



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μέλι ερείκης: Φασματοσκοπική μελέτη (FTIR, Raman) μελέτη των φαινολικών συστατικών και του πτητικού κλάσματος παραληφθέντος με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης

Φωτεινή Α. Χρυσουλάκη

Επιβλέπων καθηγητής:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Μελέτη

Μέλι ερείκης: Φασματοσκοπική μελέτη (FTIR, Raman), μελέτη των φαινολικών συστατικών και του πτητικού κλάσματος παραληφθέντος με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης

Heather honey: Spectroscopic study (FTIR, Raman), study of the phenolic components and the volatile fraction obtained by the solid phase microextraction technique

Φωτεινή Α. Χρυσουλάκη

Εξεταστική Επιτροπή:

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελευθέριος Αλυσσανδράκης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΛΜΕΠΑ

Μέλι ερείκης: Φασματοσκοπική μελέτη (FTIR, Raman) μελέτη των φαινολικών συστατικών και του πτητικού κλάσματος παραληφθέντος με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης

*ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκε το μέλι ερείκης ελληνικής προέλευσης. Αντικείμενο μελέτης είναι η βελτιστοποίηση της εκχύλισης χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) και παραλαβή του πτητικού κλάσματος με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και μελέτη του με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μαζών (GC-MS). Επιπλέον, η παραλαβή με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και χρωματογραφική μελέτη των φαινολικών ενώσεων με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (LC/Q-TOF MS) και η φασματοσκοπική μελέτη (FT-IR, Raman) για τον γρήγορο προσδιορισμό βασικών συστατικών.

Τα κύρια συστατικά που παρελήφθησαν από τυχαίο δείγμα μελιού ερείκης με την τεχνική SPME και αναλύθηκαν με GC-MS, ήταν ο 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας, η βενζαλδεΐδη, η 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη, η 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-Ισοφορόνη), η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη, η (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο[5.1.0.0 (2,4)]οκταν-5-όνη, το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο, η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (σαφρανάλη) και η (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη). Για την βελτιστοποίηση της παραλαβής αυτών, από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση στην παραλαβή του πτητικού κλάσματος είναι: η θερμοκρασία στους 60 °C, ο χρόνος εξισορρόπησης στα 30 min, ο χρόνος εκχύλισης στα 15 min, η ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα στα 100 rpm, ο όγκος δείγματος προς εκχύλιση στα 6 mL και η αναλογία νερό:μέλι η 1:3 v/m. Τα φαινολικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίζουν τα μέλια ερείκης ήταν κυρίως το καφεϊκό οξύ, το 4-υδροξυ-3,5-διμεθοξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας και το αμπισικό οξύ. Πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργικές ομάδες και για τον σκελετό των μορίων παρείχε η φασματοσκοπική μελέτη

(FT-IR, Raman), δηλαδή για τα σάκχαρα, το νερό, τα αμινοξέα, τα οργανικά οξέα και τα φαινολικά συστατικά που υπάρχουν στο μέλι ερείκης.

Επιστημονική περιοχή: Μέλι ερείκης

Λέξεις κλειδιά: Μέλι, Ερείκη, Υγρή Χρωματογραφία, Αέρια Χρωματογραφία, Βελτιστοποίηση, Φασματοσκοπία IR, Raman

Heather honey: Spectroscopic study (FTIR, Raman) study of the phenolic components and the volatile fraction obtained by the solid phase microextraction technique

*Msc Food, Nutrition and Health
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of General Chemistry*

ABSTRACT

In the present master's thesis, the heather honey of Greek origin was studied. The object of the study is the optimization of the extraction using the Response Surface Methodology (RSM) and the isolation of the of the volatile fraction with the technique of solid phase microextraction (SPME) and its study with the technique of gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS). Furthermore, the isolation with solid phase extraction (SPE) and the chromatographic study of phenolic compounds using the Health High Pressure Chromatography (LC/Q-TOF MS) technique and the spectroscopic study (FT-IR, Raman) for the rapid identification of key components.

The main components obtained from a random sample of heather honey by the SPME technique and analyzed by GC-MS were ethyl 4-methoxybenzoate, benzaldehyde, 4-methoxybenzaldehyde, 3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one (α -Isophorone), 2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione, (E)-1,6,6-trimethyl-7-(3-oxobut-1-en-1-yl)-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octan-5-one, 1,1,5-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene, 2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-diene-1-carbaldehyde (Safranal) and (E)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one (Damascenone). In order to optimize the obtainment of the above, after the statistical analysis of the results the best experimental developments to achieve the maximum efficiency are: the temperature at 60 °C, the equilibration time at 30 min, the extraction time at 15 min, the speed of the magnetic stirrer at 100 rpm, the volume of sample to be extracted at 6 mL and the ratio of water: honey 1: 3. The phenolic constituents identified and characterizing heather honey were mainly caffeic acid, methyl syringate and abscisic acid. Information about the functional groups and the skeleton of the molecules was provided by the spectroscopic study (FT-IR, Raman), ie for the sugars, water, amino acids, organic acids and apparent components present in the heather honey.

Scientific area: Heather honey

Keywords: Honey, Heather, Liquid Chromatography, Gas Chromatography, Optimization, IR Spectroscopy, Raman

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Γενικής Χημείας, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2020-2021. Επειδή μια επιστημονική μελέτη δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από ένα άτομο, αισθάνομαι την ανάγκη να αναφερθώ και να ευχαριστήσω όλους όσοι συνέβαλαν με τον τρόπο τους να ολοκληρωθεί η διπλωματική μου εργασία και στήριξαν αυτή μου την προσπάθεια.

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη του επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Γ.Π.Α., κυρίου Χρήστου Παππά. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο αντικείμενο έρευνας και μελέτης, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, τη συμπαράστασή του και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος.

Επίσης, ευχαριστώ βαθύτατα τον καθηγητή του Γ.Π.Α., κύριο Πέτρο Ταραντίλη, για τις εποικοδομητικές τους υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, ως μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Ιδιαίτερα επιθυμώ να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Μαρίνο Ξαγοράρη για την άριστη συνεργασία που είχαμε στο πλαίσιο εκπόνησης της εργασίας, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για να μου δώσει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις αλλά και για τη συνεχή υποστήριξη και βοήθειά του, καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους διδάσκοντες του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, καθώς μου εμφύσησαν το ενδιαφέρον και την αγάπη για την έρευνα και μέσα από τις εισηγήσεις τους με ώθησαν να διερευνήσω τον τρόπο σκέψης μου και να φτάσω στο σημείο της συγγραφής της παρούσας εργασίας καθώς και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενικής Χημείας για την εξαιρετική συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μελέτης.

Τέλος, με αυτή την ευκαιρία θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους σε όλη αυτή την πορεία 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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
Κατάλογος εικόνων	8
Κατάλογος πινάκων	10
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ.....	11
Α.1 Η μέλισσα	11
Α.2 Η γύρη, το νέκταρ και το μέλι	12
Α.3 Η ιστορία του μελιού και οι χρήσεις του	14
Α.4 Νομοθεσία για το μέλι	14
Α.5 Στατιστικά στοιχεία παραγωγής και κατανάλωσης μελιού	15
Α.6 Διάκριση και τύποι μελιών	17
Α.7 Η ερείκη και το μέλι της	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	22
Β.1 Περιγραφή μελιού	22
Β.2 Συστατικά μελιού	22
Β.3 Άλλα συστατικά	23
Β.4 HMF - υδροξυμεθυλοφουρουράλη.....	24
Β.5 Ένζυμα	24
Β.6 Νερό	24
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
Γ.1 Περιγραφή και μεθοδολογία μελέτης.....	27

Γ.2 Βελτιστοποίηση παραλαβής συστατικών του αρώματος μελιού ερείκης με SPME και ανάλυση με GC-MS.....	27
Γ.2.1 Πειραματική πορεία	27
Γ.2.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	34
Γ.3 Εκχύλιση πτητικών συστατικών μελιού ερείκης και ανάλυση με GC-MS.....	56
Γ.3.1 Πειραματική πορεία	56
Γ.3.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	57
Γ.4 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων σε δείγμα μελιού ερείκης και χρωματογραφική μελέτη με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (LC/Q-TOF MS).	61
Γ.4.1 Πειραματική πορεία	62
Γ.4.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	65
Γ.5 Φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου μελιού ερείκης με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR.....	71
Γ.5.1 Πειραματική πορεία	71
Γ.5.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	72
Γ.6 Φασματοσκοπική μελέτη του χημικού προφίλ μελιού ερείκης με χρήση της φασματοσκοπίας Raman	73
Γ.6.1 Πειραματική πορεία	73
Γ.6.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	74
Συμπεράσματα.....	77
Βιβλιογραφία	79
Παράρτημα 1	86
Παράρτημα 2	99
Παράρτημα 3	103

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Η μορφολογία της μέλισσας.....	11
Εικόνα 2. Η μέλισσα κουβαλώντας γύρη.....	12
Εικόνα 3. Διατροφική αξία μελιού σύμφωνα με τον F.A.O. 2019.	15
Εικόνα 4. Παγκόσμια παραγωγή μελιού ανά χώρα.	16
Εικόνα 5. Οι μεγαλύτεροι καταναλωτές μελιού ημερησίως ανά άτομο	16
Εικόνα 6. Τα τρία είδη ερείκης που αναφέρθηκαν	18
Εικόνα 7. Η εξάπλωση τριών ειδών ερείκης ανα τον κόσμο	19
Εικόνα 8. Φθινοπωρινό και ανοιξιάτικο ερεικόμελο	21
Εικόνα 9. Το μέλι ποικίλει στο χρώμα.....	22
Εικόνα 10. Μέλι ερείκης απ' όπου παρασκευάστηκαν τα δείγματα.	28
Εικόνα 11. Αρχή μεθόδου SPME - GC/MS	28
Εικόνα 12. Αρχή μεθόδου SPME - GC/MS.....	28
Εικόνα 13. Τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο SPME - GC/MS.	29
Εικόνα 14. Πειραματική διαδικασία SPME - GC/MS.....	32
Εικόνα 15. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης GC.....	33
Εικόνα 16. Τα κύρια συστατικά του πτητικού κλάσματος σε ποσοστό επί του συνόλου και παρελήφθησαν με την τεχνική SPME στα δείγματα μελιού ερείκης.	36
Εικόνα 17. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από τις διαφορετικές θερμοκρασίες που αναλύθηκαν τα δείγματα 30, 45 και 60 °C.....	38
Εικόνα 18. Διάγραμμα διασποράς βενζαλδεΐδης σε σχέση με τη θερμοκρασία.....	40
Εικόνα 19. Πλέγμα συσχέτισης βενζαλδεΐδης	41
Εικόνα 20. Διάγραμμα διασποράς 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνης (α-Ισοφορόνη) σε σχέση με τη θερμοκρασία και την ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα.	42
Εικόνα 21. Πλέγμα συσχέτισης 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνης.	43
Εικόνα 22. Διάγραμμα διασποράς 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνης (4-οξοϊσοφορόνη) σε σχέση με τη θερμοκρασία.....	43
Εικόνα 23. Πλέγμα συσχέτισης 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνης (4-οξοϊσοφορόνη).....	44

Εικόνα 24. Διάγραμμα διασποράς 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδης (Σαφρανάλη) σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον όγκο του δείγματος.	45
Εικόνα 25. Πλέγμα συσχέτισης 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (Σαφρανάλη)	46
Εικόνα 26. (Α) Διάγραμμα διασποράς της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης (Β) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης.....	47
Εικόνα 27. Διάγραμμα διασποράς του 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδروναφθαλινίου σε σχέση με τη θερμοκρασία και την ταχύτητα αναδευτήρα.	48
Εικόνα 28. Πλέγμα συσχέτισης του 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλινίου.	48
Εικόνα 29. (Α) Διάγραμμα διασποράς της (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνης (δαμασκηνόνη) σε σχέση με τη θερμοκρασία και (Β) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης.....	49
Εικόνα 30. (Α) Διάγραμμα διασποράς της (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνης σε σχέση με τη θερμοκρασία και (Β) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης.	50
Εικόνα 31. (Α) Διάγραμμα διασποράς του 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρα σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης (Β) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης.....	51
Εικόνα 32. Διάγραμμα ράβδων αποδοχής αναφορικά με το επιθυμητό αποτέλεσμα.	54
Εικόνα 33. Διαγράμματα επιφάνειας απόκρισης (contour και 3D-surface) αποδοχής του χρόνου εξισορρόπησης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.....	55

Κατάλογος πινάκων

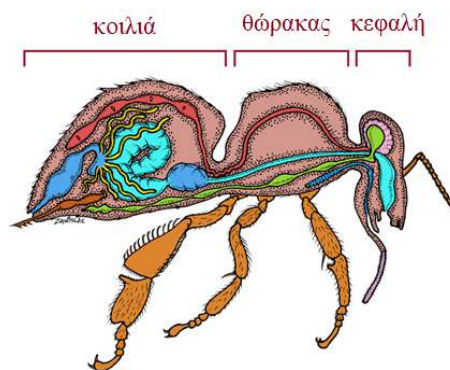
Πίνακας 1. Είδη ερείκης απ' όπου προέρχεται η παραγωγή του Ευρωπαϊκού ερεικόμελου. Πηγή: Persano Oddo et al. 2004.	18
Πίνακας 2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά Ελληνικού <i>Erica manipuliflora</i> L. Πηγή: Θρασυβούλου et al., 2001).	21
Πίνακας 3. Κύρια συστατικά του μελιού	23
Πίνακας 4. Παράγοντες που επιλέχθηκαν για την πειραματική περιοχή.....	29
Πίνακας 5. Τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο SPME – GC/MS.....	30
Πίνακας 6. Ανεξάρτητοι πειραματικοί παράγοντες και σχεδιασμοί.	31
Πίνακας 7. Πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τυχαίο δείγμα μελιού ερείκης σε πειραματικό σχεδιασμό.	34
Πίνακας 8. Κύριες πτητικές ενώσεις που επιλέχθηκαν για το ερεικόμελο.	39
Πίνακας 9. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA.	52
Πίνακας 10. Βέλτιστες συνθήκες, αποδοχής και προβλεπόμενη μέση τιμή για κάθε κύρια πτητική ένωση.....	53
Πίνακας 11. Οι βέλτιστες τιμές επιφανειακής απόκρισης που πρότεινε το στατιστικό πρόγραμμα.	55
Πίνακας 12. Δείγματα μελιών ερείκης που χρησιμοποιήθηκαν.....	57
Πίνακας 13. Πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν από δείγματα μελιού ερείκης. ..	58
Πίνακας 14. Φαινολικά συστατικά μελιών ερείκης.	66
Πίνακας 15. Οι βασικές κορυφές ενδεικτικού φάσματος FT-IR δείγματος μελιού ερείκης.	73
Πίνακας 16. Οι αποδόσεις των βασικών κορυφών αντιπροσωπευτικού φάσματος Raman μελιού ερείκης.	76

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

A.1 Η μέλισσα

Από άποψη μορφολογίας (Εικ. 1) το σώμα της μέλισσας χωρίζεται σε τρία ευδιάκριτα μέρη. Η κεφαλή, η οποία περιλαμβάνει τους οφθαλμούς (σύνθετοι και απλοί), τις κεραίες (γονατοειδείς-νηματοειδείς) και τα στοματικά μόρια: άνω και κάτω χείλος, δύο άνω γνάθοι, δύο κάτω γνάθοι και ο υποφάρυγγας, ενώ ο τύπος των στοματικών μορίων είναι λείχων –μυζητικός. Το επόμενο μέρος του σώματος της μέλισσας είναι ο θώρακας ο οποίος αποτελείται από τρία μέρη και το καθένα από τα οποία φέρει ένα ζεύγος ποδιών, ενώ το μεσαίο και τελευταίο μέρος φέρουν από ένα ζεύγος πτερύγων (μεμβρανοειδούς τύπου). Το τρίτο μέρος του σώματος της μέλισσας είναι η κοιλιά η οποία αποτελείται από 10 κοιλιακούς δακτυλίους. Στην κοιλιά βρίσκονται το σύνολο των εσωτερικών οργάνων της μέλισσας και το κεντρί (Αλυσσανδράκης, 2007).



Εικόνα 1: Η μορφολογία της μέλισσας.

Οι μέλισσες είναι κοινωνικά και συνεργάσιμα έντομα. Οι κάτοικοι μιας κυψέλης χωρίζονται γενικά σε τρεις τύπους. Οι εργάτριες είναι οι μόνες μέλισσες που βλέπουν οι περισσότεροι άνθρωποι. Αυτές οι μέλισσες είναι θηλυκά που δεν είναι ανεπτυγμένα για αναπαραγωγή. Ο ρόλος τους είναι να αναζητούν τροφή (γύρη και νέκταρ από λουλούδια), να χτίζουν και προστατεύουν την κυψέλη, να καθαρίζουν, να φροντίζουν την κυκλοφορία του αέρα χτυπώντας τα φτερά τους και να εκτελούν πολλές άλλες κοινωνικές λειτουργίες. Η δουλειά της βασίλισσας είναι απλή - γεννά τα αυγά που θα

γεννήσουν την επόμενη γενιά μελισσιών της κυψέλης. Συνήθως υπάρχει μόνο μια βασίλισσα σε μια κυψέλη. Εάν η βασίλισσα πεθάνει, οι εργάτριες θα δημιουργήσουν μια νέα βασίλισσα, ταΐζοντας μία από τις θηλυκές προνύμφες με μια αποκλειστική διατροφή ενός φαγητού που ονομάζεται «βασιλικός πολτός». Αυτό το ελιξίριο δίνει τη δυνατότητα στην εργάτρια να εξελιχθεί σε γόνιμη βασίλισσα. Οι βασίλισσες ρυθμίζουν επίσης τις δραστηριότητες της κυψέλης παράγοντας χημικά που καθοδηγούν τη συμπεριφορά των άλλων μελισσών. Οι αρσενικές μέλισσες ονομάζονται κηφήνες - η τρίτη κατηγορία μελισσών και δεν κάνουν καμία δουλειά. Αποτελούν περίπου το δέκα τοις εκατό του πληθυσμού της αποικίας και περνούν όλη τους τη ζωή τρώγοντας μέλι και περιμένοντας την ευκαιρία να ζευγαρώσουν (Hertzberg, 2019).

A.2 Η γύρη, το νέκταρ και το μέλι

Οι μέλισσες εξαρτώνται πλήρως από τα άνθη για τροφή, η οποία αποτελείται από γύρη και νέκταρ, το τελευταίο μερικές φορές τροποποιείται και αποθηκεύεται ως μέλι. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι οι μέλισσες και τα λουλούδια που επικονιάζουν, εξελίχθηκαν ταυτόχρονα. Καθώς οι μέλισσες περνούν από λουλούδι σε λουλούδι συλλέγοντας γύρη, μια μικρή ποσότητα παρασύρεται από το σώμα τους και εναποτίθεται στα λουλούδια που επισκέπτονται (Εικ. 2). Αυτή η απώλεια γύρης είναι σημαντική, διότι συχνά οδηγεί σε διασταυρούμενη επικονίαση των φυτών. Η πρακτική αξία των μελισσών ως επικονιαστών είναι πολύ μεγαλύτερη από την αξία της παραγωγής μελιού και κεριού τους (The Editors of Encyclopaedia Britannica).



Εικόνα 2. Η μέλισσα κουβαλώντας γύρη.

Οι γυρεόκοκκοι εμφανίζονται απροσδόκητα στα μέλια όταν παρασκευάζονται από τις μέλισσες. Κατά τη συλλογή νέκταρ από τα λουλούδια, οι γυρεόκοκκοι ενίοτε καταπίνονται από τις μέλισσες και μεταφέρονται στην κυψέλη. Εκεί μεταφέρονται μαζί με το νέκταρ από μέλισσα σε μέλισσα στα κελιά αποθήκευσης για να στεγνώσουν και να μετατραπούν σε μέλι. Σε ξεχωριστές διαδρομές, οι μέλισσες συλλέγουν γυρεόκοκκους από λουλούδια και τους μεταφέρουν με τα πίσω πόδια τους στην κυψέλη για αποθήκευση σε άλλα κελιά μελιού. Αυτό είναι γνωστό ως "ψωμί μελισσών" και χρησιμοποιείται για τη διατροφή των προνυμφών με πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία (Barth, 2004, Nicolson, 2011).

Το νέκταρ είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τις μέλισσες και αποτελείται κυρίως από σάκχαρα, νερό και άλλα συστατικά. Το νέκταρ, συνήθως, αποτελείται από σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη. Η περιεκτικότητά του σε νερό μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στην πιο συνηθισμένη κατάσταση των μελισσών που συλλέγουν συμπυκνωμένο νέκταρ, η περιεκτικότητα σε νερό καθορίζει το ιξώδες και ως εκ τούτου το ανώτερο όριο για αποτελεσματική συλλογή από τις μέλισσες, το οποίο είναι περίπου 60% m/m σε σακχαρόζη. Άλλα συστατικά υπάρχουν σε μικρές ποσότητες στο νέκταρ αλλά μπορεί να είναι σημαντικά από άποψη διατροφής (και να συμβάλει στη γεύση του μελιού). Τα αμινοξέα είναι οι επόμενες πιο άφθονες διαλυμένες ουσίες του νέκταρος μετά τα σάκχαρα. Λίγα είναι γνωστά για τις συγκεντρώσεις ανόργανων ιόντων στο νέκταρ. Τα άλατα σε νέκταρ (και γύρη) μπορεί να είναι σημαντικά στην ωσμωρύθμιση της μέλισσας. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες στο νέκταρ, όπως τα αλκαλοειδή και τα φαινολικά, είναι μη αναμενόμενοι δεδομένης της ελκυστικής λειτουργίας του νέκταρος, ωστόσο, μπορεί να χρησιμεύσουν για την προσέλκυση εξειδικευμένων επικονιαστών ή την αποτροπή ανεπιθύμητων επισκεπτών (Nicolson, 2011).

Το μέλι είναι μια γλυκιά παχύρρευστη ουσία που παρασκευάζεται από τις μέλισσες με πρώτη ύλη φυτικές ή ζωικές μελιτώδεις εκκρίσεις ή νέκταρ ανθέων. Η πρώτη ύλη για την παραγωγή μελιού από την μέλισσα είναι το νέκταρ. Για την παραγωγή του η μέλισσα προσθέτει δικά της ένζυμα, των οποίων οι δράσεις δεν είναι ακόμη εξακριβωμένες. Η πυκνότητα του μελιού εξαρτάται από την περιεχόμενη υγρασία και τη θερμοκρασία. Όσο

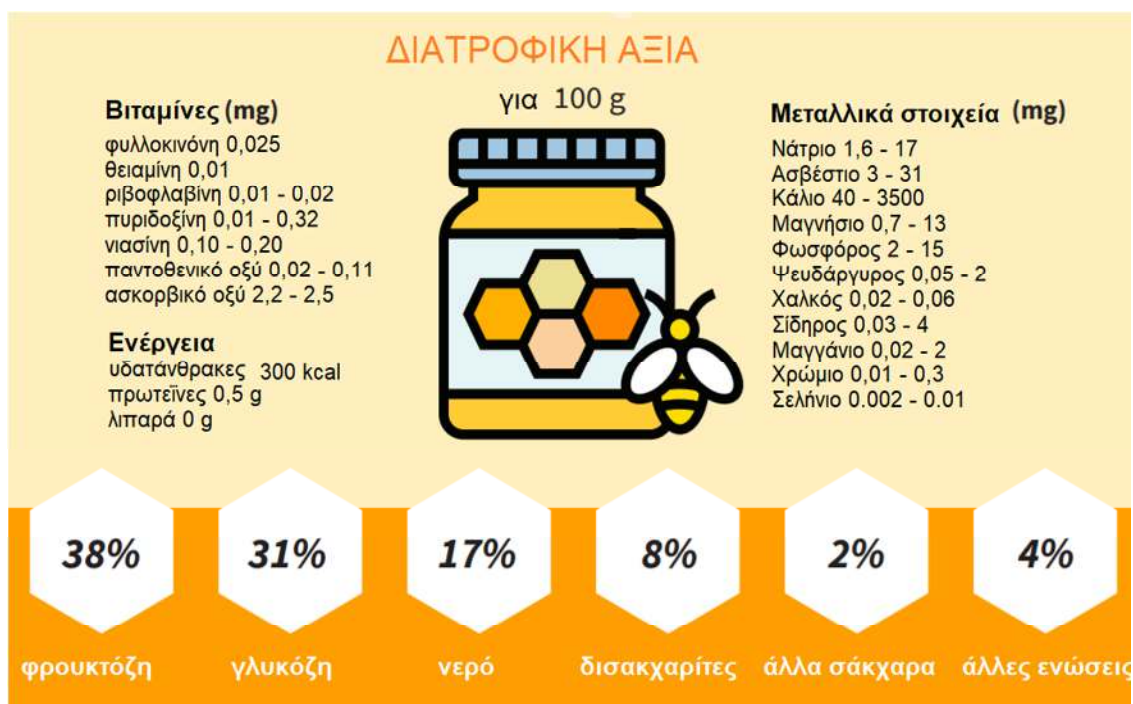
μικρότερη η θερμοκρασία και η υγρασία τόσο πιο παχύρευστο είναι το μέλι (Jean-Prost, 2014, Κοντόλαιμος, 2014).

A.3 Η ιστορία του μελιού και οι χρήσεις του

Η χρήση του μελιού ως εσωτερικού και εξωτερικού παράγοντα υγείας είναι πολύ παλαιότερη από την ιστορία της ίδιας της ιατρικής. Η παλαιότερη καταγεγραμμένη ιατρική συνταγή, συμπεριλαμβάνοντας το μέλι, προέρχεται από τους Σουμέριους. Το μέλι χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο ενάντια σε μια ποικιλία ασθενειών στην αρχαία Αίγυπτο, την Ελλάδα και τη Ρώμη. Υπάρχουν συχνές αναφορές στο μέλι σε ιερά κείμενα. Το μέλι έχει μακρά παράδοση, όχι μόνο στη δυτική ιατρική αλλά και στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική και την Αγιουρβέδα. Δεν χρησιμοποιούνταν από ιατρούς μετά την πτώση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας και στη μεσαιωνική εποχή το μέλι δεν ήταν δημοφιλές θέμα ιατρικών κειμένων και πολύ λίγα γράφτηκαν για τη χρήση του εκείνη την περίοδο. Τον 19ο αιώνα το μέλι παραμελήθηκε λόγω της ανάπτυξης της σύγχρονης συνθετικής ιατρικής. Ωστόσο, η επιστροφή του ήταν παρατηρήσιμη ήδη από τις αρχές του 20ου αιώνα και το μέλι χρησιμοποιήθηκε για μια σειρά προβλημάτων υγείας καθώς και ως θεραπευτικό μέσο των πληγών (Kuropatnicki et al. 2018).

A.4 Νομοθεσία για το μέλι

Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Γεωργίας και Τροφίμων (Food and Agriculture Organization, FAO): «Το μέλι είναι μια θρεπτική, υγιεινή και φυσική τροφή που παράγεται από τις μέλισσες». Τα οφέλη του υπερβαίνουν τη χρήση του ως γλυκαντικό καθώς περιέχει αρκετά μέταλλα, ένζυμα, βιταμίνες και πρωτεΐνες που προσδίδουν μοναδικές θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες. Το μέλι μπορεί να είναι μονοανθικό εάν ένα συγκεκριμένο φυτικό νέκταρ και η περιεκτικότητα σε γύρη επικρατεί σε προκαθορισμένα ποσοστά ή πολυανθικό αν περιέχει ένα απροσδιόριστο μείγμα διαφορετικών νέκταρ και γύρης. Λόγω των περιβαλλοντικών, γεωγραφικών και κλιματολογικών συνθηκών, το μέλι μπορεί να ποικίλει σε περιεκτικότητα σε γύρη και σχετική υγρασία. Το μέλι παράγεται και στις πέντε ηπείρους και η κατανάλωσή του ποικίλλει από χώρα σε χώρα επίσης λόγω πολιτιστικών λόγων και διατροφικών συνηθειών (FAO, 2019).



Εικόνα 3. Διατροφική αξία μελιού σύμφωνα με τον F.A.O. 2019.

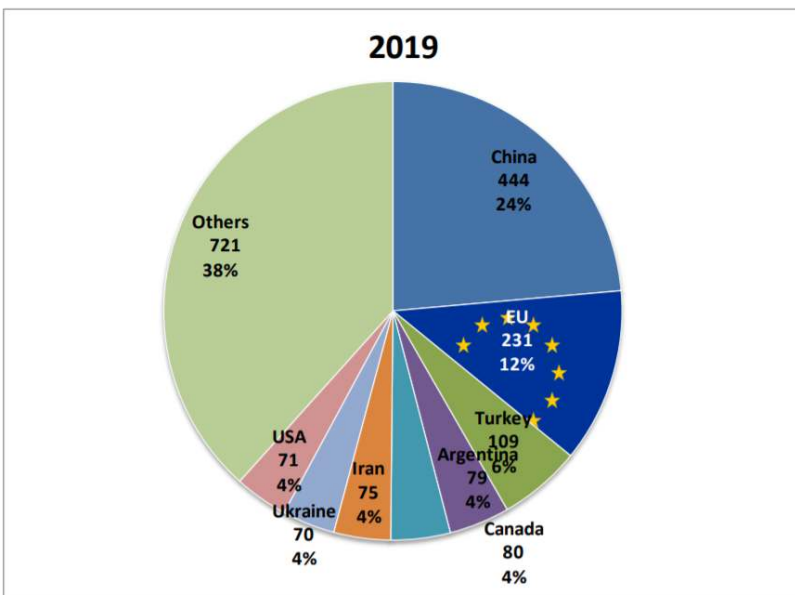
Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η διατροφική αξία του μελιού σύμφωνα με τον F.A.O. Το μεγαλύτερο ποσοστό από το οποίο αποτελείται το μέλι είναι εμφανώς τα σάκχαρα φρουκτόζη και γλυκόζη ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η υγρασία και μόλις μόνο ένα μικρό ποσοστό των 4% ανήκει στα υπόλοιπα συστατικά.

A.5 Στατιστικά στοιχεία παραγωγής και κατανάλωσης μελιού

Σύμφωνα με το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (United States Department of Agriculture, USDA), η παραγωγή μελιού το 2019 ανήλθε σε 157 εκατομμύρια λίρες από 2,81 εκατομμύρια μελίτσια, αυξημένη κατά 2% από το 2018 που ήταν λιγότερες κατά 1%. Η απόδοση ανά μελίτσια ήταν κατά μέσο όρο 55,8 λίρες, αυξημένη κατά 2% από τις 54,5 λίρες το 2018 (USDA, 2020).

Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Επιτροπή κάνοντας παρουσίαση για την αγορά του μελιού ανάρτησε κάποια στοιχεία σχετικά με την παγκόσμια παραγωγή αυτού κατά το έτος 2019 (Εικ. 4). Όπως παρατηρείται, πρώτη παγκοσμίως σε παραγωγή μελιού έρχεται η Κίνα με ποσοστό 24%, ενώ η Ευρώπη δεύτερη με το μισό ποσοστό από την πρώτη στο 12% (European Commission, 2021).

	2018	2019	Share of World Production
China	447	444	24%
European Union	240	231	12%
Turkey	108	109	6%
Canada	95	80	4%
Argentina	79	79	4%
Iran	76	75	4%
Ukraine	71	70	4%
USA	70	71	4%
India	68	67	4%
Russian Federation	65	64	3%
Mexico	64	62	3%
Ethiopia	50	54	3%
Brazil	42	46	2%
Tanzania	31	31	2%
Republic of Korea	26	30	2%
Angola	23	23	1%
Uruguay	21	22	1%
Kenya	21	14	1%
Viet Nam	20	22	1%
New Zealand	20	23	1%
Central African Republic	16	16	1%
Uzbekistan	13	13	1%
Chile	12	12	1%
Other	249	224	12%
	1 926	1 882	



Εικόνα 4. Παγκόσμια παραγωγή μελιού ανά χώρα (1000 T) το 2019 σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2021.

Επιπλέον, επεσήμανε ότι οι χώρες της ΕΕ με τη μεγαλύτερη παραγωγή μελιού (Ρουμανία, Ισπανία, Ουγγαρία, Γερμανία, Ιταλία, Ελλάδα, Γαλλία και Πολωνία) βρίσκονται κυρίως στη νότια Ευρώπη, όπου οι κλιματικές συνθήκες ευνοούν περισσότερο τη μελισσοκομία.

Οι μεγαλύτεροι καταναλωτές μελιού (g/ άτομο ημερησίως)

1	Δημοκρατία Κεντρικής Αφρικής	9,62	6	Αυστρία	3,62
2	Νέα Ζηλανδία	5,55	7	Τουρκία	3,33
3	Σλοβενία	4,4	8	Ουκρανία	3,15
4	Ελλάδα	4,24	9	Σλοβακία	3,02
5	Ελβετία	3,87	10	Μαυροβούνιο	3,01

Εικόνα 5. Οι μεγαλύτεροι καταναλωτές μελιού ημερησίως ανά άτομο F.A.O. 2019.

Σύμφωνα με τον FAO, οι κάτοικοι της Δημοκρατίας της Κεντρικής Αφρικής είναι οι μεγαλύτεροι καταναλωτές μελιού παγκοσμίως, ενώ η Ελλάδα έρχεται στην τέταρτη θέση (Εικ. 5). Τέλος αναφέρει ότι η Ιταλία είναι η μόνη χώρα στον κόσμο που παράγει περισσότερες από 30 ποικιλίες μελιού, αλλά είναι και η χώρα που καταναλώνει τη μικρότερη ποσότητα μελιού (FAO, 2019).

Δεν υπάρχουν πρόσφατες πληροφορίες σχετικά με την παραγωγή του μελιού στην Ελλάδα. Σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (Υπ.Α.Α.Τ), κατά το έτος 2009 η παραγωγή μελιού στην Ελλάδα ανήλθε στους 21.331,89 τόνους μελιού με αυξημένο μελισσοκομικό ενδιαφέρον στην Περιφέρεια της Κεντρικής Μακεδονίας (Υπ.Α.Α.Τ, 2012). Ενώ σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή, 20.651 τόνοι ήταν η παραγωγή μελιού στην Ελλάδα το 2015 και το 21% να προερχόταν από την Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας (ΕΛΣΤΑΤ, 2018).

A.6 Διάκριση και τύποι μελιών

Τα κυριότερα είδη μελιού διακρίνονται σε κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση και ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής. Όσον αφορά την προέλευση, το μέλι διακρίνεται σε δύο κατηγορίες. Το μέλι ανθέων ή μέλι νέκταρος το οποίο λαμβάνεται από νέκταρ φυτών και στο μέλι μελιτώματος το οποίο που λαμβάνεται κυρίως από εκκρίματα εντόμων, απομυζούντων φυτά (Hemiptera), ευρισκόμενα πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών ή εκκρίσεις προερχόμενες από ζώντα μέρη των φυτών. Σχετικά με τον τρόπο παραγωγής ή/και παρουσίασης, το μέλι χωρίζεται σε έξι κατηγορίες, το μέλι κηρήθρας, το μέλι με τεμάχια κηρήθρας ή τεμάχια κηρήθρας με μέλι, το μέλι στραγγισμένο, το μέλι φυγοκέντρισης, το μέλι πίεσης και το διηθημένο μέλι (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2016).

Με βάση την ελληνική νομοθεσία (ΦΕΚ 239/23.02.05), η βοτανική προέλευση μπορεί να αποδοθεί για οκτώ κατηγορίες αμιγών μελιών: πεύκου, ελάτου, θυμαριού, πορτοκαλιάς, ερείκης, καστανιάς, βαμβακιού και ηλίανθου.

A.7 Η ερείκη και το μέλι της

Η ερείκη προέρχεται από την οικογένεια των ερικοειδών (Ericaceae). Στην Ευρώπη τα είδη των φυτών ερείκης που συμβάλλουν στην παραγωγή του ερικόμελου είναι 10, με την Ισπανία, Ολλανδία, Δανία, Σκανδιναβία, Αγγλία, Πολωνία και Γερμανία να έρχονται πρώτες στη παραγωγή αυτού. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1, το φυτό από το οποίο προέρχεται το ερικόμελο των παραπάνω χωρών είναι το *Calluna vulgaris* L. (Persano Oddo et al. 2004).

Στην Ελλάδα, το μέλι ερείκης παράγεται σε ικανοποιητική ποσότητα με αυτό να βρίσκεται ανάμεσα στα οκτώ αμιγή μέλια (ΦΕΚ 239/23.02.05). Το μέλι ερείκης που

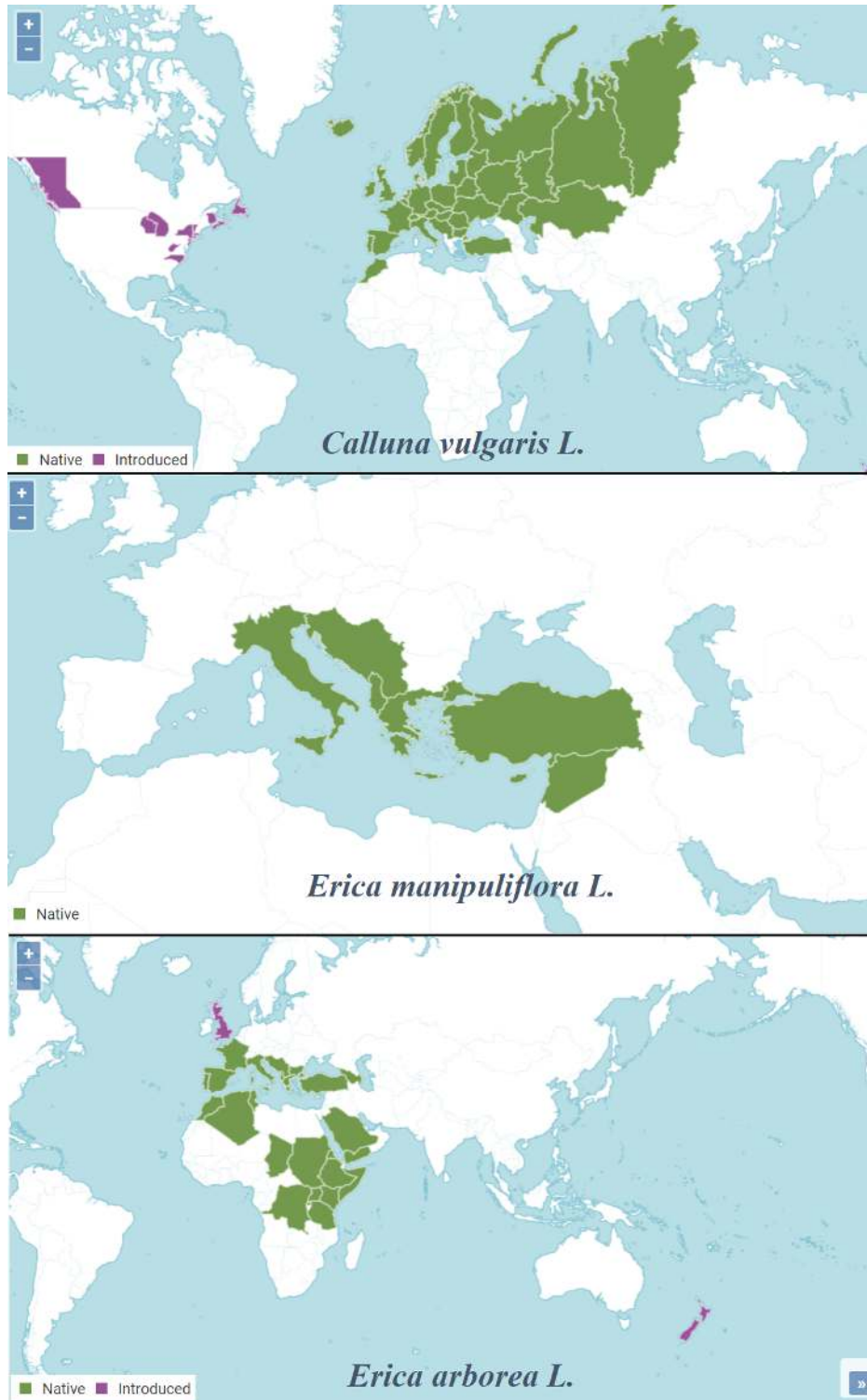
παράγεται στην Ελλάδα προέρχεται από δύο φυτά, την ανοιξιάτικη ερείκη (*Erica arborea* L.) και την φθινοπωρινή ερείκη (*Erica manipuliflora* L.), με την τελευταία να έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή (Εικ. 6). Αυτό συμβαίνει γιατί κατά το χρονικό διάστημα συλλογής της ανοιξιάτικης ερείκης, τα μελίσσια αναπτύσσονται και έτσι οι μέλισσες καταναλώνουν το μέλι.

