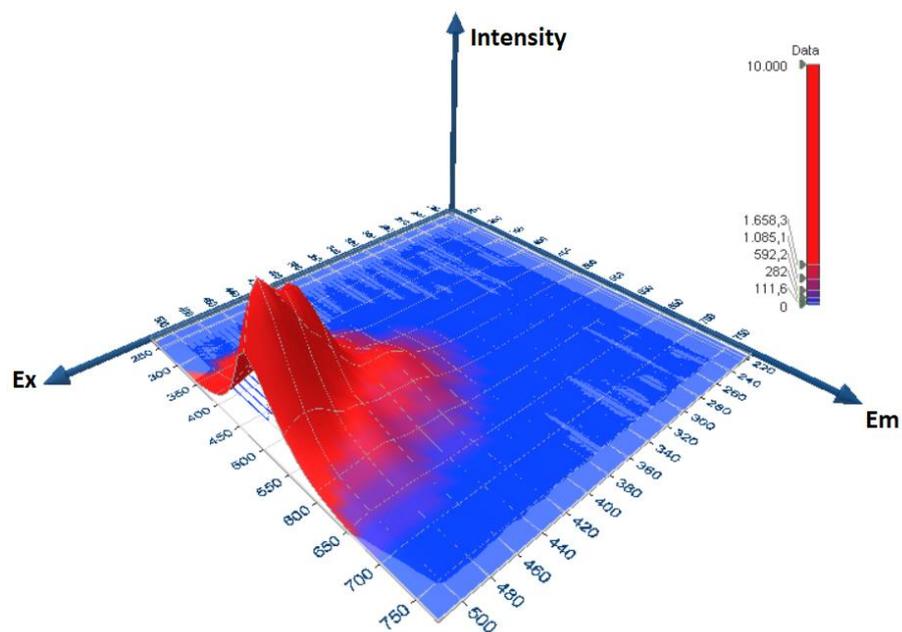
Εικόνα 38: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Σέττας.



Εικόνα 39: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής-01.



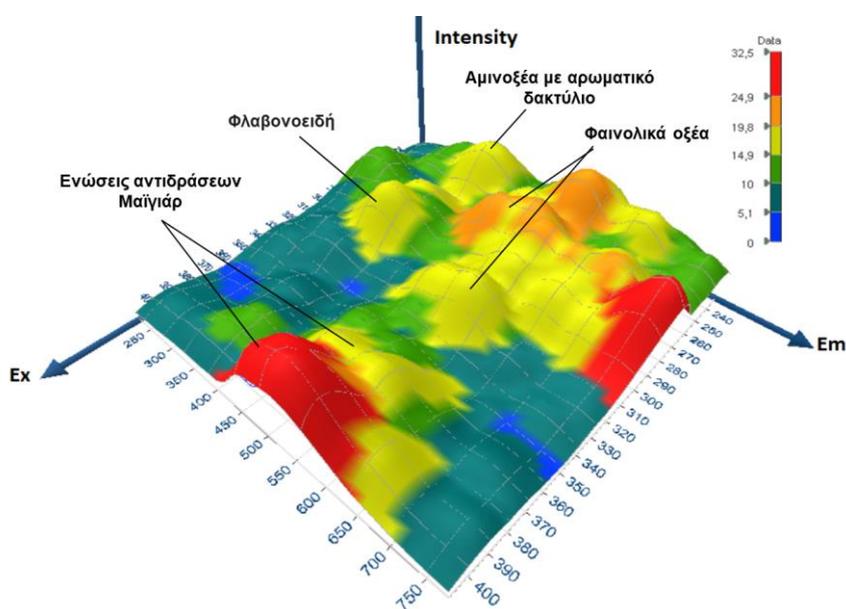
Εικόνα 40: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Πελοπόννησος.



Εικόνα 41: Φάσμα EEM μελιού κουμαριάς προερχόμενο από την περιοχή της Αττικής.

Στα φάσματα φθορισμού κάθε μελιού κουμαριάς παρατηρούμε διαφορές στις διεγέρσεις και εκπομπές (Εικ.42). Αυτό οφείλεται στην ευαισθησία των συστατικών που φθορίζουν, αλλά και στο περιβάλλον του κάθε μελιού, όπως η υγρασία, το ιξώδες και το pH (Dufour & Riaublanc, 1997). Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι οι εκπομπές που προέρχονται από τα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης των δειγμάτων μελιού (Karoui et al., 2007).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν μέγιστη διέγερση περίπου μεταξύ 265 και 335 nm και μέγιστη εκπομπή περίπου από 358 έως 426 nm (Rodriguez Delgado et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία φλαβονοειδών όπως η απιγενίνη, η χρυσίνη, η καμπεφερόλη, η πινοσεμπρίνη και άλλων, φθορίζουν περίπου στα μήκη κύματος διέγερσης/ εκπομπής, 280/340 nm (Solomon Mehretie et al., 2018). Τα φαινολικά οξέα φθορίζουν περίπου στα μήκη κύματος διέγερσης/ εκπομπής 250/ 450 nm (Solomon Mehretie et al., 2018). Αναλυτικότερα, οι διεγέρσεις για το συριγγικό και το βανιλλικό οξύ είναι στα 260-280 nm, για το 4-υδροξυβενζοϊκό και το ομογεντιστικό οξύ στα 280-290 nm. Το γαλλικό οξύ εμφανίζει διέγερση στα 280-290 nm και το 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ στα 305-325 nm (Iwona Sergiel et al., 2014). Ενώσεις που προκύπτουν από αντιδράσεις Maillard, όπως τα φουράνια, εμφανίζουν διέγερση περίπου στα 340-380 nm και μέγιστη εκπομπή στα 420 και 470 nm (Kulmyrzaev and Dufour, 2002). Η διέγερση στα 450 nm και η εκπομπή στα 550 nm σχετίζεται με τη ριβοφλαβίνη (Sikorska, Khmelinski, & Sikorski, 2009). Τέλος, τα αμινοξέα με αρωματικό δακτύλιο παρουσιάζουν διέγερση στα 230 nm και εκπομπή στα 340 nm (Solomon Mehretie et al., 2018).



Εικόνα 42: Απόδοση διεγέρσεων/ εκπομπών σε συστατικά που φθορίζουν σε μελί κουμαριάς.

Η φθορισμομετρία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της νοθείας του μελιού με σιρόπι ζαχαροκάλαμου (Ghosh et al. 2005). Συγκεκριμένα στο μήκος κύματος διέγερσης 340 nm, τα καθαρά δείγματα μελιού εμφάνισαν δυο κορυφές περίπου στα 440 nm και ένα μέγιστο που βρίσκεται στα 510 nm. Οι κορυφές στα 440 nm και στα 510 nm αποδίδονται

στο NADH και στις φλαβίνες αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τα δείγματα μελιού, τα δείγματα σιροπιού ζαχαροκάλαμου εμφάνισαν κορυφή περίπου 430 nm η οποία αποδίδετε στο NADH.

Σε άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση δειγμάτων μελιού και σιροπιού σακχάρων στην οποία παρατηρήθηκε καλή διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων. Τα φάσματα του σιροπιού χαρακτηρίστηκαν από μια κορυφή περίπου στα 305 nm και μια γύρω στα 365 nm, ενώ τα δείγματα μελιού είχαν μια ισχυρή κορυφή περίπου 460 nm και μια πιο ασθενή κορυφή περίπου 365 nm. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της έντασης στα 365 nm και 425 nm, καθώς και η αναλογία 365 nm/ 425 nm, ήταν ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης σιροπιού σακχάρων και προτάθηκε ως πιθανή μέθοδος εύρεσης της νοθείας του μελιού με σιρόπι σακχάρων (Ruoff et al. 2005; Karoui et al. 2007).

Η φθορισμομετρία έχει χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση δειγμάτων μελιού από επτά διαφορετικές βοτανικές πηγές. Οι επτά τύποι μελιού διακρίθηκαν καλά με ποσοστό σωστής ταξινόμησης 90%. Η διαφοροποίηση βασίστηκε στην φασματική περιοχή διέγερσης στα 250 nm (εκπομπή 280–480 nm), 290 nm (εκπομπή 305–500 nm) και 373 nm (εκπομπή 380–600 nm). Η μελέτη έδειξε ότι η φθορισμομετρία είναι μια κατάλληλη και εναλλακτική τεχνική για την ταξινόμηση δειγμάτων μελιού διαφορετικής βοτανικής προέλευσης (Ruoff et al. 2006).

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χημική σύσταση ελληνικού μελιού κουμαριάς. Οι ποικιλίες ήταν μονοποικιλιακές και προέρχονταν από τρεις διαφορετικές περιοχές της ελληνικής επικράτειας.

Σε πρώτο στάδιο για την πραγματοποίηση της παραλαβής και ανάλυσης των συστατικών του αρώματος του μελιού διεξήχθησαν δοκιμές από τα αποτελέσματα των οποίων οριστικοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες SPME και ανάλυσης με GC-MS. Τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά στην ένταση και το εύρος των κορυφών. Ανιχνεύτηκαν ενώσεις που προέρχονται από διάφορες βιοσυνθετικές οδούς, ενώ τα νορισοπρενοειδή αποτελούσαν μια πολύ σημαντική ομάδα ενώσεων που συνεισφέρουν στο άρωμα του μελιού κουμαριάς. Συγκεκριμένα, σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (μg/g), ήταν η α-ιζοφορόνη (2,50-8,12), η 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη (0,20-4,62), η 2-υδροξυιζοφορόνη (0,06-0,53), η 4-οξοιζοφορόνη (0,38-0,46) και η β-ιζοφορόνη (0,02-0,43). Αυτές οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν.

Σε δεύτερο στάδιο ακολούθησε η εκχύλιση των πτητικών συστατικών με την τεχνική της εκχύλισης υγρού - υγρού. Από την ανάλυση του άπολου κλάσματος εξανίου ανιχνευθήκαν 269 πτητικές ουσίες. Οι περισσότερες από αυτές ήταν σε ίχνη, ενώ από αυτές, οι 54 ουσίες ταυτοποιήθηκαν. Το 1-αιθυλοβουτυλιοϋδροϋπεροξειδίο σε ένα ποσοστό επί του συνόλου (3,60%), το 1-μεθυλοπεντυλιοϋδροϋπεροξειδίο (3,52%), η 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη (3,52%), το 3-ενδεκανυλοβενζόλιο (2,56%), η α-ιζοφορόνη (2,32%), η 3,3,6-τριμεθυλοδεκυκλο[3.1.0]εξαν-2-όνη (2,17%), (1,3,3-τριμεθυλοεννιανιλο)-βενζόλιο (1,80%), και η 3-οξο-α-ιονόνη (1,64%) ήταν μερικές από αυτές. Αντίστοιχα, από το κλάσμα της ισοπροπανόλης ανιχνευθήκαν 108 πτητικές ουσίες, ενώ από αυτές, οι 65 ουσίες ταυτοποιήθηκαν. Η 3-μεθυλο-4- (1,3,3-τριμεθυλο-7-οξαδικυκλο [4.1.0]-επταν-1-υλο) -3-βουτεν-2-όνη (40,84%), η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (8,49%), η 5,5,8a-τριμεθυλο-3,5,6,7,8,8a-εξαϋδρο-2H-χρωμόνιο (4,62%), η 6-βουτυλο-3-μεθοξυ- 2-κυκλοεξεν-1-όνη (3,12%), η 2,3-διυδρο-3,5-διυδροξυ-6-μεθυλο-4H-πυραν-4-όνη (1,84%), η 2-μεθοξυ-α,5-διμεθυλοβενζοακεταλδεΐδη (1,67%), η 1-ισοβουτυλο-7,7-διμεθυλοοκταϋδροϊσοβενζοφουραν-3α-1-όλη (1,37%), η 2,4,6-τριμεθυλοφαινόλη (1,31%) και το 2,5-διϋδροξυβενζολοξικό οξύ (1,30%) ήταν μερικές από αυτές. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πτητικών συστατικών του μελιού κουμαριάς εξαρτώνται κατά πολύ από τις τεχνικές παραλαβής. Γενικότερα θα πρέπει να αναφερθεί

πως η παραλαβή των πτητικών συστατικών από το μέλι είναι πολύ δύσκολη λόγω της φύσης του.