Πίνακας 1. Είδη ερείκης απ' όπου προέρχεται η παραγωγή του Ευρωπαϊκού ερεϊκόμελου. Πηγή: Persano Oddo et al. 2004.

Είδος ερείκης	Μεγάλη παραγωγή	Μέτρια παραγωγή	Σπάνια παραγωγή
<i>Calluna vulgaris</i> L.	Ισπανία, Ολλανδία, Δανία, Σκανδιναβία, Αγγλία, Πολωνία, Γερμανία	Γαλλία	Ιταλία
<i>Erica arborea</i> L.	Ισπανία	Ιταλία, Γαλλία, Κροατία	Ελλάδα
<i>Erica manipuliflora</i> L.	-	Ελλάδα, Αλβανία, Κροατία	-
<i>Erica australis</i> L.	Ισπανία	-	-
<i>Erica carnea</i> L.	-	Γαλλία	-
<i>Erica cinerea</i> L.	Ισπανία	Γαλλία, Αγγλία	Πορτογαλία
<i>Erica multiflora</i> L.	Ισπανία	Κροατία	Ιταλία
<i>Erica scoparia</i> L.	Ισπανία	-	-
<i>Erica umbellata</i> L.	Ισπανία	-	-
<i>Erica vagans</i> L.	Ισπανία	Γαλλία	-



Εικόνα 6. Τα τρία είδη ερείκης που αναφέρθηκαν. Από αριστερά προς τα δεξιά: *Calluna vulgaris* L., *Erica manipuliflora* L. και *Erica arborea* L.



Εικόνα 7. Η εξάπλωση τριών ειδών ερείκης ανα τον κόσμο. Με πράσινο χρώμα αναπαρίστανται τα ιθαγενή είδη, ενώ με μωβ τα εισαγόμενα. Πηγή: <http://www.plantsoftheworldonline.org/>.

Η *Calluna vulgaris* L. (Εικ. 6) είναι ένας πολυετής θάμνος ύψους 20 – 50 cm, ενώ μπορεί να ξεπεράσει και το 1 m. Φύεται κυρίως στη Βόρεια και Δυτική Ευρώπη (Εικ. 7) και είναι το μοναδικό φυτό του γένους *Calluna* που ανήκει στην οικογένεια Ericaceae (Persano Oddo & Piro, 2004, Coats, 1992).

Η *Erica manipuliflora* L., (Εικ. 6) γνωστή και ως φθινοπωρινή ερείκη (ή σουσουρά), είναι ένας πολυετής, αειθαλής θάμνος ύψους 1 m και φύεται σε υψόμετρο που ξεκινάει από την επιφάνεια της θάλασσας και φτάνει τα 2000 m. Η ανθοφορία της διαρκεί από τέλος καλοκαιριού έως το τέλος του φθινοπώρου. Η άφθονη γύρη που δίνει σε συνδυασμό με την έλλειψη άλλων ανθισμένων φυτών κατά την περίοδο αυτή το κάνουν μία πολύ καλή πρωτεϊνούχο πηγή. Ως αυτοφυές (Εικ. 7), συναντάται σε Ιταλία, Κροατία, Αλβανία, Ελλάδα και Τουρκία (Σπύρου, 1981). Το μέλι της παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στην Ελλάδα, και είναι ένα προϊόν με υψηλή θρεπτική αξία και τονωτικό για τον ανθρώπινο οργανισμό. Παρατηρώντας τον Πίνακα 2., το χαρακτηριστικό που ξεχωρίζει το ερεικόμελο σε σύγκριση με άλλες κατηγορίες μελιών είναι η υγρασία (18,8%), αφού πολλές φορές υπερβαίνει ακόμα και το όριο των αγρονομικών διατάξεων που είναι το 20%, κάτι που θεωρείται ως ιδιομορφία κατ' εξαίρεση για το ερεικόμελο και είναι αποδεκτό. Έχει επίσης σχετικά υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα σε τιμές μεταξύ ανθόμελων και δασόμελων επιτρέποντας τη διάκρισή του από τα υπόλοιπα ανθόμελα. Το ερεικόμελο έχει κοκκινωπό χρώμα και χαρακτηριστική οσμή και γεύση. Λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε υγρασία και σε ζαχαρομύκητες, ξινίζει εύκολα (Εικ. 8). Κρυσταλλώνει στους 1 – 3 μήνες (σχετικά γρήγορα) λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε γλυκόζη, γεγονός που το καθιστά ανίκανο να αναμιχθεί με άλλα μέλια για εμπορικούς σκοπούς (χαρμάνια) (Θρασυβούλου, et al. 2002).

Η *Erica arborea* L., (Εικ. 6) γνωστή και ως ανοιξιιάτικη ερείκη, είναι ένα αειθαλές, πολυετές μικρό δέντρο ή θάμνος με ύψος έως 2,5 m. Η ανθοφορία του ξεκινάει από νωρίς το Φεβρουάριο στα χαμηλά και ζεστά μέρη και τελειώνει τον Απρίλιο με στο υψηλότερα. Συναντάται σε όλη τη νότια Ευρώπη και σε κάποιες χώρες της Αφρικής (Εικ. 7). Το ανοιξιιάτικο ερεικόμελο σε σχέση με το φθινοπωρινό είναι πιο ανοιχτόχρωμο (Εικ. 8), έχει διαφορετική γεύση, και χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, η οποία μπορεί να κυμανθεί υψηλότερα της φρουκτόζης (Θρασυβούλου, et al. 2002).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τον ΦΕΚ 239/23.02.05 για την ταυτοποίηση αμιγών ελληνικών μελιών, η οδηγία που δίνεται για το μέλι ερείκης είναι μόνον ο κύριος γυρεόκοκκος, ο οποίος ως ποσοστό των συνολικών γυρεόκοκκων των νεκταρογόνων φυτών πρέπει να είναι $\geq 45\%$.

Πίνακας 2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά Ελληνικού *Erica manipuliflora* L. Πηγή: Θρασυβούλου et al., 2001).

Χημικά Χ/κα	Αριθ. δειγμ.	Μέσος όρος	Ελάχ.-Μεγ. τιμή	Τυπική αποκλ	Συντελεστής Παράλ.%
Υγρασία %	35	18,8	16,0 - 23,0	2,19	11,6
Τέφρα %	35	0,4	0,3-0,6	0,11	27,5
pH	35	4,2	3,30- 4,62	0,27	6,4
HMF mg/Kg	35	4,3	0,0 - 11,9	3,2	7,4
Γλυκόζη %	35	31,2	29,4-38,8	1,5	4,8
Φρουκτόζη %	35	36,8	34,8-43,4	2,5	6,7
Γλυκόζη+Φρουκτόζη	35	68,0	64,2-82,2	4,1	6,0
Ανάγοντα ζάχαρα	35	74,3	69,8-81,7	8,3	11,1
Σουκρόζη %	35	0,25	0,20-0,50	0,04	16
Χρώμα 560 nm	35	0,524	0,396-0,644	0,114	26,8
Αγωγιμότητα mS.cm	35	0,67	0,56-0,89	0,16	23,8
Διαστάση DN	35	27,6	15,9 - 32,1	5,3	19,20
Ιμπερτάση IN	20	19,6	12,7-39,6	4,7	29,2
Προλίνη mg/kg	35	536	329-931	332	61,2
Συνολική οξύτητα meq/Kg	20	31,6	31,8-43,6	2,5	7,9
Ποσοστά γυρεοκόκκων%	35	63,3	45,0-90,0	15,6	24,6
Κάλιο mg/Kg	20	2,38	2,15-2,55	0,13	5,69
Νάτριο mg/Kg	20	0,1	0,1-0,1	0,0	0,0
Ασβέστιο mg/Kg	20	5,1	4,0-6,0	0,7	13,4
Μαγνήσιο mg/Kg	20	2,8	1,6-5,2	1,3	46,9
Μαγγάνιο mg/Kg	20	0,03	0,00-0,042	0,02	60,7
Ψευδάργυρο mg/Kg	20	-	-		-
Σίδηρος mg/Kg	20	-	-		-
Χαλκός mg/Kg	20-	-	-		-



Εικόνα 8. Φθινοπωρινό (αριστερά) και ανοιξιάτικο (δεξιά) ερεικόμελο από Ελληνική πιστοποιημένη βιολογική μελισσοκομία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

B.1 Περιγραφή μελιού

Σύμφωνα με τον ενημερωμένο (το 2019) CXS 12-1981¹ διατροφικό κώδικα Codex Alimentarius από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το μέλι αποτελείται ουσιαστικά από διαφορετικά σάκχαρα, κυρίως φρουκτόζη και γλυκόζη καθώς και άλλες ουσίες όπως οργανικά οξέα, ένζυμα και στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη συλλογή μελιού (Εικ. 3). Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άχρωμο έως σκούρο καφέ (Εικ. 9). Η συνοχή μπορεί να είναι ρευστή, ιξώδης ή εν μέρει έως πλήρως κρυσταλλωμένη. Η γεύση και το άρωμα ποικίλλουν, αλλά προέρχονται από τη φυτική προέλευση. Η διαφορά με τον ορισμό της ΕΕ είναι ότι αναφέρει πως το μέλι είναι μόνο μέλι σύμφωνα με τον ορισμό όταν παράγεται από μέλισσες *Apis mellifera* L..



Εικόνα 9. Το μέλι ποικίλει στο χρώμα, F.A.O. 2019.

B.2 Συστατικά μελιού

Το μέλι αποτελείται από ένα μείγμα σακχάρων, κυρίως γλυκόζης και φρουκτόζης (White, 1975). Εκτός από το νερό (συνήθως 17-20 %), το μέλι περιέχει επίσης πολύ μικρές ποσότητες άλλων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων μετάλλων, βιταμινών, πρωτεϊνών και αμινοξέων (Πίν. 3).

Ένα μικρό, αλλά σημαντικό συστατικό του μελιού είναι η γύρη. Η γύρη μεταφέρεται στη φωλιά των μελισσών (κυψέλη) και αποθηκεύεται μέσα της αρκετά ξεχωριστά από το νέκταρ, αλλά μερικοί κόκκοι γύρης βρίσκουν το δρόμο τους στο νέκταρ και τελικά στο μέλι. Η γύρη στο μέλι μπορεί να αναγνωριστεί χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο και δίνει έναν οδηγό για τα φυτά από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ και γύρη. Οι ειδικοί είναι σε θέση να καθορίσουν τη γεωγραφική προέλευση του μελιού από τη γύρη που περιέχει. Αυτή η επιστήμη της μελισσοπαλυνολογίας απαιτεί μόνο ένα οπτικό μικροσκόπιο για να δει την γύρη στο μέλι και γνώση των χαρακτηριστικών σχημάτων της γύρης που πρέπει να υπάρχουν σε μέλι. Σε πολλές χώρες, πραγματοποιείται τακτική

ανάλυση γύρης των τοπικά παραγόμενων μελιών και οι ειδικοί της γύρης έχουν ακριβή γνώση του φάσματος γύρης των μελιών της περιοχής τους.

Η περιεκτικότητα του μελιού σε «τέφρα» αποτελεί κυρίως τα μεταλλικά ιχνοστοιχεία. Τα μεταλλικά στοιχεία που υπάρχουν είναι ασβέστιο, χαλκός, σίδηρος, μαγνήσιο, μαγγάνιο, κάλιο, νάτριο και χλωρίδια, φωσφορικά άλατα, πυριτικά άλατα και θειικά άλατα. Τα σκούρα μέλια είναι συχνά πολύ πλούσια σε μεταλλικά στοιχεία, αλλά η διακύμανση της περιεκτικότητας αυτών σε διάφορα μέλια είναι μεγάλη. Αυτές οι μικρές ποσότητες μεταλλικών στοιχείων μπορεί να είναι σημαντικές για τη διατροφή του ανθρώπου (Bradbear, 2009).

Πίνακας 3. Κύρια συστατικά του μελιού

Κύρια συστατικά (99%)		
	%	Μέσος (%)
Νερό	13,4 - 26,6	17,0
Φρουκτόζη	21,7 - 53,9	39,3
Γλυκόζη	20,4 - 44,4	32,9
Σακχαρόζη	0,0 - 7,6	2,3
Άλλα σάκχαρα	0,1 - 16,0	8,5
Άλλα συστατικά (1%)		
	(%) του 1%	
Οξέα (γλυκονικό)	0,17-1,17	
Μεταλλικά στοιχεία	0,02-1,03	
Άζωτο (πρωτεΐνη)	0,00-0,13	
Ένζυμα	>0,1%	
Άρωμα	>0,1%	
Άλλα (HMF, κλπ.)	>0,1%	

B.3 Άλλα συστατικά

Ορισμένα μέλια έχουν πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε γύρη που τα κάνει να φαίνονται θολά: για παράδειγμα, το μέλι που προέρχεται από συμπίεση της περιέχει συχνά σχετικά υψηλό επίπεδο γύρης. Σε ορισμένες χώρες αυτό το «μη φιλτραρισμένο» μέλι που περιέχει άφθονη γύρη πωλείται σε υψηλότερη τιμή, αλλού το μέλι αυτό μερικές φορές θεωρείται (λανθασμένα) χαμηλής ποιότητας. Η παρουσία οποιωνδήποτε άλλων

ρύπων στο μέλι (για παράδειγμα κομματάκια κεριού, μέρη νεκρών μελισσών και θραύσματα ξύλου ή σκόνης) καθιστούν το μέλι χαμηλής ποιότητας και χαμηλής αξίας.

B.4 HMF - υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλη

Το HMF (hydroxymethylfufural) είναι η υδροξυμεθυλοφουρφοϋράλη, ένα προϊόν διάσπασης της φρουκτόζης (ένα από τα κύρια σάκχαρα στο μέλι) που σχηματίζεται αργά και φυσικά κατά την αποθήκευση του μελιού και πολύ πιο γρήγορα όταν θερμαίνεται το μέλι. Η ποσότητα HMF που υπάρχει στο μέλι είναι η αναφορά που χρησιμοποιείται ως οδηγός για τη θέρμανση που έχει λάβει χώρα: όσο υψηλότερη είναι η τιμή HMF, τόσο χαμηλότερη θεωρείται η ποιότητα του μελιού. Ορισμένες χώρες θέτουν όριο στη συγκέντρωση της HMF για το εισαγόμενο μέλι (περί τα 40 mg/kg) και το μέλι με τιμή HMF υψηλότερη από αυτό το όριο δεν γίνεται αποδεκτό. Ωστόσο, ορισμένα μέλια έχουν, από τη φύση τους, υψηλό επίπεδο HMF. Το HMF μετριέται με εργαστηριακές δοκιμές (Bradbear, 2009).

B.5 Ένζυμα

Τα επίπεδα των ενζύμων που υπάρχουν στο μέλι μερικές φορές χρησιμοποιούνται ως οδηγός για την ποιότητα του μελιού. Τα ένζυμα στο μέλι (ινβερτάση, οξειδάση γλυκόζης, αμυλάση κ.λπ.) προέρχονται από τις μέλισσες ή από το φυτό όπου έψαχνε η μέλισσα. Υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες, αλλά μπορεί να έχουν διατροφική σημασία στη διατροφή του ανθρώπου. Τα ένζυμα είναι πολύ ευαίσθητα στην θέρμανση (πάνω από 35 °C) ή στην αποθήκευση σε υψηλή θερμοκρασία. Επειδή καταστρέφονται με θέρμανση, ένα χαμηλό επίπεδο ενζύμων μπορεί να σημαίνει ότι το μέλι έχει θερμανθεί, αλλά πολλά μέλια καλής ποιότητας έχουν, από τη φύση τους, χαμηλή περιεκτικότητα σε ένζυμα (Bradbear, 2009).

B.6 Νερό

Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό κυμαίνεται από 13% έως και 23%, ανάλογα με την πηγή του μελιού, τις κλιματολογικές συνθήκες και άλλους παράγοντες. Εάν η περιεκτικότητα σε νερό του μελιού είναι μεγαλύτερη από 20%, τότε το μέλι είναι πιθανό να ζυμωθεί. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό είναι επομένως η πιο σημαντική. Η περιεκτικότητα σε νερό μετριέται χρησιμοποιώντας ένα διαθλασίμετρο μελιού. Σε περιοχές με υψηλή υγρασία, μπορεί να είναι δύσκολο να παραχθεί μέλι με αρκετά

χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό. Διαφορετικές χώρες ορίζουν διαφορετικές τιμές για την αποδεκτή περιεκτικότητα σε νερό του μελιού. Ο Codex Alimentarius και οι κανονισμοί της Ε.Ε. θέτουν ένα επίπεδο 20 %, με εξαιρέσεις το μέλι των αρτοποιιών και το μέλι ερείκης. Οι κανονισμοί των ΗΠΑ θέτουν ως όριο το 18,6 %. Οι έμποροι, συχνά, επιμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα νερού, τυπικά 17%, προκειμένου να αγοράσουν μειωμένο όγκο νερού (Bradbear, 2009).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η βελτιστοποίηση της εκχύλισης και παραλαβή του πτητικού κλάσματος μελιού ερείκης με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και μελέτη του με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματοόμετρο μαζών (GC-MS). Εν συνεχεία, η παραλαβή των φαινολικών ενώσεων μελιού ερείκης και χρωματογραφική μελέτη με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (LC/Q-TOF MS). Τέλος, η καταγραφή και μελέτη φασμάτων FTIR και Raman των δειγμάτων μελιού ερείκης ώστε να επιτευχθεί ο γρήγορος προσδιορισμός βασικών συστατικών του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γ.1 Περιγραφή και μεθοδολογία μελέτης

- Συλλέχθηκαν δείγματα μελιών ερείκης από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας.
- Παρελήφθησαν πτητικά συστατικά με την τεχνική SPME, αφού προηγουμένως προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, και μελετήθηκαν με την τεχνική GC-MS.
- Παρελήφθησαν τα φαινολικά συστατικά ορισμένων δειγμάτων μελιού ερείκης και μελετήθηκε η χημική τους σύσταση με LC/Q-TOF MS.
- Καταγράφηκαν τα FTIR και Raman φάσματα των δειγμάτων.

Γ.2 Βελτιστοποίηση παραλαβής συστατικών του αρώματος μελιού ερείκης με SPME και ανάλυση με GC-MS

Γ.2.1 Πειραματική πορεία

Γ.2.1.1 Πληροφορίες δείγματος

Για την εκτέλεση του πειράματος παρασκευάστηκαν δείγματα από μέλι ερείκης που συλλέχθηκε σε περιοχή της Ναυπακτίας το 2019 (Εικ. 10). Το μέλι παραδόθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας και διατηρήθηκε σε σκοτεινό μέρος στους 25 °C, μέχρι να πραγματοποιηθούν οι χημικές αναλύσεις. Πριν την εκτέλεση των πειραμάτων εξασφαλίστηκε ότι το δείγμα είναι αμιγές με βάση τις φυσικοχημικές και τις γυρεοσκοπικές αναλύσεις που ορίζει η νομοθεσία.



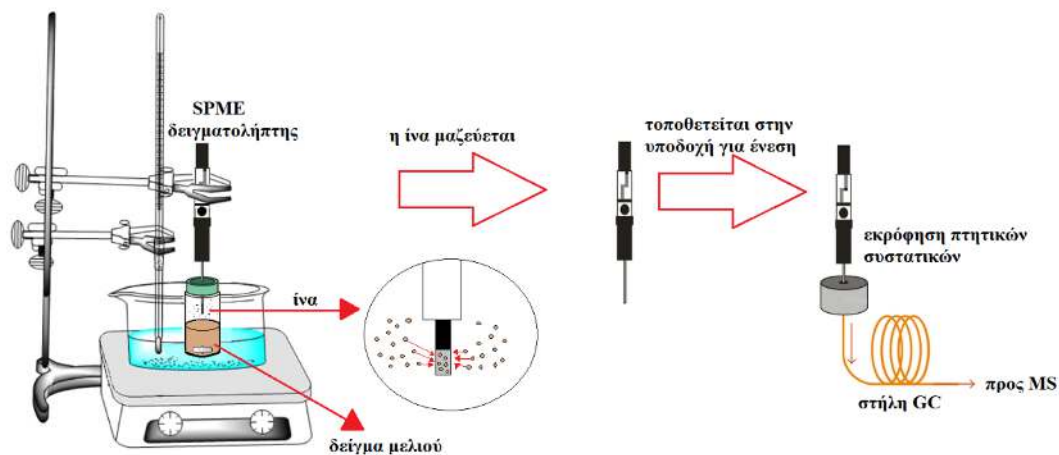
Εικόνα 10. Μέλι ερείκης απ' όπου παρασκευάστηκαν τα δείγματα.

Γ.2.1.2 Αρχή Μεθόδου

Το πτητικό κλάσμα του δείγματος μελιού ερείκης παρελήφθη με την τεχνική SPME. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εσωτερικού προτύπου βενζοφαινόνη με σκοπό την ημιποσοτικοποίηση των ενώσεων. Στη συνέχεια οι παραληφθείσες πτητικές ενώσεις διαχωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική GC-MS.

Συγκεκριμένα, μία ίνα, η οποία περιέχεται σε βελόνα μιας σύριγγας εκτίθεται στο κενό πάνω από το υδατικό δείγμα (υπερκείμενος χώρος). Το ενεργό μήκος της ίνας είναι 1 cm.

Τα απελευθερωμένα πτητικά συστατικά προσροφώνται από την ίνα και αυτή αποσύρεται μέσα στη βελόνα. Ύστερα, πραγματοποιείται η εκρόφιση του συγκεντρωμένου εκχυλίσματος στο ακολουθούμενο αναλυτικό όργανο GC. Στον αέριο χρωματογράφο η ίνα, ενώ βρίσκεται μέσα στη βελόνα, εισάγεται απευθείας στον εισαγωγέα (injector) του χρωματογράφου και εξέρχεται από αυτήν όταν η βελόνα έχει τρυπήσει το septum του εισαγωγέα. Η εκρόφιση των οργανικών λαμβάνει χώρα στο αέριο μεταφοράς, στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το ήλιο (He) (Reeve, 2002). Τέλος, τα πτητικά συστατικά διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται μέσω του συστήματος GC-MS (Εικ. 12).



Γ.2.1.3 Παράγοντες παραλαβής πτητικών ενώσεων

Η επιλογή των ανεξάρτητων μεταβλητών οι οποίες επηρεάζουν το σύστημα και τη πειραματική περιοχή έγινε με βάση τη βιβλιογραφία των Elisa Robotti, et al., 2017; Bianchin, J.N, et al., 2013; Ioannis K. Karabagias, et al., 2017. Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί φαίνονται οι παράγοντες αλλά και τα επίπεδα που επιλέχθηκαν.

Πίνακας 4. Παράγοντες που επιλέχθηκαν για την πειραματική περιοχή.

Παράγοντες	Επίπεδο 1	Επίπεδο 2	Επίπεδο 3
Θερμοκρασία (°C)	30	45	60
Χρόνος εξισορρόπησης (min)	5	15	30
Χρόνος εκχύλισης (min)	15	30	60
Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα (rpm)	100	400	700
Όγκος δείγματος προς εκχύλιση (mL)	2	4	6
Αναλογία νερό : μέλι (v/m)	1:1	1:3	3:1

Γ.2.1.4 Όργανα – Αντιδραστήρια

Τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και εικονίζονται στην Εικ. 13 και στον παρακάτω Πίνακα 5. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριπλής φάσης DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane). Η διαφορετική πολικότητα προς κάθε φάση έδωσε τη δυνατότητα απομόνωσης άπολων (PDMS), μέτριας πολικότητας (DVB) και πολικών πτητικών ουσιών (CAR).



Εικόνα 12. Τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο SPME - GC/MS.

Πίνακας 5. Τα όργανα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέθοδο SPME – GC/MS.

1) Αναλυτικός ζυγός ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων (0,01 g)	9) Μαγνητάκια ανάδευσης
2) Μεταλλική σπάτουλα	10) Εσωτερικό πρότυπο διαλύματος βενζοφαινόνης (300 µg/mL)
3) Σωληνάκια πλαστικά (PP) 50mL (τύπου Falcon)	11) Πιπέτες των 50 µL και 1000 µL
4) Υδροβολέας με απιονισμένο νερό	12) Μαγνητικός αναδευτήρας με δυνατότητα θέρμανσης
5) Πουάρ τριών βαλβίδων	13) Ποτήρι ζέσεως 0,5 L
6) Σιφόνιο των 10 mL	14) Θερμόμετρο υδραργύρου
7) Γυάλινοι περιέκτες των 15 mL	15) Δειγματολήπτης spme με ίνα
8) Καπάκια γυάλινου περιέκτη μίας χρήσης (PTFE silicone septa beige 1,5 mm)	16) Αέριος χρωματογράφος (Trace GC Ultra) συζευγμένος με φασματοφωτόμετρο μάζας DSQ II της εταιρίας Thermo Fisher Scientific

Γ.2.1.5 Αναλυτική πειραματική πορεία

Προκειμένου να μελετηθεί η διαδικασία προς εκχύλισης των πτητικών συστατικών των δειγμάτων του μελιού ερείκης, χρησιμοποιήθηκε προς Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD) σε συνδυασμό με τη μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας (Response Surface Methodology, RSM), ο οποίος επέφερε μια ευέλικτη δομή σχεδιασμού για να φιλοξενήσει ένα προσαρμοσμένο μοντέλο, με αριθμητικούς και κατηγορηματικούς ανεξάρτητους παράγοντες και ακανόνιστες περιορισμένες περιοχές. Για τη διεξαγωγή του παραπάνω πειραματικού σχεδιασμού αναλύθηκαν ορισμένοι παράμετροι ώστε να μελετηθεί η επίδραση αυτών στην παραλαβή των πτητικών συστατικών από το μέλι που επιλέχθηκε. Οι μεταβλητές αυτές είναι ανεξάρτητες μεταξύ προς αποτελώντας προς πειραματικές συνθήκες, ενώ μπορούν να μεταβάλλονται χωρίς να επηρεάζει η μία την άλλη. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν πέντε αριθμητικοί παράγοντες (θερμοκρασία, χρόνος εξισορρόπησης, χρόνος εκχύλισης, ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, όγκος δείγματος προς εκχύλιση) και προς κατηγορικός παράγοντας (αναλογία νερό: μέλι v/m) από έναν τετραγωνικό τομέα σχεδίασης (Πιν. 6). Ενώ οι εξαρτημένες μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι αποκρίσεις των πτητικών ενώσεων εκφρασμένες ως χρωματογραφική περιοχή (%). Η καταλληλότητα του μοντέλου επιβεβαιώθηκε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και τον συντελεστή προσδιορισμού (R^2) χρησιμοποιώντας προς τιμές p. Οι εξαρτώμενες μεταβλητές επιβεβαιώθηκαν επίσης από τις στατιστικές δοκιμές Box-Cox, συσχετίσεις και κανονικότητα υπολειμμάτων. Όλες οι πιθανές βελτιστοποιημένες λύσεις, για (α) κυρίαρχο πτητικό προφίλ και (β) κάθε πτητικό μόριο αξιολογήθηκαν με τη μεγιστοποίηση των δεικτών αποδοχής (desirability). Όλα τα πειραματικά δεδομένα

επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Desing-Expert 11.0.5.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Πίνακας 6. Ανεξάρτητοι πειραματικοί παράγοντες και σχεδιασμοί.

		1 ^{ος} Παράγοντας	2 ^{ος} Παράγοντας	3 ^{ος} Παράγοντας	4 ^{ος} Παράγοντας	5 ^{ος} Παράγοντας	6 ^{ος} Παράγοντας
Δοκιμή	Κωδικός δείγματος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Εξισορρόπησης (min)	Χρόνος Εκχύλισης (min)	Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα (rpm)	Όγκος δείγματος προς εκχύλιση (mL)	Αναλογία νερό: μέλι (v/m)
1	G11E	30	30	30	400	6	1:3
2	G12E	30	5	15	700	4	1:3
3	G13E	30	5	60	400	2	1:1
4	G14E	30	30	60	100	2	1:3
5	G15E	30	5	15	100	6	1:1
6	G16E	30	30	60	700	6	1:1
7	G17E	30	15	15	100	4	3:1
8	G28E	30	15	60	700	6	1:3
9	G29E	30	30	60	100	6	3:1
10	G210E	30	5	30	700	6	3:1
11	G211E	30	30	15	700	6	3:1
12	G212E	30	30	30	100	4	1:1
13	G213E	30	30	60	700	2	3:1
14	G214E	30	15	15	700	2	1:1
15	G215E	30	5	15	100	2	1:3
16	G316E	60	5	60	100	2	3:1
17	G531E	45	5	60	100	6	1:3
18	G532E	45	30	15	100	6	1:3
19	G533E	45	15	60	100	2	1:1
20	G534E	45	5	60	700	2	1:3
21	G535E	45	30	30	100	2	3:1
22	G536E	45	30	15	700	2	1:3
23	G537E	45	5	15	400	4	1:1
24	G538E	45	15	60	700	6	3:1
25	G317E	60	30	60	100	6	1:1
26	G318E	60	5	15	100	6	3:1
27	G319E	60	30	30	700	4	3:1
28	G320E	60	15	30	400	2	1:3
29	G321E	60	30	15	100	2	1:1
30	G322E	60	5	60	700	6	1:1
31	G423E	60	5	30	100	2	1:1
32	G424E	60	30	15	700	6	1:1
33	G425E	60	30	60	700	6	1:3
34	G426E	60	30	60	700	2	1:1
35	G427E	60	30	15	100	4	1:3

36	G428E	60	5	15	700	6	1:3
37	G429E	60	5	60	400	6	3:1
38	G430E	60	5	15	700	2	3:1



Εικόνα 13. Πειραματική διαδικασία SPME - GC/MS.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6, οι ποσότητες, οι τιμές και οι αναλογίες αλλάζουν σε κάθε πείραμα. Έχοντας αυτό το γεγονός ως δεδομένο, εκτελέστηκε το κάθε πείραμα ως εξής:

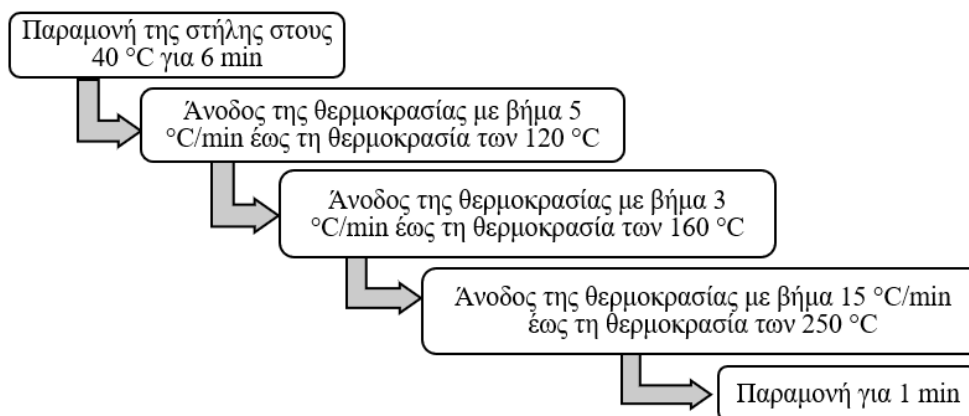
- Αρχικά, τα δείγματα παρασκευάστηκαν ζυγίζοντας την ποσότητα μελιού σε πλαστικό σωληνάριο τύπου falcon και αραιώνοντας με απιονισμένο νερό.
- Ποσότητα από το παραπάνω διάλυμα μεταφέρθηκε με σιφόνιο σε γυάλινο περιέκτη των 15 mL, προτέθηκαν 20 μ L διαλύματος βενζοφαινόνης (300 μ g/mL), ως εσωτερικό πρότυπο, μαγνητάκι ανάδευσης και σφραγίστηκε με καπάκι σιλικόνης Ptfе Septum μίας χρήσης. Τα καπάκια αυτά διευκολύνουν την παραλαβή των πτητικών, καθώς προσφέρουν στεγανότητα.
- Στη συνέχεια, ο γυάλινος περιέκτης τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο τοποθετημένο επάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα (Heidolph MR 3001) όπου και παρέμεινε ορισμένο χρόνο προς αποκατάσταση της ισορροπίας (Εικ. 14 ,B).
- Παράλληλα, η ίνα του δειγματολήπτη SPME ενεργοποιείται για 15 min σε θερμοκρασίες 260 – 40 $^{\circ}$ C έχοντας τοποθετηθεί στην κατάλληλη υποδοχή του οργάνου GC (Εικ. 14 , A).
- Μετά το πέρας των παραπάνω διαδικασιών, η ενεργοποιημένη ίνα εισήλθε στον υπερκείμενο χώρο του vial τρυπώντας το spectrum από το καπάκι με τη βοήθεια

του δειγματολήπτη SPME. Εκεί παρέμεινε ορισμένο χρόνο ώστε να εκχυλιστούν οι πτητικές ενώσεις και να προσροφηθούν από την ίνα (Εικ. 14 ,Γ).

- Τέλος, η ίνα αποσύρθηκε μέσα στην βελόνα του δειγματολήπτη, μεταφέρθηκε και εισήχθη απευθείας στον εισαγωγέα (injector) του αέριου χρωματογράφου. Ακολούθησε η αεριοχρωματογραφική ανάλυση σύμφωνα με τους Ioanna Kosma, et al., 2016. (Εικ. 14 ,Δ)

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες συνθήκες:

- Χαμηλής πολικότητας στήλη Restek Rtx-5MS μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και πάχους επένδυσης υμενίου 0,25 μm.
- Θερμοκρασία εγχυτή στους 250 °C και θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς (transfer line) στους 290 °C.
- Φέρον αέριο ήλιο (He) καθαρότητας 99,999% με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης συνολικής διάρκειας 42,33 min (Εικ. 15):



Εικόνα 14. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης GC.

- Αρχικά ο εισαγωγέας βρισκόταν σε λειτουργία χωρίς διαμοιρασμό (splitless) για 3 min, ενώ αφού απομακρύνθηκε η ίνα η βαλβίδα διαμοιρασμού του εισαγωγέα (split) άνοιγε με λόγο 1:50.
- Το φασματόμετρο μαζών βρισκόταν σε θερμοκρασία 240 °C, το εύρος μαζών σάρωσης (mass range): $m/z= 35-650$, σαρώσεις με scan/s: 0,7974 και την τεχνική των θετικών ιόντων.

Η ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών του μελιού ερείκης πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και των φασμάτων μαζών των χημικών ενώσεων που είναι καταχωρημένα στις βιβλιοθήκες του οργάνου Adams, Excalibur και Nist.

Γ.2.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Γ.2.2.1 Αξιολόγηση των απομονωμένων πτητικών ενώσεων

Στην παρούσα μελέτη της βελτιστοποίησης ταυτοποιήθηκαν 54 πτητικές ενώσεις (Πιν. 7) που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες.

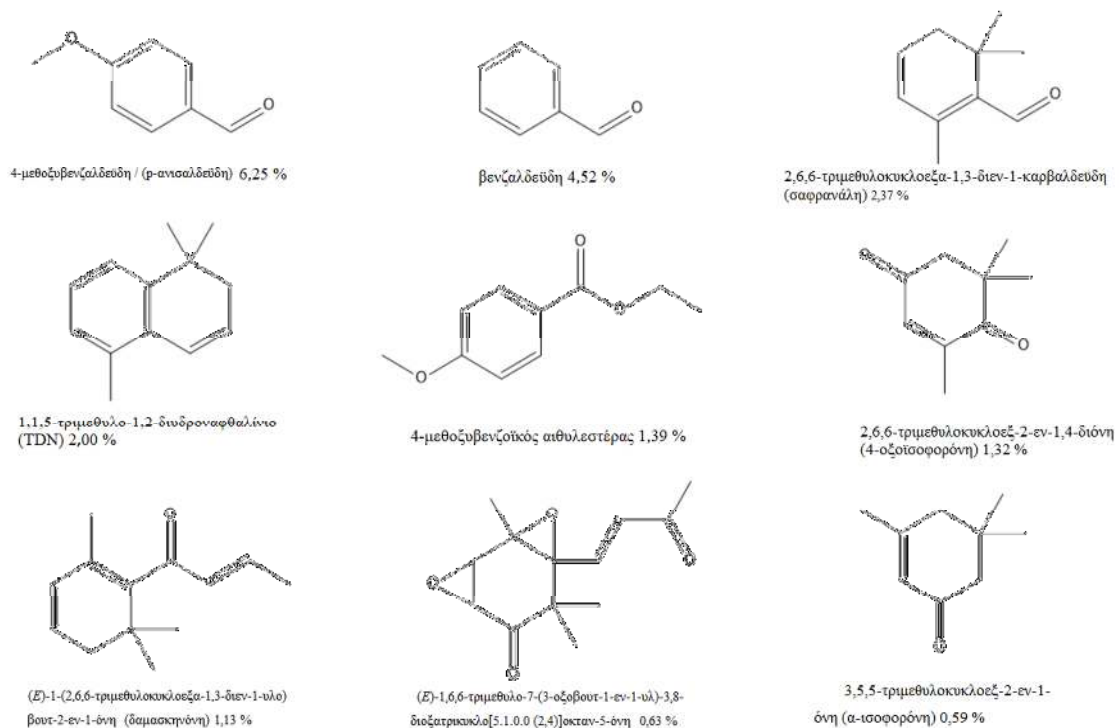
Πίνακας 7. Πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από τυχαίο δείγμα μελιού ερείκης σε πειραματικό σχεδιασμό.