Σε τρίτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση και ανάλυση των φαινολικών συστατικών με την τεχνική SPE. Παρατηρήθηκε ότι τα χρωματογραφήματα δεν παρουσιάζουν διαφορές. Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών γενικά στα μέλια, όπως και ειδικά στην κουμαριάς, εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος των ανθέων, της υγείας των φυτών συλλογής, της γεωγραφικής προέλευσης και των κλιματικών χαρακτηριστικών. Επίσης, κάποια φαινολικά προέρχονται από την πρόπολη. Για την κουμαριά, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στην βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, από τα φαινολικά οξέα, που αναφέρθηκαν παραπάνω το 2,5-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, 2-(1,2-διυδροξυπροπυλο)-4,8,8-τριμεθυλο-1-οξασπιρο[2.5]οκτεν-4-εν-6-όνη (unedone-UD) και αμπισικό οξύ θα μπορούσαν να αποτελέσουν χημικούς δείκτες για το ελληνικό μέλι κουμαριάς.

Σε τέταρτο και τελευταίο στάδιο τα δείγματα μελετήθηκαν φασματοσκοπικά με FT-IR, Raman και φθορισμομετρία. Μέσω αυτών των τεχνικών πήραμε δομικές πληροφορίες για τον σκελετό των μορίων που υπάρχουν στο μέλι κουμαριάς, αλλά και για την πιστοποίηση της καθαρότητας του. Από την καταγραφή των φασμάτων και τη μελέτη των κύριων φασματικών περιοχών, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Η φασματοσκοπία FT-IR και Raman έδειξε ότι τα δείγματα αποτελούνται από νερό, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και φαινολικά συστατικά. Επίσης, αντίστοιχες πληροφορίες ελήφθησαν από τα φάσματα φθορισμού κάθε δείγματος μελιού κουμαριάς. Από τα σχήματα (3D) των φασμάτων εκπομπής και διέγερσης, αξιολογήθηκαν οι πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των ουσιών που φθορίζουν στο μέλι.

Συμπερασματικά, το μέλι κουμαριάς, αποτελεί αν και όχι το διασημότερο ελληνικό μέλι, μια ποικιλία μελιού με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Αυτό οφείλεται στα πλούσια βιοδραστικά αρωματικά, πτητικά και φαινολικά συστατικά του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

Δερματόπουλος Β. Η σύγχρονη πρακτική μελισσοκομία. 1984; Έκδοση Δ, Αθήνα.

Πίκουλας Ε. Τεχνολογία γλυκαντικών υλών. 1986 Αθήνα.

Υπ.Α.Α.Τ. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων. <http://www.minagric.gr>.
<http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/animal-production/bees-honey>.

Ξένη Βιβλιογραφία

Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council of 15 May 2014 amending Council Directive 2001/110/EC relating to honey. OJEU L164:1–5.

Commission implementing regulation (EU) 2017/1555. Official Journal of the European Union. 12 September 2017.

Zarchin S, Dag A, Salomon M, Hendriksma HP, Shafir S, 2017. Honey bees dance faster for pollen that complements colony essential fatty acid deficiency. Behav Ecol Sociobiol 71:172.

Eva Crane, The world History of Beekeeping and honey hunting, Taylor & Francis, 1999.

Contessi A (2005) Le Api – Biologia, allevamento, prodotti. Edagricole, Bologna.

Terrab A, Escudero ML, González-Miret ML, Heredia FJ (2004) Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: A multivariate study. J Sci Food Agric 84(4):380–396. doi:10.1002/jsfa.1668.

Singh N, Bath PK (1998). Relationship between heating and hydroxymethylfurfural formation in different honey types. J Food Sci Technol 35:154–156.

Prota R., Floris I, Papoff C.M. (1997). “Comparazione delle caratteristiche chimicofisiche di mieli della Sardegna e della Corsica”. Apicoltura Moderna.88: 51–59.

Rosa A., Tuberoso C.I.G., Atzeri A., Melis M.P., Bifulco E., Dessi M.A. (2011). “Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentistic acid in several models of oxidative stress”. Food Chem. 129:1045-1053.

Tuberoso I.G.C., Bifulco E., Caboni P., Cottiglia F., Cabras P., Floris I. (2010). “Floral markers of strawberry tree(*Arbutus unedo* L.)honey”. *J Agric Food Chem.*58:384-389.

Ramírez R, Montenegro G (2004) Certificación del origen botánico de miel y polen corbicular pertenecientes a la comuna de Litueche, VI región de Chile. *Cien Inv Agr* 31:197–211.

Mupož O, Copaja S, Speisky H, Pepa RC, Montenegro G (2007) Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Quvm Nova* 30:848–851.

Bianchi F., Careri M., Musci M. (2005). “Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry”. *Food Chem* .89:527-532.

Spano N., Casula L., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Tappavo A., Sanna G. (2006). “An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey”. *Talanta* .68:1390-1395.

Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Faccno R.M. (2005). “Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics”. *Anal Chim Acta.* 533:185-191.

Tuberoso C.I.G., Boban M., Bifulo E., Budimir D., Pirisi F.M. (2013). “Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey”. *Food Chem.*140:686-691.

Anklam E., (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem* 63:549–562.

Dimitrova B, Gevrenova R, Anklam E (2007) Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* 18:24–32.

Trautvetter S, Koelling-Speer I, Speer K., (2009). Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC–MS. *Apidologie* 40:140–150.

Tomás-Barberán FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E (2001) HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *J Sci Food Agric* 81:485–496.

Truchado P, Vit P, Ferreres F, Tomas-Barberan F (2011) Liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis allows the simultaneous characterization of C-glycosyl and O-glycosyl flavonoids in stingless bee honeys. *J Chromatogr A* 1218:7601–7607.

Truchado P, Ferreres F, Bortolotti L, Sabatini AG, Tomás-Barberán FA (2008). Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudoacacia*) honey. *J Agric Food Chem* 56:8815–8824.

Winterhalter, P. and Rouseff, R. (2002). Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, Winterhalter, P. and Rouseff, R. L. Eds, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Chicago, Illinois, USA, Chapter 1, pp. 1-17.

D' Arcy, B., Rintoul, G. B., Rowland, C. Y., and Blackman, A. J. (1997). Composition of Australian honey extracts. 1. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from blue gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and yellow box (*Eucalyptus melliodora*) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:1834-1843.

Guyot, C., Scheirman, V. and Collin, S. (1999). Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*, 64:3–11.

Oroian, M.; Sonia, S.; Amariei, A.; Leahu, A.; Gutt, G. Multi-element composition of honey as a suitable tool for its authenticity analysis. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2015, 65, 93–100. [CrossRef]

Acevedo, F.; Torres, P.; Oomah, B.D.; de Alencar, S.M.; Massarioli, A.P.; Martín-Venegas, R.; Albarral-Ávila, V.; Burgos-Díaz, C.; Ferrer, R.; Rubilar, M. Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and in vitro bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. *Food Res. Int.* 2017, 94, 20–28. [CrossRef] [PubMed]

De-Melo, A.A.M.; de Almeida-Muradian, L.B.; Sancho, M.T.; Pascual-Maté, A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *J. Apic. Res.* 2018, 57, 5–37. [CrossRef]

Jerkovic, I.; Ku's, P.M. Terpenes in honey: Occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. *RSC Adv.* 2014, 4, 31710–31728. [CrossRef]

Manyi-Loh, C.E.; Ndip, R.N.; Clarke, A.M. Volatile Compounds in Honey: A Review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 9514–9532. [CrossRef].

Kaškonienė, V.; Venskutonis, P.R. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010, 9, 620–634. [CrossRef].

Consonni, R.; Cagliani, L.R. Recent developments in honey characterization. *RSC Adv.* 2015, 5, 59696–59714.

Pontes, M.; Marques, J.C.; Câmara, J.S. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 2007, 74, 91–103.

Radovic, B.S.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; Gerboles, M.; Anklam, E. Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem.* 2001, 72, 511–520.

Piasenzotto, L., Gracco, L., Conte, L. S. and Bogdanov, S. (2002). Application of solid phase microextraction to evaluate traces of thymol in honey. *Apidologie*, 33:545-552.

Tan, S. T., Wilkins, A. L., Holland, P. T., & McGhie, T. K. (1989a). Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1217-1221.

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N. and Raymont, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86:169-177.

Broom, S. J., Ede, R. M. and Wilkins, A. L. (1992). Synthesis of (±)-E-(1,2,4-trihydroxy- 2,6,6-trimethylcyclohexyl)but-3-en-2-one: A novel degraded carotenoid isolated from New Zealand's thyme (*Thymus vulgaris*) honey. *Tetrahedron Letters*, 33:3197-3200.

Dörrscheidt, W. and Friedrich, K. (1962). Trennung von Aromastoffen des Honigs mit Hilfe der Gas-Chromatographie. *Journal of Chromatography*, 7:13-18.

Hoopen, H. J. and Ten, G. (1963). Flüchtige Carbonylverbindungen in Honig. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 119:427-428.

Merz, J. H. (1963). The objective assessment of honey aroma by gas chromatography. Journal of Apicultural research, 2:55-61.

Piotr M. Ku's, and Igor Jerkovic. New Sample Preparation Method for Honey Volatiles Fingerprinting Based on Dehydration Homogeneous Liquid–Liquid Extraction (DHLLE). Molecules 2018, 23, 1769.

Izabela Jasicka Misiak, Ewa Makowicz, Natalia Stanek, (2017). Chromatographic fingerprint, antioxidant activity, and colour characteristic of polish goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) honey and flower. European Food Research and Technology.

Escriche I, Kadar M, Juan-Borrás M, Domenech E (2014) Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. Food Chem 142:135–143.

Ciulu M, Spano N, Pilo MI, Sanna G (2016) Recent advances in the analysis of phenolic compounds in unifloral honeys. Molecules 21:451–482.

Kečkeš S, Gašić U, Veličković TĆ, Milojković-Opsenica D, Natić M, Tešić Z (2013) The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. Food Chem 138:32–40.

Campillo N, Viñas P, Férrez-Melgarejo G, Hernández-Córdoba M (2015) Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry. Talanta 131:185–191.

Campone L, Piccinelli AL, Pagano I, Carabetta S, Di Sanzo R, Russo M, Rastrelli L (2014) Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. J Chrom A 1334:9–15.

Biesaga M, Pyrżyńska K (2013) Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. Food Chem 136:46–54.

Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K (2008) Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J Chromatogr A* 1187:18–24.

Truchado P, Vit P, Heard TA, Tomàs-Barberà FA, Ferreres F (2015) Determination of interglycosidic linkages in O-glycosyl flavones by high-performance liquid chromatography/photodiode-array detection coupled to electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Its application to *Tetragonula carbonaria* honey from Australia. *Rapid Commun Mass Spectrom* 29:948–954.

Tsiapara A.V., Jaakkola M., Chinou I., Graikou K., Tolonen T., Virtanen V., Moutsatsou P. (2009). “Bioactivity of greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: profile analysis of extracts”. *Food Chem.* 116(3):702-708.

Melliou, E. & Chinou, I. (2011). Chemical constituents of selected unifloral Greek honeys with antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 129, 284-290.

Karabagias, I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas.M.G. (2014a). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, 548–557.

Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., Chinou, I., Kassi, E., Karabournioti, S., & Moutsatsou, P. (2014). Phenolic Acid Composition, Antiatherogenic and Anticancer Potential of Honeys Derived from Various Regions in Greece. *PLOS ONE*, 9(4), e94860.

Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F.A. (1997). Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2824-2829.