Αρ.	Πτητικές ενώσεις	Χρόνοι συγκράτησης – RT (min)	Δείκτης κατακράτησης – RI	Ελάχιστο Εμβαδό επί τοις εκατό του συνόλου % Area	Μέγιστο Εμβαδό επί τοις εκατό του συνόλου % Area	Μέσος όρος Εμβαδό επί τοις εκατό του συνόλου % Area
Εστέρες						
1	2-μεθυλοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας	5,08	>800	0,00	0,64	0,02
2	εξανοϊκός μεθυλεστέρας	11,22	923	0,00	0,52	0,01
3	βενζοϊκός μεθυλεστέρας	17,31	1093	0,00	2,19	0,96
4	οκτανοϊκός μεθυλεστέρας	18,28	1124	0,00	1,84	0,56
5	βενζοϊκός αιθυλεστέρας	19,57	1165	0,00	1,84	0,52
6	2-υδροξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας (σαλικυλικός μεθυλεστέρας)	20,38	1192	0,00	4,75	2,41
7	εννεανοϊκός μεθυλεστέρας	21,3	1222	0,00	5,79	1,80
8	δεκανοϊκός μεθυλεστέρας	24,27	1322	0,00	0,89	0,20
9	4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας	28,7	1458	0,00	3,96	1,39
10	δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	30,83	1521	0,00	0,75	0,06
11	τετραδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	37,05	1726	0,00	1,07	0,05
12	δις(2-μεθυλοπροπυλο)βενζολοτετραδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	38,97	1859	0,00	1,78	0,14
13	παλμιτικός μεθυλεστέρας	39,73	1930	0,00	4,53	0,33
14	Στεατικός μεθυλεστέρας	41,35	1998	0,00	0,76	0,03
Αλκοόλες						
15	οκτ-1-εν-3-όλη	13,43	981	0,00	2,32	1,31
16	2-αιθυλοεξαν-1-όλη	15,14	1029	0,00	2,55	0,26
17	4-μεθυλο-1-(προπ-1-εν-2-υλ)κυκλοεξ-3-εν-1-όλη	19,99	1179	0,00	2,61	1,06
18	3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη	24,02	1314	0,00	0,72	0,22
19	6,6-διμεθυλο-5-μεθυλενοδικυκλο [2.2.1] επταν-2-όλη	30,45	1510	0,00	2,43	1,23
20	4,6,10,10-τετραμεθυλ-5-οξετρακυκλο[4.4.0.0 (1,4)]δεκ-2-εν-7-όλη	29,3	1476	0,00	1,35	0,75
Καρβοξυλικά οξέα						
21	βενζοϊκό οξύ	20,11	1183	0,00	2,54	0,33
22	εννεανοϊκό οξύ	23,22	1288	0,00	10,01	1,08
Αλδεύδες						

23	φουρανο-2-καρβαλδεϋδη (φουρφουράλη)	7,35	826	1,72	34,63	15,50
24	βενζαλδεϋδη	12,62	959	1,59	6,70	4,52
25	οκτανάλη	14,20	1001	0,00	1,43	0,48
26	2-φαινυλακεταλδεϋδη	15,56	1041	0,00	0,79	0,12
27	εννεανάλη	17,67	1104	0,00	6,66	2,63
28	δεκανάλη	20,8	1205	0,00	3,90	1,72
29	4-ισοπροπυλοβενζαλδεϋδη	20,97	1211	0,00	2,46	0,14
30	4-μεθοξυβενζαλδεϋδη / (p-ανισαλδεϋδη)	22,43	1261	0,00	13,52	6,25
31	δωδεκανάλη	26,98	1407	0,00	0,57	0,03
Κετόνες						
32	επτάν-3-όνη	9,63	882	0,00	0,92	0,07
33	1-(φουρανο-2-υλ)αιθανόνη(2-ακετυλοφουράνιο)	10,61	907	0,00	3,27	1,42
34	2-κυκλοεξέν-1-όνη	14,68	1015	0,00	0,78	0,20
35	3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη)	18,15	1120	0,00	1,11	0,59
36	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη)	18,86	1143	0,00	2,90	1,32
37	1-(1,4-διμεθυλοκυκλοεξ-3-εν-1-υλο) αιθαν-1-όνη	19,07	1149	0,53	2,88	1,42
38	(E)-1,6,6-τριμεθυλο-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο[5.1.0.0 (2,4)]οκταν-5-όνη	27,99	1437	0,00	1,38	0,63
39	4-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διενυλο)βουτ-3-εν-2-όνη	29,22	1474	0,00	2,18	0,37
Υδρογονάνθρακες						
40	οκτάνιο	6,30	800	0,00	12,99	3,20
41	εννεάνιο	10,26	898	0,00	4,36	1,09
42	δεκάνιο	14,12	999	0,00	0,59	0,02
43	ενδεκάνιο	17,57	1101	0,00	1,72	0,11
44	δωδεκάνιο	20,66	1201	0,00	3,29	0,89
Τερπένια						
45	p-κυμένιο	14,91	1022	0,00	3,23	0,49
46	1-μεθυλο-4-(προπ-1-εν-2-υλο) βενζόλιο (p-κυμενένιο)	17,21	1090	0,00	5,52	1,75
47	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-καρβαλδεϋδη (σαφρανάλη)	20,57	1198	0,98	4,57	2,37
48	(E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-υλο) βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη)	26,00	1377	0,00	1,80	1,13
Αιθέρες						
49	4-μεθυλο-2-(2-μεθυλοπροπ-1-εν-1-υλ)τετραϋδρο-2H-πυράνη	16,77	1077	0,00	1,18	0,32
50	1-μεθοξυ-4-προπυλοβενζόλιο	23,54	1299	0,00	7,71	2,80
Άλλες ενώσεις						
51	4-ισοπροπυλο-1-μεθυλοκυκλοεξ-1-ένιο	15,02	1025	0,00	5,29	1,19
52	5-(δευτ.-βουτυλο)-2,2-διμεθυλοτετραϋδροφουράνιο	16,58	1072	0,00	3,26	1,77
53	2,6,6-τριμεθυλο-10-μεθυλιδενιο-1-οξασπιρο [4.5] δεκάνιο	23,14	1285	0,00	0,87	0,07
54	1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο	25,21	1352	0,00	6,09	2,00

Το πτητικό προφίλ του μελιού είναι ένα δακτυλικό αποτύπωμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με τη γυρεοσκοπική ανάλυση για τον προσδιορισμό της βοτανικής του προέλευσης. Συγκεκριμένες πτητικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί ως χαρακτηριστικές μιας συγκεκριμένης φυτικής προέλευσης και ως εκ τούτου χρήσιμες ως «δείκτες». Παρόλο που η ταυτοποίηση τέτοιων ενώσεων θα ήταν ιδιαίτερα επωφελής, δεν υπάρχει πάντοτε συμφωνία για τις ενώσεις που προτείνονται ως δείκτες, καθώς μπορεί να υπάρχουν διαφορές, ακόμη και μέσα σε έναν μόνο τύπο μονοανθικού μελιού, λόγω της φυτικής ποικιλίας, της γεωγραφικής προέλευσης ή της τοπικής μελισσοκομίας πρακτικές (Castro-Vázquez et al. 2009). Επομένως, μόνο κάποιες από τις παραπάνω πτητικές ενώσεις που παρελήφθησαν και ταυτοποιήθηκαν έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικές στο άρωμα του μελιού ερείκης.

Δεδομένου ότι οι πτητικές ενώσεις του μελιού προέρχονται από τα άνθη, καθώς οι πρόδρομες ενώσεις μετατρέπονται κατά την ωρίμανση του μελιού, η σύνθεση του μελιού μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες αποθήκευσης, την επεξεργασία μετά τη συγκομιδή και τους χειρισμούς των μελισσοκόμων, θα πρέπει να γίνει προσεκτική επιλογή πτητικών ενώσεων όταν αυτές χρησιμοποιούνται σε χημειομετρικά μοντέλα (Manyi-Loh et al. 2011; Visser et al. 1988, Bouseta et al. 1992; da Silva et al. 2016). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αλλά και συνοψίζοντας την πρόσφατη βιβλιογραφία, επιλέχθηκαν οι κυρίαρχες πτητικές ενώσεις του μονοανθικού ελληνικού μελιού ερείκης. Αυτές είναι ο 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας, η βενζαλδεΐδη, η 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη,



η 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη), η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη, η (E) -1,6,6-τριμεθυλο-7- (3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ) -3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη, το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδ로나φθαλίνιο, η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-καρβαλδεϋδη (σαφρανάλη) και η (E) -1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-υλο) βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη) (Εικ. 16). Κάθε πτητική απόκριση χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μοντέλου βελτιστοποίησης που βασίζεται στην RSM.

Σε σχέση με τις πτητικές ενώσεις του μελιού ερείκης που έχουν αναφερθεί, ενώσεις όπως η 4-μεθοξυβενζαλδεϋδη, η βενζαλδεϋδη, η α-ισοφορόνη (3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη) και η 4-οξοϊσοφορόνη (2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη) εντοπίστηκαν στα περισσότερα δείγματα μελιού ερείκης που έχουν μελετηθεί (Yang et al., 2012). Η α-ισοφορόνη και η 4-οξοϊσοφορόνη βρέθηκαν να εμφανίζονται ταυτόχρονα μόνο σε δείγματα μελιού ερείκης, ενώ η β-ισοφορόνη δεν ανιχνεύτηκε καθόλου (Radovic et al. 2001). Η βενζαλδεϋδη έχει άρωμα πικραμύγδαλου (Genovese et al., 2007) και η α-ισοφορόνη μέντας (Pino, 2012) ή και ξυλώδη οσμή (Costa et al., 2019).

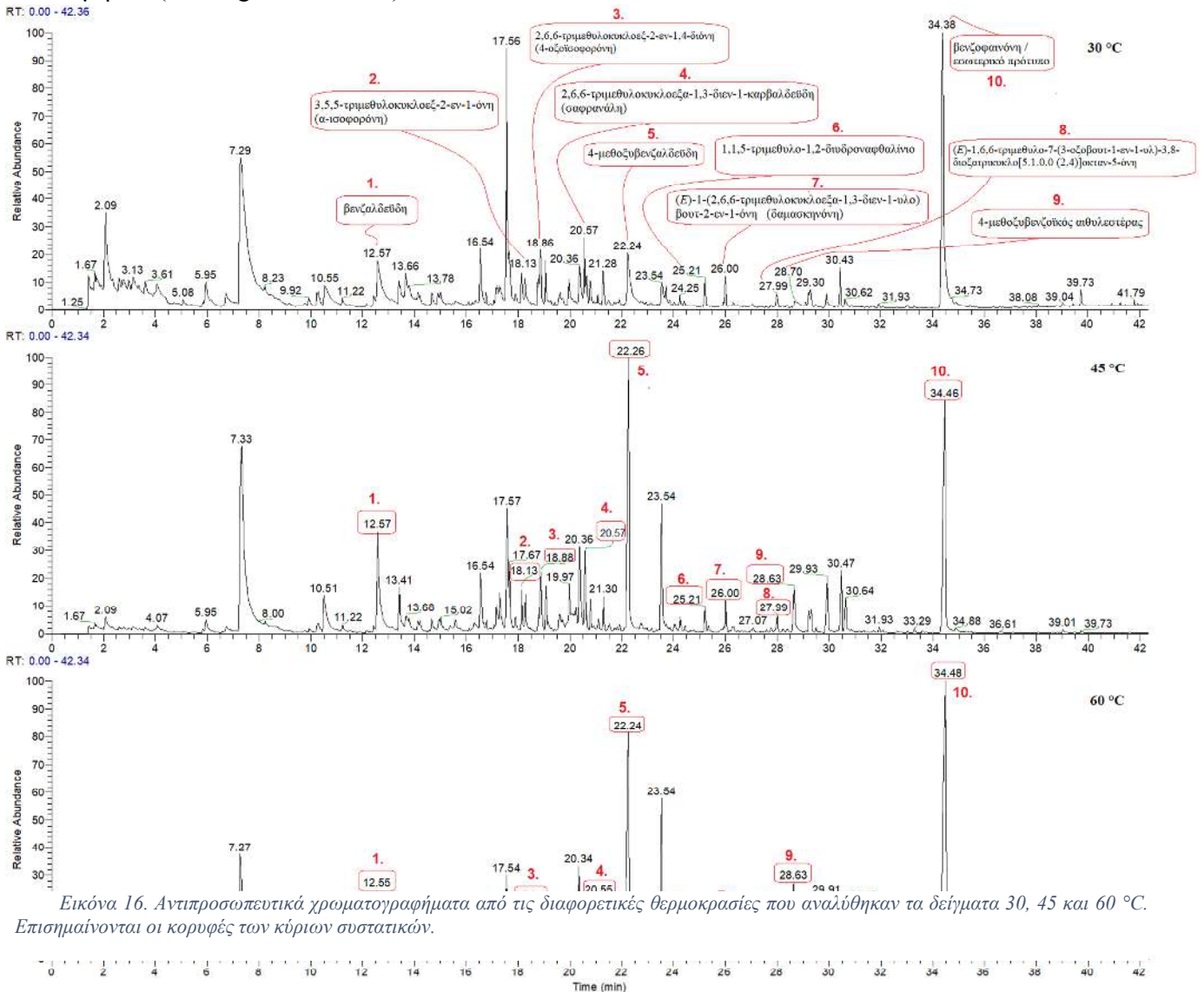
Διάφορες δομές αποδομημένων καρποτενοειδών με δομή 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-ενίου έχουν βρεθεί σε μέλια ερείκης που θα μπορούσαν να είναι πιθανοί δείκτες των ερεικόμελων (Soria et al., 2009; Tan et al., 1989). Τέτοιες ενώσεις βρέθηκαν στη παρούσα μελέτη και είναι η α-ισοφορόνη (3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη) και η 4-οξοϊσοφορόνη (2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη). Η α-ισοφορόνη μπορεί να συμβάλει στην πιστοποίηση της αυθεντικότητας των μελιών ερείκης (Guyot et al., 1999).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η 4-μεθοξυβενζαλδεϋδη καθώς έχει χαρακτηριστεί ως ιδανικός δείκτης συγκεκριμένης ποικιλίας μελιών ερείκης, της *Erica arborea* καθώς η ουσία αυτή απουσιάζει από άλλες βοτανικές προελεύσεις (Guyot et al., 1999). Με ανάλυση αραιωμένου εκχυλίσματος αρώματος, οι Blank et al., (1989) το καθόρισαν ως ένα από τα πιο ισχυρά αρώματα του μελιού ερείκης, με νότες «μπισκότου με τζίντζερ» ή και άρωμα γλυκάνισου (Ruisinger et al., 2012).

Οι Rodríguez-Flores, et al. (2021) απομόνωσαν το πτητικό κλάσμα μελιών ερείκης συλλεγμένα στα βορειοδυτικά της Ιβηρικής χερσονήσου με SPME-GC-MS, αρκετές από αυτές που θεωρήσαμε σημαντικές βρέθηκαν και στο δικό μας πτητικό κλάσμα όπως, η 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη), η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-

διόνη (4-οξοϊσοφορόνη), η (E)-1,6,6-τριμεθυλο-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο[5.1.0.0 (2,4)]οκταν-5-όνη, το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο, η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (σαφρανάλη) και η (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)-βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηρόνη). Μάλιστα επισήμαναν ανάμεσα σε άλλες ουσίες ότι η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη) και το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο αξίζει να αναφερθούν λόγω της συχνότητας εμφάνισής τους, η οποία ξεπερνά το 50%.

Η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (σαφρανάλη) έχει οσμή του πράσινου φαρμακευτικού φυτού (Costa et al., 2019) και η (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηρόνη) μαγειρεμένου μήλου (Ruisinger et al. 2012).



Εικόνα 16. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από τις διαφορετικές θερμοκρασίες που αναλύθηκαν τα δείγματα 30, 45 και 60 °C. Επισημαίνονται οι κορυφές των κύριων συστατικών.

Ο 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας είναι μία ένωση παράγωγο του p-ανισικού οξέος που άξιζε να μελετηθεί καθώς δεν έχει βρεθεί ακόμα σε άλλες βοτανικές πηγές, ενώ έχει αναφερθεί στο μέλι *Erica arborea* L. (Guyot et al., 1999).

Από τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν, μπορούμε να παρατηρήσουμε τις διαφορετικές εντάσεις αλλά και τα εύρη κορυφών των πτητικών ενώσεων που προκύπτουν (Εικ.17).

Γ.2.2.2 Αξιολόγηση των κύριων πτητικών ενώσεων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, προκειμένου να προσδιοριστούν οι καταλληλότερες συνθήκες για κάθε πτητική ένωση μελετήθηκαν έξι παράγοντες SPME (θερμοκρασία, χρόνος εξισορρόπησης, χρόνος εκχύλισης, ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, όγκος του δείγματος προς ανάλυση, αναλογία νερό: μέλι) για τις συνολικά εννέα κύριες πτητικές ενώσεις που επιλέχθηκαν (αποκρίσεις R1-R9) (Πιν. 8) για βελτιστοποίηση.

Πίνακας 8. Κύριες πτητικές ενώσεις που επιλέχθηκαν για το ερεικόμελο.

Απόκριση	Πτητική Ένωση	Ελάχιστη τιμή (%Area)	Μέγιστη τιμή (%Area)	Μέσος (%Area)	Τυπική απόκλιση
R1	βενζαλδεΐδη	1,59	6,70	4,52	1,22
R2	3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη)	0,00	1,11	0,59	0,36
R3	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοισοφορόνη)	0,00	2,90	1,32	0,75
R4	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (Σαφρανάλη)	0,98	4,57	2,37	0,81
R5	4-μεθοξυβενζαλδεΐδη / (p-ανισαλδεΐδη)	0,00	13,52	6,25	4,07
R6	1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο	0,00	6,09	2,00	1,53
R7	(E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη)	0,00	1,80	1,13	0,40
R8	(E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη	0,00	1,38	0,63	0,53
R9	4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας	0,00	3,96	1,39	1,30

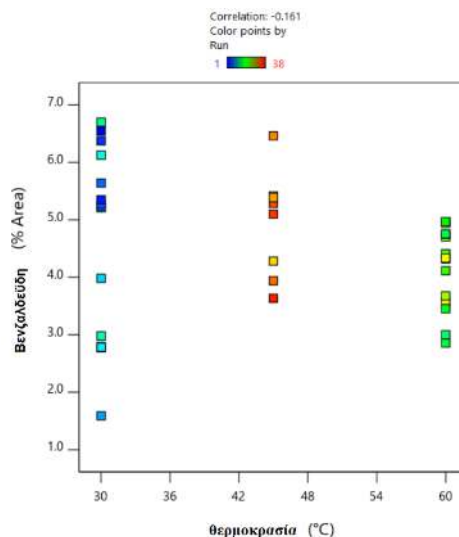
Μία πρώτη και σημαντική παρατήρηση πριν την βελτιστοποίηση κάθε πτητικής ένωσης, είναι η εκτίμηση της συσχέτισης μεταξύ των παραγόντων (άξονας x) και των αποκρίσεων (άξονας y) μέσω των 38 δοκιμών που έγιναν (Πιν. 6) (μικρά τετραγωνάκια) κατανεμημένων ανάμεσα στους δύο άξονες σε διάγραμμα διασποράς (scatter plot). Ένα διάγραμμα σαν αυτό, διευκολύνει τον παρατηρητή να συσχετίσει δύο μεταβλητές μεταξύ τους με αυτές να συσχετίζονται όταν βρίσκονται κοντά η μία στην άλλη, ενώ όσο

απομακρύνονται η συσχέτιση αυτών να γίνεται μικρότερη και στο διάγραμμα να παρατηρείται διασπορά.

Ακόμη ένα γράφημα συσχέτισης είναι το πλέγμα συσχέτισης (correlation grid). Στο γράφημα αυτό, παρατηρούνται μικρά τετραγωνάκια, καθ' ένα από τα οποία συσχετίζει δύο μεταβλητές μεταξύ τους, είτε αυτές είναι παράγοντες, είτε αποκρίσεις. Το μέγεθος της συσχέτισης παρουσιάζεται με χρωματικές διαβαθμίσεις, με αυτές να κυμαίνονται από έντονο κόκκινο (πλήρη συσχέτιση, $r=1$) έως λευκό (μικρή ή ελάχιστη συσχέτιση, ή και ανεξάρτητες μεταβλητές), με ενδιάμεσες αποχρώσεις ροζ χρώματος (ελαφριά θετική συσχέτιση) και μπλε (αρνητική συσχέτιση).

Η σημαντικότητα όλων των παραπάνω συσχετίσεων κρίνεται στατιστικά από τις τιμές p (p -value). Οι τιμές P μικρότερες από 0,05 υποδεικνύουν ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί. Ο έλεγχος ANOVA επιβεβαιώνει την επάρκεια του μοντέλου. Όταν το p -value είναι μικρότερο του 0,05 σημαίνει ότι η ανεξάρτητη μεταβλητή (π.χ. θερμοκρασία) επηρεάζει αρκετά την εξαρτημένη μεταβλητή (πητητικά συστατικά). Αν οι ανεξάρτητες μεταβλητές δεν είναι σημαντικές βγαίνει το συμπέρασμα ότι δεν επηρεάζουν την παραλαβή των πτητικών συστατικών. Επομένως, πέραν από τις παρατηρήσεις των γραφημάτων ενδιαφέρει και η σημαντικότητα της κάθε παρατήρησης αυτής.

1. Βενζαλδεΐδη



Εικόνα 17.. Διάγραμμα διασποράς βενζαλδεΐδης σε σχέση με τη θερμοκρασία..

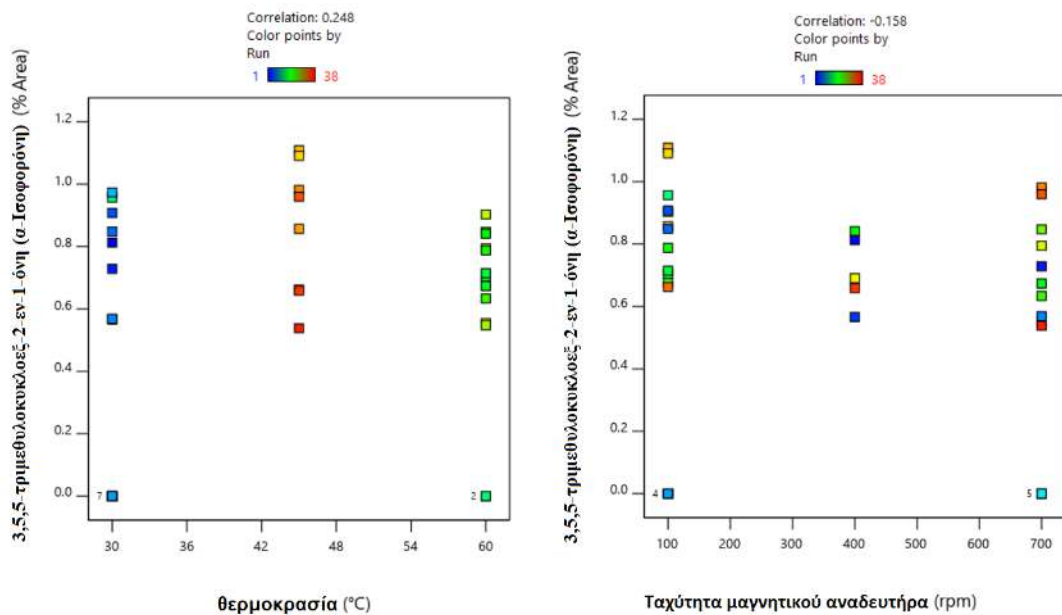
Η βενζαλεϋδη δε παρατηρήθηκε να έχει κάποια σημαντική συσχέτιση με κάποιον από τους έξι παράγοντες (Εικ. 19) . Η μεγαλύτερη συσχέτιση που παρατηρείται να έχει, είναι αυτή με την θερμοκρασία καθώς υπάρχει μια μικρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτής και της βενζαλεϋδης με $r = -0,161$ (Εικ. 18). Από το γράφημα παρατηρούμε ότι σε μικρότερες θερμοκρασίες, όπως αυτές των 30 °C θα επιτύχουμε να παραλάβουμε μεγαλύτερη ποσότητα βενζαλεϋδης, ενώ όσο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 45 °C και μετέπειτα στους 60 °C, η παραληφθείσα ποσότητα μειώνεται.

Στο πλέγμα συσχέτισης (Εικ. 19) παρατηρείται η μικρή αρνητική συσχέτιση που παρουσιάζει η βενζαλεϋδη με την θερμοκρασία, την ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα και τον όγκο του δείγματος (ανοιχτό μπλέ χρώμα), ενώ μια μικρή θετική συσχέτιση παρουσιάζει με τον χρόνο εκχύλισης. Όμως, οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές καθώς ένας μόνο παράγοντας από τους έξι, αυτός της αναλογίας νερό / μέλι έχει $p\text{-value} < 0,05$ ο οποίος είναι κατηγορικός παράγοντας.

Run	Group	a:Temperature	B:Equilibration time	C:Extraction time	D:Magnetic stirrer speed	E:Sample volume	F:water: honey	benzaldehyde	3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one	2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione	2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-diene-1-carboxaldehyde	4-methoxybenzaldehyde	1,1,5-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	(E)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)ethanone	(E)-1,6,6-trimethyl-7-(3-oxobut-1-en-1-yl)-3,8-dioxatricyclohexa-2,4,6-triene
E:Sample volume								X							
F:water: honey	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
benzaldehyde								X							
3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one								X							
2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione								X							

Εικόνα 18. Πλέγμα συσχέτισης βενζαλεϋδης, Όπου a: θερμοκρασία, B: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

2. 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη)



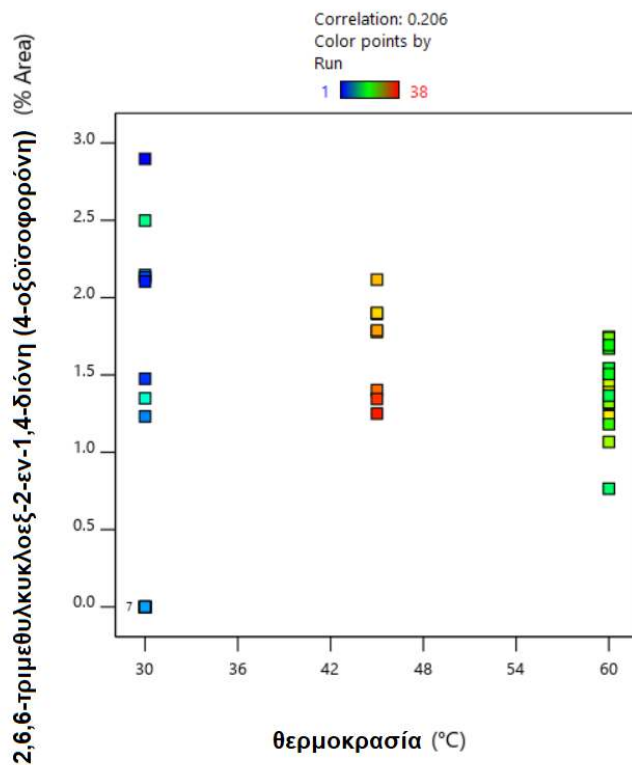
Εικόνα 19. Διάγραμμα διασποράς 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνης (α-Ισοφορόνη) σε σχέση με τη θερμοκρασία και την ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα..

Η 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη, παρατηρείται να έχει εξίσου μικρή συσχέτιση με τους παράγοντες που μελετήθηκαν (Εικ. 21). Όμως παρουσιάζει μία μικρή θετική συσχέτιση $r = 0,248$ με την θερμοκρασία. Από την Εικόνα 20 φαίνεται ότι παρόλο που η ένωση θα παραληφθεί σε παρόμοιες ποσότητες και στις τρεις θερμοκρασίες των 30, 45 και 60 °C, παρατηρείται ότι επιτεύχθηκε παραλαβή της ένωσης σε μέγιστη ποσότητα σε μια μέση θερμοκρασία, αυτή των 45 °C. Επίσης, παρατηρείται μια μικρή αρνητική συσχέτιση της εκχύλισης της ένωσης με την ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα, με $r = -0,158$ και κρίνεται ως στατιστικά σημαντική αφού το $p\text{-value} = 0,05$. Όπως φαίνεται από την εικόνα 21 με την χαμηλή ταχύτητα επιτυγχάνεται παραλαβή της μέγιστης ποσότητας από την ένωση. Το πλέγμα συσχέτισης που ακολουθεί μπορεί να επαληθεύσει όλα τα παραπάνω. Τέλος, εντυπωσιακή είναι η πολύ μικρή μεν συσχέτιση της 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνης με τον όγκο του δείγματος αλλά στατιστικά σημαντική αφού το $p\text{-value} = 0,04$, ενώ ο κατηγορικός παράγοντας της αναλογίας νερό / μέλι με $p\text{-value} < 0,05$ κρίνεται κι αυτός στατιστικά σημαντικός.

Run	Group	a: Temperature	B: Equilibration time	C: Extraction time	D: Magnetic stirrer speed	E: Sample volume	F: water: honey	benzaldehyde
								X
								X
								X

Εικόνα 20. Πλέγμα συσχέτισης 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνης. Όπου α: θερμοκρασία, Β: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδεντήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

3. 2,6,6-τριμεθυλκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη)



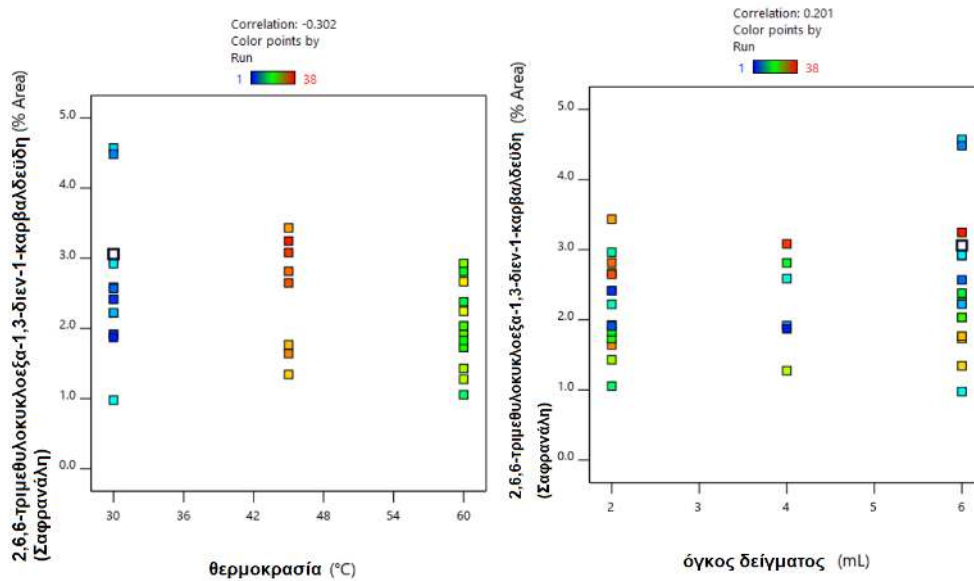
Εικόνα 21. Διάγραμμα διασποράς 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνης (4-οξοϊσοφορόνη) σε σχέση με τη θερμοκρασία.

Η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη), είναι μια ακόμη ένωση που δεν παρατηρήθηκε να έχει σημαντικές συσχετίσεις με τους υπό μελέτη ποσοτικούς παράγοντες (p -values $> 0,05$), παρά μόνο μια μικρή θετική συσχέτιση με την θερμοκρασία, με $r = 0,206$. Ο κατηγορικός παράγοντας της αναλογίας νερό / μέλι έχει p -value $< 0,05$, επομένως κρίνεται στατιστικά σημαντικός. Από το γράφημα διασποράς (Εικ. 22) φαίνεται πως η ένωση παραλήφθηκε στη μέγιστη ποσότητα στις χαμηλότερη θερμοκρασία, αυτή των 30 °C, ενώ όσο η θερμοκρασία ανέβαινε, όλο και μικρότερη ποσότητα παρελήφθη. Παρατηρώντας το γράφημα συσχέτισης (Εικ. 23) είναι φανερό πως οι παράγοντες συσχετίζονται από ελάχιστα έως λίγο με την 4-οξοϊσοφορόνη, όπου αμέσως μετά την θερμοκρασία, ο παράγοντας που έχει κάποια μικρή αρνητική συσχέτιση με την ένωση είναι η ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα με $r = -0,114$.

	Run	Group	a: Temperature	B: Equilibration time	C: Extraction time	D: Magnetic stirrer speed	E: Sample volume	F: water: honey
3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-1-one								X
2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione								X
2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-diene-1-carbaldehyde								X

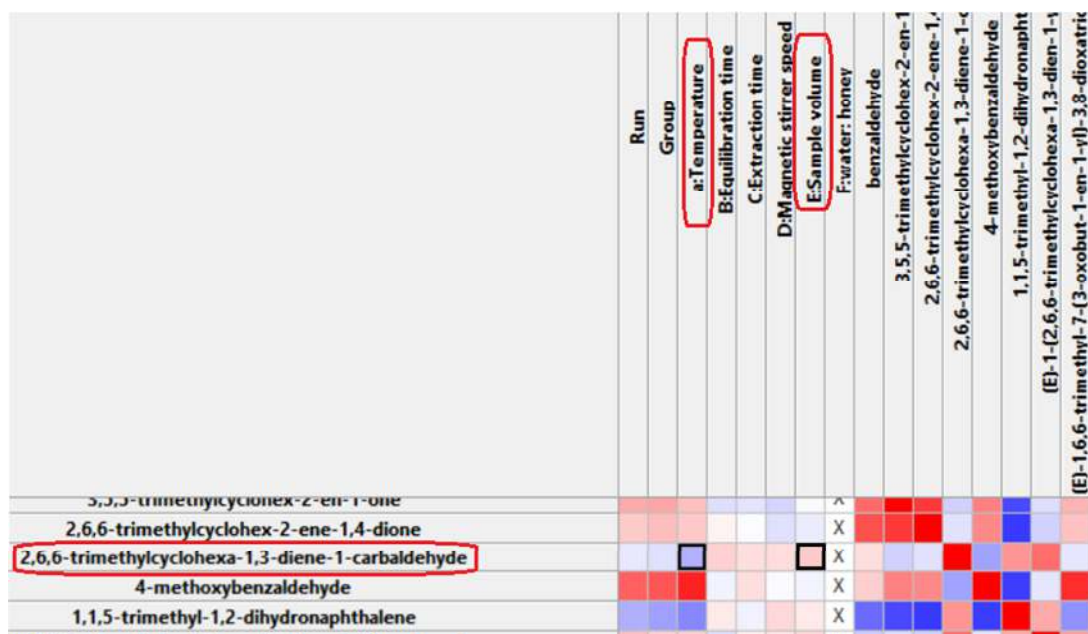
Εικόνα 22. Πλέγμα συσχέτισης 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνης (4-οξοϊσοφορόνη). Όπου a: θερμοκρασία, B: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

4. 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (σαφρανάλη)



Εικόνα 23. Διάγραμμα διασποράς 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδης (Σαφρανάλη) σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον όγκο του δείγματος.

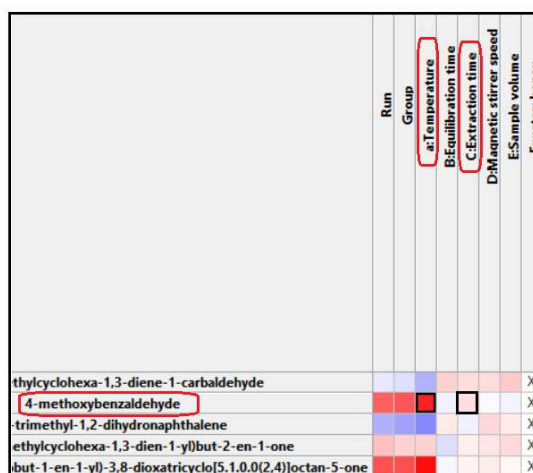
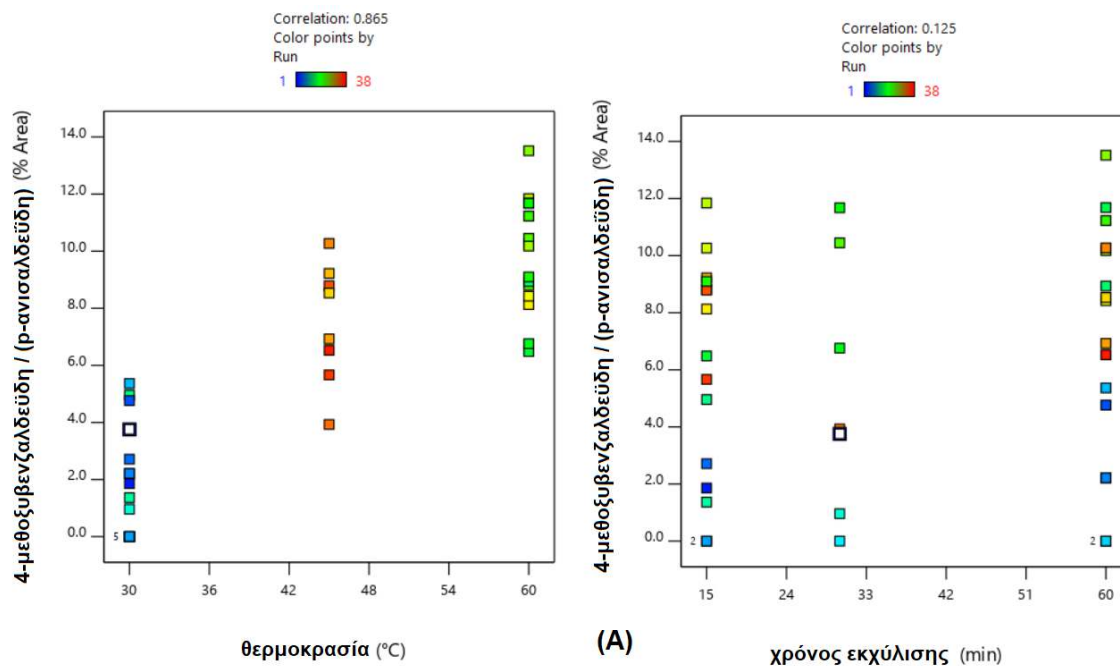
Η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τη θερμοκρασία $r = -0,302$ και θετική με τον όγκο του δείγματος $r = 0,201$ (Εικ. 24). Ο παράγοντας της θερμοκρασίας έχει περισσότερη επίδραση σε σχέση με τον όγκο του δείγματος. Συγκεκριμένα, παρατηρείται στη θερμοκρασία των 30 °C ότι παραλήφθηκε μεγαλύτερη ποσότητα σαφρανάλης και όσο η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 45 °C και στη συνέχεια στους 60 °C τόσο μικρότερη ποσότητα εκχυλίζεται. Όσον αφορά τον όγκο του δείγματος, φαίνεται πως ο μεγαλύτερος όγκος των 6 mL απέδωσε και μεγαλύτερη ποσότητα με μια μικρή συσχέτιση. Συμπερασματικά, η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται όταν η θερμοκρασία είναι στους 30 °C και ο όγκος του δείγματος 6 mL. Το πλέγμα συσχέτισης δείχνει ότι μόνον οι δυο παράγοντες που αναφέρθηκαν έχουν κάποια συσχέτιση με την σαφρανάλη, ενώ οι υπόλοιποι έχουν μικρότερη (Εικ. 25). Συνολικά, κανένας από τους παράγοντες δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντικός ($p\text{-values} > 0,05$).