Paolo Cabras, Alberto Angioni, Carlo Tuberoso, Ignazio Floris, Fabiano Reniero, Claude Guillou,§ and Stefano Ghelli|. Homogentisic Acid: A Phenolic Acid as a Marker of Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) Honey. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4064–4067.

Lovakovic T.B., Lazarus M., Karaconji B.I., Jurica K., Semren Z.T., Lusic D., Brajenovic N., Pelaic Z., Pizent A. (2018). “Multi-element composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk benefit analysis”. *J trace elem Med Biol.* 45:85-92.

Scanu R., Spano N., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Sanna G., Tapparo A. (2005). “Direct chromatographic methods for the rapid determination of homogentisic acid in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey”. *J Chromatog A*. 1090:76-80.

Karakonji J.B., Jurica K. (2017). “Development and Validation of a GC-MS Method for the Analysis of Homogentisic Acid in Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Honey”. *J. AOAC Int.* 100:889-892.

Lidija Svec̃njak, Saša Prdun, Josip Rogina, Dragan Bubalo, Igor Jerkovic, (2017). Characterization of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) nectar-tohoney transformation pathway using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chemistry*, 232, 286–294.

Ofelia Anjos, Maria Graca Campos, Pablo Contreras Ruiz, Paulo Antunes, (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169, 218–223.

Gulzar Ahmad Nayik, B.N. Dar, Vikas Nanda, (2015). Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India. *Arabian Journal of Chemistry*.

Kuan Wei Sea, Si Krishna Ghoshal, Roswanira Abdul Wahab, Raja Kamarulzaman Raja Ibrahim, Mohd Nizam Lanid, (2018). A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bees (*Heterotrigona itama*) honey. *Food Research International*, 105, 453–460.

Mircea Oroian, Sorina Ropciuc (2018). Botanical authentication of honeys based on Raman spectra. *Food Measure*, 12:545–554. DOI 10.1007/s11694-017-9666-3.

Apostolos Batsoulis, Nikolaos G. Siatis, Athanasios C. Kimbaris, Eleutherios K. Alissandrakis, Christos S. Pappas, Petros A. Tarantilis, Paschalis C. Harizanis and Maschos G. Polissiou (2005). FT-Raman Spectroscopic Simultaneous Determination of Fructose and Glucose in Honey. *J. Agric. Food Chem*, 53, 207-210.

Haroon Elrasheid Tahir, Zou Xiaobo, Li Zhihua, Shi Jiyong, Xiaodong Zhai, Sheng Wang, Abdalbasit Adam Mariod (2017). Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, 202–211.

Goodacre, R., Radovic, B. S., & Anklam, E. (2002). Progress toward the Rapid Nondestructive Assessment of the Floral Origin of European Honey Using Dispersive Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 56(4), 521–527. doi:10.1366/0003702021954980.

C Frausto-Reyes, R Casillas-Peñuelas, JL Quintanar-Stephano, EMacías-López, JM Bujdud-Pérez, I Medina-Ramírez. (2017). Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 178, 212–217.

Ofélia Anjosa, António J.A. Santos, Vasco Paixão, Leticia M. Estevinhoe, (2018). Physicochemical characterization of *Lavandula* spp. honey with FT-Raman Spectroscopy. *Talanta* 178, 43–48.

Corbett, E. C.; Vichy, V (1991). Fourier transform Raman studies of materials and compounds of biological importance-II. The effect of moisture on the molecular structure of the alpha and beta anomers of D-glucose. *Spectrochim. Acta*, 47A, 1399-1411.

Z. Jandrić, S.A. Haughey, R.D. Frew, K. McComb, P. Galvin- King, C.T. Elliott, A. (2015). Cannavan, Discrimination of honey of different floral origins by a combination of various chemical parameters. *Food Chem.* 189, 52–59.

Paradkar, M. M.; Irudayaraj, J. (2001). Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. *Food Chem.*, 76, 231-239.

Pierna, J. A. F., Abbas, O., Dardenne, P., & Baeten, V. (2011). Discrimination of Corsican honey by FT-Raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, 15(1), 75–84.

Anjos, O., Campos, M. G., Ruiz, P. C., & Antunes, P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169, 218–223. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.138.

Kacurakova, M.; Mathlouthi, M. (1996). FT-IR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. *Carbohydr. Res.*, 284, 145-157.

Nickless, E. M., Holroyd, S. E., Stephens, J. M., Gordon, K. C., & Wargent, J. J. (2014). Analytical FT-Raman spectroscopy to chemotype *Leptospermum scoparium* and generate

predictive models for screening for dihydroxyacetone levels in floral nectar. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(10), 890–894.

Dufour, E., & Riaublanc, A. (1997). Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. I. Front face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Lait*, 77, 657–670.

Karoui, R., Dufour, E., Bosset, J. O., & De Baerdemaeker, J. (2007a). The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chemistry*, 101, 314–323.

Rodriguez Delgado, M. A., Malovana, S., Perez, J. P., Borges, T., & Garcia Montelongo, F. J. (2001). Separation of phenolic compounds by high performance liquid chromatography with absorbance and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*, 912, 249–257.

Solomon Mehretie, Dimas Firmanda Al Riza, Saito Yoshito, Naoshi Kondo. Classification of raw Ethiopian honeys using front face fluorescence spectra with multivariate analysis. *Food Control* 84 (2018) 83e88.

Iwona Sergiel, Pawel Pohl, Magdalena Biesaga, Agnieszka Mironczyk. Suitability of three-dimensional synchronous fluorescence spectroscopy for fingerprint analysis of honey samples with reference to their phenolic profiles. *Food Chemistry* 145 (2014) 319–326.

Kulmyrzaev, A., & Dufour, E. (2002). Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. *Lait*, 82, 725–735.

Sikorska, E., Khmelinski, I., & Sikorski, M. (2009). In V. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention* (pp. 963–976). London: Elsevier.

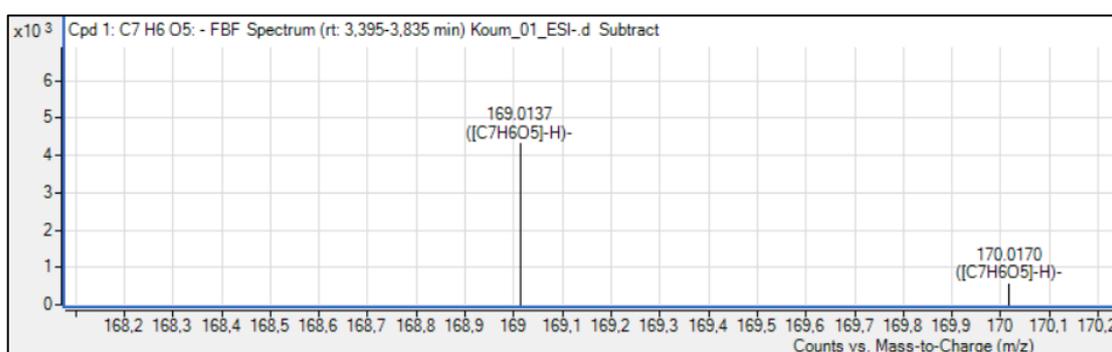
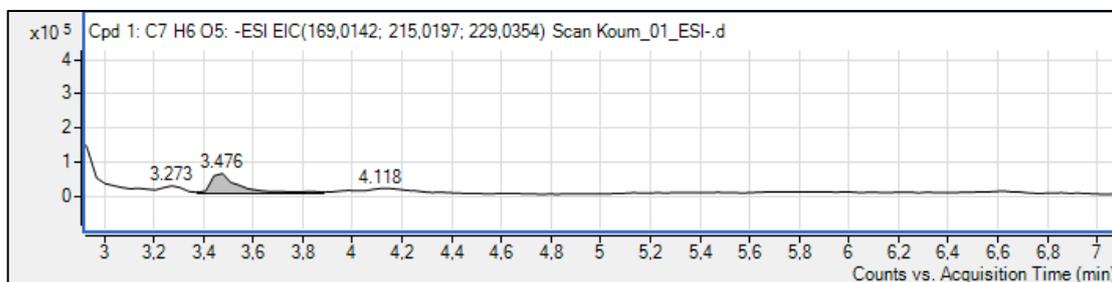
Ruoff, K., Karoui, R., Dufour, E., Luginbühl, W., Bosset, J. O., Bogdanov, S., et al. (2005). Authentication of the botanical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy, a preliminary study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1343–1347.

Ruoff, R., Luginbühl, W., Künzli, R., Bogdanov, S., von der Ohe, K., von der Ohe, W., et al. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front face fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6858–6866.

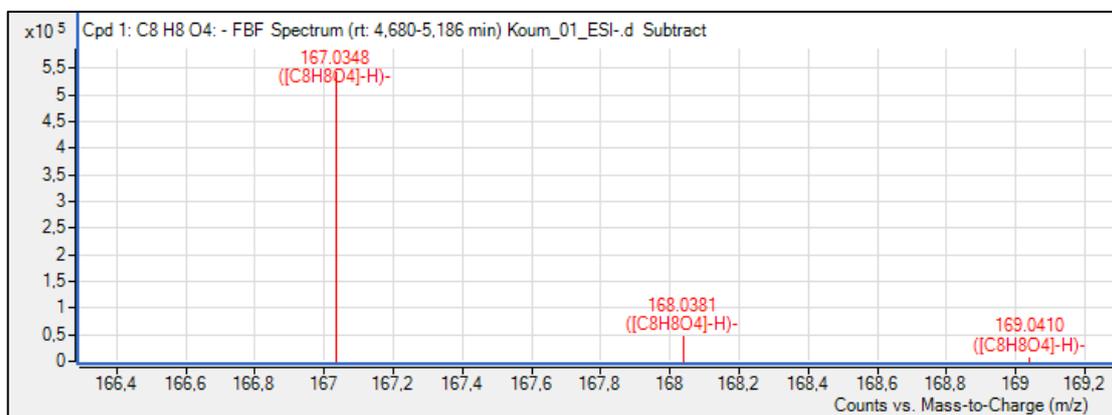
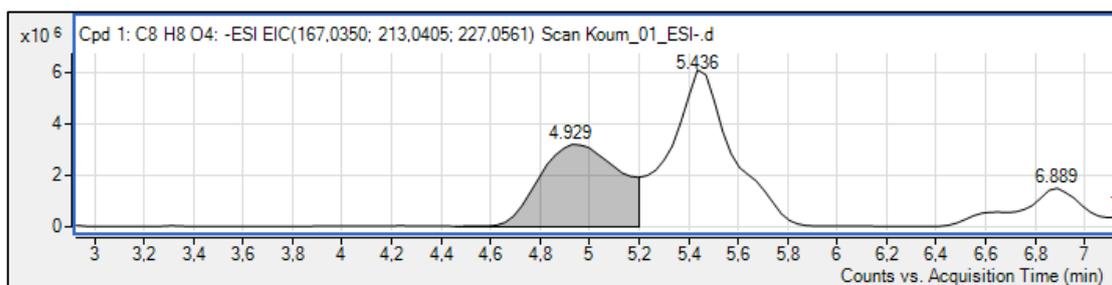
Nirmaly Ghosh, Yogesh Verma, Yogesh Verma S.K. (2005). A Fluorescence Spectroscopic Study of Honey and Cane Sugar Syrup Food Sci. Technol. Res.