Εικόνα 24. Πλέγμα συσχέτισης 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (Σαφρανάλη). Όπου α: θερμοκρασία, Β: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

5. 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη / (p-ανισαλδεΐδη)

Στην περίπτωση της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης φαίνεται ότι υπάρχει θετική συσχέτιση με την θερμοκρασία και την εκχύλιση της ένωσης με σχετικά μεγάλο συντελεστή συσχέτισης $r = 0,865$, κάτι που επιβεβαιώνεται και ως στατιστικά σημαντικό με πολύ μικρό p-value $< 0,05$ (Εικ. 26). Είναι καθαρά αντιληπτό ότι όταν αυξάνεται η θερμοκρασία αυξάνεται και ποσότητα της ένωσης που παραλαμβάνεται, καθιστώντας τους $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ την ιδανικότερη θερμοκρασία παραλαβής αυτής. Ακόμη ένας παράγοντας, αυτός του χρόνου εκχύλισης αποδεικνύεται στατιστικά σημαντικός με p-value $< 0,05$, ενώ η συσχέτιση αυτού με την 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη είναι σχετικά χαμηλή θετική, με $r = 0,125$. Οι υπόλοιποι ποσοτικοί παράγοντες δεν φαίνεται να συσχετίζονται σημαντικά (ούτε στατιστικά) με την εκχύλιση της ένωσης παρά μόνον ο κατηγορικός παράγοντας της αναλογίας νερό / μέλι με p-value $< 0,05$.



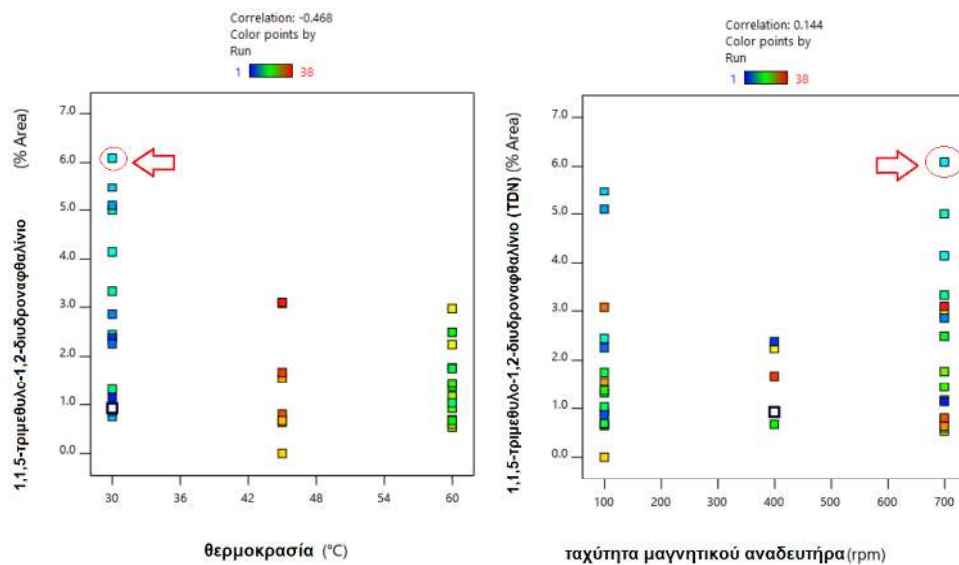
(B)

Εικόνα 25. (A) Διάγραμμα διασποράς της 4-μεθοξυβενζαλδεϋδης σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης (B) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεϋδης. Όπου a: θερμοκρασία, B: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

6. 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο

Το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο, παρατηρήθηκε να έχει μια αρνητική συσχέτιση με την θερμοκρασία (Εικ. 27.) με $r = -0,468$ και στατιστικά σημαντική με $p\text{-value} < 0,05$. Στη χαμηλότερη θερμοκρασία που τέθηκε, αυτή των $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, επιτεύχθηκαν και οι εκχυλίσεις των μεγαλύτερων ποσοτήτων της ένωσης. Η ταχύτητα του μαγνητικού

αναδευτήρα, μπορεί να έχει μικρή θετική συσχέτιση με την ένωση ($r= 0,144$) και όχι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value}= 0,07$), όμως αξίζει να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός των 30 °C μαζί με την υψηλότερη ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα στα 700 rpm μας έδωσε τη βέλτιστη ποσότητα από το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο. Οι υπόλοιποι ποιοτικοί παράγοντες βρέθηκαν να έχουν ακόμα μικρότερη ή και καθόλου συσχέτιση με την εκχύλιση αυτού και κανένας τους δεν είναι στατιστικά σημαντικός (Εικ. 28). Τέλος, ο κατηγορικός παράγοντας της αναλογίας νερό / μέλι παρατηρείται στατιστικά σημαντικός με $p\text{-value}< 0,05$.



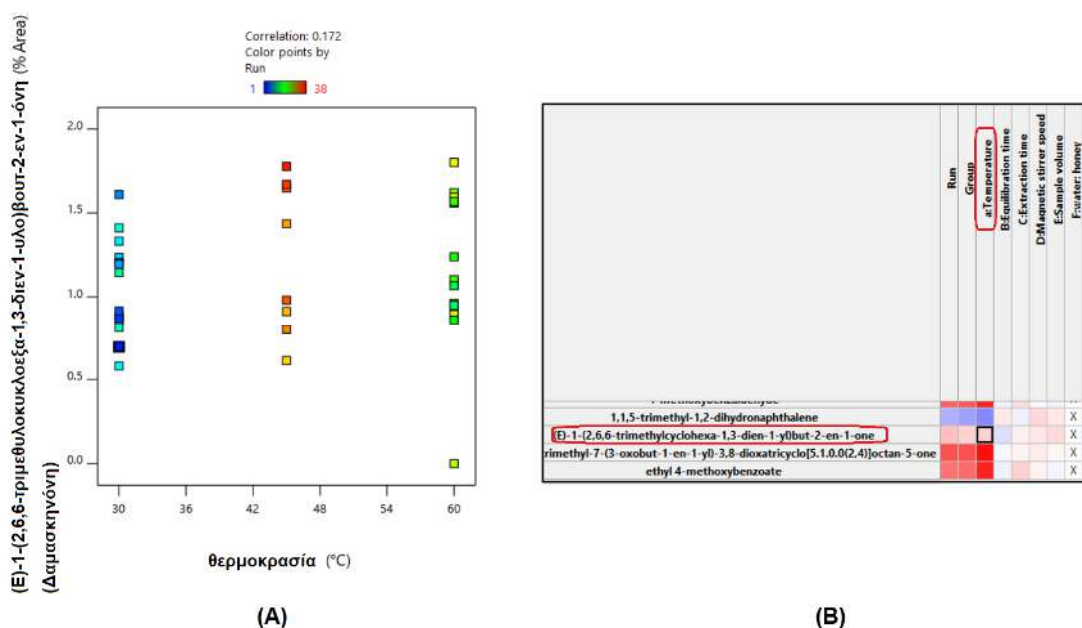
Εικόνα 26. Διάγραμμα διασποράς του 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλινίου σε σχέση με τη θερμοκρασία και την ταχύτητα αναδευτήρα.



Εικόνα 27. Πλέγμα συσχέτισης του 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλινίου. Όπου α: θερμοκρασία, Β: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

7. (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη)

Η (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη) είναι μια ένωση που παρουσιάζει μικρή συσχέτιση με τους υπό μελέτη παράγοντες (Εικ. 29). Η μεγαλύτερη συσχέτιση που εμφανίζει είναι αυτή του παράγοντα της θερμοκρασίας με $r = 0,172$ και είναι θετική, όμως όχι στατιστικά σημαντική αφού το p-value ξεπερνάει την τιμή των 0,05. Μόνον ο κατηγορικός παράγοντας της αναλογίας νερό / μέλι παρατηρείται στατιστικά σημαντικός με $p\text{-value} < 0,05$.

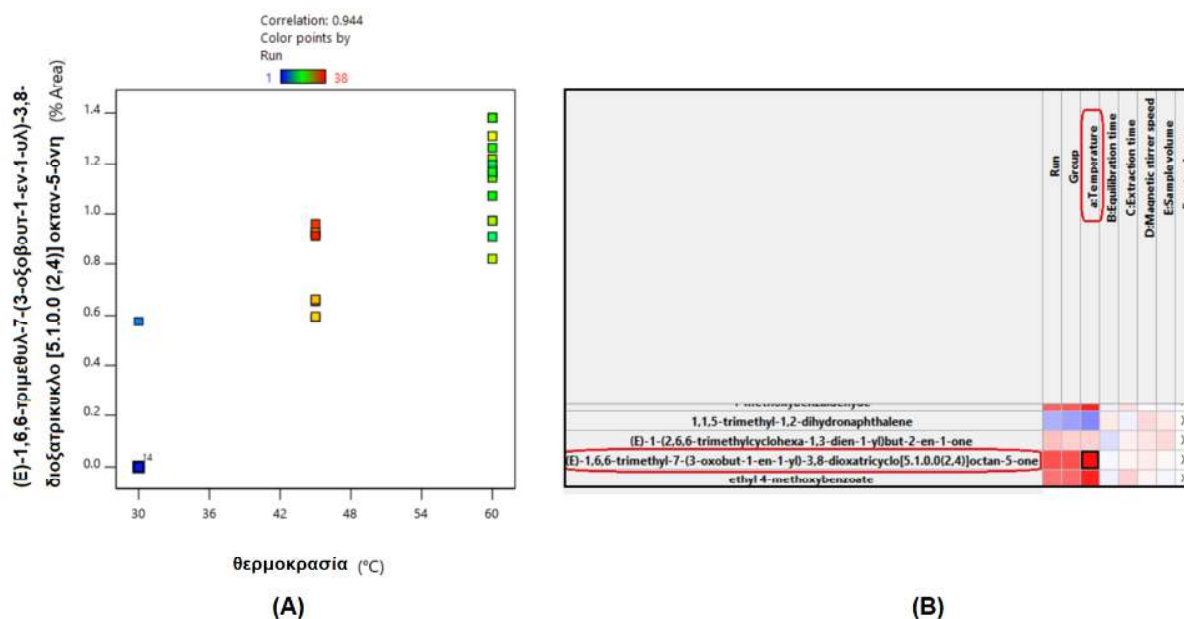


Εικόνα 28. (A) Διάγραμμα διασποράς της (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνης (δαμασκηνόνη) σε σχέση με τη θερμοκρασία και (B) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεΐδης. Όπου A: θερμοκρασία, B: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

8. (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη

Όσον αφορά την (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη, παρατηρήθηκε μεγάλη θετική συσχέτιση με τον παράγοντα της θερμοκρασίας η οποία είναι στατιστικά σημαντική, με $r = 0,944$ και $p\text{-value} < 0,0001$ αντίστοιχα. Εφόσον οι υπόλοιποι παράγοντες έχουν πολύ μικρή συσχέτιση με την ένωση, και όχι στατιστικά σημαντική και λόγω των παραπάνω υψηλών τιμών, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η εκχύλιση αυτής εξαρτάται σχεδόν άμεσα από τον παράγοντα

της θερμοκρασίας και πάντοτε στα πλαίσια των παραγόντων που μελετήθηκαν. Παρατηρώντας το διάγραμμα διασποράς, φαίνεται πως η εν λόγω ένωση εκχυλίζεται και δίνει μεγαλύτερες ποσότητες στους 60 °C. Το πλέγμα συσχέτισης επιβεβαιώνει τα παραπάνω (Εικ. 30).

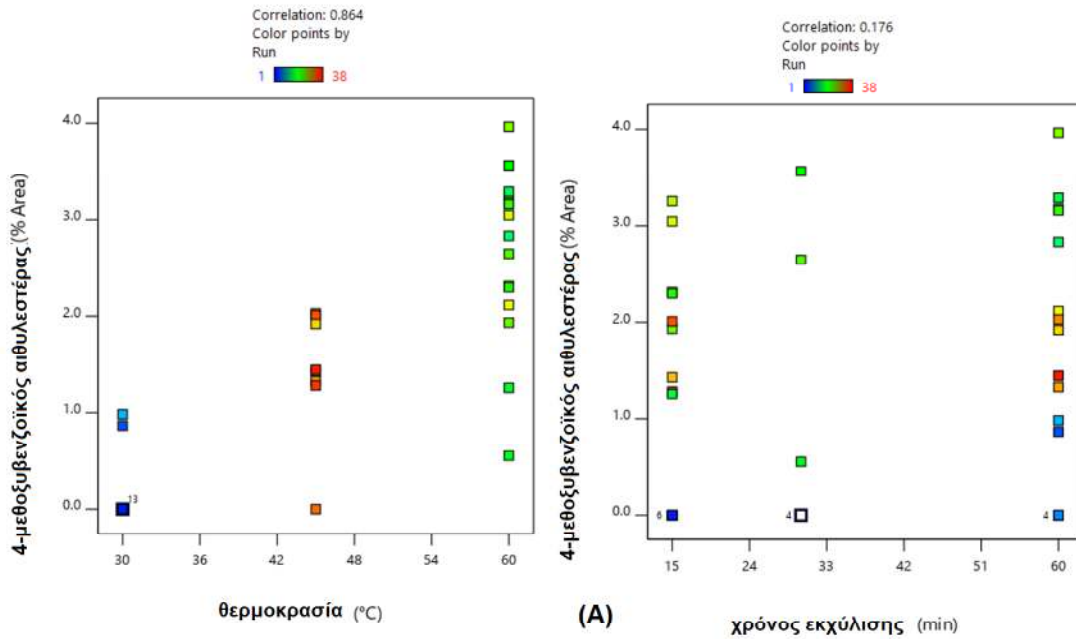


Εικόνα 29. (Α) Διάγραμμα διασποράς της (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνης σε σχέση με τη θερμοκρασία και (Β) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζαλδεϋδης. Όπου α: θερμοκρασία, Β: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

9. 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας

Η εκχύλιση του 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρα παρατηρήθηκε να έχει μεγάλη συσχέτιση με την θερμοκρασία και μικρή αλλά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον χρόνο εκχύλισης. Συνεπώς, σε αυτήν την περίπτωση δύο είναι οι παράγοντες που είναι στατιστικά σημαντικοί, με την θερμοκρασία να έχει p-value < 0,05 και θετική συσχέτιση με $r = 0,864$ και τον χρόνο εκχύλισης να έχει p-value < 0,05 και θετική συσχέτιση $r = 0,176$. Παρατηρώντας το διάγραμμα διασποράς, φαίνεται ότι ο παράγοντας της θερμοκρασίας δείχνει την ιδανικότερη τιμή των 60 °C για την επίτευξη της εκχύλισης της ουσίας σε μέγιστο βαθμό. Τέλος, φαίνεται πως για να παραλάβουμε την ένωση μας σε μεγαλύτερη ποσότητα ο χρόνος εκχύλισης θα πρέπει να κυμανθεί, κυρίως, στους μεγαλύτερους χρόνους από τους τρεις που μελετήθηκαν (15, 30, 60 min), δηλαδή μεταξύ

30 και 60 min. Αυτό φαίνεται από τα «πράσινα τετραγωνάκια» που αντιστοιχούν στις δοκιμές που έγιναν στους 60 °C, όπου παραλαμβάνουμε τις μέγιστες ποσότητες. Ο κατηγορικός παράγοντας της αναλογίας νερό / μέλι παρατηρείται στατιστικά σημαντικός με $p\text{-value} < 0,05$. Το πλέγμα συσχέτισης αλλά και τα $p\text{-value}$ των υπολοίπων παραγόντων μας δείχνουν πώς δεν υπάρχει κάποια άλλη συσχέτιση άξια αναφοράς (Εικ.



	Run	Group	a: Temperature	B: Equilibration time	C: Extraction time	D: Magnetic stirrer speed	E: Sample volume	F: water: honey
1,5-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene								X
1-methylcyclohexa-1,3-dien-1-ylbut-2-en-1-one								X
4-cyclobut-1-en-1-yl-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octan-5-one								X
ethyl 4-methoxybenzoate								X

(B)

31).

Εικόνα 30. (A) Διάγραμμα διασποράς του 4-μεθοξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα σε σχέση με τη θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης (B) πλέγμα συσχέτισης της 4-μεθοξυβενζοϊκού αιθυλεστέρα. Όπου a: θερμοκρασία, B: χρόνος εξισορρόπησης, C: Χρόνος εκχύλισης, D: Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα, E: Όγκος δείγματος και F: αναλογία νερό / μέλι.

Γ.2.2.3 Έλεγχοι υποθέσεων και στατιστικών μετρήσεων για την απόδοση του μοντέλου, στατιστικά καλής προσαρμογής (Fit Statistics).

Πριν την βελτιστοποίηση του κύριου πτητικού προφίλ, κάθε πτητική ένωση επιβεβαιώθηκε με κανονική κατανομή, συντελεστή προσδιορισμού (R^2) και ανάλυση διακύμανσης ANOVA ώστε να εκτιμηθεί η ορθότητα του μοντέλου (Πίνακας 9). Τα πτητικά ακολούθησαν την κανονική κατανομή. Το R^2 αποτελεί ένα μέτρο της ποσότητας της διακύμανσης γύρω από το μέσο που εξηγείται από το μοντέλο. Συγκεκριμένα το προτεινόμενο μοντέλο εμφάνισε καλή εφαρμογή με ακρίβεια, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, κάτι που επαληθεύεται από τις τιμές του συντελεστή προσδιορισμού R^2 ($\geq 0,89$) οι οποίες βρίσκονται σύμφωνες μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών. Το ANOVA επιβεβαιώνει την επάρκεια του μοντέλου (τιμή $p < 0,05$) και υποδεικνύει εάν οι όροι του μοντέλου ήταν σημαντικοί. Οι σημαντικοί όροι μοντέλου πιθανώς να έχουν πραγματική επίδραση στην απόκριση, δηλαδή επηρεάζουν την εκχύλιση των πτητικών ενώσεων. Η σημαντικότητα του κάθε παράγοντα φαίνεται στον Πίνακα 9, με έντονη γραφή (bold) το $p\text{-value} < 0,05$ κάτι που σημαίνει ότι οι όροι του μοντέλου είναι σημαντικοί, με κανονική γραφή το $0,05 \leq p\text{-value} < 0,1$. Άρα οι όροι του μοντέλου δεν είναι στατιστικά σημαντικοί αλλά ίσως ασκούν κάποια επιρροή και με πιο αχνή γραφή $p\text{-value} \geq 0,1$, κάτι που κάνει του όρους πλέον ασήμαντους.

Πίνακας 9. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA.

Αποκρίσεις / Πτητικές Ενώσεις	ANOVA ($p\text{-value} < 0,05$)						R^2
	Παράγοντες ($p < 0,05$ $0,05 \leq p < 0,1$ $p \geq 0,1$)						
	θερμοκρασία	χρόνος εξισορρόπησης	Χρόνος εκχύλισης	Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα	Όγκος δείγματος	αναλογία νερό / μέλι	
R1	0,19	0,50	0,40	0,35	0,60	0,00	0,988
R2	0,23	0,84	0,11	0,05	0,04	0,01	0,979
R3	0,09	0,12	0,54	0,19	0,44	0,00	0,988
R4	0,09	0,53	0,73	0,36	0,17	0,07	0,895
R5	0,00	0,53	0,00	0,64	0,74	0,00	0,997
R6	0,00	0,41	0,37	0,07	0,59	0,00	0,985
R7	0,66	0,95	0,35	0,18	0,12	0,00	0,956
R8	0,00	0,39	0,97	0,24	0,32	0,09	0,991
R9	0,00	0,32	0,01	0,70	0,23	0,00	0,988

Όπου R1: Βενζαλδεΐδη, R2: 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α -Ισοφορόνη), R3: 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη), R4: 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (Σαφρανάλη), R5: 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη / (p -ανισαλδεΐδη), R6: 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο, R7: (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (Λαμασκιγρόνη), R8: (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη και R9: 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας.

Γ.2.3.4 Ανάπτυξη μοντέλων βελτιστοποίησης βασισμένα σε κάθε πτητική ένωση

Το στατιστικό μοντέλο, ορίζοντάς του κριτήρια, προτείνει λύσεις ώστε κάθε μια από τις αποκρίσεις που μας ενδιαφέρουν, δηλαδή οι πτητικές ενώσεις του μελιού στη προκειμένη περίπτωση, να απομονωθούν στο βέλτιστο βαθμό. Ο βέλτιστος βαθμός καθορίζεται από την χρωματογραφική περιοχή (%) (% area). Ο στόχος της βελτιστοποίησης, στην παρούσα μελέτη, ήταν οι τιμές των παραγόντων, που τέθηκαν στο σχεδιασμό του πειράματος, να βρίσκονται σε ορισμένο εύρος τιμών. Δηλαδή, η θερμοκρασία να βρίσκεται μεταξύ 30 και 60 °C, ο χρόνος εξισορρόπησης μεταξύ 5 και 30 min, ο χρόνος εκχύλισης μεταξύ 15 και 60 min, η ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα μεταξύ 100 και 700 rpm, ο όγκος του δείγματος από 2 έως 6 mL ενώ τέλος η αναλογία νερό / μέλι να είναι ίση με 1:3 , είτε με 1:1, είτε με 3:1 v/m, αφού είναι κατηγορικός και όχι ποσοτικός παράγοντας.

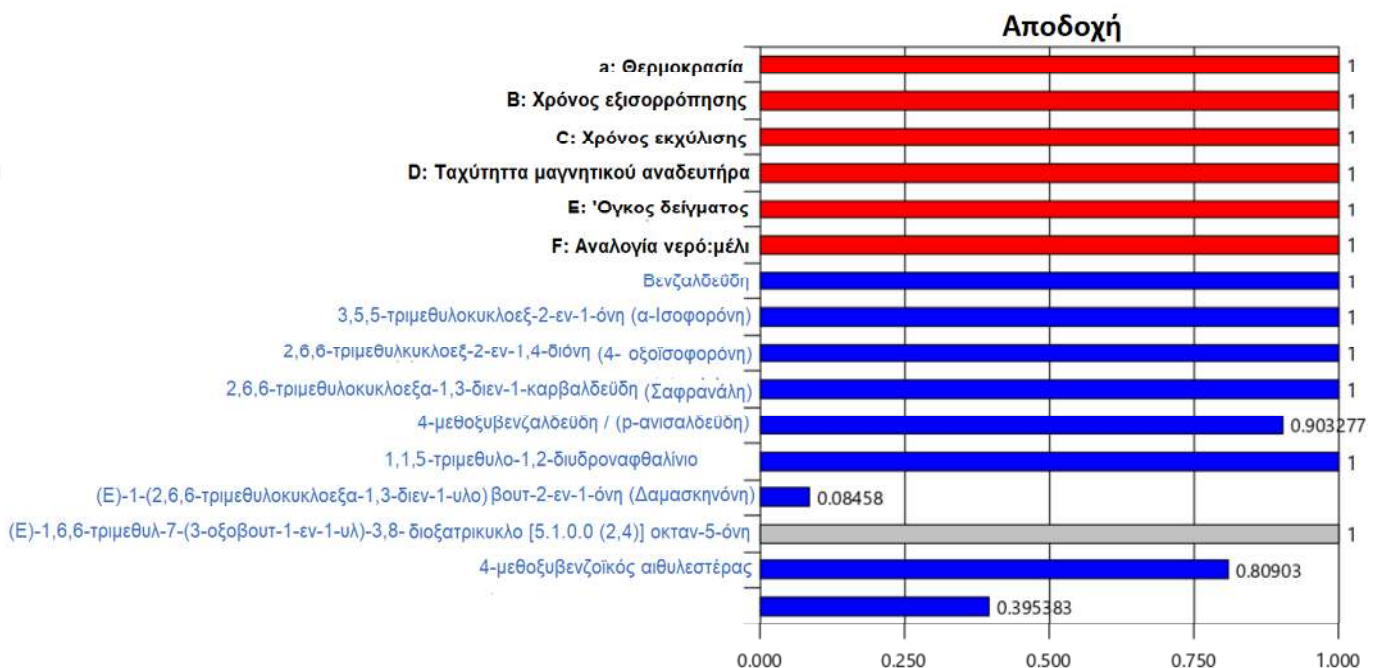
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, ενώ η αξιολόγηση έγινε με δείκτες αποδοχής. Οι δείκτες αυτοί κυμαίνονται από 0 έως 1 με την ιδανική περίπτωση να βρίσκεται στο 1. Για κάθε πτητική ένωση δίνεται και ένας προβλεπόμενος μέσος όρος. Όπως παρατηρείται, η κάθε ένωση για να απομονωθεί «βέλτιστα» απαιτεί διαφορετικό συνδυασμό των τιμών των παραγόντων. Φαίνεται πως η θερμοκρασία για τις περισσότερες πτητικές ενώσεις απαιτούσε τη μέγιστη τιμή του μοντέλου. Από την άλλη ο χρόνος εκχύλισης, όπως και η ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα φαίνεται να προτιμούν τις χαμηλότερες τιμές που μελετήθηκαν.

Πίνακας 10. Βέλτιστες συνθήκες, αποδοχής και προβλεπόμενη μέση τιμή για κάθε κύρια πτητική ένωση.

Αποκρίσεις / Πτητικές Ενώσεις	Παράγοντες						Επιθυμητότητα	Προβλεπόμενος Μέσος (%Area)
	Θερμοκρασία	Χρόνος εξισορρόπησης	Χρόνος εκχύλισης	Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα	Όγκος δείγματος	Αναλογία νερό / μέλι (v/m)		
R1	60	5	60	700	6	1:1	1,000	4,07 ± 0,36
R2	45	30	15	700	2	1:3	1,000	0,96 ± 0,18
R3	60	30	15	100	4	1:3	1,000	1,63 ± 0,22
R4	45	30	15	100	6	1:3	1,000	1,97 ± 0,71
R5	60	15	15	100	2	1:3	1,000	12,61 ± 0,64
R6	60	5	15	700	6	1:3	1,000	0,64 ± 0,11
R7	60	15	30	400	2	1:3	1,000	0,77 ± 0,23
R8	60	30	30	100	4	1:3	1,000	0,84 ± 0,22
R9	60	30	15	100	2	1:1	1,000	2,48 ± 0,39

Πρακτικά όμως, εάν θελήσουμε να απομονώσουμε τις κύριες πτητικές ενώσεις από ένα μέλι ερείκης, πιθανότατα να θελήσουμε να μειώσουμε τον αριθμό των πειραμάτων και των διαφορετικών συνθηκών, παραλαμβάνοντας όλο το άρωμα στο βέλτιστο βαθμό με ένα πείραμα. Βάσει αυτού και των παραπάνω κριτηρίων που τέθηκαν, το στατιστικό πρόγραμμα πρότεινε λύσεις και ως βέλτιστη επιλέχθηκε εκείνη που έχει την καλύτερη αποδοχή με τιμή 0.40 (Εικ. 32.) και συνάμα αποτελεσματικότητα της παραλαβής των περισσότερων πτητικών ενώσεων στο μέγιστο βαθμό.

Το γράφημα ράβδων δείχνει πόσο καλά η κάθε μεταβλητή πληροί τα κριτήρια που ορίστηκαν. Παρατηρείται ότι οι περισσότερες ενώσεις είναι κοντά στο επιθυμητό αποτέλεσμα με δείκτη αποδοχής = 1.

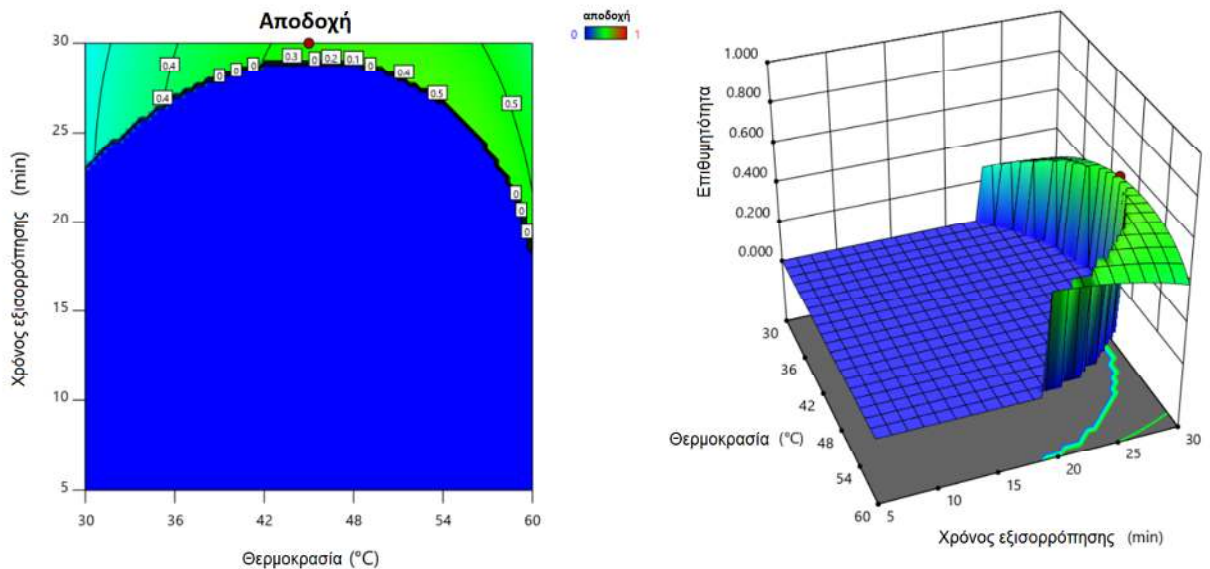


Εικόνα 31. Διάγραμμα ράβδων αποδοχής αναφορικά με το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Οι βέλτιστες τιμές των παραγόντων που πρότεινε το πρόγραμμα και οι προβλεπόμενες μέσες τιμές (%Area) των πτητικών ενώσεων φαίνονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Οι βέλτιστες τιμές επιφανειακής απόκρισης που πρότεινε το στατιστικό πρόγραμμα.

Βέλτιστη τιμή επιφανειακής απόκρισης		
Παράγοντες		
Θερμοκρασία	60	°C
Χρόνος εξισορρόπησης	30	min
Χρόνος εκχύλισης	15	min
Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα	100	rpm
Όγκος δείγματος προς εκχύλιση	6	mL
Αναλογία νερό: μέλι	1:3	v/m
Πτητικές ενώσεις		
βενζαλδεΰδη	4,53	%
3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη)	0,88	%
2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη)	1,64	%
2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-καρβαλδεΰδη (σαφρανάλη)	1,29	%
4-μεθοξυβενζαλδεΰδη / (ρ-ανισαλδεΰδη)	12,21	%
1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διδροναφθαλίνιο	0,66	%
(E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-α-1,3-διεν-1-υλο)βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη)	0,15	%
(E)-1,6,6-τριμεθυλ-7-(3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ)-3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη	0,71	%
4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας	2,88	%



Εικόνα 32. Διαγράμματα επιφάνειας απόκρισης (contour και 3D-surface) αποδοχής του χρόνου εξισορρόπησης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας.

Η Εικόνα 33 παρουσιάζει τα διαγράμματα της επιφάνειας απόκρισης της αποδοχής σε συνάρτηση με την θερμοκρασία και τον χρόνο εξισορρόπησης. Παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος εξισορρόπησης στα 30 min παρουσίασε μια ασυνήθιστη υψηλή τιμή. Τα διαγράμματα διαβάθμισης χρώματος, εικονιζόμενα ως δύο και τριών διαστάσεων,

δείχνουν πως οι επιθυμητές αποκρίσεις που αναπαρίσταται με το πράσινο χρώμα, εμφανίζονται κοντά στον χρόνο εξισορρόπησης των 30 min, ενώ όσο η θερμοκρασία αυξάνεται υπάρχει χρωματική διαβάθμιση με έντονο το πράσινο χρώμα στους 60 °C, γεγονός που επιβεβαιώνει πως ο συνδυασμός των παραγόντων χρόνου εξισορρόπησης στα 30 min και θερμοκρασίας στους 60 °C είναι ικανοποιητικός ως προς την επιθυμητότητα για την εκχύλιση των ενώσεων.

Γ.3 Εκχύλιση πτητικών συστατικών μελιού ερείκης και ανάλυση με GC-MS

Γ.3.1 Πειραματική πορεία

Μετά τη βελτιστοποίηση, ακολούθησε η παραλαβή του πτητικού κλάσματος από δείγματα 25 μελιών ερείκης από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας (Πίν. 12). Τα δείγματα παρελήφθησαν κατευθείαν από τοπικούς παραγωγούς και παράχθηκαν κατά την περίοδο συγκομιδής 2019-2020. Πριν την εκτέλεση των πειραμάτων εξασφαλίστηκαν ότι τα δείγματα είναι αμιγή με βάση τα νομοθετικά κριτήρια τα οποία ορίζουν τις φυσικοχημικές και τις γυρεοσκοπικές αναλύσεις.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.3.1 με τη διαφορά ότι οι συνθήκες των παραγόντων παρέμειναν σταθερές για κάθε δείγμα, ενώ για μεγαλύτερη ακρίβεια έγινε δειγματοληψία τρεις φορές από κάθε δείγμα. Ως αποτέλεσμα της μελέτης της βελτιστοποίησης, οι τιμές των παραγόντων που επιλέχθηκαν ήταν αυτές που προτάθηκαν από το πρόγραμμα ως βέλτιστες για την παραλαβή του πτητικού κλάσματος. Αυτές είναι:

- Θερμοκρασία 60 °C
- Χρόνος εξισορρόπησης 30 min
- Χρόνος εκχύλισης 15 min
- Ταχύτητα μαγνητικού αναδευτήρα 100 rpm
- Όγκος δείγματος προς εκχύλιση 6 mL
- Αναλογία νερό: μέλι 1:3 v/m (συγκεκριμένα: 3 mL νερό : 9 g μέλι)

Πίνακας 12. Δείγματα μελιών ερείκης που χρησιμοποιήθηκαν.

Κωδικός δείγματος	Προέλευση μονοανθικού μελιού	Γεωγραφική περιοχή	Έτος
Ερεια_χαλκ_2019_1	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Χαλκιδική	2019
Ερεια_καλ_2019_2	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Κάλαμος Αττικής	2019
Ερεια_καλ_2019_3	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Κάλαμος Αττικής	2019
Ερεια_χαλκ_2019_4	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Χαλκιδική	2019
Ερεια_χαλκ_2019_5	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Χαλκιδική	2019
Ερεια_χαλκ_2019_6	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Χαλκιδική	2019
Ερεια_χαλκ_2019_7	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Χαλκιδική	2019
Ερεια_χαλκ_2019_8	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Χαλκιδική	2019
Ερεια_ανδ_2019_9	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Άνδρος	2019
Ερεια_θεσσ_2019_10	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Θεσσαλονίκη	2019
Ερεια_ανδ_2019_11	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Άνδρος	2019
Ερεια_ανδ_2019_12	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Άνδρος	2019
Ερεια_ανδ_2019_13	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Άνδρος	2019
Ερεια_καλ_2019_14	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Κάλαμος Αττικής	2019
Ερεια_αγ.φωτ_2019_15	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Αγ. Φωτεινή Κρήτης	2019
Ερεια_στε_2019_16	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Στερεά Ελλάδα	2019
Ερεια_βοι_2019_17	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Βοιωτία	2019
Ερεια_ευβ_2019_18	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Εύβοια	2019
Ερεια_αχα_2019_19	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Αχαΐα	2019
Ερεια_ευβ_2019_20	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Εύβοια	2019
Ερεια_θεσ_2019_21	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Θεσσαλονίκη	2019
Ερεια_ευβ_2019_22	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Εύβοια	2019
Ερεια_ευβ_2019_23	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Εύβοια	2019
Ερεια_κυκ_2019_24	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Κυκλάδες	2019
Ερεια_αρκ_2019_25	Ερείκη (<i>Erica manipuliflora</i> L.)	Αρκαδία	2019

Γ.3.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Γ.3.2.1 Αξιολόγηση των απομονωμένων πτητικών ενώσεων

Από τα 25 δείγματα απομονώθηκαν συνολικά 49 πτητικές ενώσεις που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες όπως εστέρες, αλκοόλες, καρβοξυλικά οξέα, αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες, τερπένια και άλλες ενώσεις (Πιν. 13). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ημιποσοτικοποιημένες τιμές, αφού χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο η βενζοφαινόνη, αλλά και η εκατοστιαία αναλογία του εμβαδού της κάθε

κορυφής επί του συνολικού εμβαδού. Όπως φαίνεται, το μέλι ερείκης περιέχει διάφορες πτητικές ενώσεις αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 13. Πτητικές ενώσεις που απομονώθηκαν από δείγματα μελιού ερείκης.

Αρ.	Πτητικές ενώσεις	RT ^a	RI ^b	Ελάχιστο (mg/kg μελιού)	Μέγιστο (mg/kg μελιού)	Μέσος όρος (mg/kg μελιού)	Μέσος όρος Εμβαδό (%) επί του συνόλου (% Area)
Εστέρες							
1	βενζοϊκός μεθυλεστέρας	17,3	1093	0,00	0,33	0,02	0,16
2	Οκτανοϊκός μεθυλεστέρας	18,3	1124	0,00	0,17	0,06	1,07
3	βενζοϊκός αιθυλεστέρας	19,6	1165	0,00	1,68	0,11	1,95
4	2-φαινυλοξικός μεθυλεστέρας	19,8	1179	0,00	0,32	0,04	0,80
5	2-υδροξυβενζοϊκός μεθυλεστέρας (σαλικυλικός μεθυλεστέρας)	20,4	1192	0,00	0,54	0,06	0,77
6	εννεανοϊκός μεθυλεστέρας	21,3	1222	0,06	0,44	0,16	2,95
7	δεκανοϊκός μεθυλεστέρας	24,3	1322	0,00	0,10	0,05	0,76
8	4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας	28,7	1458	0,00	0,24	0,02	0,22
9	δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας	30,8	1521	0,00	0,06	0,01	0,24
10	φθαλικός διβουτυλεστέρας	39,0	1859	0,00	0,07	0,02	0,46
Αλκοόλες							
11	οκτ-1-εν-3-όλη	13,4	981	0,00	0,26	0,02	0,10
12	2-αιθυλοεξαν-1-όλη	15,1	1029	0,00	0,16	0,03	0,52
13	5-(3,3-διμεθυλοξιραν-2-υλ)-3-μεθυλοπεντ-1-εν-3-όλη (cis-λιναλολοξείδιο)	16,6	1072	0,00	0,35	0,07	0,96
14	2-φαινυλοαιθαν-1-όλη	17,9	1114	0,00	0,34	0,06	0,98
15	4-μεθυλο-1-(προπ-1-εν-2-υλο) κυκλοεξ-3-εν-1-όλη	20,0	1183	0,00	0,54	0,02	
16	3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη	24,0	1314	0,00	0,93	0,08	0,98
17	4,6,10,10-τετραμεθυλο-5-οξατρίκυκλο [4.4.0.0 (1,4)] δεκ-2-εν-7-όλη	29,3	1476	0,00	0,11	0,01	0,20
18	6,6-διμεθυλο-5-μεθυλενοδικυκλο [2.2.1] επταν-2-όλη (6-καμφενόλη)	30,5	1510	0,00	0,38	0,02	0,22
Καρβοξυλικά οξέα							
19	εννεανοϊκό οξύ	23,2	1288	0,00	0,27	0,11	1,93
Αλδεΐδες							
20	φουρανο-2-καρβαλδεΐδη (φουρφουράλη)	7,4	826	0,01	2,61	1,14	18,73
21	βενζαλδεΐδη	12,6	959	0,02	1,44	0,18	2,62
22	οκτανάλη	14,2	1001	0,00	0,15	0,05	0,75
23	2-φαινυλοακεταλδεΐδη	15,6	1041	0,00	0,85	0,16	2,70
24	εννεανάλη	17,7	1104	0,07	0,46	0,19	3,38
25	δεκανάλη	20,8	1205	0,00	0,35	0,15	2,66
26	4-μεθοξυβενζαλδεΐδη / (p-ανισαλδεΐδη)	22,4	1261	0,00	1,36	0,23	3,62
Κετόνες							

27	1- (φουρανο-2-υλ) αιθανόνη (2-ακετυλοφουράνιο)	10,6	907	0,07	0,34	0,16	2,69
28	2-κυκλοεξέν-1-όνη	14,7	1015	0,00	0,15	0,01	0,10
29	3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη)	18,2	1120	0,01	4,16	0,43	6,14
30	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη)	18,9	1143	0,01	0,89	0,13	1,90
31	2-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη	18,9	1145	0,00	0,29	0,09	1,29
32	1- (1,4-διμεθυλοκυκλοεξ-3-εν-1-υλο) αιθαν-1-όνη	19,1	1149	0,00	0,22	0,02	0,17
33	(E) -4- (2,4,4-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,5-διεν-1-υλ) βουτ-3-εν-2-όνη	27,6	1420	0,00	0,10	0,01	0,17
34	(E) -1,6,6-τριμεθυλο-7- (3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ) -3,8-διοξάτρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη	28,0	1437	0,00	0,23	0,05	0,84
35	4- (2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διενυλο) βουτ-3-εν-2-όνη	29,2	1474	0,00	0,10	0,01	0,05
36	1-(4-(τριτ.-βουτυλο)-2,6-διμεθυλοφαινυλ) αιθαν-1-όνη	33,3	1584	0,00	0,14	0,04	0,63
37	(E) -3,5,5-τριμεθυλο-4- (3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ) κυκλοεξ-2-εν-1-όνη	35,0	1654	0,00	0,09	0,02	0,29
Υδρογονάνθρακες							
38	οκτάνιο	6,3	800	0,00	0,18	0,06	1,16
39	εννεάνιο	10,3	898	0,00	0,16	0,03	0,44
40	ενδεκάνιο	17,6	1101	0,10	0,52	0,21	3,69
41	δωδεκάνιο	20,7	1201	0,00	0,18	0,02	0,22
Τερπένια							
42	1-μεθυλο-4-προπαν-2-υλ)βενζόλιο (p-κυμένιο)	14,9	1022	0,00	0,15	0,01	0,17
43	1-μεθυλο-4- (προπ-1-εν-2-υλ) βενζόλιο (p-κυμενένιο)	17,2	1090	0,00	0,18	0,02	0,17
44	2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεϋδη (σαφρανάλη)	20,6	1198	0,00	0,54	0,12	1,75
45	1-μεθοξυ-4-προπυλοβενζόλιο	23,5	1299	0,00	0,83	0,04	0,56
46	(E) -1- (2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο) βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη)	26,0	1377	0,00	0,16	0,05	0,84
Άλλες ενώσεις							
47	(2S, 8aR) -2,5,5,8a-τετραμεθυλο-3,5,6,8a-τετραϋδρο-2H-χρωμίνη	23,9	1306	0,00	0,09	0,01	0,12
48	1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διϋδروναφθαλίνιο	25,2	1352	0,00	0,19	0,08	1,21
49	8-ισοπροπυλο-1-μεθυλ-1,2,3,4-τετραϋδروναφθαλένιο	31,5	1535	0,00	0,11	0,05	0,91

^aΧρόνοι συγκράτησης – RT (min), ^bΔείκτης κατακράτησης – RI.

Οι εστέρες είναι μία κατηγορία ενώσεων που απαντάται συχνά στα άνθη και στο μέλι από μελιτώματα, ενώ κάποιες από αυτές είναι κύριες πτητικές ενώσεις αυτών (Machado et al., 2020). Στην παρούσα μελέτη, ο μοναδικός εστέρας που ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερη, σε σύγκριση με του υπόλοιπους, συγκέντρωση είναι ο εννεανοϊκός μεθυλεστέρας. Σε προηγούμενη μελέτη, ο οκτανοϊκός μεθυλεστέρας, ο εννεανοϊκός μεθυλεστέρας και ο δωδεκανοϊκός μεθυλεστέρας έχουν αναφερθεί σε μέλι από μελιτώματα ελάτου και πεύκου και πιθανότατα η παρουσία τους να οφείλεται στην

περίοδο συλλογής των μελισσών από τα πεύκα (Xagoraris et al., 2021). Από όλους τους εστέρες που απομονώθηκαν, μόνο ο 4-μεθοξυβενζοϊκός αιθυλεστέρας έχει αναφερθεί σε μέλι από ερείκη (Guyot et al., 1999) και επιλέχθηκε νωρίτερα στην μελέτη ως «κύριο» πτητικό συστατικό. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο εννεανοϊκός μεθυλεστέρας ήταν ο μόνος εστέρας που εμφανίστηκε σε όλα τα δείγματα.

Οι αλκοόλες βρέθηκαν εξίσου σε χαμηλές συγκεντρώσεις και καμία από αυτές δε κρίθηκε άξια μελέτης ως ένωση «δείκτης» του μελιού ερείκης στο προηγούμενο κεφάλαιο. Προηγούμενες έρευνες έχουν αναφέρει κάποιες αλκοόλες που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη, ενώ κάποιες τις έχουν χαρακτηρίσει ως «βασικές» πτητικές ενώσεις του μελιού ερείκης. Οι Rodríguez-Flores et al. το 2021 ανέφεραν την 4,6,10,10-τετραμεθυλ-5-οξατρύκυκλο[4.4.0.0(1,4)]δεκ-2-εν-7-όλη και την 6,6-διμεθυλο-5-μεθυλενοδικυκλο[2.2.1]επταν-2-όλη (6-καμφενόλη) στο πτητικό κλάσμα που λήφθηκε με τεχνική SPME και παρόμοιες συνθήκες με την παρούσα εργασία από δείγματα μελιού ερείκης σε περιοχές της Ιβηρικής Χερσονήσου. Άλλη μελέτη ανέφερε την 3,4,5-τριμεθυλοφαινόλη ως μία από τις κύριες πτητικές ενώσεις του μελιού ερείκης από την Πολωνία (Plutowska et al., 2011). Επίσης, οι αλκοόλες 5-(3,3-διμεθυλοξιραν-2-υλο)-3-μεθυλπεντ-1-εν-3-όλη (cis-λιναλολοξιδιο) και 2-φαινυλοαιθαν-1-όλη έχουν βρεθεί σε μέλια από εσπεριδοειδή, ακακία, κάστανο και θυμάρι σε υψηλές συγκεντρώσεις (Machado et al., 2020), ενώ άλλες πηγές τις αναφέρουν ως κύριες πτητικές ενώσεις (Rodríguez-Flores et al. 2021; de la Fuente et al. 2005, Guyot et al. 1999; Castro-Vázquez et al. 2009; Soria et al. 2009).

Οι αλδεΐδες αποτελούν μια ομάδα ενώσεων που εντοπίστηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις εντοπίστηκε η φουρανο-2-καρβαλδεΐδη (φουρφουράλη), μια ένωση που προέρχεται από το φουράνιο και θεωρείται ότι είναι δείκτης θερμικής επεξεργασίας και αποθήκευσης (Castro-Vázquez et al., 2007). Παρόλο που η φουρφουράλη έχει αποδοθεί σε μέλια ερείκης (Castro-Vázquez et al., 2009), στην παρούσα μελέτη δεν είχε αξιοσημείωτο ενδιαφέρον. Προηγούμενες μελέτες απέδωσαν σε μέλια ερείκης αλδεΐδες όπως η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-καρβαλδεΐδη (σαφρανάλη, μονοτερπενική αλδεΐδη), η 4-μεθοξυβενζαλδεΐδη / (p-ανισαλδεΐδη), η βενζαλδεΐδη και η 2-φαινυλακεταλδεΐδη (Boi et al. 2013; Guyot et al. 1999; de la Fuente et al. 2005; Soria et al. 2009; Castro-Vázquez

et al. 2009; Seisonen et al. 2015; Rodríguez-Flores et al. 2021). Η οκτανάλη, η εννεανάλη και η δεκανάλη είναι ενώσεις που έχουν εντοπιστεί σε μέλια πεύκου, ακακίας και μελιτωμάτων, επομένως δεν έχουν κάποιο ενδιαφέρον για το μέλι ερείκης (Machado et al. 2020). Οι αλδεΐδες που εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα ήταν η φουρανο-2-καρβαλδεΐδη (φουρφουράλη), η βενζαλδεΐδη και η εννεανάλη.

Οι περισσότερες κετόνες βρέθηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις με εξαίρεση την 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη), τη 1-(φουρανο-2-υλ)αιθανόνη (2-ακετυλοφουράνιο) και η 2,6,6-τριμεθυλκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη), οι οποίες εκτός της εμφανούς μεγαλύτερης συγκέντρωσης που βρέθηκαν, ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ορισμένες κετόνες σε μέλια ερείκης, όπως η 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη), η 2,6,6-τριμεθυλκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη), 2-υδροξυ-3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη, η (E)-1,6,6-τριμεθυλ-7- (3-οξοβουτ-1-εν-1-υλ) -3,8-διοξατρικυκλο [5.1.0.0 (2,4)] οκταν-5-όνη, η 4- (2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διενυλο) βουτ-3-εν-2-όνη και η (E)-1-(2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξα-1,3-διεν-1-υλο) βουτ-2-εν-1-όνη (δαμασκηνόνη) (Guyot et al. 1999; Castro-Vázquez et al. 2009; Plutowska et al. 2011; Tan et al. 1989).

Μόνο τέσσερις υδρογονάνθρακες ανιχνεύθηκαν με το ενδεκάνιο να εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα και να απαντάται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα υπόλοιπα. Οι υδρογονάνθρακες βρίσκονται σε πολλά είδη μελιού (Machado et al. 2020), επομένως δεν παρουσιάζουν κάποιο ενδιαφέρον.

Τέλος, από τα καρβοξυλικά οξέα, τις τερπενοειδείς ενώσεις (πέραν από αυτές που έχουν ήδη αναφερθεί) και άλλες ενώσεις μόνο το 1,1,5-τριμεθυλο-1,2-διυδροναφθαλίνιο βρέθηκε και το οποίο έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη μελέτη του πτητικού προφίλ μελιών ερείκης (Rodríguez-Flores et al. 2021).

Γ.4 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων σε δείγμα μελιού ερείκης και χρωματογραφική μελέτη με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (LC/Q-TOF MS).

Ο προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων σε δείγματα από μέλι ερείκης χρησιμοποιώντας την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC/Q-TOF MS), έγινε για την

ανάλυση του φαινολικού του προφίλ καθώς οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες βοτανικής προέλευσης του μελιού και σε ορισμένες περιπτώσεις δείκτες για τη γεωγραφική προέλευση του μελιού.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση των φαινολικών ενώσεων των δειγμάτων μέλι ερείκης με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης SPE (Solid Phase Extraction) και στη συνέχεια διαχωρισμός και ταυτοποίηση αυτών με LC/Q-TOF MS. Οι φαινολικές ενώσεις που αναζητήθηκαν στα συνολικά πέντε δείγματα μελιού ερείκης που επιλέχθηκαν τυχαία, ήταν γνωστές πρότυπες ουσίες που ζυγίστηκαν, αραιώθηκαν σε γνωστή συγκέντρωση και ταυτοποιήθηκαν με την ίδια πειραματική διαδικασία που ακολούθησαν τα δείγματα.

Γ.4.1 Πειραματική πορεία

Γ.4.1.1 Εκχύλιση Φαινολικών από μέλι ερείκης με SPE

Όργανα – Αντιδραστήρια:

- Υπερκάθαρο νερό
- Οξινισμένο υπερκάθαρο νερό
- Υδροχλωρικό οξύ, HCl (14 M)
- Ακετονιτρίλιο
- Πιπέτα 1000 ul
- Πιπέτα 50 ul
- Πλαστικοί περιέκτες
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)
- Οικιακό κουτάλι
- Συσκευή Buchner
- Ποτήρι ζέσεως
- Φίλτρο καθαρισμού πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE)

Προετοιμασία δείγματος μελιού για την εκχύλιση των φαινολικών:

Από το αποθηκευμένο δείγμα μελιού παρελήφθησαν 20 g και διαλύθηκαν σε 20 mL υπερκάθαρου νερού σε πλαστικό φιαλίδιο. Στο παραπάνω διάλυμα έγινε ρύθμιση του pH στην τιμή 2 με υδροχλωρικό οξύ 0,1 M . Ακολούθησε ομογενοποίηση με υπέρηχους για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που προέκυψε διηθήθηκε με χωνί Buchner για να απομακρυνθούν τυχόν στερεά σωματίδια που υπάρχουν πολλές φορές

στο μέλι. Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Isolute C18 (EC) 2 g / 15 mL συζευγμένες με αντλία κενού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε φαίνεται στις Εικόνες 34 και 35:

- Ενεργοποίηση της στήλης:

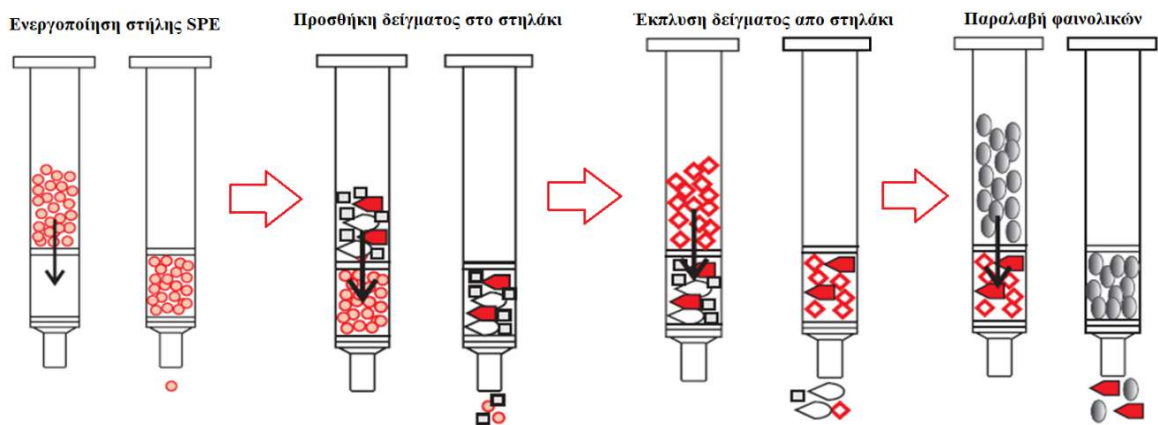
Πρώτο βήμα είναι να ενεργοποιήσουμε την στήλη. Το στηλάκι SPE ενεργοποιήθηκε με 3 mL ακετονιτρίλιο και 9 mL υπερκάθαρου νερού.

- Τοποθέτηση δείγματος και πλύση SPE:

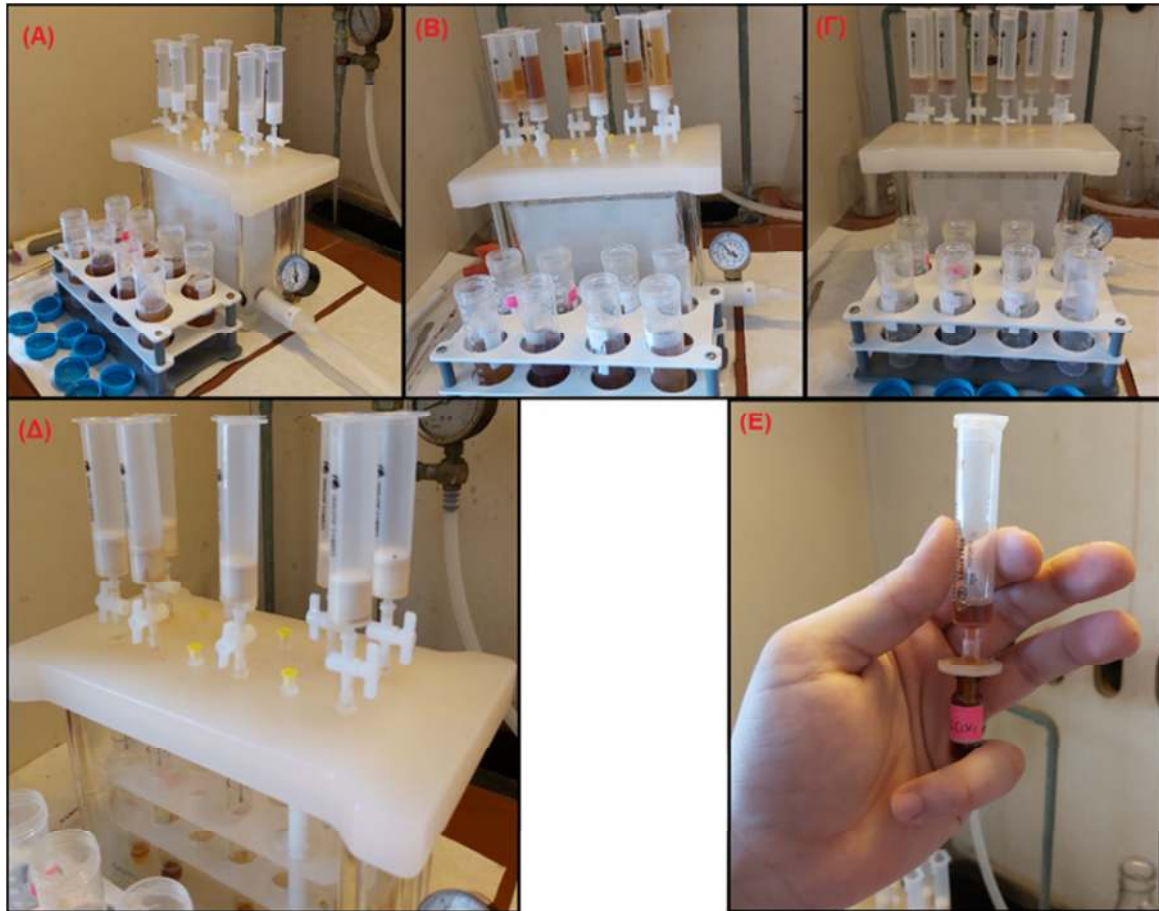
Τοποθετούμε το δείγμα μας. Ακολουθεί εκχύλιση με διαλύτες διαφορετικής πολικότητας με στόχο την κλασματοποίηση. Περάστηκε το δείγμα και στην συνέχεια η στήλη ξεπλύθηκε με 12 mL οξινισμένου νερού με σκοπό να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και άλλα πολικά συστατικά.

- Παραλαβή ενώσεων στόχων από την στήλη SPE:

Τα φαινολικά συστατικά παρελήφθησαν με 1,5 mL ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα των φαινολικών καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα (PTFE) 0,45 μm. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C μέχρι να αναλυθούν.



Εικόνα 34. Γραφική αναπαράσταση διαδικασίας SPE.



Εικόνα 35. Τεχνική SPE παραλαβής φαινολικών από μέλι ερείκης εργαστηριακά. Α: Ενεργοποίηση στήλης SPE. Β: Προσθήκη δείγματος στο στηλάκι. Γ: Έκπλυση δείγματος από το στηλάκι. Δ: Παραλαβή φαινολικών. Ε: Καθαρισμός φαινολικών με φίλτρο.

Γ.4.1.2. Ανάλυση Φαινολικών από μέλι ερείκης με LC/Q-TOF MS

Η ανάλυση των φαινολικών που απομονώθηκαν με SPE πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός συστήματος LC/Q-TOF MS που αποτελείται από ένα σύστημα υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης HPLC συζευγμένο με φασματοόμετρο μαζών χρόνου πτήσης QTOF-MS της εταιρίας Agilent Series 1260 με αυτόματο δειγματολήπτη (Εικ. 36). Τα χαρακτηριστικά του συστήματος ήταν τα εξής:

- Στήλη αντίστροφης φάσης Supelco Discovery HS C18 με μήκος 150 mm, διάμετρο 4,5 mm και πάχος επένδυσης 5 μm.
- Σύστημα διαλυτών: Οξινομένο νερό με μυρμηκικό οξύ 0,1% LC-MS (διαλύτης Α) και ακετονιτρίλιο LC-MS (διαλύτης Β).

- Πρόγραμμα έκλυσης: Από 0 min., 10 % ο διαλύτης (B), από 20 min., 30 % ο διαλύτης (B), από 30 min., 40 % ο διαλύτης (B), από 40 min., 50 % ο διαλύτης (B), από 45 min., 10% ο διαλύτης (B), από 60 min., 10% ο διαλύτης (B).
- Όγκος ένεσης 5 μ L, ρυθμός ροής 1 mL/min
- Καταγραφή χρωματογραφημάτων στα 280, 320, 330, 360 και 520 nm.
- Το σύστημα QTOF-MS είναι εφοδιασμένο με πηγή ESI, σε λειτουργία αρνητικού ιονισμού. Η τριχοειδής τάση ήταν 3000 V, η πίεση εκνεφωτή 2 bar (N_2), το αέριο ξήρανσης με ταχύτητα ροής 8 L/min (N_2) και θερμοκρασία ξήρανσης 200 $^{\circ}C$.



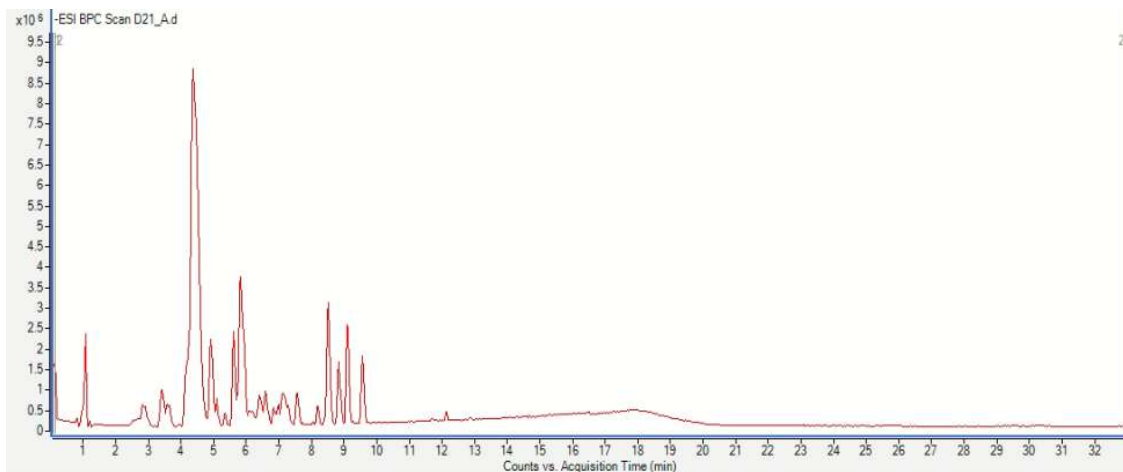
Εικόνα 36. Σύστημα HPLC/DAD/QTOF.

Γ.4.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

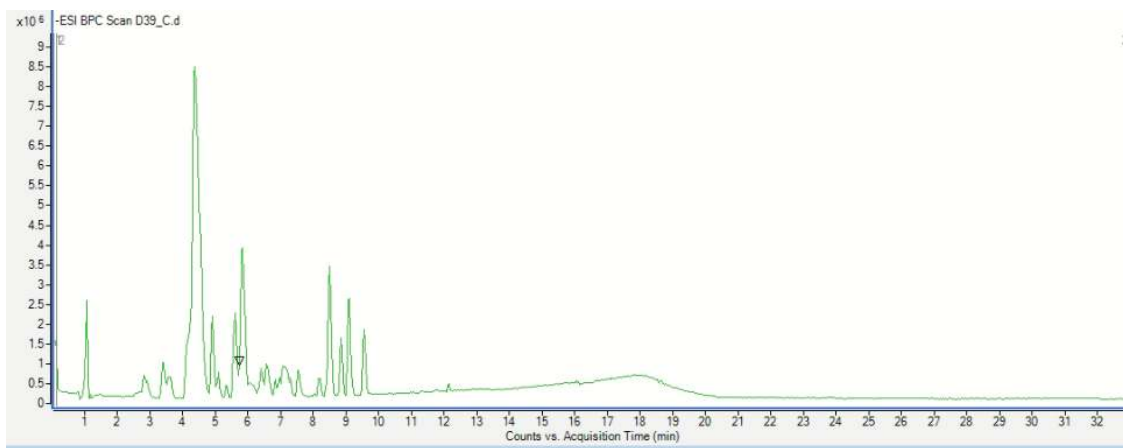
Συνολικά εντοπίστηκαν 26 φαινολικές ενώσεις στα πέντε δείγματα που μελετήθηκαν. Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα απομονωμένα φαινολικά συστατικά από τα δείγματα ερείκης. Στο παράρτημα 1 υπάρχουν τα φάσματα μαζών των ευρεθέντων φαινολικών ενώσεων. Τέλος, στις εικόνες 37 – 41 φαίνονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των δειγμάτων (8, 9, 11, 12, 13,) που μελετήθηκαν.

Πίνακας 14. Φαινολικά συστατικά μελιών ερείκης.

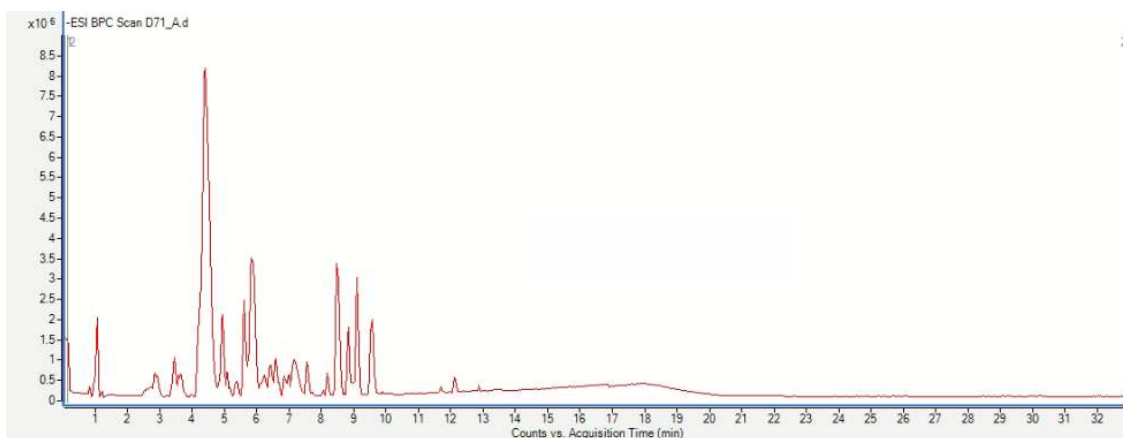
No.	Όνομασία φαινολικής ένωσης	Μοριακός τύπος	Χρόνος Εκπλοουσης (min)	Μοριακή μάζα g/mol	[M-H] ⁻ -m/z προτύπου	[M-H] ⁻ - m/z πειραματικό	Σφάλμα μάζας (ppm)	Αφθονία	Diff
1	απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	11.6	270.0528	269.0455	269.4532	0.72	112905.25	0.89
2	γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	1.5	170.0215	169.0142	169.1463	-3.42	6922.92	-3.26
3	βανιλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	4.0	168.0423	167.0350	167.3494	0.30	36368.87	-0.04
4	συρριγγικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	4.3	198.0528	197.0455	197.4612	-3.70	27958.58	-3.28
5	p-κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	5.6	164.0473	163.0400	163.3990	0.77	77919.09	1.08
6	καμφερόλη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	11.9	286.0477	285.0404	285.4240	0.10	28932.27	0.41
7	καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	4.0	180.0423	179.0350	179.3460	2.33	1783744.01	2.18
8	φερουλικό οξύ	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	6.1	194.0579	193.0506	193.5510	-5.18	9553.48	-4.87
9	λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	10.0	286.0477	285.0404	285.4400	-0.77	17554.17	-0.13
10	trans-κινναμωμικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₂	9.7	148.0524	147.0451	147.4490	1.51	9187.66	2.28
11	μυρικετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	8.0	318.0376	317.0303	317.2990	0.63	83138.85	0.75
12	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₃	3.4	138.0317	137.0244	137.2426	0.62	276530.15	1.05
13	αμπισικό οξύ	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	9.1	264.1362	263.1289	263.1284	1.79	588777.24	1.68
14	χρυσίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	15.0	254.0579	253.0506	253.5260	1.56	13014.93	1.50
15	ελαγικό οξύ	C ₁₄ H ₆ O ₈	6.2	302.0063	300.9990	3.9991	-0.41	20152.41	-0.42
16	γεντισικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	3.3	154.0266	153.0193	153.1932	-0.33	29391.32	0.02
17	εσπερετίνη	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	11.8	302.0790	301.0717	31.7176	-0.09	142828.31	0.12
18	ομογεντισικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄	1.8	168.0423	167.0350	167.3486	1.86	15645.21	1.11
19	ισορχαμνετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	12.3	316.0583	315.0510	315.5380	2.18	105522.14	2.24
20	συριγγικό μεθυλεστέρας	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	8.0	212,0685	211.0612	211.6106	0.82	558721.93	0.82
21	ναριγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	11.3	272.0685	271.0612	271.6720	1.10	122075.18	1.09
22	φλωρογλυκινόλη	C ₆ H ₆ O ₃	1.5	126.0317	125.0244	125.2427	0.93	5893.03	1.35
23	πινοσεμπρίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	15.2	256.0736	255.0663	255.6590	1.69	51416.29	1.54
24	πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄	2.4	154.026	153.0187	153.1924	-3.98	37099.28	0.20
25	ροσμαρινικό οξύ	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	7.6	360.0845	359.0772	359.7773	-1.41	37457.99	-1.29
26	σιναπικό οξύ	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	6.3	224.0685	223.0612	223.6153	-1.47	12808.83	-1.62



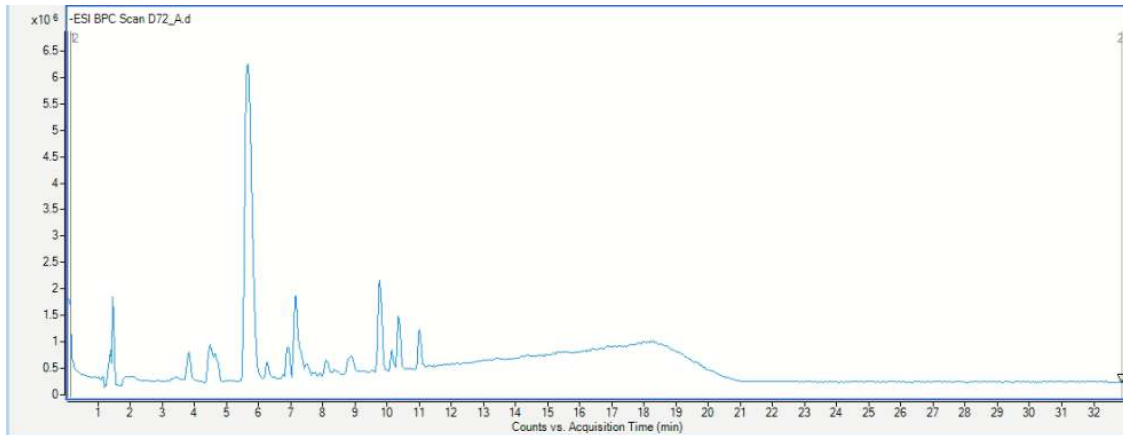
Εικόνα 37. Χρωματογράφημα δείγματος ερείκης 11.



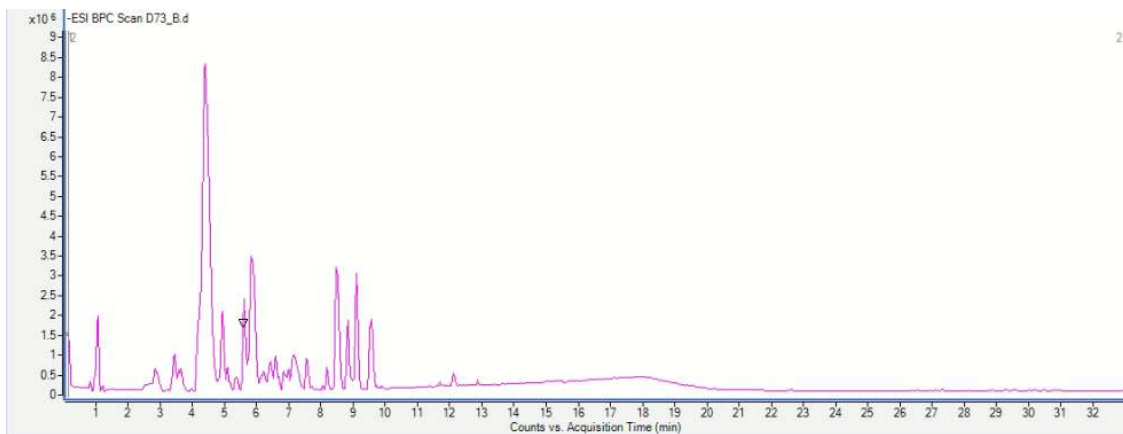
Εικόνα 38. Χρωματογράφημα δείγματος ερείκης 12.



Εικόνα 39. Χρωματογράφημα δείγματος ερείκης 13.



Εικόνα 40. Χρωματογράφημα δείγματος ερείκης 9.



Εικόνα 41. Χρωματογράφημα δείγματος ερείκης 8.

Η βοτανική προέλευση του μελιού είναι μια από τις κύριες ποιοτικές παραμέτρους του και η τιμή του σχετίζεται πολύ συχνά με την ανθική προέλευση. Ορισμένα μονοανθικά μέλια εκτιμώνται περισσότερο από άλλα είτε λόγω της γεύσης και των αρωμάτων τους, είτε λόγω των φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων και αυτά κοστίζουν γενικά πιο ακριβά από τα πολυανθικά μέλια (Ferrerres et al., 1996). Τα συστατικά του μελιού με αντιοξειδωτική δράση είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, το ασκορβικό οξύ, η καταλάση, η υπεροξειδάση, τα καροτενοειδή και τα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard (Gheldof & Engeseth, 2002). Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή έχουν διερευνηθεί εκτενώς στο μέλι (Dimitrova et al., 2007; Ferreira et al., 2009; Kečkeš et al.,

2013; Khalil et al., 2011; Pyrzynska and Biesaga, 2009) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της ποιότητας του μελιού.

Η προετοιμασία του δείγματος είναι μια βασική διαδικασία στη σύγχρονη χημική ανάλυση. Η εκχύλιση στερεάς φάσης με στηλάκια μίας χρήσης που διατίθενται στο εμπόριο, παρέχει τον απλούστερο και αποτελεσματικότερο τρόπο διαχωρισμού φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών από ανεπιθύμητα συστατικά της μήτρας του μελιού, δηλαδή κυρίως σάκχαρα και άλλες πολικές ενώσεις, και αυξάνει τη προσυγκέντρωσή τους στην οργανική φάση (Bertoncelj et al., 2011; Michalkiewicz et al., 2008; Pulcini et al., 2006).

Η πολυπλοκότητα της μήτρας του μελιού και του φαινολικού κλάσματος απαιτεί την αντικατάσταση των συμβατικών μη ειδικών μεθόδων με άλλες που παρουσιάζουν υψηλότερη εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Η HPLC σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών προσφέρει μια ισχυρή αναλυτική εναλλακτική λύση. Η φασματομετρία μαζών είναι μια μέθοδος υψηλής ευαισθησίας και έχει τα πλεονεκτήματα της παροχής ακριβών δομικών πληροφοριών για τις φαινολικές ενώσεις. Επιπλέον, η χρήση φασματομετρίας μαζών τετραπολικού χρόνου πτήσης (QTOF) επιτρέπει την ακριβή μέτρηση μάζας τόσο των ιόντων MS όσο και των MS/MS, η οποία είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύνθεσης και, επομένως, για τον χαρακτηρισμό των μικρών μορίων (Cádiz-Gurrea et al., 2014).