Παράρτημα 1

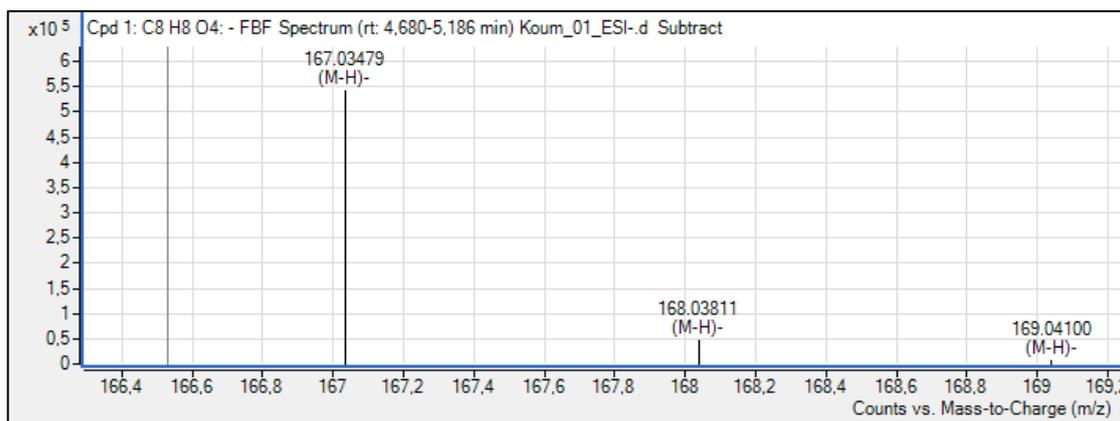
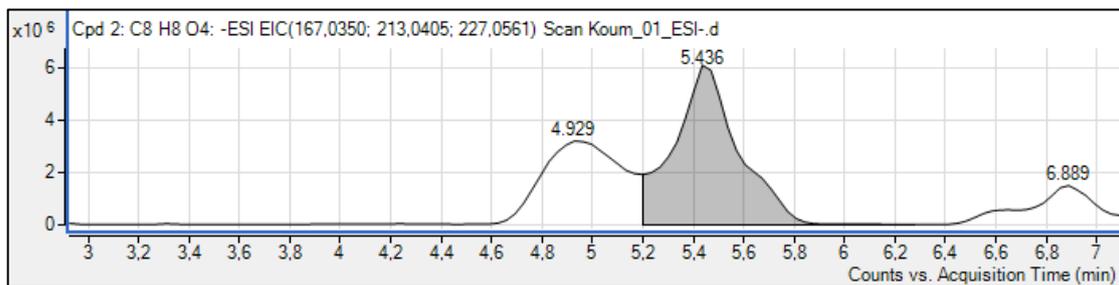
Gallic acid ($C_7H_6O_5$)



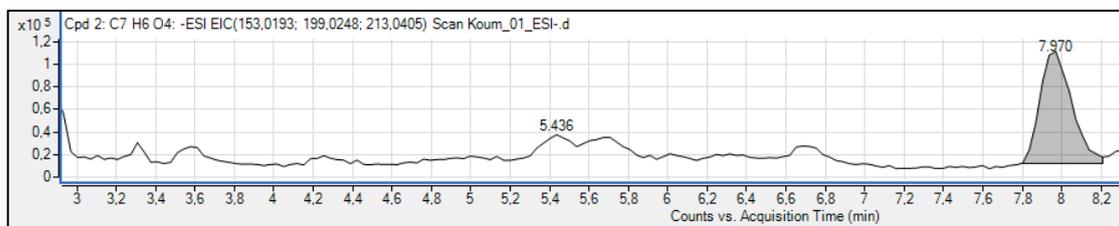
Vanillic acid ($C_8H_8O_4$)



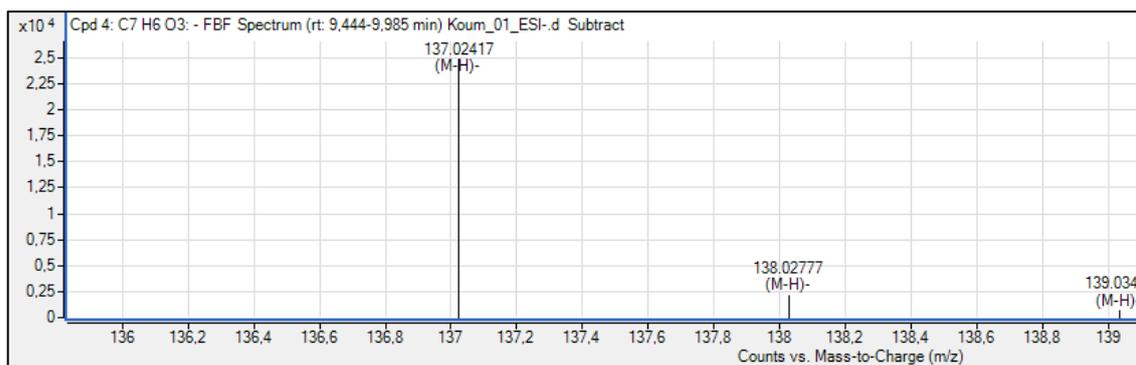
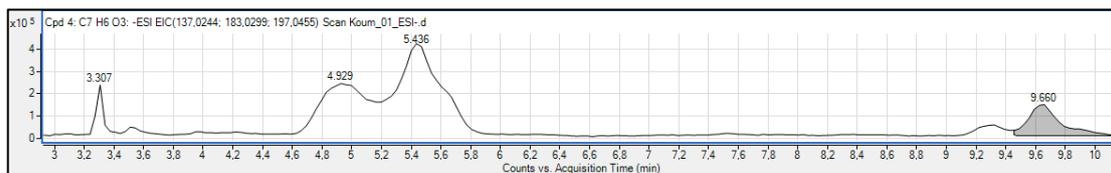
Homogentisic Acid (C₈H₈O₄)



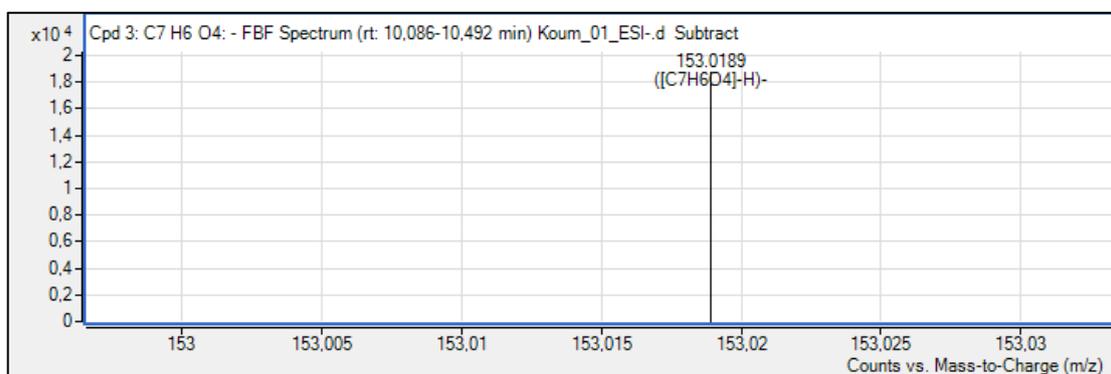
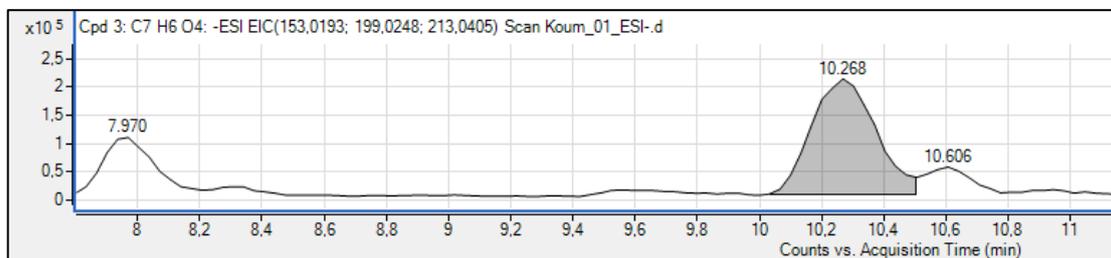
Protocatechuic acid (C₇H₆O₄)



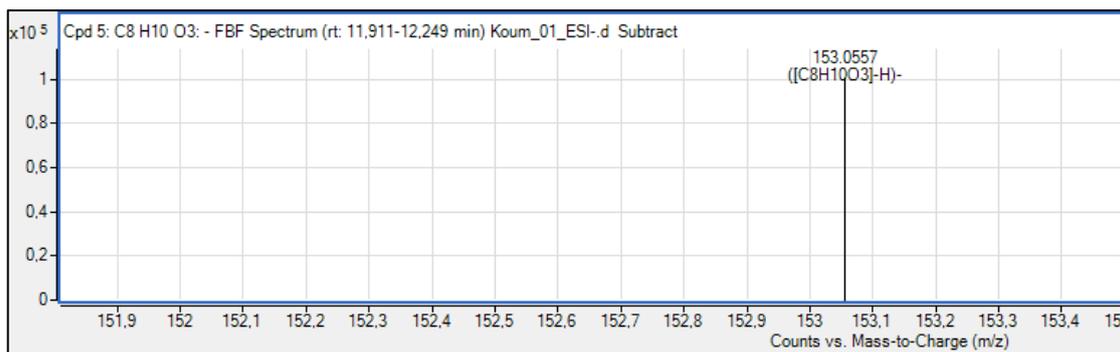
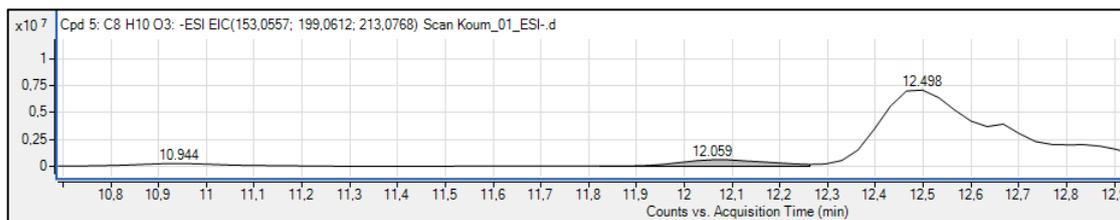
Salycilic acid ($C_7H_6O_3$)



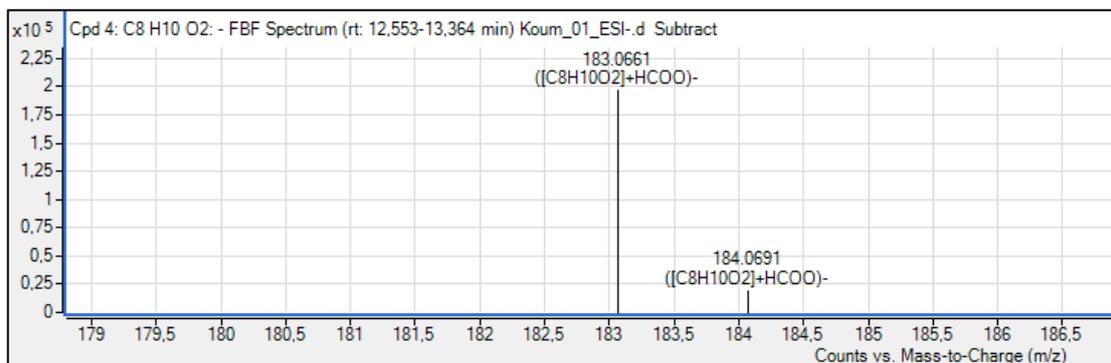
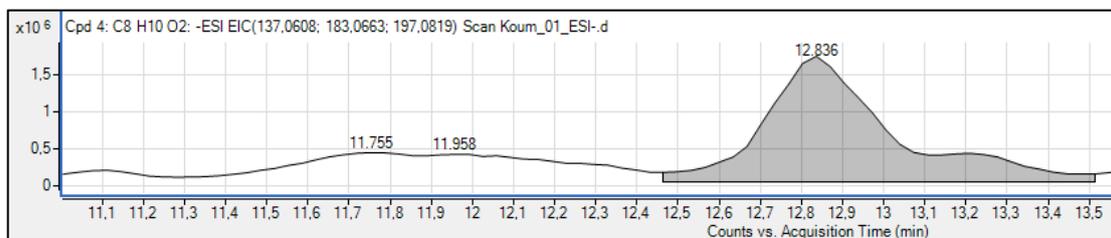
Gentisic acid ($C_7H_6O_4$)