Σύμφωνα με την ερευνητική μελέτη των Andrade, P., Ferreres, F. & Amaral, M. T. το 1997, το μέλι *Erica* sp. χαρακτηρίζεται από την παρουσία p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, συριγγικού οξέος, ο-κουμαρικού οξέος και ελαγικού οξέος. Η παρουσία ελαγικού οξέος (διμερές παράγωγο του γαλλικού οξέος) στο μέλι *Erica* sp. συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές στις οποίες αυτό το φαινολικό οξύ προτάθηκε ως δείκτης για την βοτανική του προέλευση. Φαίνεται ότι η συγκέντρωση ενός μεμονωμένου φαινολικού οξέος θα μπορούσε να σχετίζεται με την βοτανική προέλευση του μελιού. Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εν λόγω έρευνας το μέλι *Erica* sp. περιέχει σημαντική συγκέντρωση (περίπου 39%, μονάδες;) p-κουμαρικού οξέος (Andrade et al., 1997). Λίγο νωρίτερα, περίπου η ίδια ερευνητική ομάδα σε άλλη δημοσίευση συμπέρανε ότι ο 3-μεθυλαιθέρας μυρικετίνης και το ελαγικό οξύ είναι οι πιο ενδιαφέροντες μεταβολίτες που σχετίζονται με τη βοτανική προέλευση του μελιού ερείκης, , αφού δεν έχουν ανιχνευθεί στην

πλειονότητα δειγμάτων μονοανθικών μελιών που είχαν αναλυθεί μέχρι τότε (δεντρολίβανο, ηλιάνθος, εσπεριδοειδή, λεβάντα, ευκάλυπτος, αμύγδαλο, καστανιά, ακακία, θυμάρι, βιασμός, έλατο, σκλήθρα, ροδόδενδρο, φιλύρακ.λπ.) και φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενοι δείκτες που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες στον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού ερείκης (Ferrerres, F., Andrade, P., Gil, M. I. & Tomás-Barberán, F. A., 1996). Άλλη μια ακόμα μελέτη κατέληξε ότι το αμψισικό οξύ θα μπορούσε να είναι ένας χρήσιμος δείκτης για την βοτανική προέλευση του μελιού ερείκης (Ferrerres, F., Andrade, P. and Tomás-Barberán, F. A., 1996). Τέλος αξίζει να αναφερθεί μία ακόμα επιστημονική μελέτη, στην οποία αναλύθηκαν τα φλαβονοειδή που υπάρχουν σε επιλεγμένα δείγματα μελιού ερείκης από την περιοχή Κοΐμπρα της Πορτογαλίας (Ferrerres, F., Andrade, P. and Tomás-Barberán, F. A., 1994). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα είχαν παρόμοιο προφίλ φλαβονοειδών, αποτελούμενο από τουλάχιστον 22 ενώσεις. Οι πιο χαρακτηριστικές ουσίες ήταν η μυρικετίνη, ο 3'-μεθυλαιθέρας της μυρικετίνης, ο 3-μεθυλαιθέρας της μυρικετίνης και η τρικετίνη. Είναι επίσης σημαντικό, ότι τα τέσσερα φλαβονοειδή που φαίνεται να είναι χαρακτηριστικά του μελιού ερείκης δείχνουν να έχουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό, έναν τριοξυγονωμένο δακτύλιο Β (3', 4', 5'- τριοξυγόνωση), αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό που δεν βρίσκεται σε φλαβονοειδή που ανιχνεύθηκαν σε οποιοδήποτε άλλο δείγμα μελιού διαφορετικής βοτανικής προέλευσης που είχε αναλυθεί μέχρι τότε, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι ουσίες θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τη βοτανική προέλευση του μελιού ερείκης.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα, εάν εξαιρεθεί το δείγμα 9, τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν μια ομοιομορφία (Εικ. 37 – 41). Η ένωση που εμφανίστηκε με διαφορά σε αφθονία, σε όλα τα δείγματα ήταν το καφεϊκό οξύ, ένα φαινολικό οξύ που ανήκει στα υποκατεστημένα κινναμωμικά οξέα (Πιν. 14).

Γ.5 Φασματοσκοπική μελέτη του χημειότυπου μελιού ερείκης με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR

Γ.5.1 Πειραματική πορεία

Η καταγραφή των φασμάτων FT-IR πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο IROS 05 της εταιρίας Ostec και ο υποδοχέας του δείγματος ήταν πρίσμα διαμαντιού (Εικ. 42). Συνολικά μελετήθηκαν 13 δείγματα μελιού ερείκης και καταγράφηκαν φάσματα τριών δειγματοληψιών από κάθε δείγμα. Πριν από κάθε λήψη φάσματος, καταγραφόταν το φάσμα υποβάθρου (background) με κενό τον υποδοχέα του δείγματος με το πρίσμα διαμαντιού.

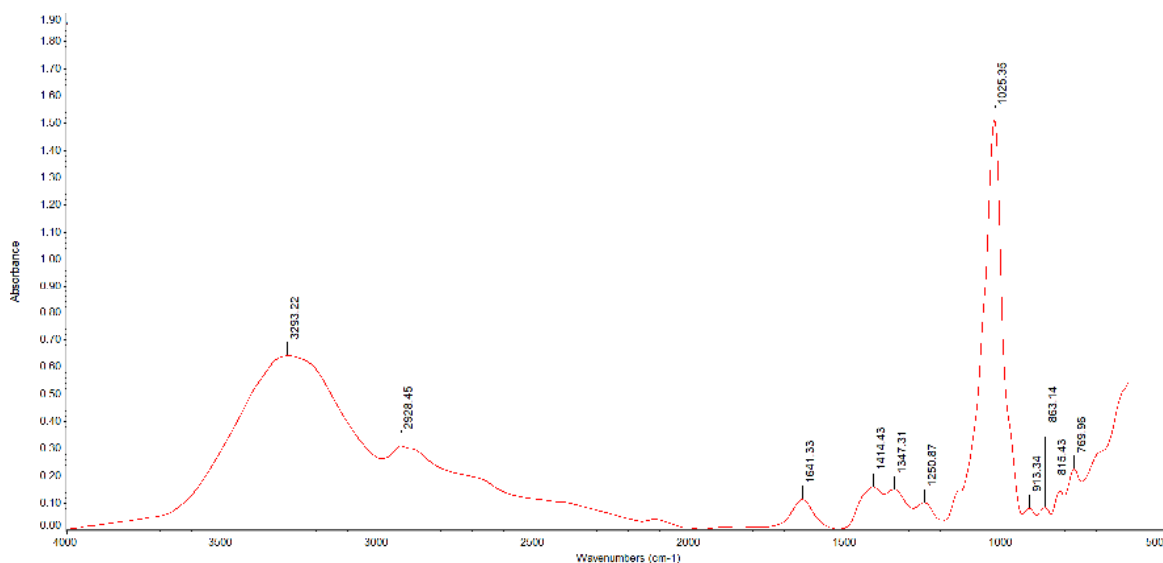
Η επεξεργασία των φασμάτων που λήφθηκαν πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα IROS που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο. Πιο συγκεκριμένα, από τα φάσματα FT-IR αφαιρέθηκε η κορυφή του διοξειδίου του άνθρακα, εξομαλύνθηκε το φάσμα με διεργασία αυτόματης εξομάλυνσης (automatic smooth), διορθώθηκε η βασική γραμμή με διεργασία αυτόματης διόρθωσης (automatic baseline correct) και τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος των φασμάτων που λήφθηκαν για κάθε δείγμα.



Εικόνα 42. Το φασματοφωτόμετρο FT-IR Ostec IROS 05 που χρησιμοποιήθηκε και ο υποδοχέας του δείγματος.

Γ.5.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Παρατηρώντας τους μέσους όρους των επεξεργασμένων φασμάτων των δεκατριών δειγμάτων μελιού ερείκης που μελετήθηκαν, φαίνεται ότι τα φάσματα παρουσιάζουν παρόμοια υφή με μικρές διαφορές στο εύρος και ένταση των κορυφών. Όλα τα φάσματα βρίσκονται στο Παράρτημα 2, ενώ αντιπροσωπευτικό φάσμα εικονίζεται στην Εικόνα 43.



Εικόνα 43. Αντιπροσωπευτικό φάσμα FT-IR μελιού ερείκης.

Η περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων των φασμάτων FT-IR βρίσκεται μεταξύ 4000 και 1500 cm^{-1} . Οι παρατηρούμενες κορυφές αποδίδονται στις λειτουργικές ομάδες των χημικών ενώσεων. Η κορυφή στα 769 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση του δακτυλίου της φρουκτόζης, ενώ η κορυφή στα 815 cm^{-1} στην δόνηση της φρουκτόζης C-C-H. Στη συνέχεια, η κορυφή που ακολουθεί στα 863 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση της β-φρουκτόζης C-C. Ακολουθεί, στα 913 cm^{-1} η κορυφή που αποδόθηκε στη δόνηση C-H της γλυκόζης και των σακχάρων γενικότερα (Svečnjak et al., 2017).

Στα 1025 cm^{-1} παρατηρείται κορυφή με μεγάλη ένταση και σχετικά μικρό εύρος, η οποία αποδίδεται στη δόνηση C-O του σκελετού των σακχάρων, της φρουκτόζης και του C-OH (Anjos et al. 2018). Η κορυφή στα 1250 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση του -CH₂ της γλυκόζης, στη δόνηση του δακτυλίου της φρουκτόζης και στη δόνηση C-C του σκελετού των σακχάρων (Svečnjak et al., 2017; Anjos et al. 2018). Επιπλέον, η κορυφή

στα 1347 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση του -OH της γλυκόζης, ενώ η κορυφή στα 1414 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση του C-O-H της φρουκτόζης (Svečnjak et al., 2017), στη δόνηση -CH₂ και στη δόνηση C-H των αλκενίων (Anjos et al. 2018).

Η κορυφή στα 1641 cm^{-1} όπως και η πλατιά με μεγάλο εύρος κορυφή στα 3293 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στις δονήσεις O-H του νερού. Τέλος, η κορυφή στα 2928 cm^{-1} αποδόθηκε στην δόνηση του C-H των καρβοξυλικών οξέων και στην δόνηση του -NH₂ των ελευθέρων αμινοξέων (Anjos et al. 2018).

Στον Πίνακα 14 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις των κορυφών που δόθηκαν.

Πίνακας 15. Οι βασικές κορυφές ενδεικτικού φάσματος FT-IR δείγματος μελιού ερείκης.

Κοματαριθμοί cm^{-1}	Λειτουργική ομάδα	Αποδόσεις
~3293	O-H	Νερό
~2928	C-H, -NH ₂	Καρβοξυλικά οξέα, ελεύθερα αμινοξέα
~1641	O-H	Νερό
~1414	C-O-H, -CH ₂ , C-H	Φρουκτόζη, αλκένια
~1347	-OH	Γλυκόζη
~1250	-CH ₂ , C-C	Γλυκόζη, δακτυλίου της φρουκτόζης, σκελετού των σακχάρων
~1025	C-O	Σάκχαρα, φρουκτόζη,
~913	C-H	Γλυκόζη, σάκχαρα
~863	C-C	β- φρουκτόζη
~815	C-C-H	Φρουκτόζη
~769	C-C-H	Δακτύλιος της φρουκτόζης

Γ.6 Φασματοσκοπική μελέτη του χημικού προφίλ μελιού ερείκης με χρήση της φασματοσκοπίας Raman

Γ.6.1 Πειραματική πορεία

Η καταγραφή των φασμάτων Raman πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο Vis-Raman της εταιρίας DeltaNu (Εικ. 44). Μελετήθηκαν τα ίδια 13 δείγματα μελιού ερείκης που χρησιμοποιήθηκαν στην φασματοσκοπική μελέτη FT-IR.

Αρχικά, λήφθηκαν μικρές ποσότητες από κάθε δείγμα και αφού παρέμειναν σε υδατόλουτρο για 20 min στους 55 °C ώστε να αποκρυσταλλωθούν τα σάκχαρα, μέρος τους τοποθετήθηκε σε γυάλινο σωληνίσκο Widmad WG-SM τύπου NMR 4,97 mm και πάχος τοιχώματος 0,38 mm. Στη συνέχεια, καταγράφηκαν για κάθε δείγμα 9 φάσματα, με την πηγή του οργάνου να εκπέμπει στα 768 nm. Τέλος, η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα OMNIC 9.1. Πιο συγκεκριμένα έγινε εξομάλυνση (automatic smooth), διόρθωση της βασικής γραμμής (automatic baseline correct) και λήφθηκε ο μέσος όρος των φασμάτων που καταγράφηκε για κάθε δείγμα.

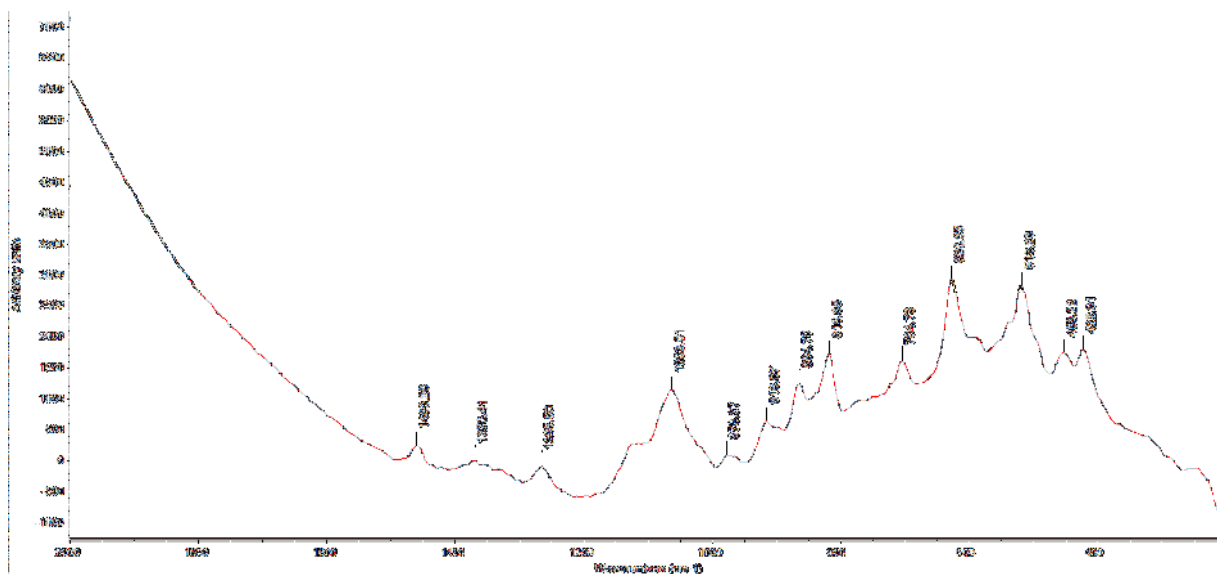


Εικόνα 44. Το φασματοφωτόμετρο Raman.

Γ.6.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Τα φάσματα Raman που καταγράφηκαν παρουσίασαν ομοιότητες ως προς τις κορυφές μεταξύ των δειγμάτων. Ενδεικτικά παρουσιάζεται στην Εικόνα 45 αντιπροσωπευτικό φάσμα, ενώ τα φάσματα των υπόλοιπων δειγμάτων βρίσκονται στο Παράρτημα 3. Μελετώντας την κύρια και σημαντικότερη περιοχή του φάσματος, μπορούμε να αναγνωρίσουμε και να αποδώσουμε τις κορυφές στις αντίστοιχες χαρακτηριστικές ομάδες και τα σάκχαρα, τα οποία εκπέμπουν μεταξύ 1600 – 400 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα, με τη μελέτη του φάσματος και σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφία δόθηκαν πληροφορίες για τον σκελετό των μορίων.

Επομένως, η κορυφή που εμφανίζεται στα 422 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση κάμψης των C-C-O και C-C-C των σκελετών της φρουκτόζης και της γλυκόζης. Η κορυφή που ακολουθεί στα 453 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση τάσης του σκελετού των σακχάρων (Oroian et al., 2018).



Εικόνα 45. Ενδεικτικό φάσμα Raman μελιού ερείκης.

Η κορυφή που ακολουθεί στα 518 cm^{-1} αποδίδεται στη παραμόρφωση των C-C-O και C-C-C λόγω της δόνησης κάμψης του σκελετού της φρουκτόζης και της γλυκόζης (Tahir et al., 2017; Batsoulis et al., 2005). Στα 626 cm^{-1} η κορυφή μπορεί να αποδοθεί στη παραμόρφωση του δακτυλίου της φρουκτόζης (Goodacre et al., 2002; Anjos et al., 2015; Frausto-Reyes et al., 2017). Στα 704 cm^{-1} η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης των C-O και C-C-O και στη δόνηση κάμψης του O-C-O (Tahir et al., 2017; Oroian et al., 2018).

Στη συνέχεια, η κορυφή στα 818 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση τάσης του C-H (Corbett et al., 1991). Ακολουθεί η κορυφή στα 864 cm^{-1} , με αυτή να αποδίδεται στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης των C-H, C-H-O και $-\text{CH}_2$ (Oroian et al., 2018). Έπειτα, η κορυφή στα 916 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση κάμψης των C-H και C-O-H (Tahir et al., 2017; Oroian et al., 2018). Στα 978 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε στην κάμψη C-C-H της φρουκτόζης (Jandrić et al. 2015).

Η εκπομπή στα 1063 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης του C-O των σακχάρων (Oroian et al., 2018). Ακολούθως, στα 1265 cm^{-1} η κορυφή αποδόθηκε στη δόνηση τάσης του C-OH των πρωτεϊνών και του αμιδίου (III). Ακόμα, η κορυφή στα 1370 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση $-\text{CH}_2$ των σακχάρων, ενώ τέλος η κορυφή στα 1460 cm^{-1} στις

δονήσεις κάμψης του $-CH_2$ με τις δόνηση τάσης του COO^- (Oroian et al., 2018; Anjos et al. 2018).

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλες οι αποδόσεις που δόθηκαν.

Πίνακας 16. Οι αποδόσεις των βασικών κορυφών αντιπροσωπευτικού φάσματος Raman μελιού ερείκης.

Κυματαριθμοί cm^{-1}	Λειτουργική ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος δόνησης
~1460	$-CH_2$ και COO^-	Οργανικά οξέα	Τάση και Κάμψη
~1370	$-CH_2$	Σάκχαρα	Τάση
~1265	C-OH	πρωτεΐνες και αμίδιο (III)	Τάση
~1063	C-O	Σάκχαρα	Τάση
~978	C-C-H	Φρουκτόζη	Κάμψη
~916	C-H και C-O-H	Σάκχαρα	Κάμψη
~864	C-H, C-H-O και $-CH_2$	Σάκχαρα	Τάση
~818	C-H	Σάκχαρα	Τάση
~704	C-O, C-C-O και O-C-O	Σάκχαρα	Κάμψη
~626	Σκελετός	Σάκχαρα	Τάση
~518	C-C-O και C-C-C	Φρουκτόζη και γλυκόζη	Κάμψη
~453	Σκελετός	Σάκχαρα	Τάση
~422	C-C-O και C-C-C	Φρουκτόζη και γλυκόζη	Κάμψη

Συμπεράσματα

Στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η χημική σύσταση του ελληνικού μελιού ερείκης, συλλεγμένο από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδος.

Η μελέτη της βελτιστοποίησης της παραλαβής των κύριων πτητικών συστατικών σε συνεργασία με τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, απέδωσε τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση στην παραλαβή του κύριου πτητικού κλάσματος. Αυτές ήταν: η θερμοκρασία στους 60 °C, ο χρόνος εξισορρόπησης στα 30 min, ο χρόνος εκχύλισης στα 15 min, η ταχύτητα του μαγνητικού αναδευτήρα στα 100 rpm, ο όγκος δείγματος προς εκχύλιση στα 6 mL και η αναλογία νερό:μέλι η 1:3 v/m.

Ακολούθως, οι παραπάνω τιμές χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή των πτητικών ενώσεων με την ίδια μέθοδο από 25 δείγματα μελιού ερείκης από διαφορετικές περιοχές της ελληνικής επικράτειας. Από τα κύρια πτητικά συστατικά, η βενζαλδεΰδη, η 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη) και η 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη) ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα και πιθανόν να αποτελούν δείκτες βοτανικής προέλευσης του ελληνικού φθινοπωρινού μελιού ερείκης *Erica manipuliflora* L. . Τα υπόλοιπα συστατικά που επιλέχθηκαν ως κύρια και μελετήθηκαν εμφανίστηκαν στα περισσότερα δείγματα αλλά όχι σε όλα.

Έπειτα, με την παραλαβή των φαινολικών συστατικών πέντε τυχαίων δειγμάτων μελιού ερείκης με SPE και με τη μελέτη της χημικής τους σύστασης με LC/Q-TOF MS, εντοπίστηκαν 26 φαινολικές ενώσεις. Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ένωση που εμφανίστηκε με διαφορά σε αφθονία σε όλα τα δείγματα ήταν το καφεϊκό οξύ, ένα φαινολικό οξύ που ανήκει στα υποκατεστημένα κινναμωμικά οξέα. Επομένως θα μπορούσε να αποτελέσει χημικό δείκτη για την αναγνώριση του ελληνικού φθινοπωρινού μελιού ερείκης καθώς σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν αναφέρεται ως δείκτης σε άλλα μέλια ερείκης ανά τον κόσμο. Η παρουσία των p-υδροξυβενζοϊκού οξέος, συριγγικού οξέος, ελαγικού οξέος, p-κουμαρικού οξέος, αμπισικού οξέος και μυρικετίνης στα δείγματά μας επιβεβαιώθηκε από τη βιβλιογραφία ότι οι ενώσεις αυτές ίσως αποτελούν χημικούς δείκτες για το μέλι ερείκης.

Τέλος, 13 δείγματα μελιού ερείκης μελετήθηκαν με φασματοσκοπία FT-IR και Raman. Παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα που καταγράφηκαν παρουσίαζαν ομοιότητες μεταξύ τους με ελάχιστες διαφορές στο εύρος και την ένταση των κορυφών απορρόφησης και εκπομπής αντίστοιχα. Οι πληροφορίες που δόθηκαν από τα φάσματα αφορούσαν τις χαρακτηριστικές ομάδες αλλά και δομικές πληροφορίες για τον σκελετό των μορίων που αποτελείται το μέλι ερείκης. Συμπερασματικά, το μέλι ερείκης αποτελείται από νερό, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και φαινολικά συστατικά.

Συνοψίζοντας, τα ελληνικά φθινοπωρινά μέλια ερείκης *Erica manipuliflora* L. δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς και η παρούσα μελέτη θα μπορούσε να συμβάλλει ουσιαστικά στην ενίσχυση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας με σκοπό την ανάδειξη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών μιας ποικιλίας με εμπορικό ενδιαφέρον. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναυσμα για περαιτέρω έρευνα καθώς γεννήθηκαν κάποια ουσιώδη ερωτήματα:

- Η βελτιστοποίηση πρότεινε ορισμένες τιμές για τη βέλτιστη παραλαβή των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν. Θα μπορούσε να επιτευχθεί η βέλτιστη παραλαβή αυτών αλλά με γνώμονα το περιβαλλοντικό αποτύπωμα; Παραδείγματος χάριν, να μειωθεί η θερμοκρασία των 60 °C, ο χρόνος εξισορρόπησης - εκχύλισης ή και ακόμη η ποσότητα μελιού που χρησιμοποιείται;
- Θα μπορούσαν οι πτητικές ενώσεις, που απομονώθηκαν από το άρωμα του μελιού ερείκης και βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα, βενζαλδεϋδη, 3,5,5-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-όνη (α-ισοφορόνη) και 2,6,6-τριμεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1,4-διόνη (4-οξοϊσοφορόνη) να αποτελέσουν δείκτες βοτανικής προέλευσης του ελληνικού φθινοπωρινού μελιού ερείκης;
- Θα μπορούσε η φαινολική ένωση καφεϊκό οξύ να αποτελέσει χημικό δείκτη για την αναγνώριση του ελληνικού φθινοπωρινού μελιού ερείκης καθώς σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν αναφέρεται ως δείκτης σε άλλα μέλια ερείκης ανά τον κόσμο;
- Τα φάσματα FT-IR και Raman που καταγράφηκαν παρουσίαζαν ομοιότητες. Θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν γρήγορο τρόπο αναγνώρισης του ελληνικού φθινοπωρινού μελιού ερείκης;

Βιβλιογραφία

Andrade, P., Ferreres, F. & Amaral, M. T. (1997). Analysis of Honey Phenolic Acids by HPLC, Its Application to Honey Botanical Characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 20 (14), 2281-2288.

Anjos, O., Santos, A.J.A., Paixão, V., Estevinho, L.M. (2018). Physicochemical characterization of *Lavandula* spp. honey with FT-Raman spectroscopy. *Talanta*, 1;178, 43-48.

Anjos O, Campos MG, Ruiz PC, Antunes P. (2015). Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chem*, 15;169:218-23.

Antony J., "Design of Experiments for Engineers and Scientists", 2003, Elsevier Science & Technology Books.

Batsoulis AN, Siatis NG, Kimbaris AC, Alissandrakis EK, Pappas CS, Tarantilis PA, Harizanis PC, Polissiou MG. (2005). FT-Raman spectroscopic simultaneous determination of fructose and glucose in honey. *J Agric Food Chem.*, 26;53(2), 207-10.

Bertoncelj, J., Polak, T., Kropf, U., Korosec, M., Golob, T. (2011). LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 127, 296-302.

Bezerra M.A., Erthal, R., Santelli R.E., Oliveiraa E.P., Villar L.S and Escaleiraa L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965–977.

Blank, I., Fischer, K. -H. and Grosch, W. (1989). Intensive neutral odourants of linden honey. Differences from honeys of other botanical origin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189, 426±433.

Boi, M.; Llorens, J.A.; Cortés, L.; Lladó, G.; Llorens, L. Palynological and chemical volatile components of typically autumnal honeys of the western Mediterranean. *Grana* 2013, 52, 93–105, doi:10.1080/00173134.2012.744774.

Bouseta, A.; Collin, S.; Dufour, J.-P. (1992). Characteristic Aroma Profiles of Unifloral Honeys Obtained with a Dynamic Headspace GC-MS System. *J. Apic. Res.*, 31, 96–109.

Barth, M. O., 2004. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, 61 (3), p.342-350.

Cádiz-Gurrea, M.L., Lozano-Sanchez, J., Contreras-Gómez, M., Legeai-Mallet, L., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A. (2014). Isolation, comprehensive characterization and antioxidant activities of *Theobroma cacao* extract. *Journal of Functional Foods*, 10, 485-498.

- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 112 (4), 1022-1030.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C. & Pérez-Coello, M.S., (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys.. *Food Chemistry*, Issue 103, pp. 601-606.
- Corbett, E.C., Zichy, V., Goral, J., Passingham, C. (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. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, Volume 47, Issues 9–10, Pages 1399-1411
- Costa, A. CV., Garruti, D. S., Madruga, M. S. (2019). The power of odour volatiles from unifloral melipona honey evaluated by gas chromatography–olfactometry Osme techniques. Wiley Online Library, DOI 10.1002/jsfa.9647.
- Dimitrova, B., Gevrenova, R. & Anklam E. (2007). Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-pase extraction and high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 18, 24-32, 10.1002/pca.948
- de la Fuente, E.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J. Characterization of Spanish unifloral honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1093–1100, doi:10.1002/jssc.200500018.
- da Silva, P.M.; Gauche, C.; Gonzaga, L.V.; Costa, A.C.O.; Fett, R. (2016). Honey: Chemical Composition, Stability and Authenticity. *Food Chem.*, 196, 309–323.
- Ferreira, I.C.F.R., Aires, E., Barreira, J.C.M. & Estevinho L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443, 10.1016/j.foodchem.2008.11.028
- Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M. I. & Tomás-Barberán, F. A. (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 202, 40–44.
- Ferreres, F., Andrade, P. and Tomás-Barberán, F. A. (1996). Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Floral Nectar. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (8), 2053–2056.
- Ferreres, F., Andrade, P. and Tomás-Barberán, F. A. (1994). Flavonoids from Portuguese heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199, 32–37.
- Frausto-Reyes C, Casillas-Peñuelas R, Quintanar-Stephano JL, Macías-López E, Bujdud-Pérez JM, Medina-Ramírez I. (2017). Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 5;178:212-217.

- Gheldof, N. & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3050-3055.
- 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*, Vol. 56, Issue 4, pp. 521-527.
- Guyot, C.; Scheirman, V.; Collin, S. Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chem.* 1999, 64, 3–11, doi:10.1016/S0308-8146(98)00122-8.
- Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103,1228–1236.
- Guyot, C., Scheirman, V., Collin, S. (1999). Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*, 64, 3-11.
- Hanrahan G., Zhu J., Gibani S., Patil D.G., 2005. Experimental design. *Chemometrics and Statistics*, 8-13.
- Jandrić Z, Haughey SA, Frew RD, McComb K, Galvin-King P, Elliott CT, Cannavan A. (2015). Discrimination of honey of different floral origins by a combination of various chemical parameters. *Food Chem.*, 15;189, 52-9.
- John R. S., Draper, N. R., D-optimality for regression designs: a review. *Technometrics*, 1975, 17 (1) 15-23.
- Kečkeš, S., Gašić, U., Veličković, T.Ć., Milojković-Opsenica, D., Natić, M. & Tešić, Ž. (2013). The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138, 32-40.
- Khalil, M.I., Alam, N., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S.A. & Gan S.H. (2011). Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *Journal of Food Science*, 76, pp. C921-C928.
- Kuropatnicki, A. K., Kłósek, M. & Kucharzewski, M. (2018). Honey as medicine: historical perspectives. *Journal of Apicultural Research*, 57 (1), 113-118.
- Lunney P. D., Cogdill R. P., Drennen J. K., Innovation in pharmaceutical experimentation Part 1: review of experimental designs used in industrial pharmaceuticals research and introduction to Bayesian D-optimal experimental design, *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2008, 3 (3) 188-203.
- Machado, A.M.; Miguel, M.G.; Vilas-Boas, M.; Figueiredo, A.C. Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules* 2020, 25, 374.

- Manyi-Loh, C.E.; Ndip, R.N.; Clarke, A.M. (2011). Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 9514–9532.
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, 1187, 18-24.
- Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46 (2), 197-204.
- Oroian, M. & Ropciuc, S. (2018). Botanical authentication of honeys based on Raman spectra. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 545–554.
- Persano Oddo, L., Piana, L., Bogdanov, S., Bentabol, A., Gotsiou, P., Kerkvliete, J., Martinf, P., Morlot, M., Ortiz Valbuenah, A., Ruoffb K. and von der Ohe K. (2004). Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie*, 35(1), 82-S93.
- Persano Oddo, L. and Piro, L. with the collaboration of Bruneau, E., Guyot-Declerck, C., Ivanov, T., Piskulová, J., Flamini, C., Lheritier, J., Morlot, M., Russmann, H., Von der Ohe, W., Von der Ohe, K., Gotsiou, P., Karabournioti, S., Kefalas, P., Passaloglou-Katrali, M., Thrasyvoulou, A., Tsigouri, A., Luigi Marcazzan, G., Lucia Piana, M., Gioia Piazza, M., Gloria Sabatini, A., Kerkvliet, J., Godinho, J., Bentabol, A., Ortiz Valbuena, A., Bogdanov S., and Ruoff, K. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35(1) S38-S81.
- Pulcini, P., Allegrini, F., Festuccia, N. (2006). Fast SPE extraction and LC–ESI–MS–MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *Apiacta*, 4, 21-27.
- Pino, J. A. (2012). Analysis of odour-active compounds of black mangrove (*Avicennia germinans* L.) honey by solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–olfactometry. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1688–1694.
- Plutowska, B.; Chmiel, T.; Dymerski, T.; Wardencki, W. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. *Food Chem.* 2011, 126, 1288–1298, doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.079.
- Pyrzynska, K., Biesaga M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, 893-902.
- Radovic, B.S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72 (4), 511-52.
- Reeve, R.N. (2002), “Introduction to Environmental analysis”, John Wiley & Sons, Chichester.

Rodríguez-Flores, M.S.; Falcão, S.I.; Escuredo, O.; Seijo, M.C.; Vilas-Boas, M. (2021). Description of the volatile fraction of Erica honey from the northwest of the Iberian Peninsula. *Food Chem.*, 336, 127758.

Ruisinger, B., and Schieberle, P. (2012). Characterization of the Key Aroma Compounds in Rape Honey by Means of the Molecular Sensory Science Concept. *J. Agric. Food Chem.*, 60 (17), 4186–4194.

Seisonen, S., Kivima, E., Vene, K. (2015). Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry. *Food Chem.*, 169, 34–40.

Singh K.P., Rai P., Pandey P., Sinha S., 2012. Modeling and optimization of trihalomethanes formation potential of surface water (a drinking water source) using Box-Behnken design. *Environ Sci Pollut Res* 19, 113-127.

Soria, A.C.; Sanz, J.; Martínez-Castro, I. SPME followed by GC-MS: A powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. *Eur. Food Res. Technol.* 2009, 228, 579–590, doi:10.1007/s00217-008-0966-z.

Soria, A. C., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2009). SPME followed by GC–MS: A powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. *European Food Research and Technology*, 228(4), 579–590.

Stalikas C., Fiamegos Y., Sakkas V. and Albanis T., "Developments on Chemometric Approaches to Optimize and Evaluate Microextraction", *Journal of Chromatography A*, 1216 (2), 2009, 175-189.

Svečnjak L, Prđun S, Rogina J, Bubalo D, Jerković I. (2017). Characterization of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) nectar-to-honey transformation pathway using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chem*, 1;232, 286-294.

Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X., Wang, S., Mariod, A. A. (2017). Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, Pages 202-211.

Tan, S. T., Wilkins, A. L., Holland, P. T., & McGhie, T. K. (1989). Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1217–1221.

Tarley C.R.T., Silveira G., Lopes dos Santos W.N., Matos G.D., Paranhos da Silva E.G., Bezerra M.A., Miro M., Ferreira S.L.C., 2009. Review article: Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal* 92, 58-67.

Visser, F.R.; Allen, J.M.; Shaw, G.J. (1988). The Effect of Heat on the Volatile Flavour Fraction from a Unifloral Honey. *J. Apic. Res.*, 27, 175–181.

Xagoraris, M.; Revelou, P.K.; Dedegkika, S.; Kanakis, C.D.; Papadopoulos, G.K.; Pappas, C.S.; Tarantilis, P.A. SPME-GC-MS and FTIR-ATR spectroscopic study as a tool for unifloral common greek honeys' botanical origin identification. Appl. Sci. 2021, 11, 3159, doi:10.3390/app11073159.

Yang, Y., Battesti, M.-J., Paolini, J., Muselli, A., Tomi, P., Costa, J. (2012). Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican "Erica arborea spring maquis" honeys. Food Chemistry, 134 (1), 37-47.

Ελληνική βιβλιογραφία

Αλυσσανδράκης Ε., (2007). Μελισσοκομία. ΤΕΙ Κρήτης, Σχολή Τεχνολόγων Γεωπόνων, Ηράκλειο, Σελ.97.

Κοντόλαιμος, Ε. Ν. και Τατήρης, Β.(2014). Μελισσοκομία - Σηροτροφία. Αθήνα, Εκδόσεις ΔΙΟΦΑΝΤΟΣ.

Μπίκος,Θ., Jean-Prost, P. (2014). Μελισσοκομία. Αθήνα, Εκδόσεις Ψύχαλου, Επιμέλεια έκδοσης:

Σπύρου, Λ. Π. (1981). Τα φαρμακευτικά βότανα και οι θεραπευτικές τους ιδιότητες, , Αγροτικός εκδοτικός οίκος, Αθήνα, Β' τόμος, σελίδες: 460.

Αναφορές σε ιστότοπους

Hertzberg, 2019. Every bee in a hive has a job. Here's how they get them. <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/honey-bee-job-queen-hive-animals>

The Editors of Encyclopaedia Britannica. Bee. <https://www.britannica.com/animal/bee>

F.A.O. 2019 Honey. <http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA4657EN/>

United States Department of Agriculture. HONEY PRODUCTION. March 20, 2020. https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Montana/Publications/News_Releases/2020/MT-Honey-Production-03202020

Θρασυβούλου, Α., Μανίκης, Ι., Τανανάκη, Χ., Τσέλλιος, Δ., Καραμπουρνιώτη, Σ., Δήμου, Μ. (2002). Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού Α. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. 1ο Επιστημονικό Συνέδριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας Αθήνα, 29 Νοεμβρίου – 1 Δεκεμβρίου.

European Commission, (Spring 2021). Honey Market Presentation. <https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming->

[fisheries/animals_and_animal_products/documents/market-presentation-honey-spring2021_en.pdf](#)

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (Υπ.Α.Α.Τ), 2012. http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/MeliMelissokomia/Stoixeia_paragolis_tis_xoras1.pdf

ΕΛΣΤΑΤ, 2018. https://www.statistics.gr/el/statistics?p_p_id=com_liferay_portal_search_web_portlet_SearchPortlet_INSTANCE_3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_com_liferay_portal_search_web_portlet_SearchPortlet_INSTANCE_3_mvcPath=%2Fview_content.jsp&_com_liferay_portal_search_web_portlet_SearchPortlet_INSTANCE_3_assetEntryId=12044578&_com_liferay_portal_search_web_portlet_SearchPortlet_INSTANCE_3_type=document

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, ΕΚΔΟΣΗ 4 / Νοέμβριος 2016. Άρθρο 67-2. <https://www.aade.gr/sites/default/files/2020-03/67-iss4.pdf>

Ταυτοποίηση αμιγών ελληνικών μελιών πεύκου, ελάτης, καστανιάς, ερείκης, θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλίανθου. Αριθμ 127/2004 (ΦΕΚ 239/23.02.05). http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/MeliMelissokomia/KYA_Taytopoiisi.pdf

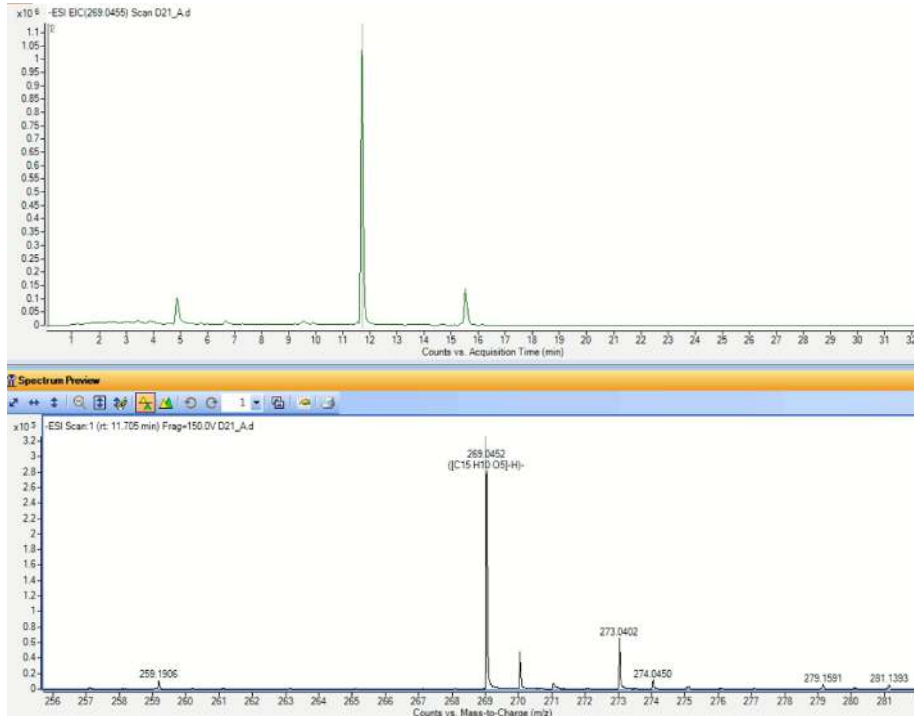
Codex Alimentarius. STANDARD FOR HONEY. CXS 12-1981¹. Adopted in 1981. Revised in 1987, 2001. Amended in 2019. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%252B12-1981%252FCXS_012e.pdf

Bradbear, N. (2009). Bees and their role in forest livelihoods, A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products, 9. DEFINITION AND USES OF HONEY. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Rome, pages 81-88. <http://www.fao.org/3/i0842e/i0842e00.pdf>

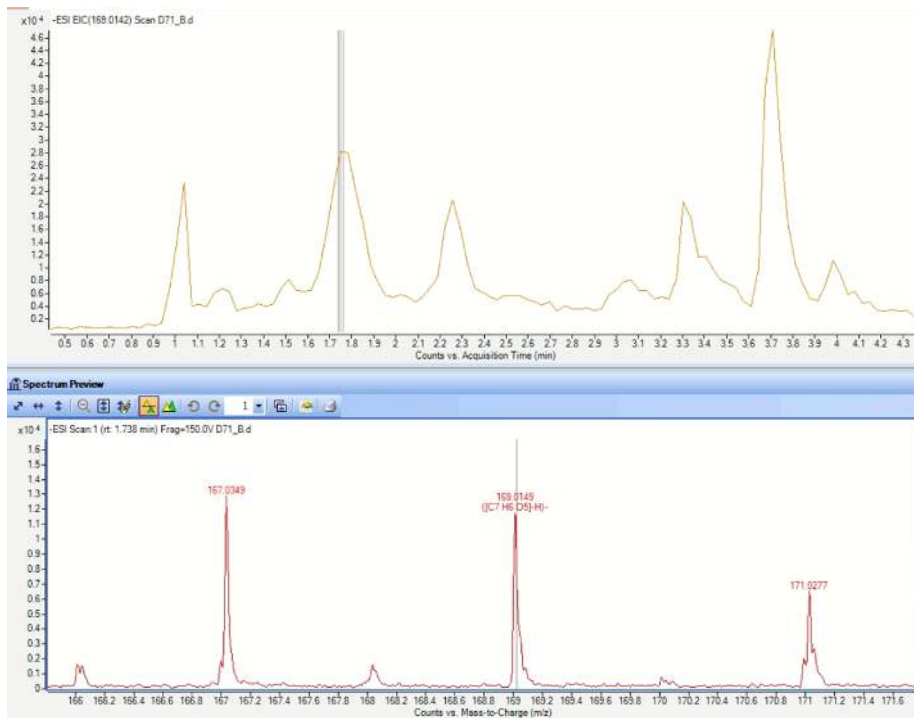
Coats, A. M., 1992. In favorable conditions, old plants can grow to the height of a man, and have hidden many a fugitive. *British Shrubs and Their Histories (1964)*, s.v. "Calluna".