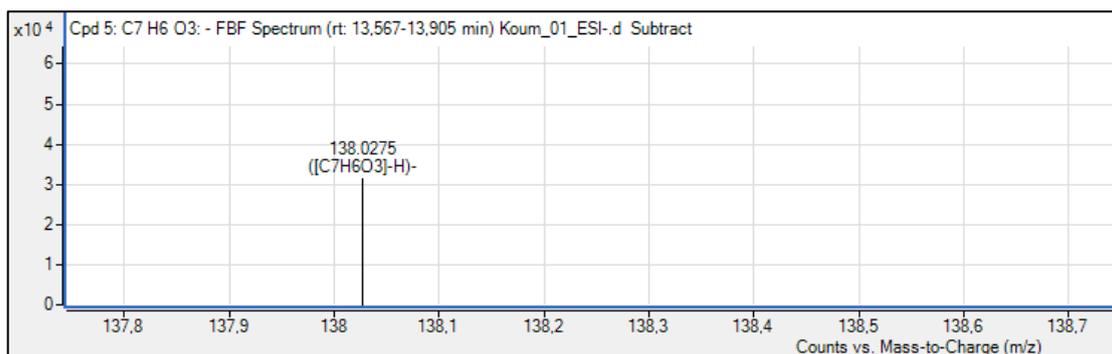
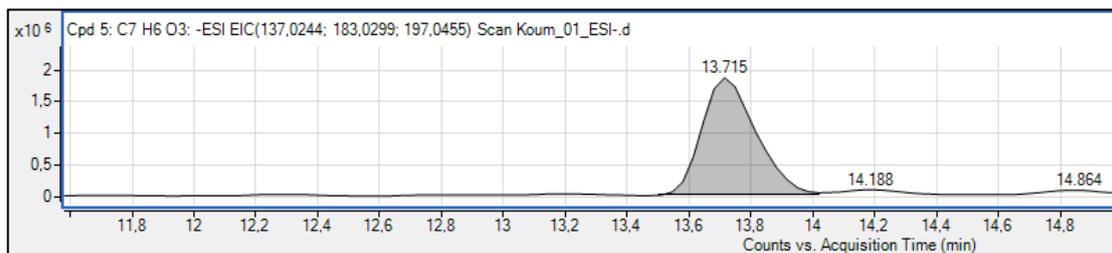
Hydroxytyrosol ($C_8H_{10}O_3$)



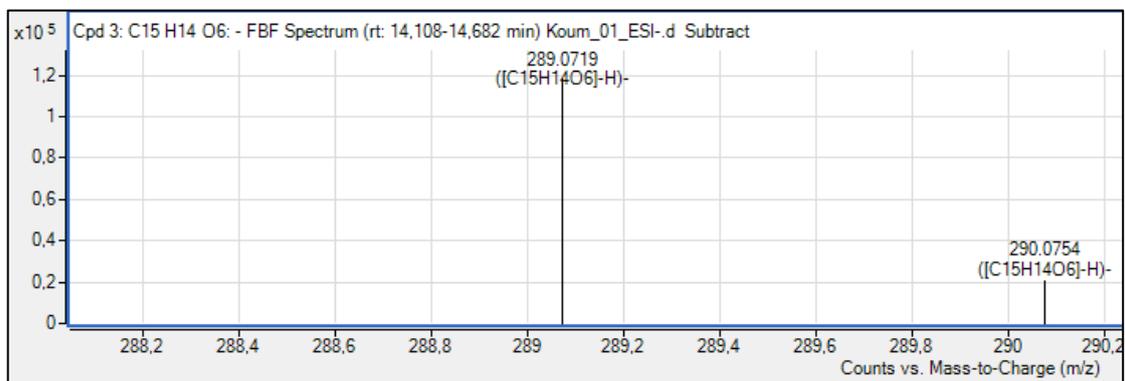
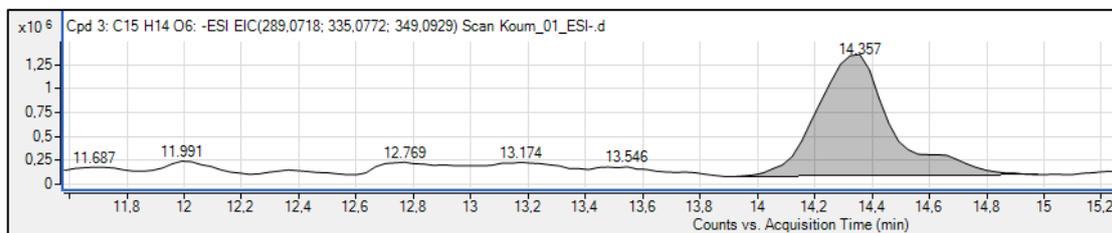
Tyrosol ($C_8H_{10}O_2$)



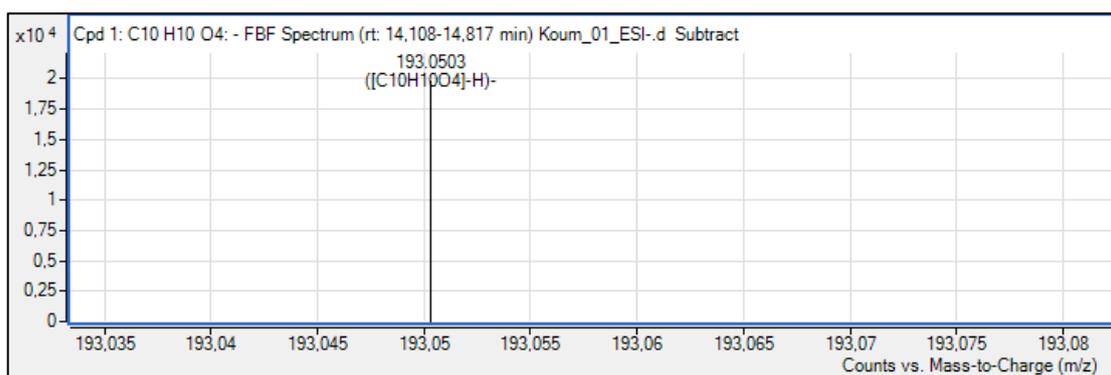
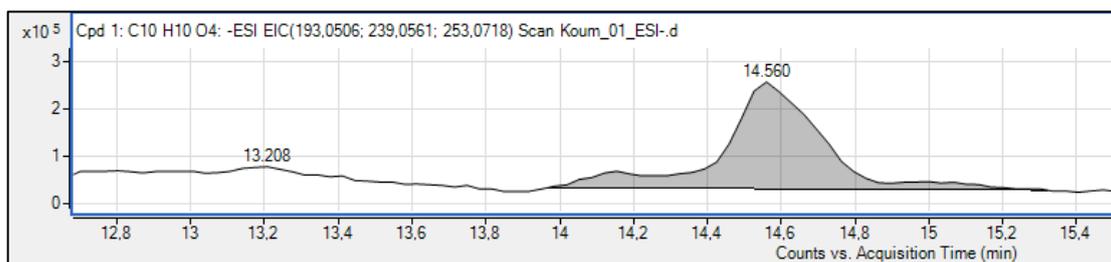
p-Hydroxybenzoic acid ($C_7H_6O_3$)



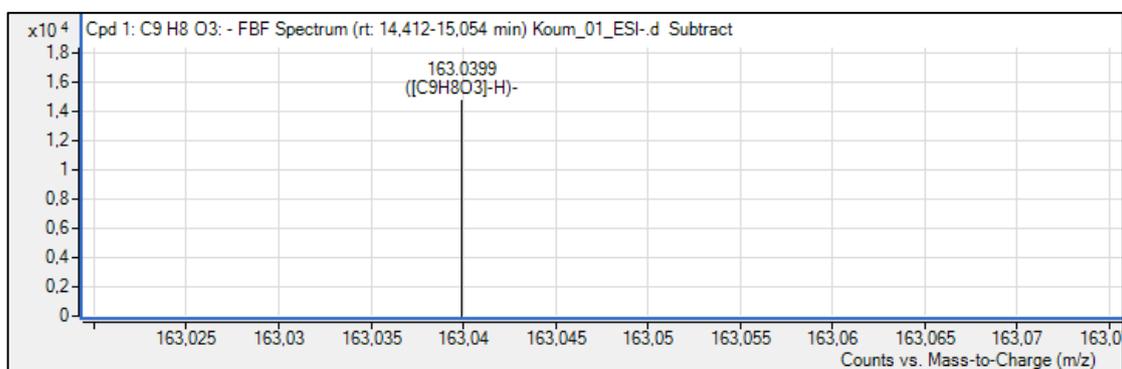
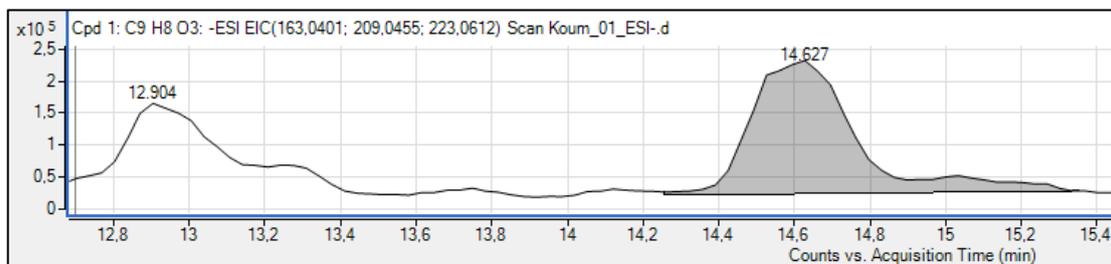
Catechin ή epicatechin ($C_{15}H_{14}O_6$)



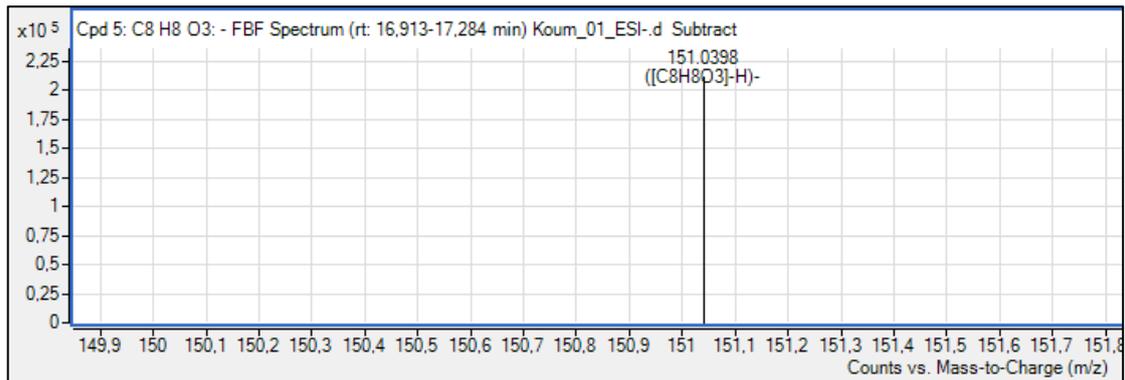
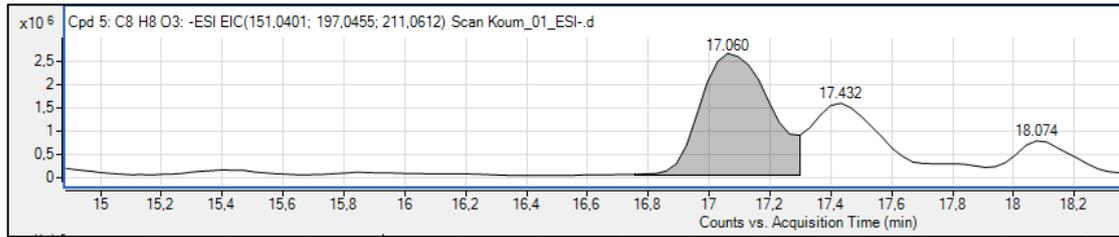
Ferulic acid (C₁₀H₁₀O₄)



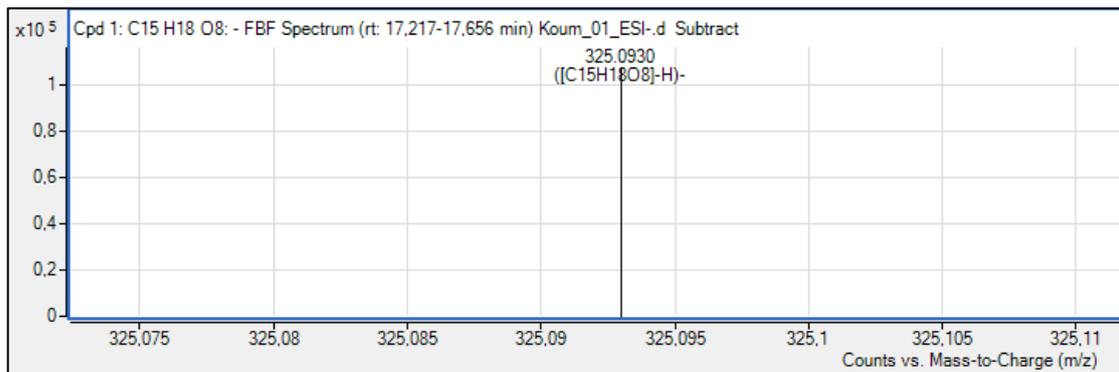
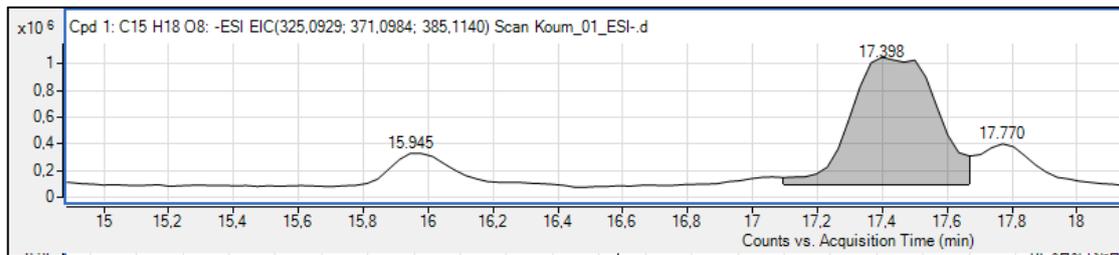
p-Coumaric acid (C₉H₈O₃)



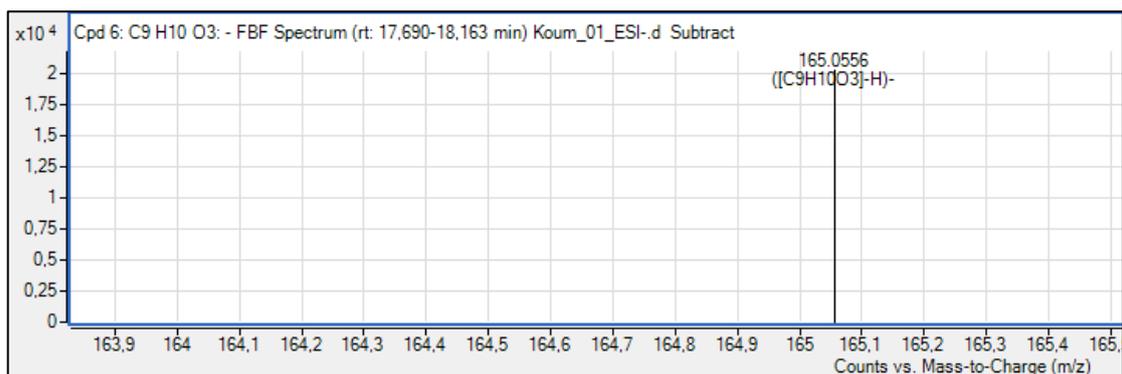
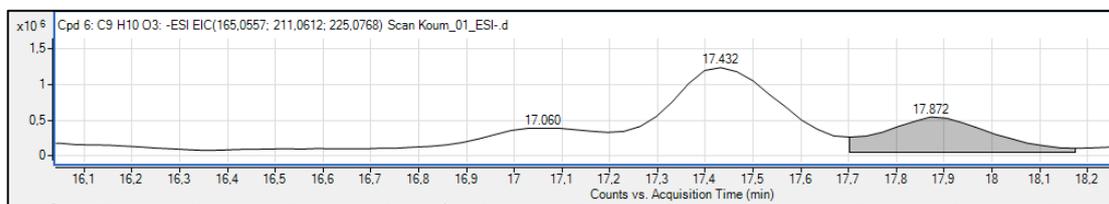
Vanillin ($C_8H_8O_3$)



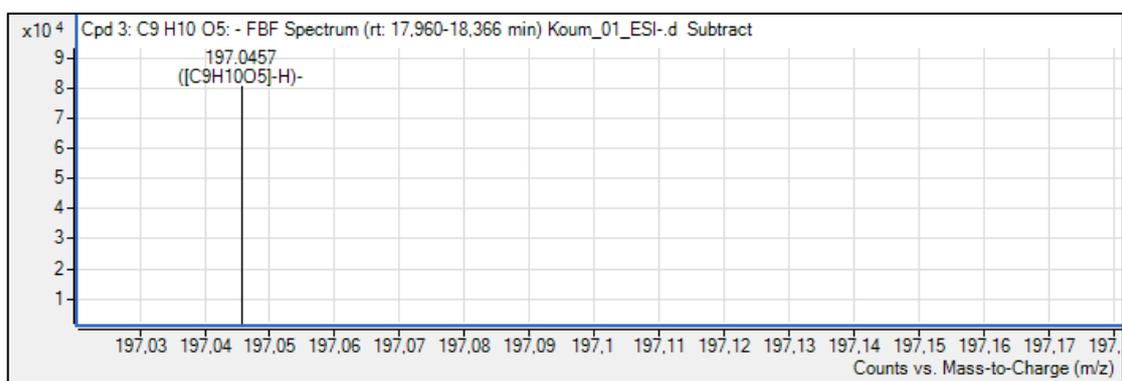
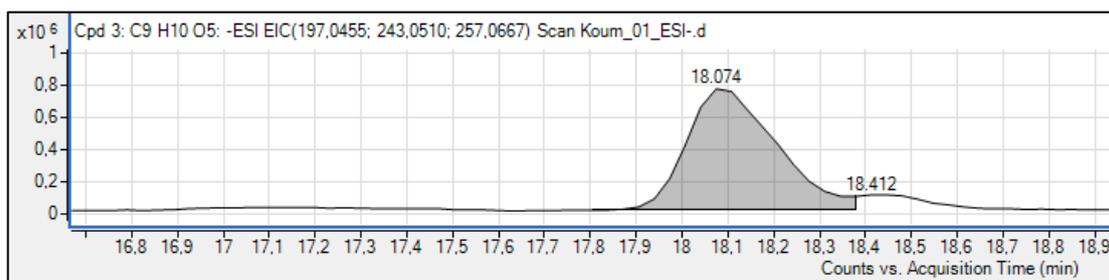
Coumaric acid hexoside ($C_{15}H_{18}O_8$)



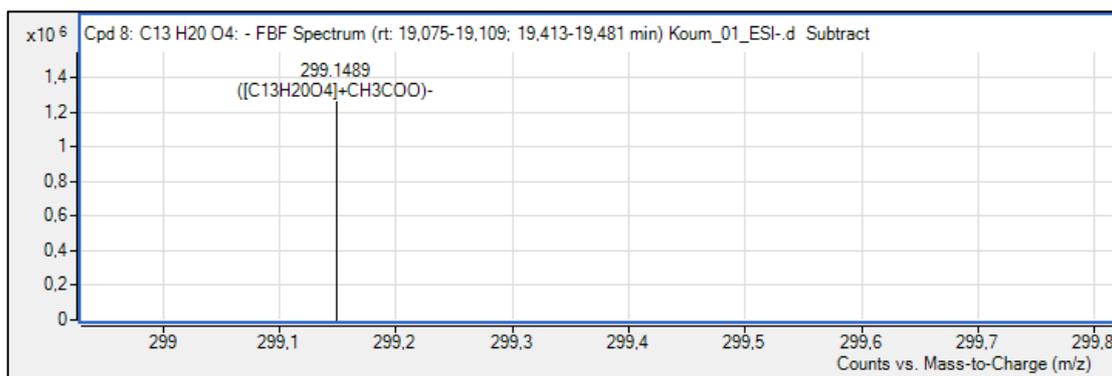
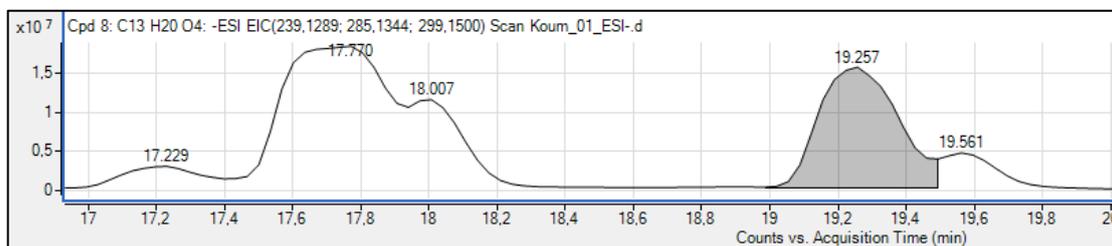
Ethyl vanillin ($C_9H_{10}O_3$)



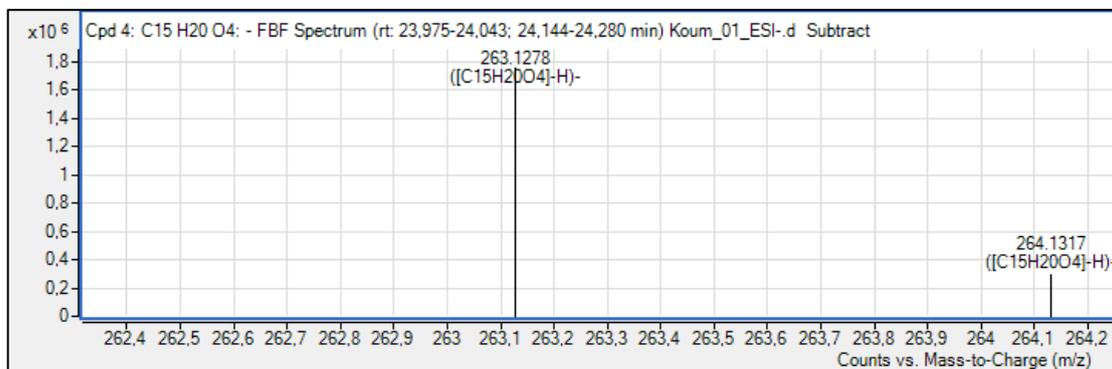
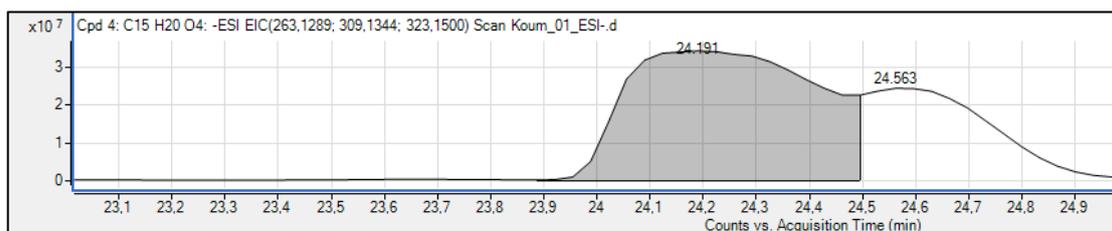
Syringic acid ($C_9H_{10}O_5$)