Παράρτημα 1

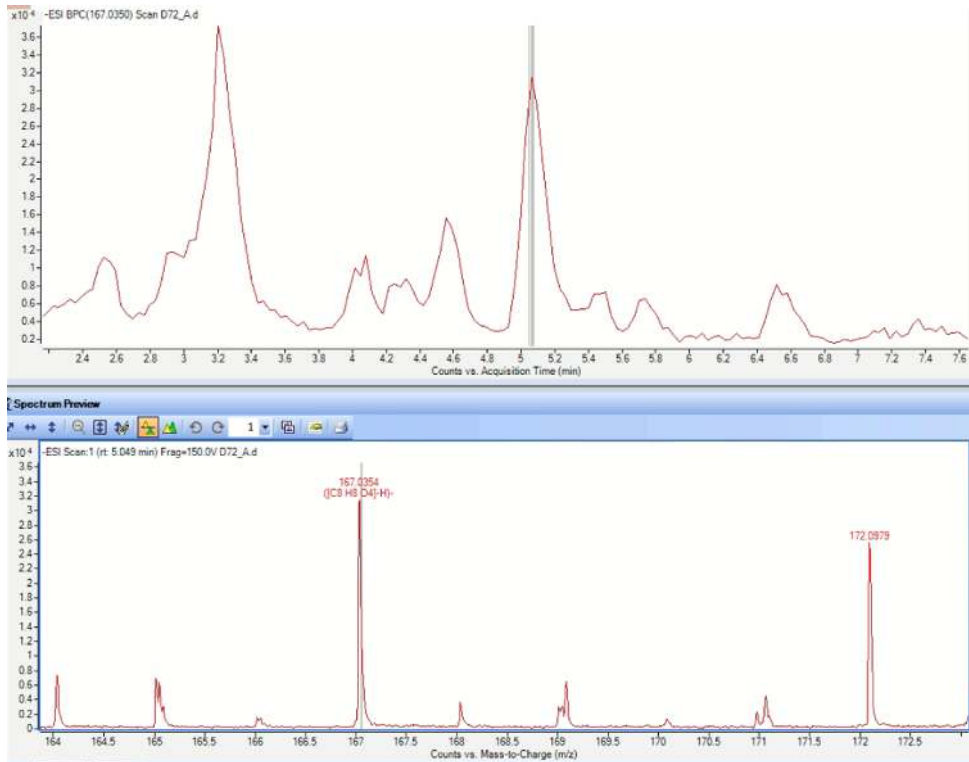
Απιγενίνη $C_{15}H_{10}O_5$



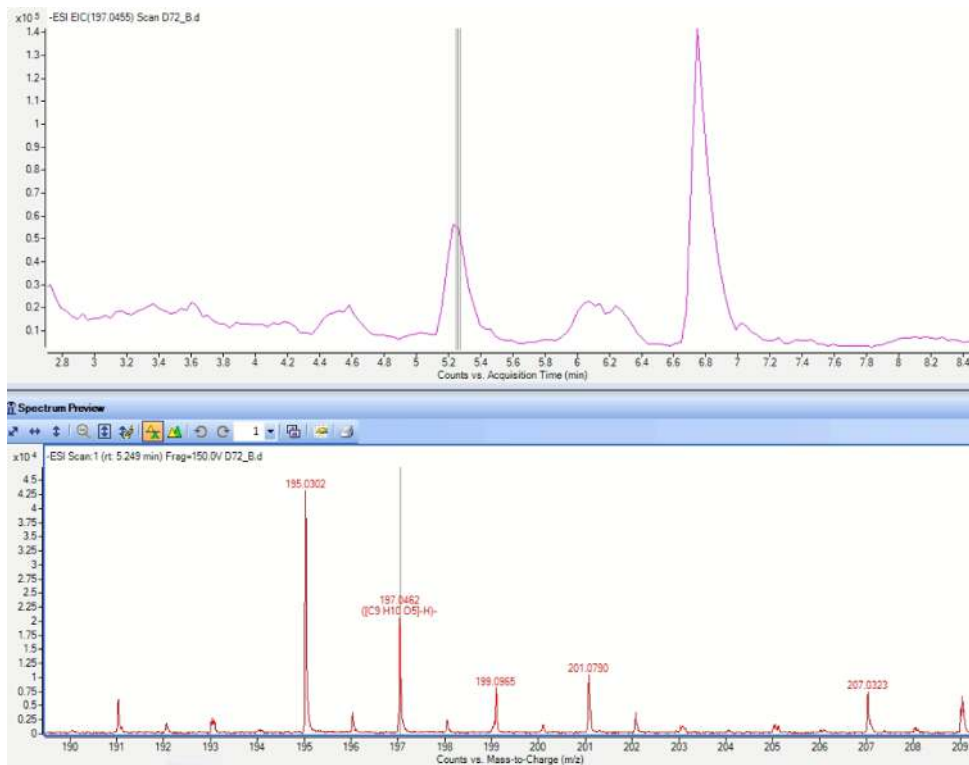
Γαλλικό οξύ $C_7H_6O_5$



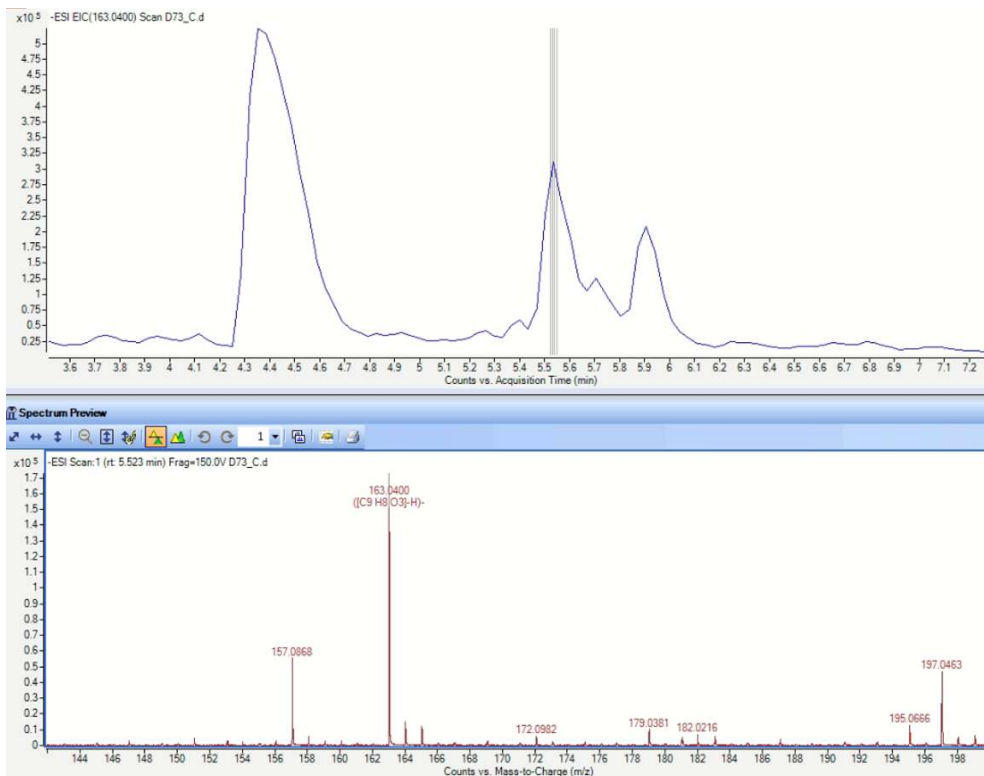
Βανιλικό οξύ $C_8H_8O_4$



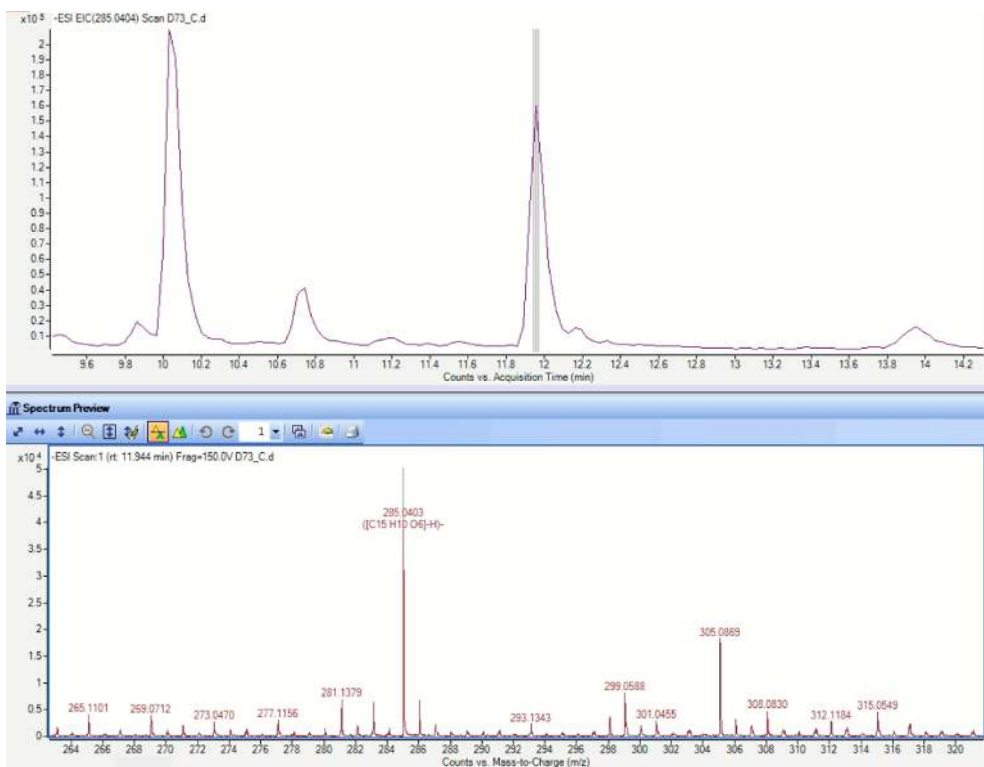
Συρριγγικό οξύ $C_9H_{10}O_5$



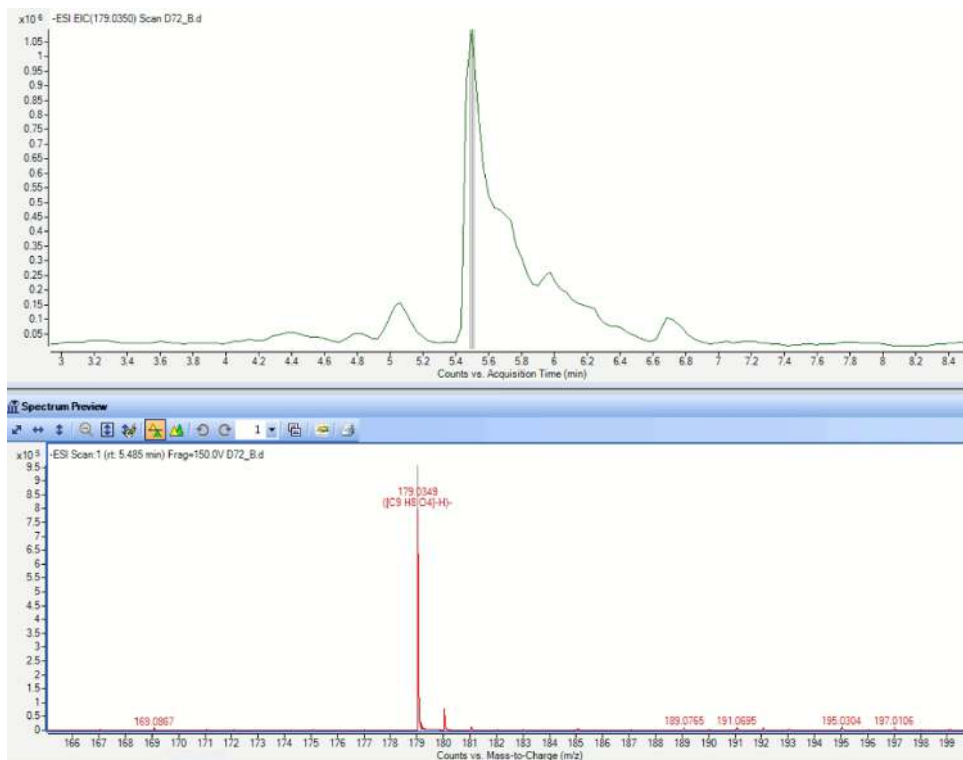
ρ-κουμαρικό οξύ $C_9H_8O_3$



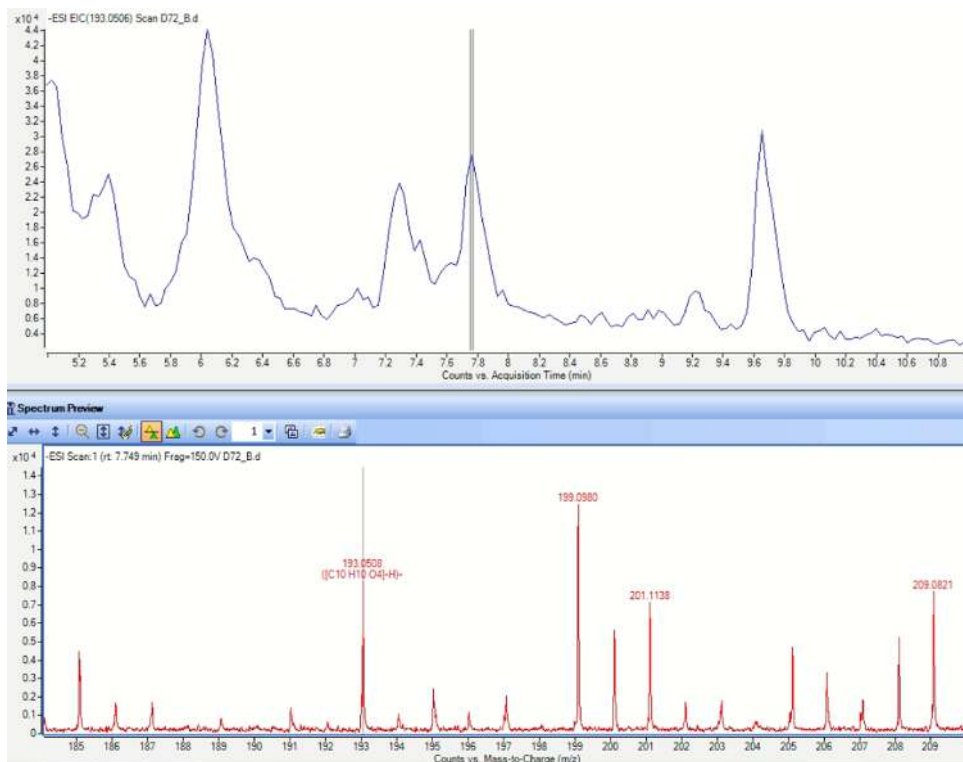
Καμφορόλη $C_{15}H_{10}O_6$



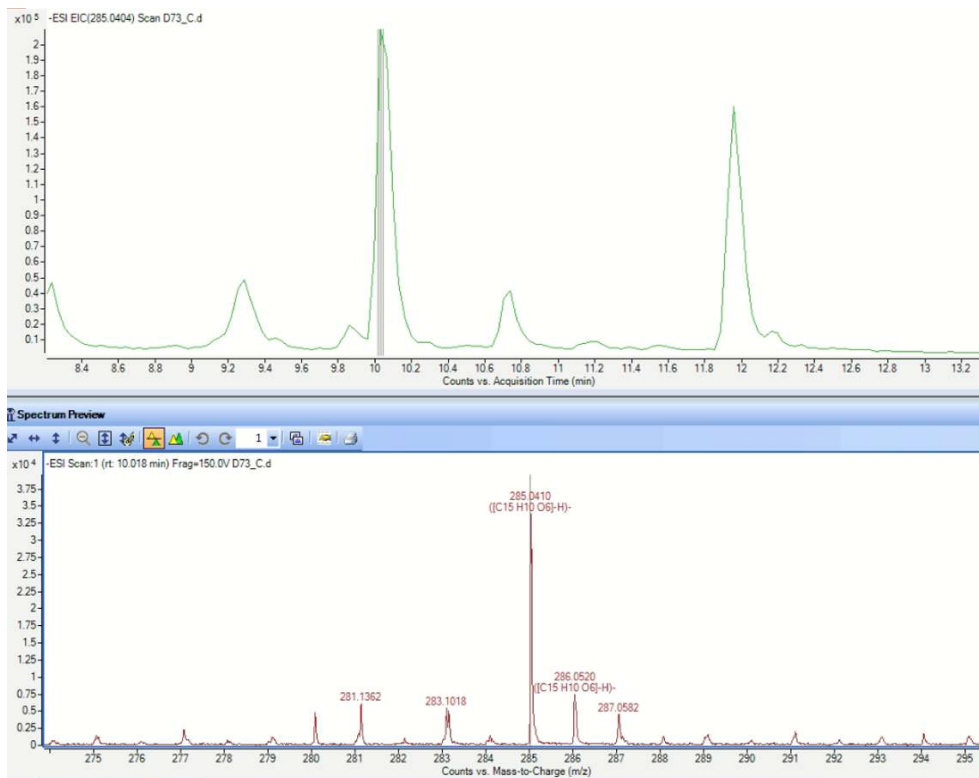
Καφεϊκό οξύ $C_9H_8O_4$



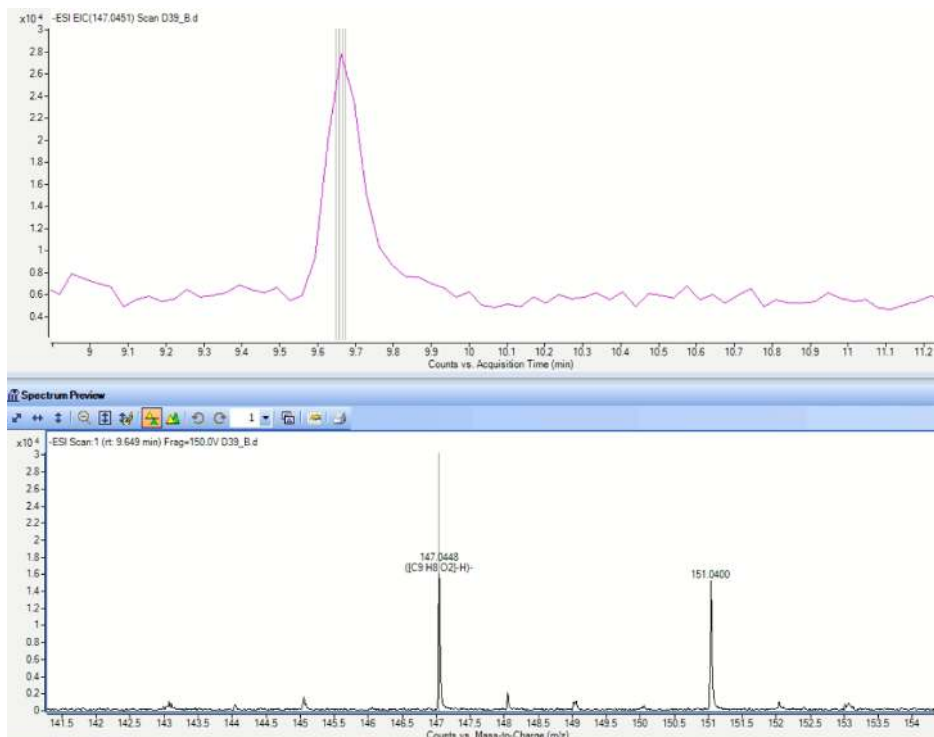
Φερουλικό οξύ $C_{10}H_{10}O_4$



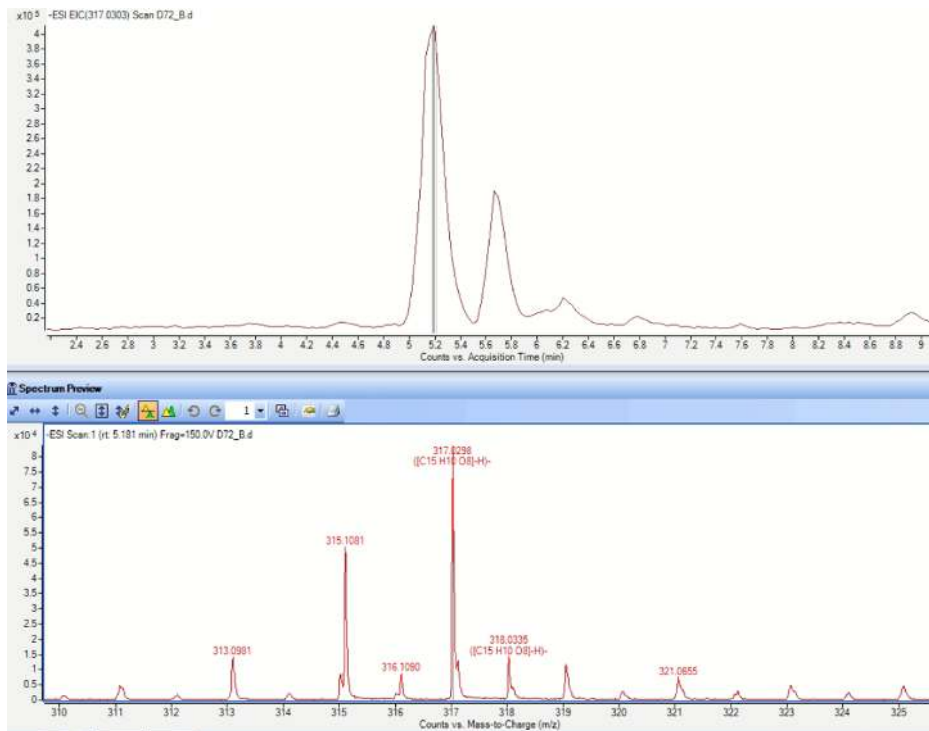
Λουτεολίνη $C_{15}H_{10}O_6$



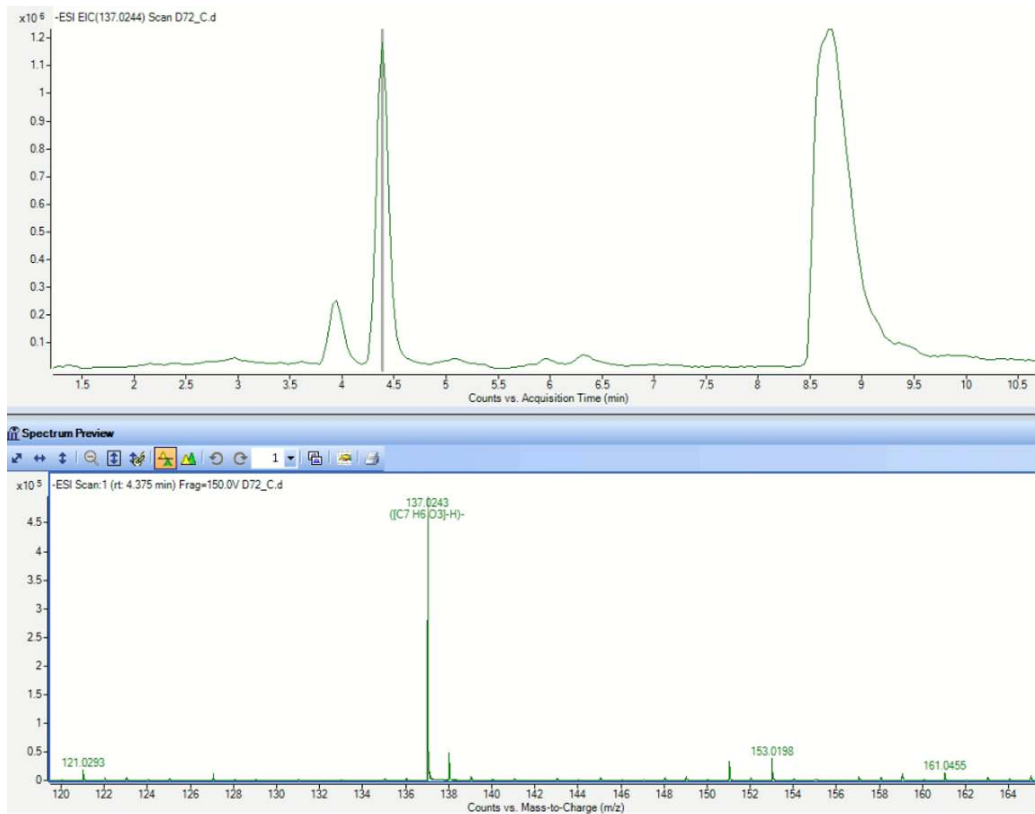
trans-Κινναμωμικό οξύ $C_9H_8O_2$



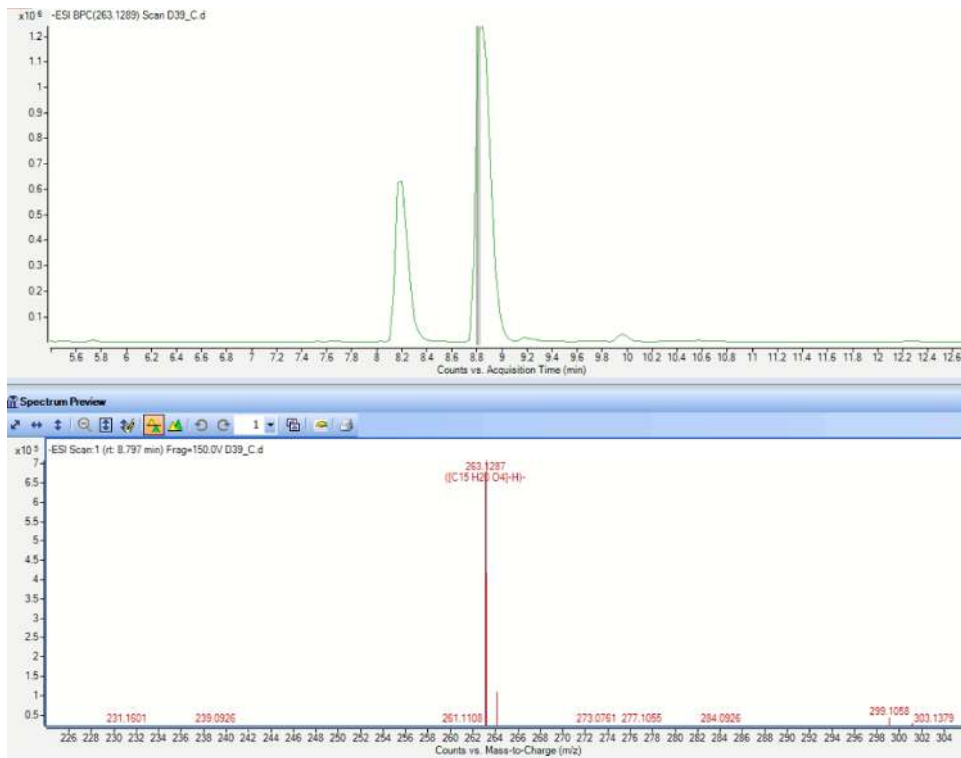
Μυρικετίνη $C_{15}H_{10}O_8$



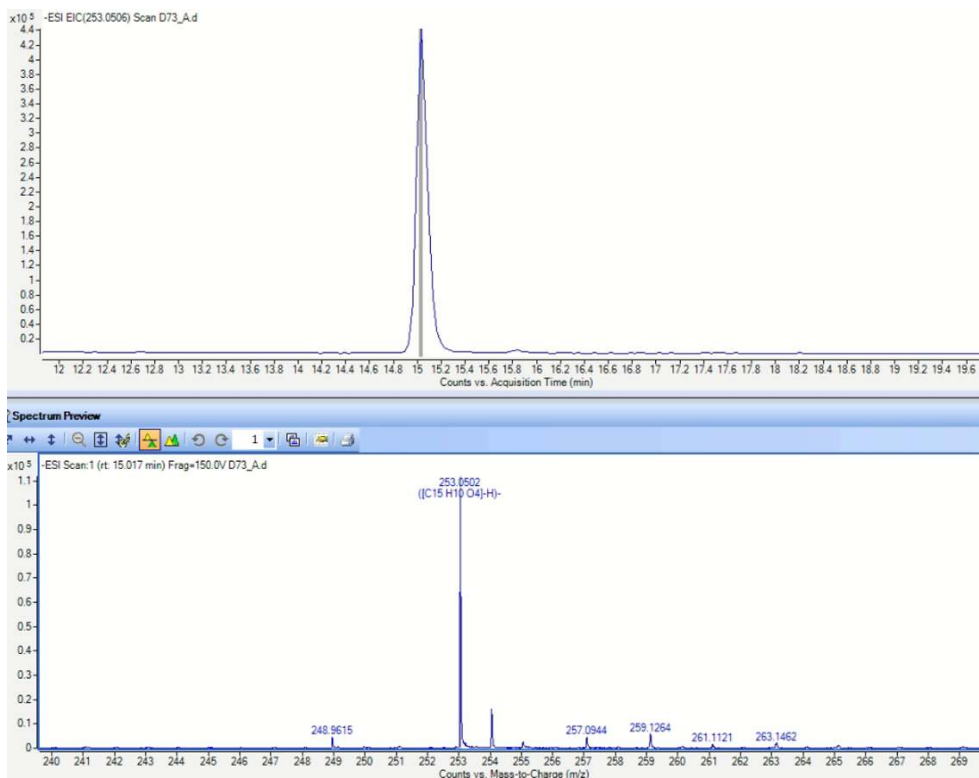
4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ $C_7H_6O_3$