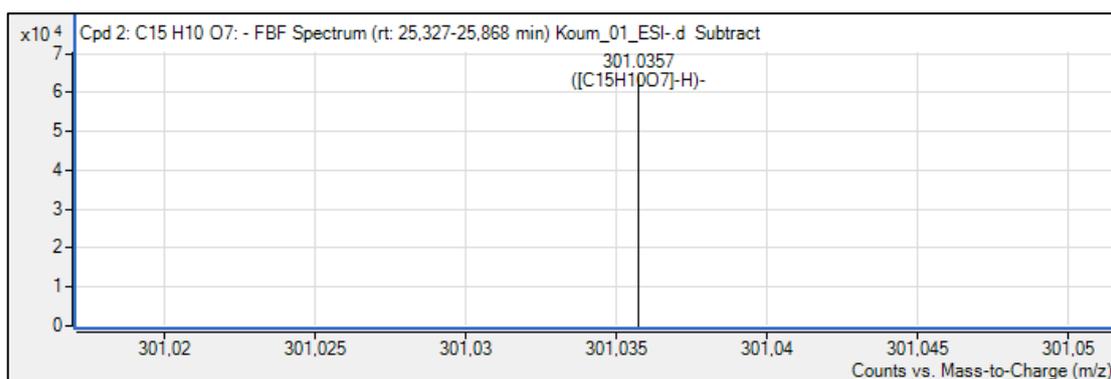
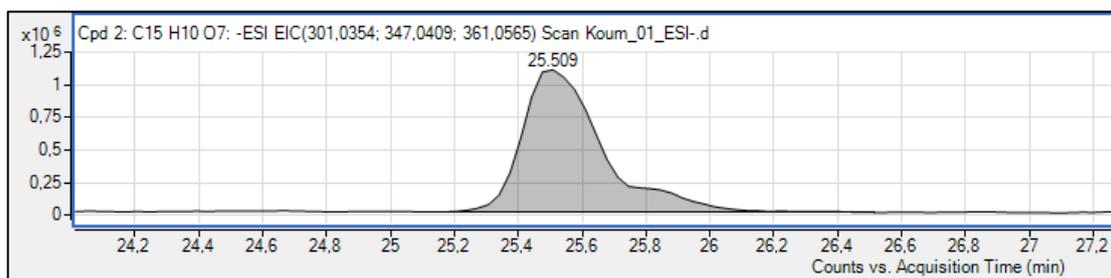
Unedone (C₁₃H₂₀O₄)



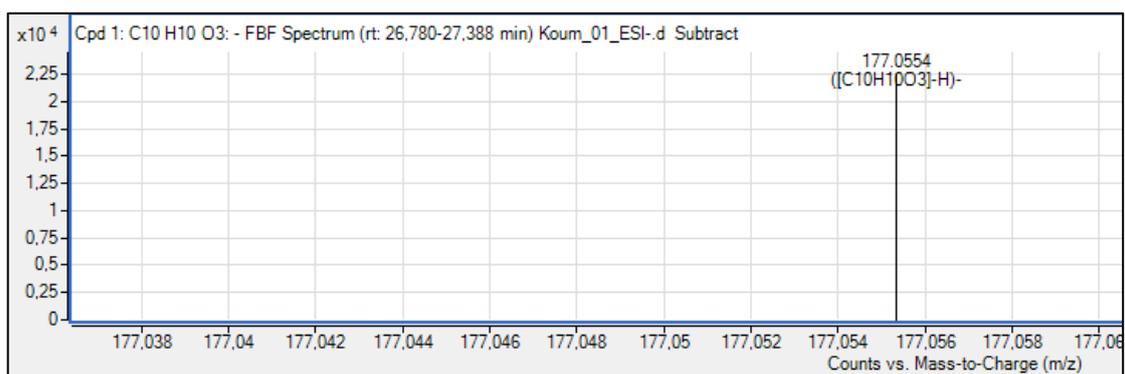
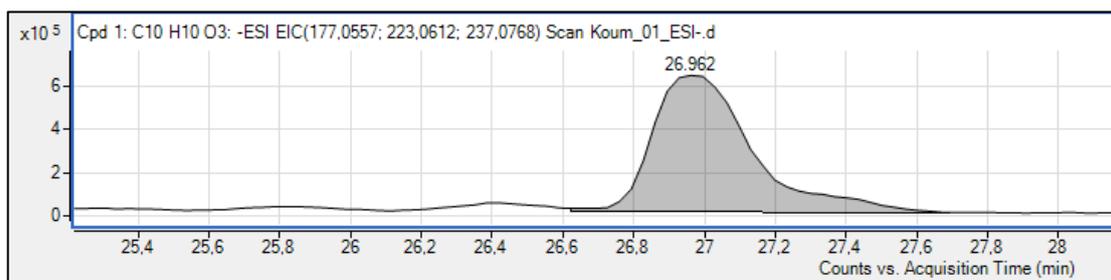
Abscisic acid (C₁₅H₂₀O₄)



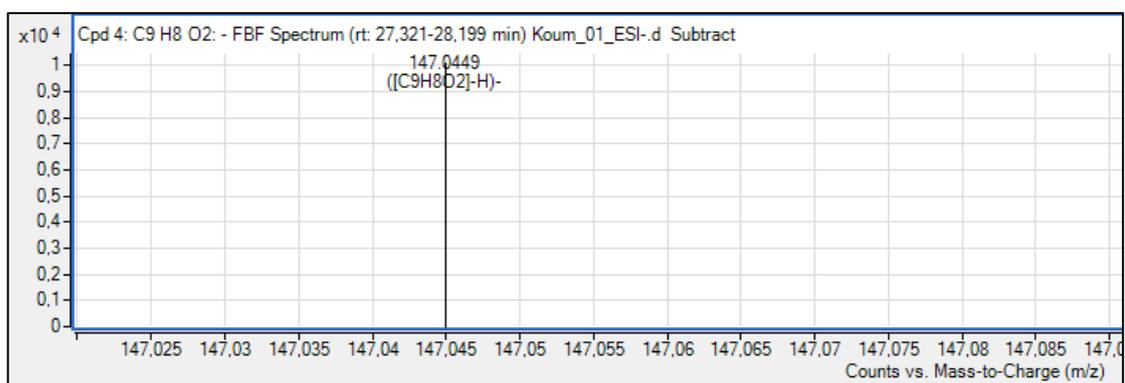
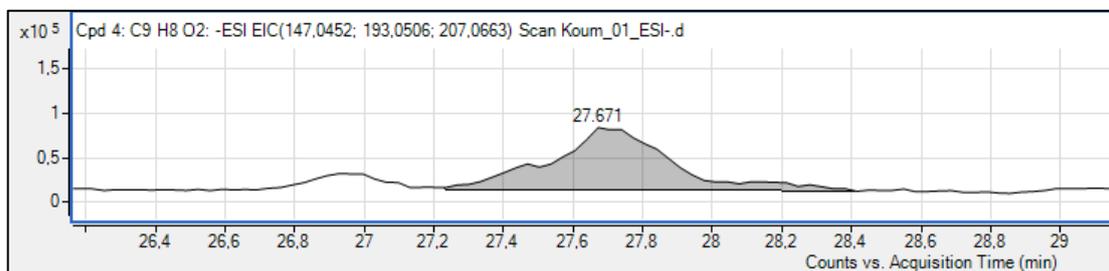
Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$)



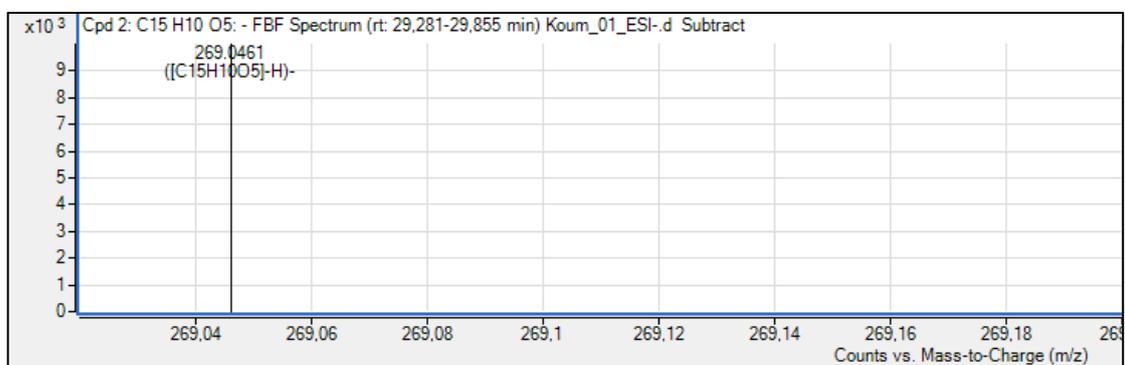
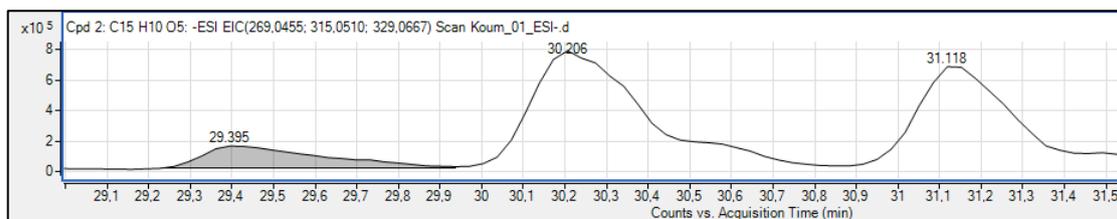
p-Coumaric acid methyl ester ($C_{10}H_{10}O_3$)



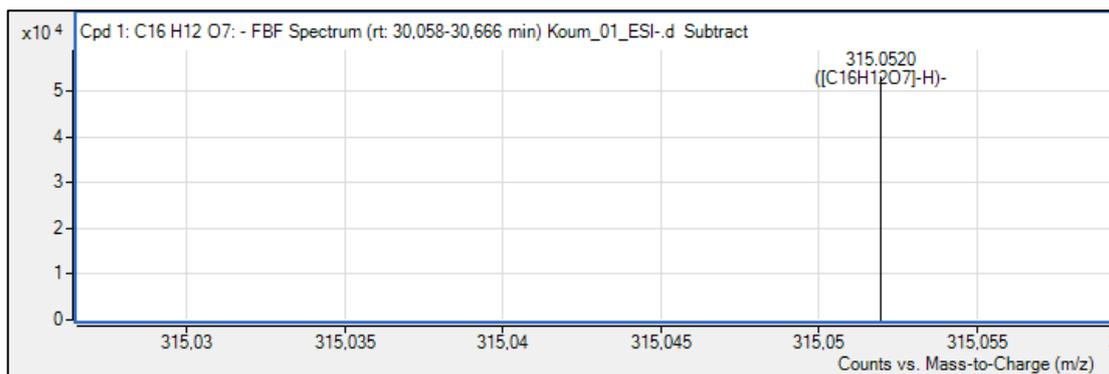
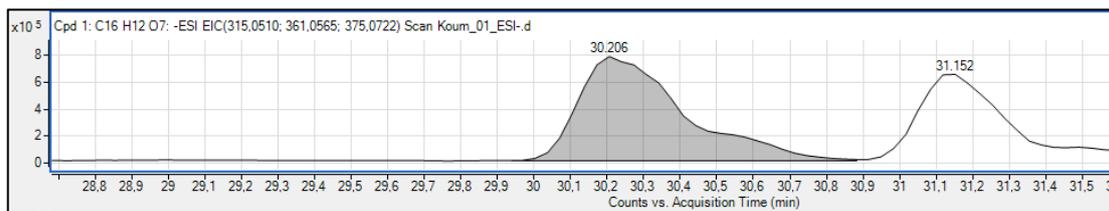
Cinnamic acid ($C_9H_8O_2$)



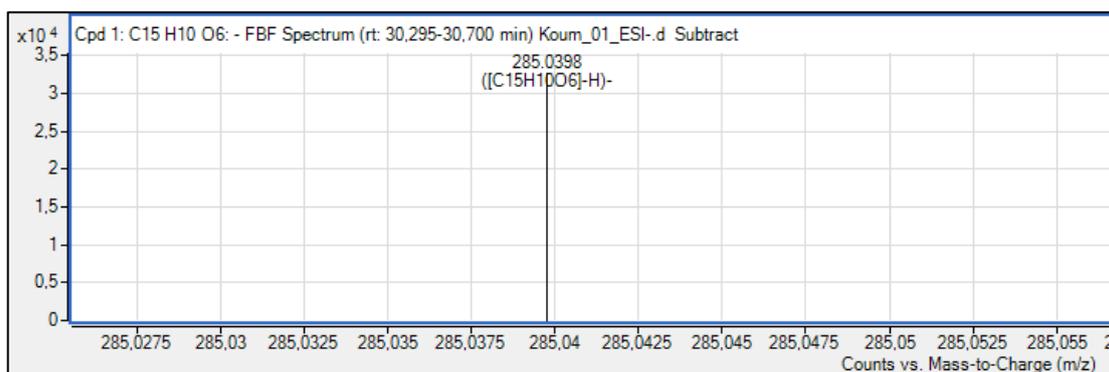
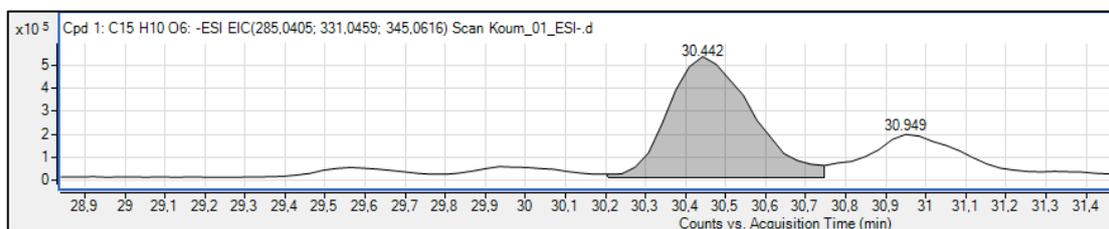
Apigenin ($C_{15}H_{10}O_5$)



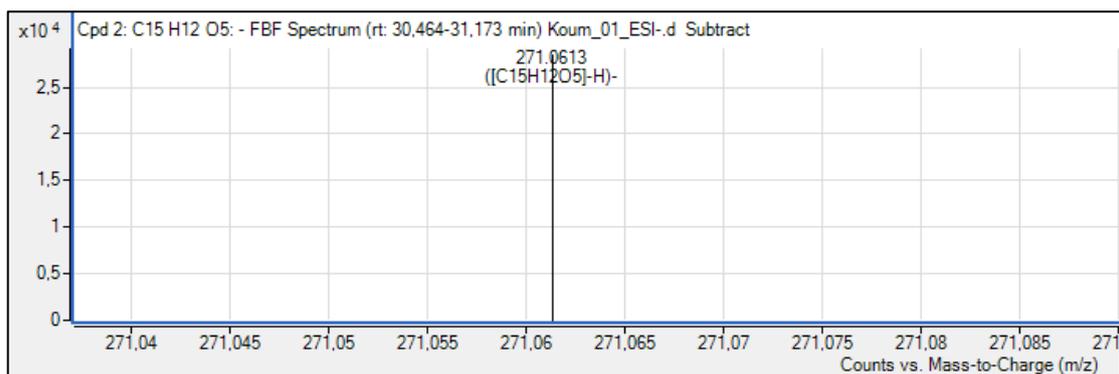
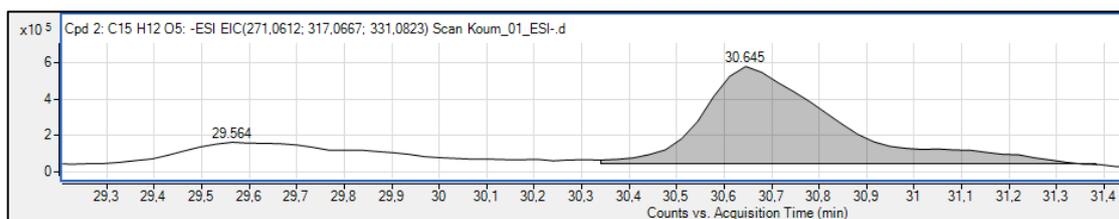
Isorhamnetin ($C_{16}H_{12}O_7$)



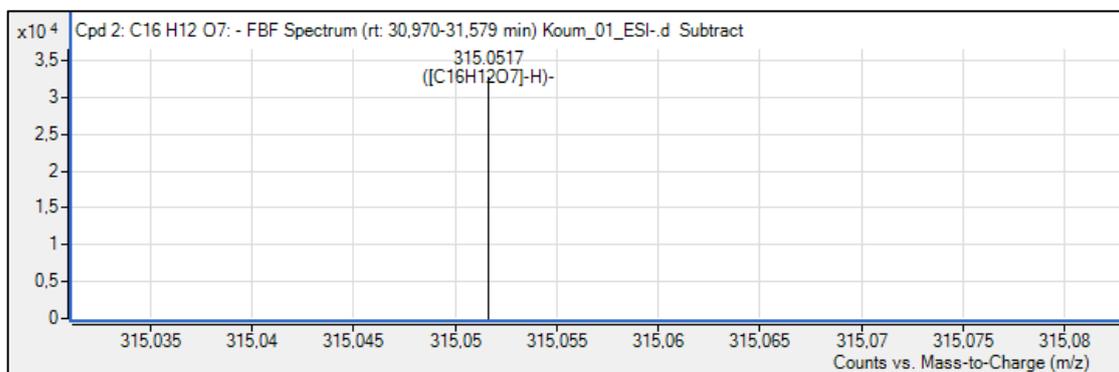
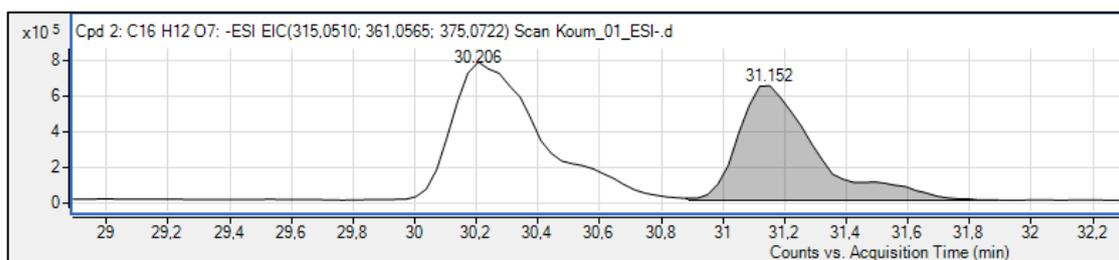
Luteolin ή Kaempferol ($C_{15}H_{10}O_6$)



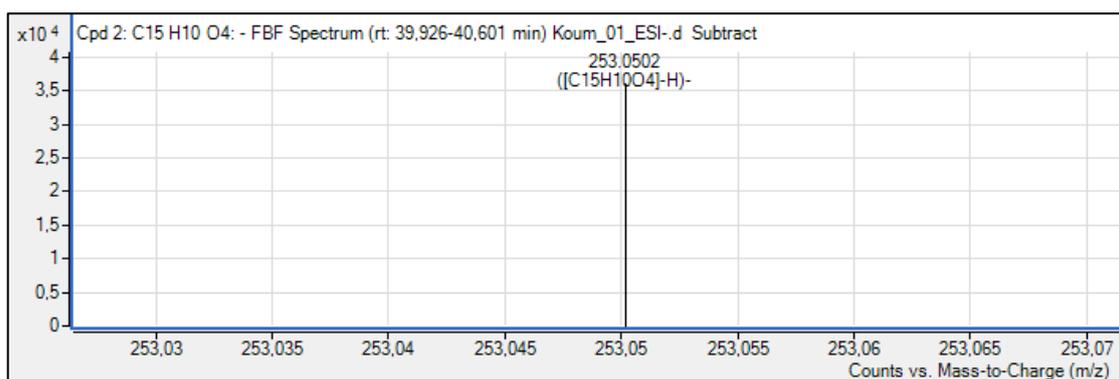
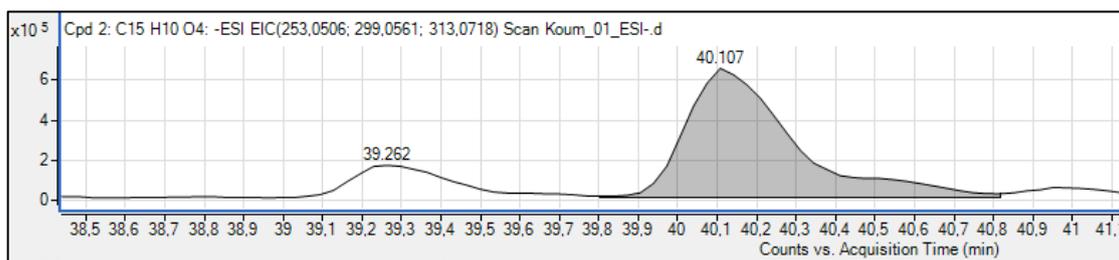
Naringenin ($C_{15}H_{12}O_5$)



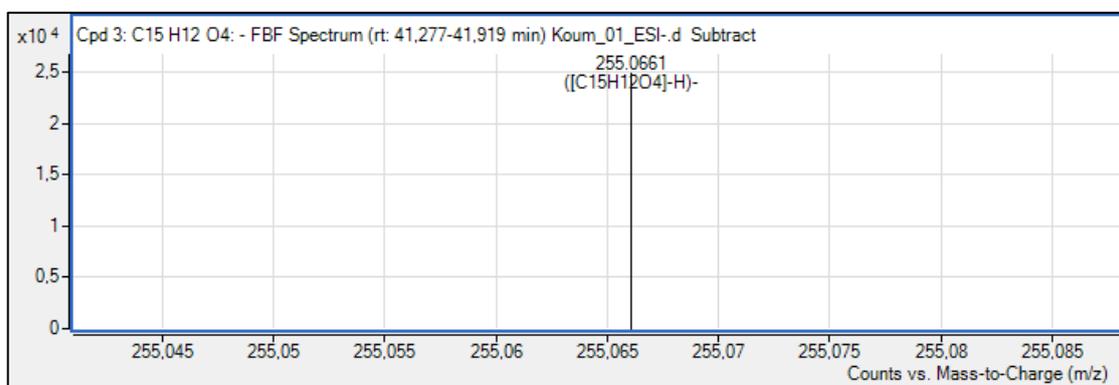
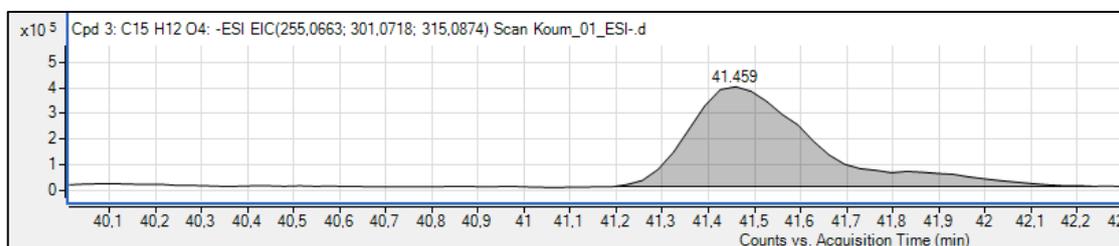
Rhamnetin ($C_{16}H_{12}O_7$)



Chrysin (C₁₅H₁₀O₄)



Pinocembrin (C₁₅H₁₂O₄)



Galangin ($C_{15}H_{10}O_5$)