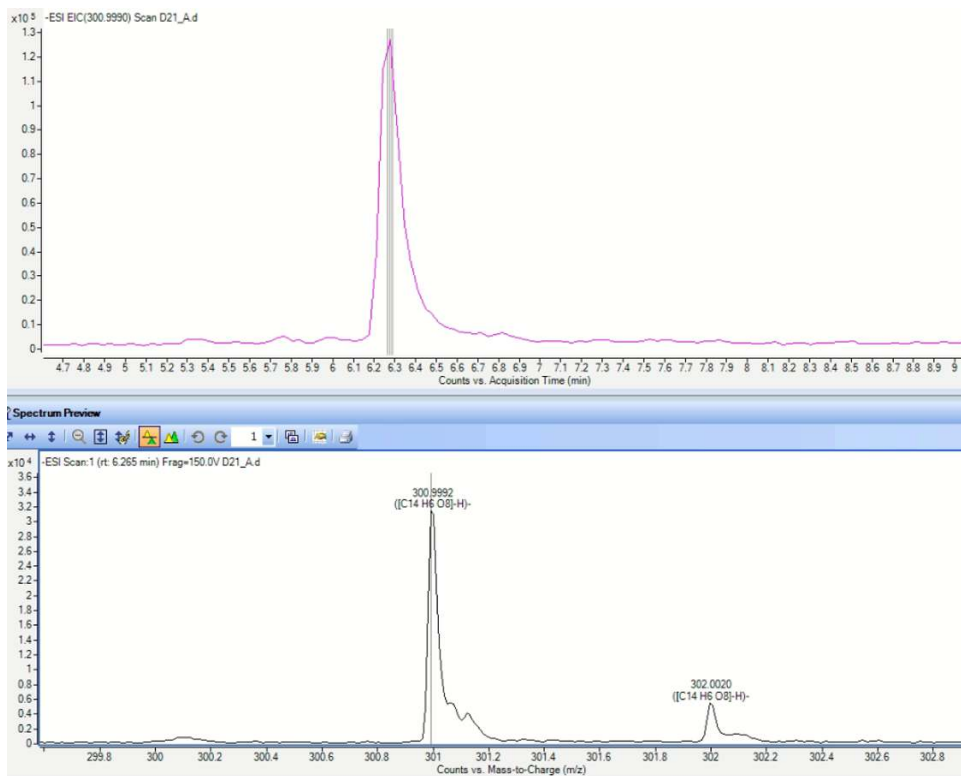
Αμπισικό οξύ $C_{15}H_{20}O_4$



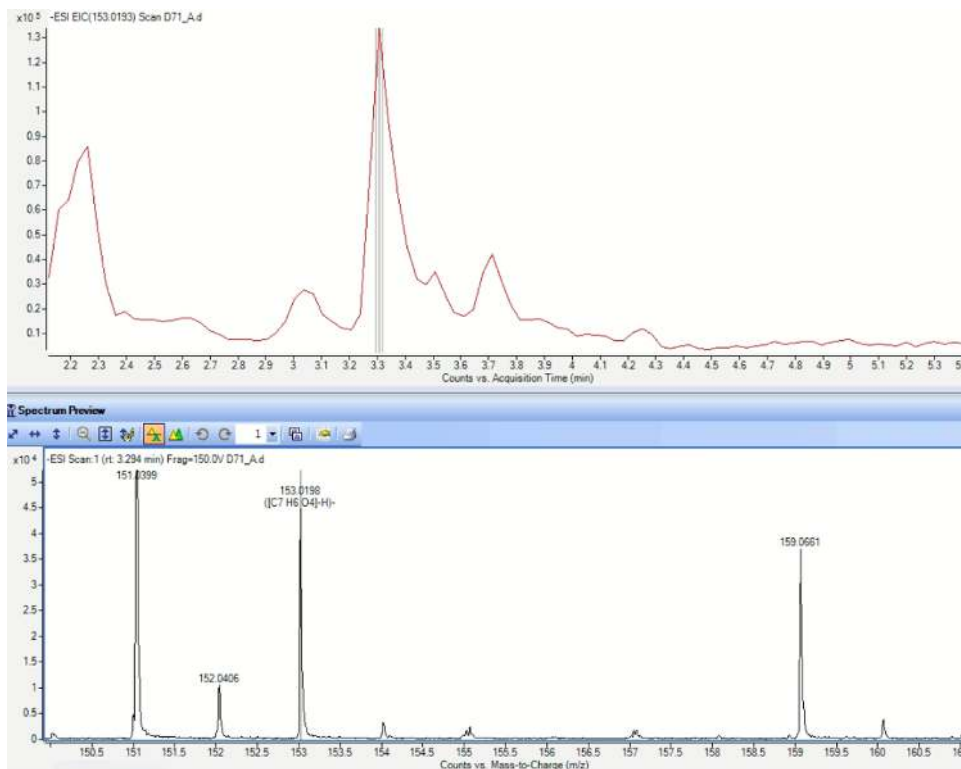
Χρυσίνη $C_{15}H_{10}O_4$



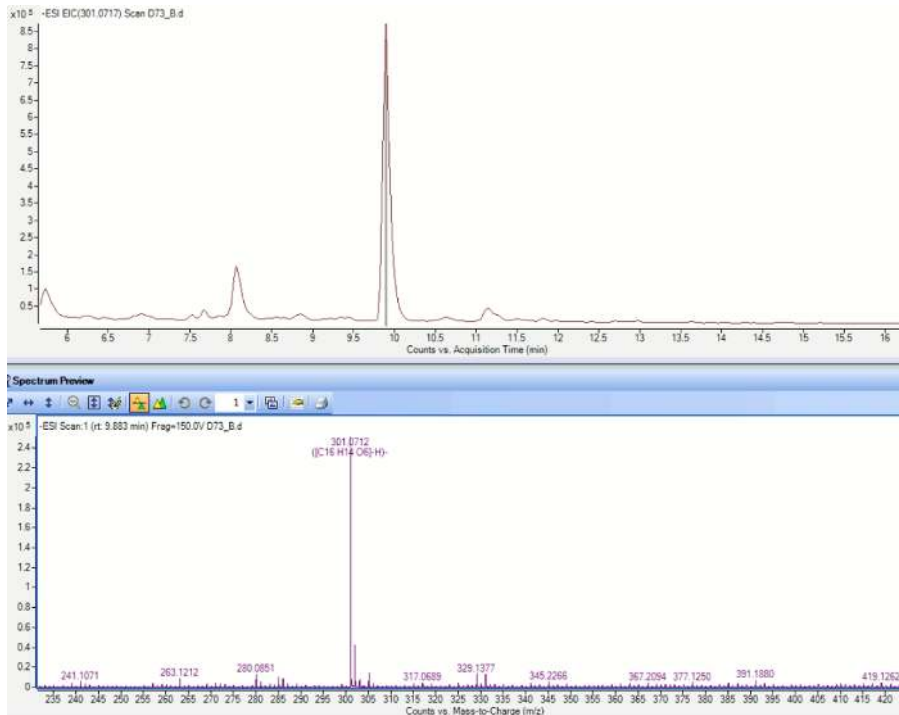
Ελαγικό οξύ $C_{14}H_6O_8$



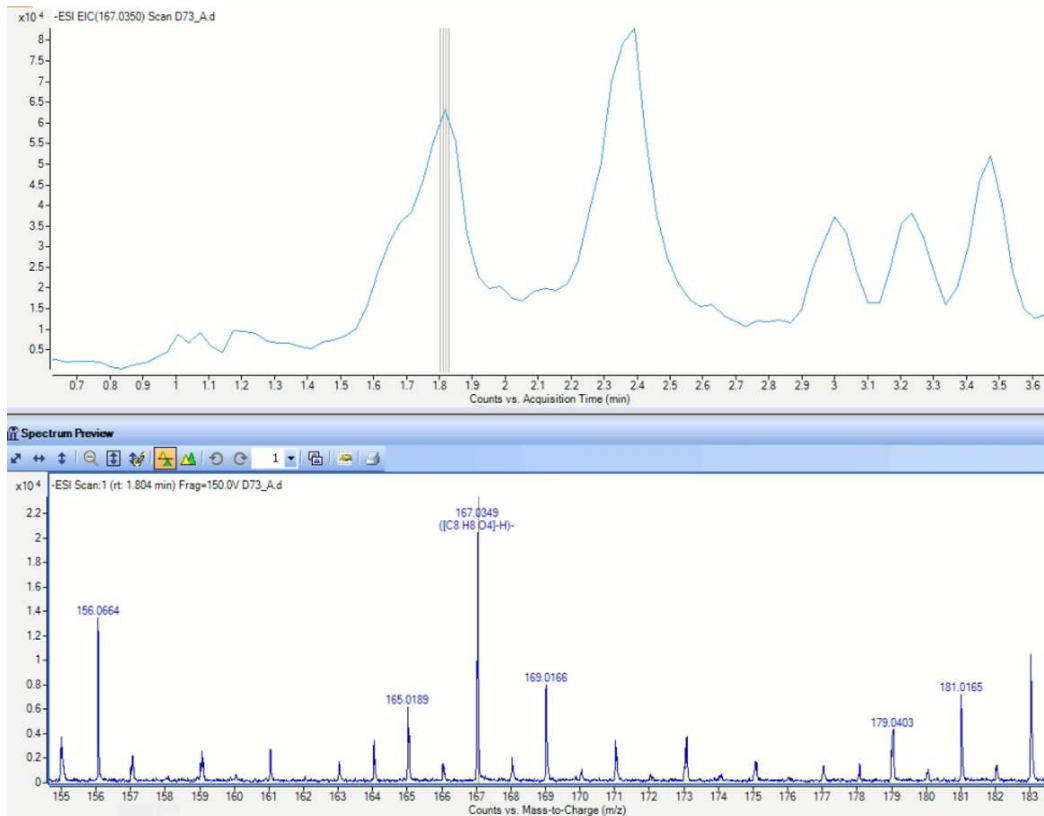
Γεντισικό οξύ $C_7H_6O_4$



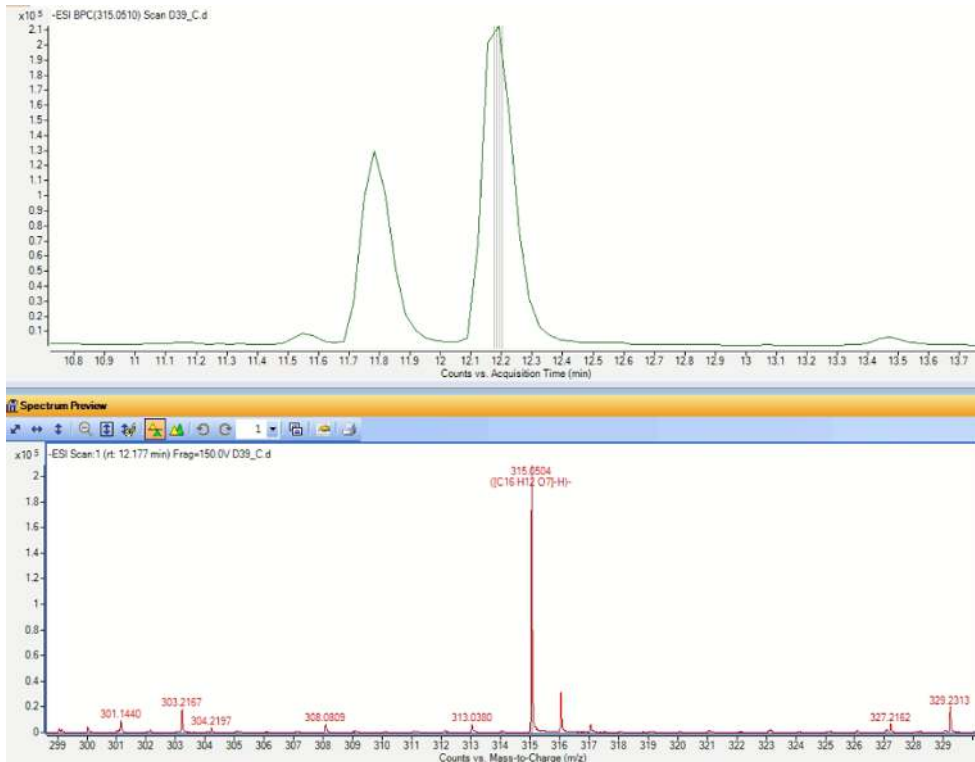
Εσπερετίνη $C_{16}H_{14}O_6$



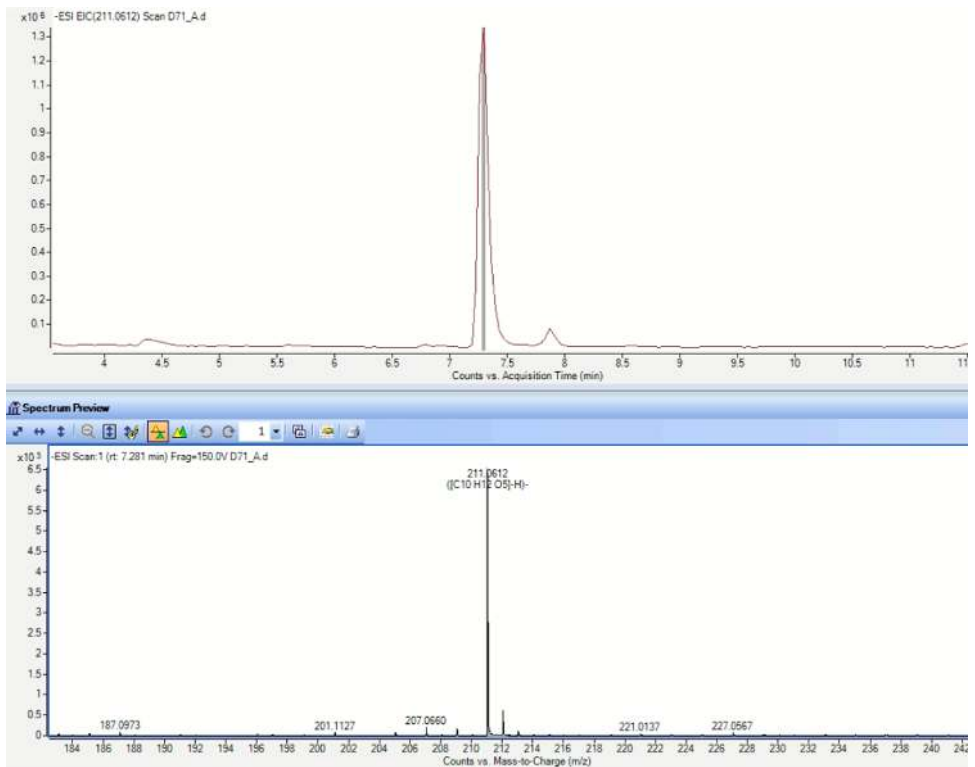
Ομογεντισικό οξύ $C_8H_8O_4$



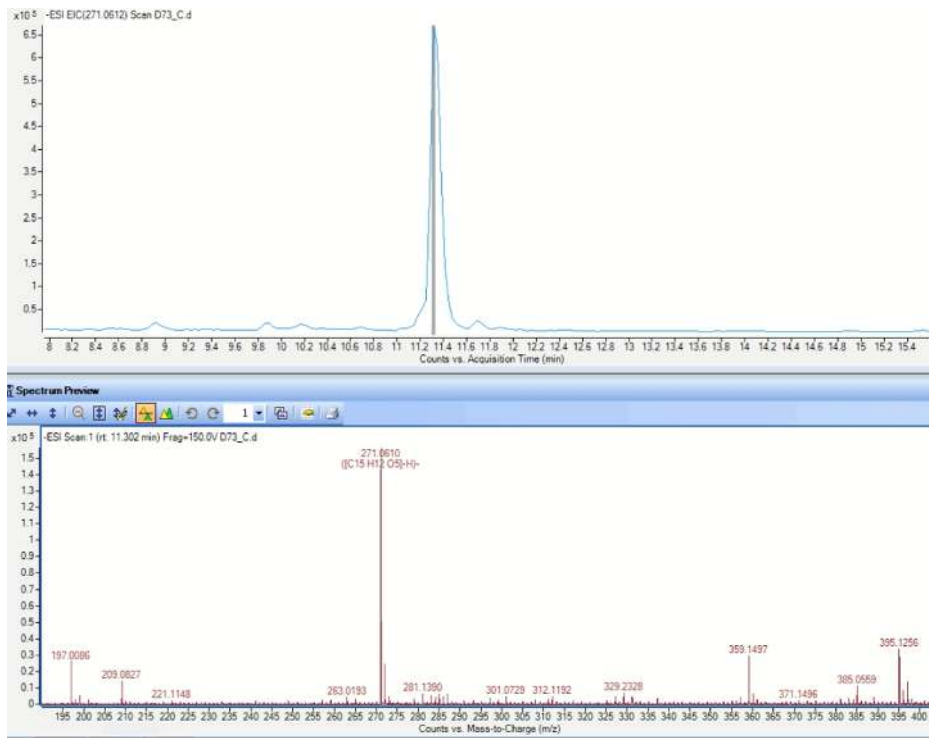
Ισορχαμνετίνη $C_{16}H_{12}O_7$



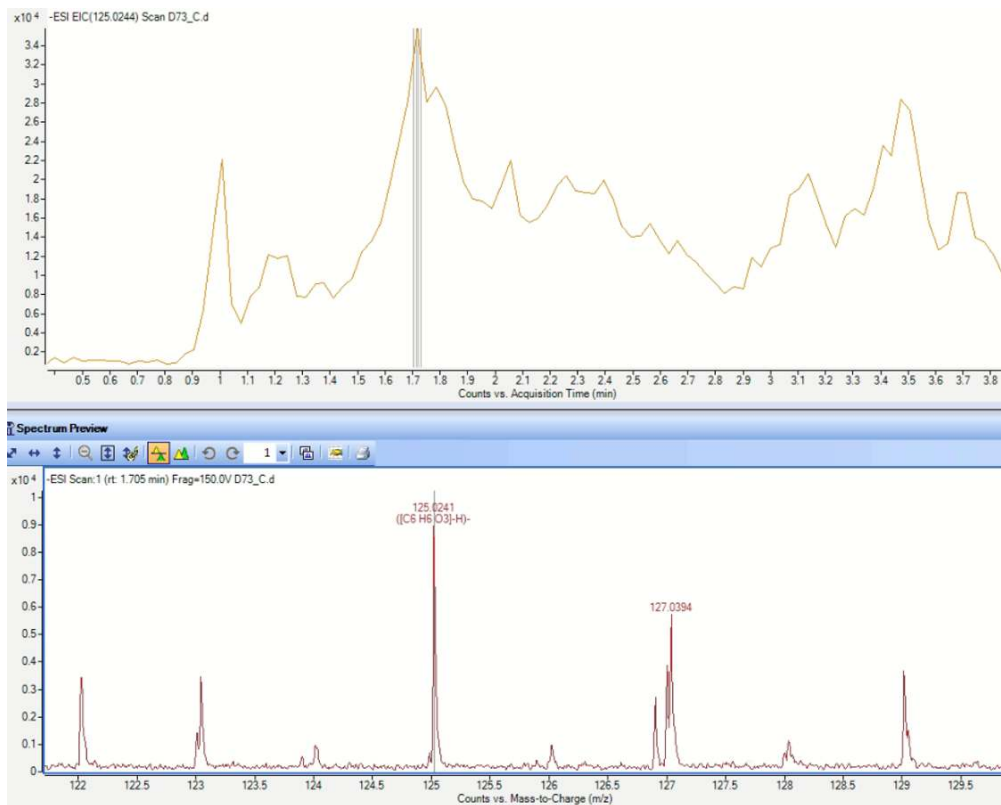
methyl syringate $C_{10}H_{12}O_5$



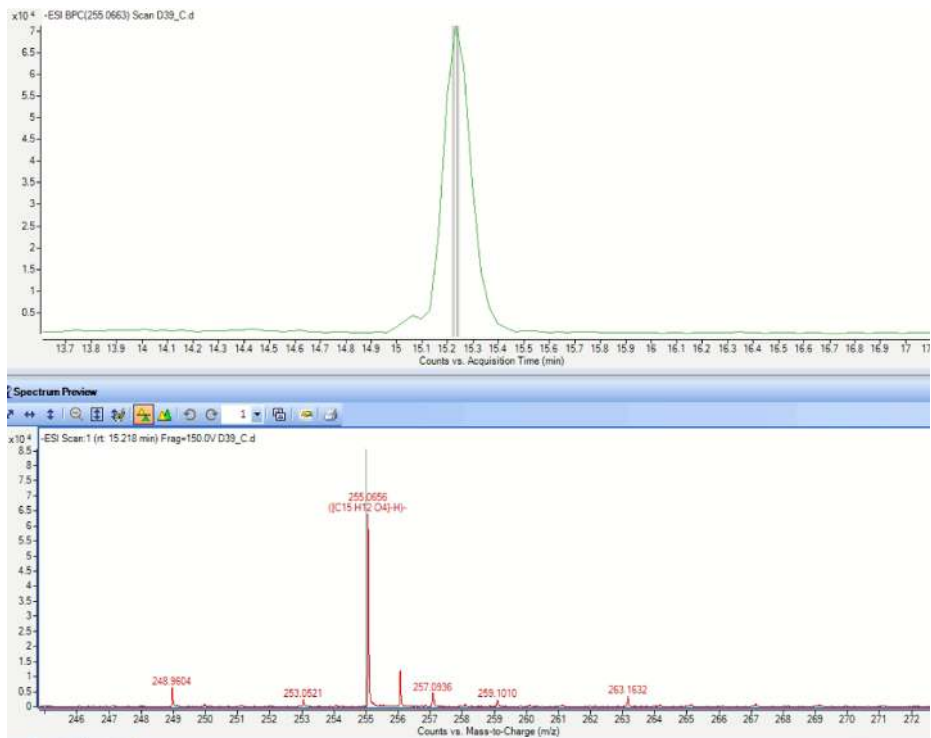
Ναριγενίνη $C_{15}H_{12}O_5$



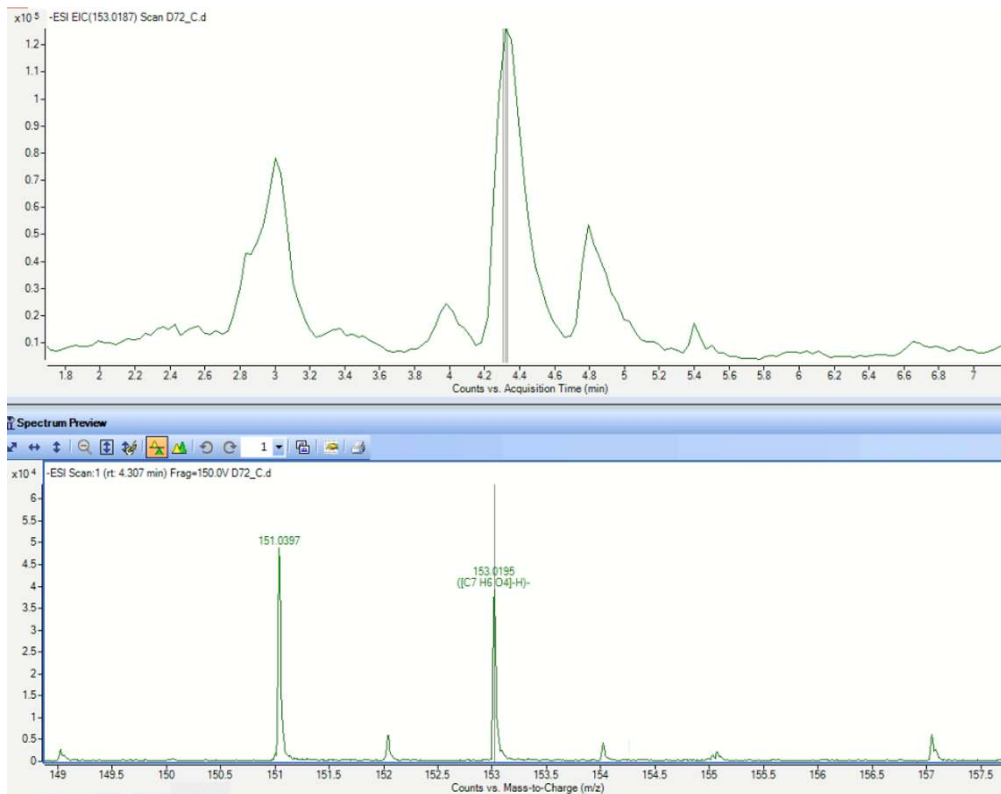
Φλωρογλυκινόλη $C_6H_6O_3$



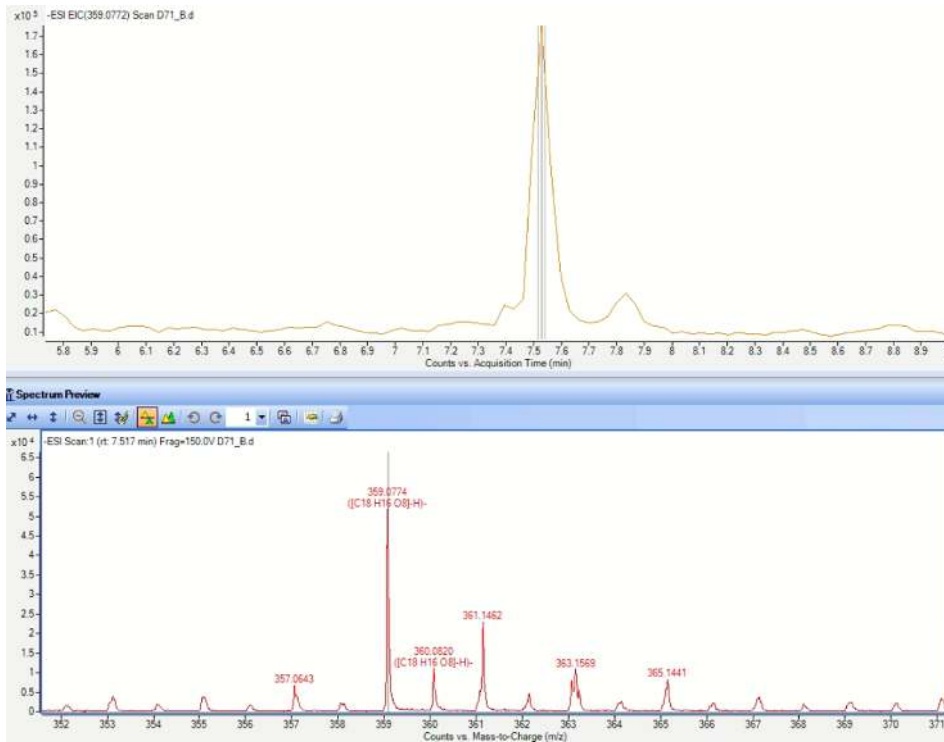
Πινοσεμπρίνη $C_{15}H_{12}O_4$



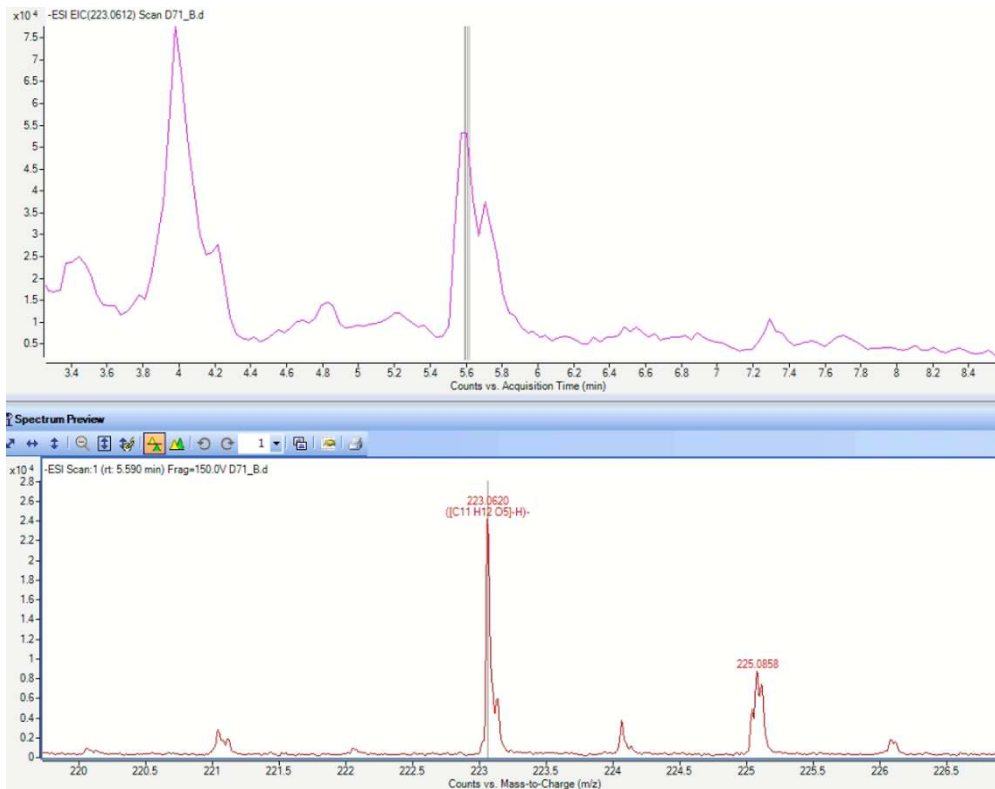
Πρωτοκατεχικό οξύ $C_7H_6O_4$



Ροσμαρινικό οξύ $C_{18}H_{16}O_8$

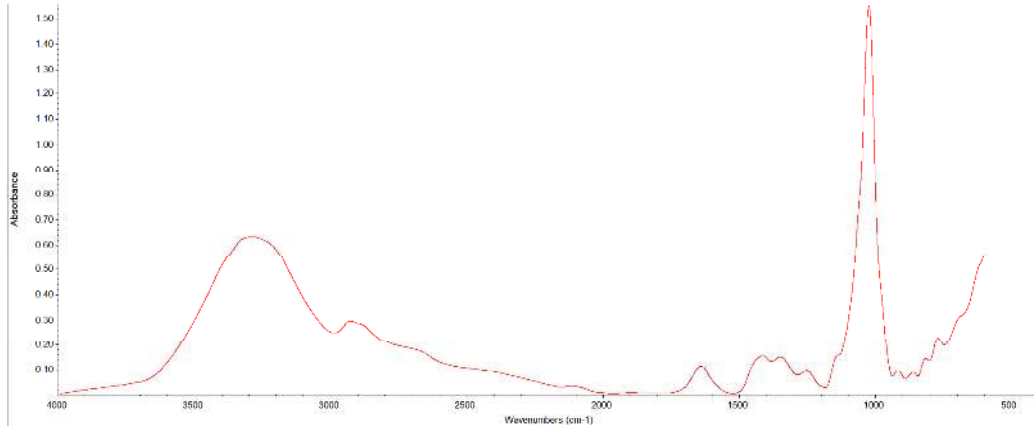


Σιναπικό οξύ $C_{11}H_{12}O_5$

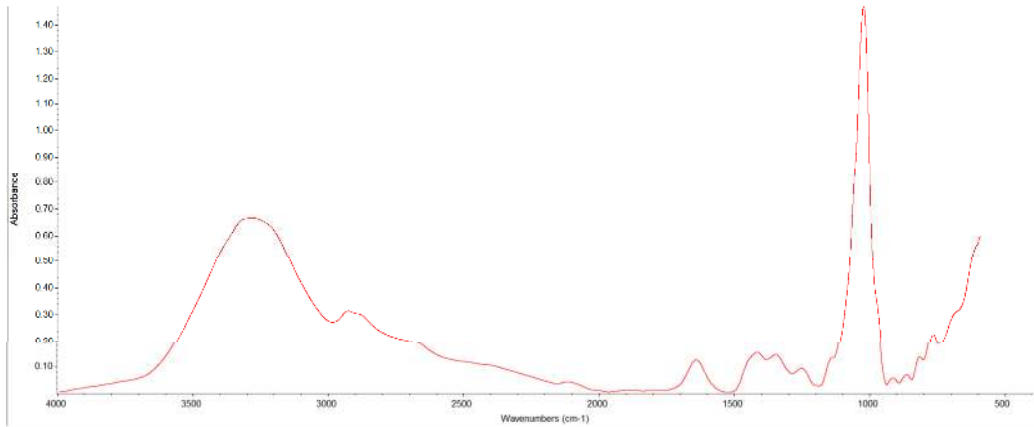


Παράρτημα 2

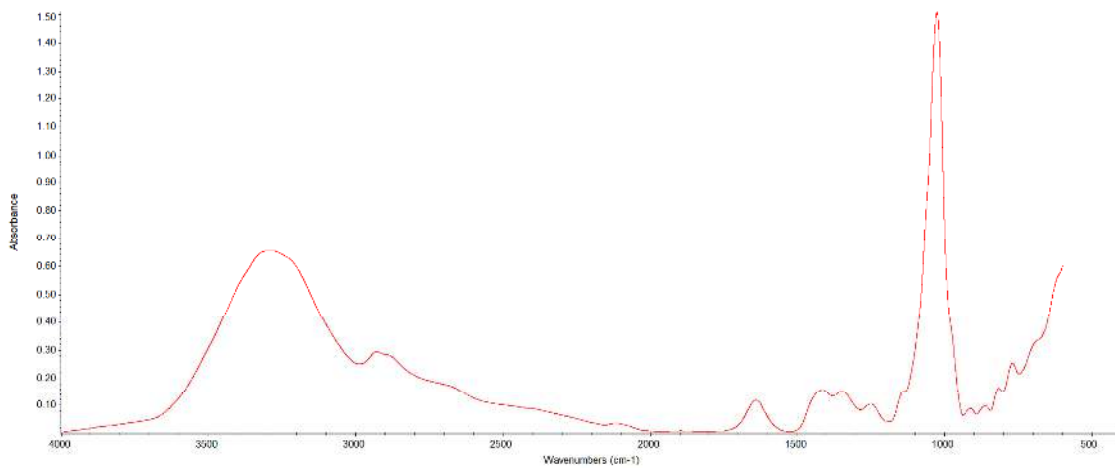
Ereik_2019_107



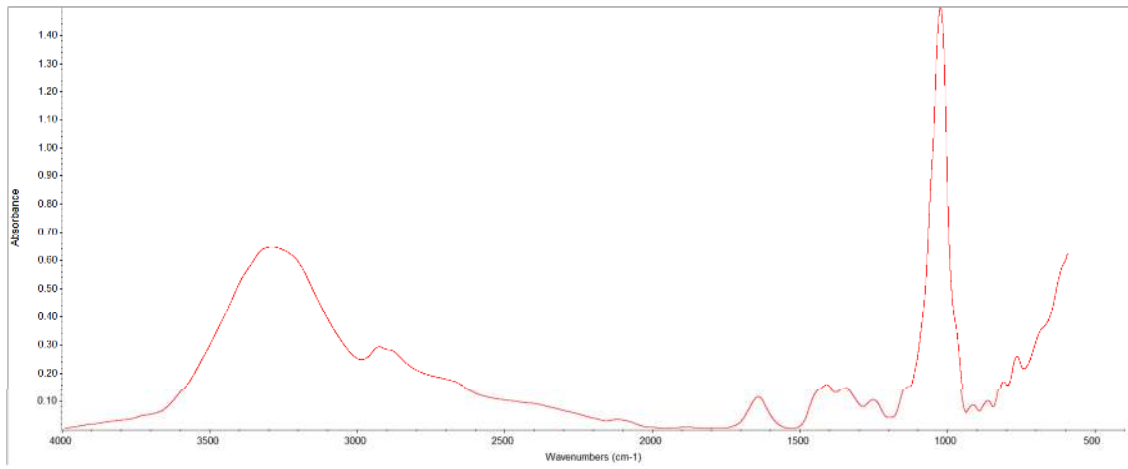
Ereik_and_2019_21



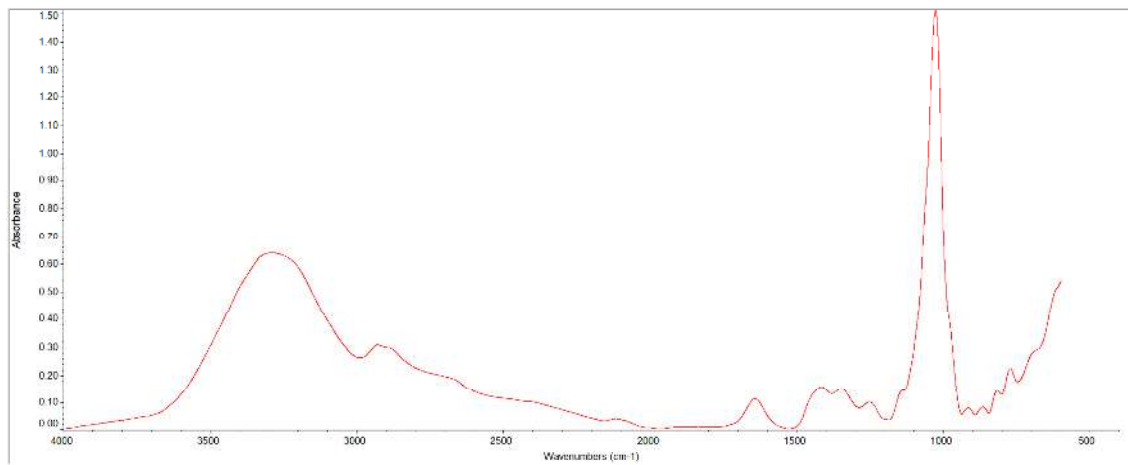
Ereik_and_2019_39



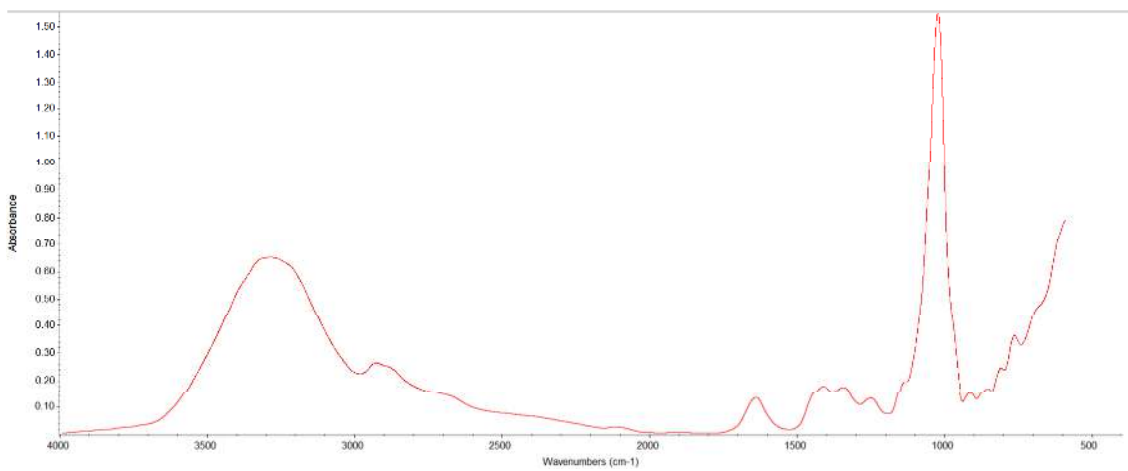
Ereik_and_2019_71



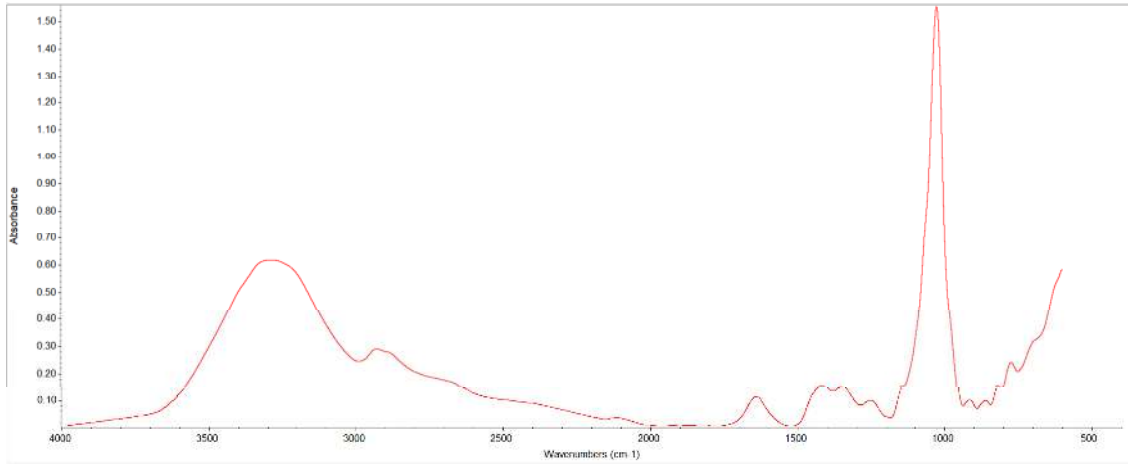
Ereik_and_2019_72



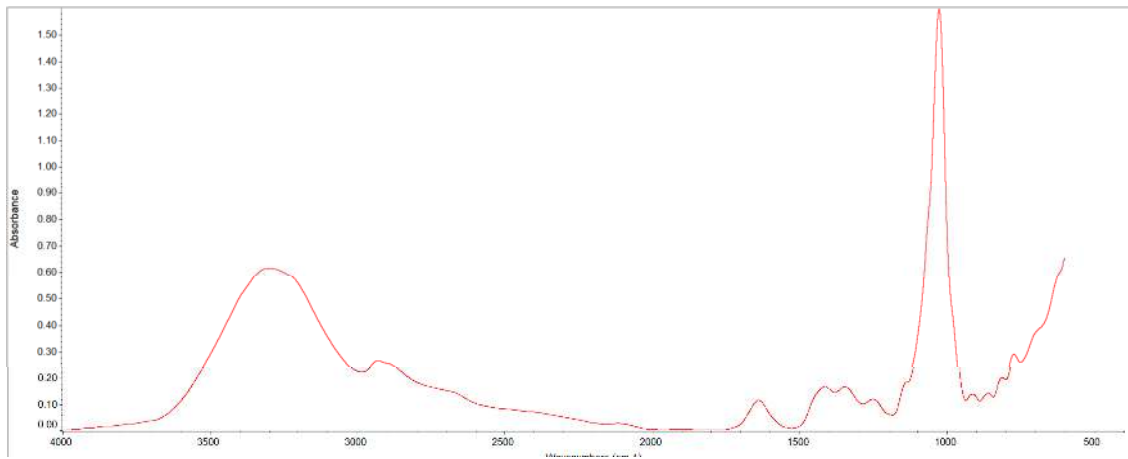
Ereik_lak_2019_156



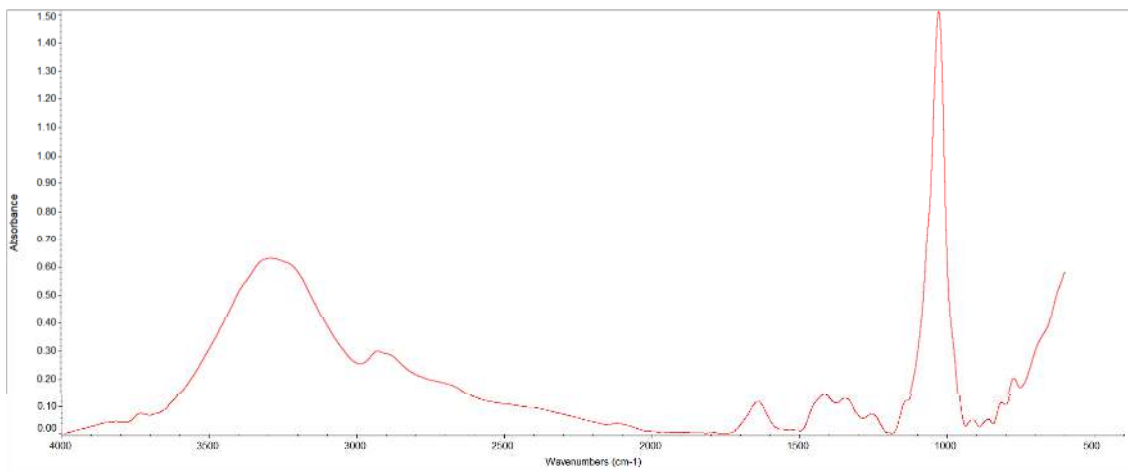
Ereik_thess_2019_108



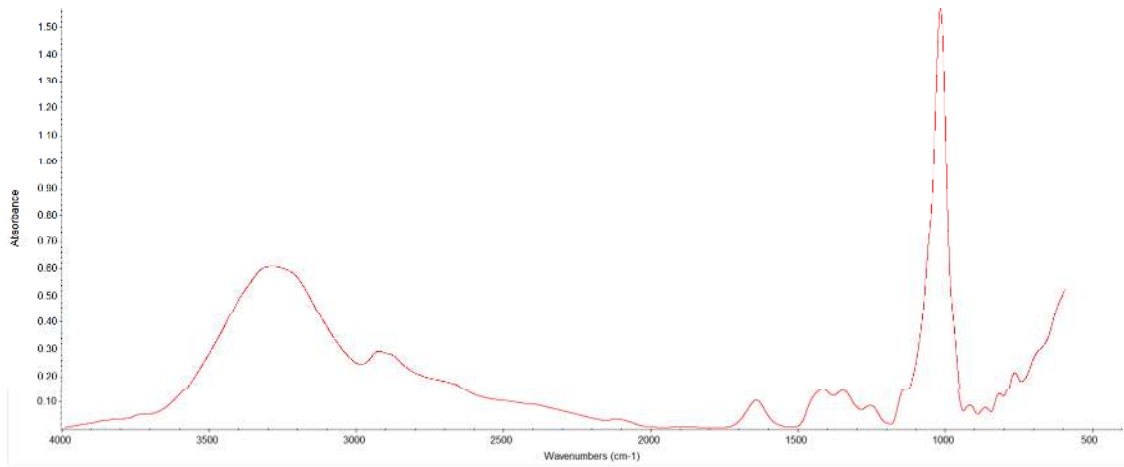
Ereik_xalk_2019_73



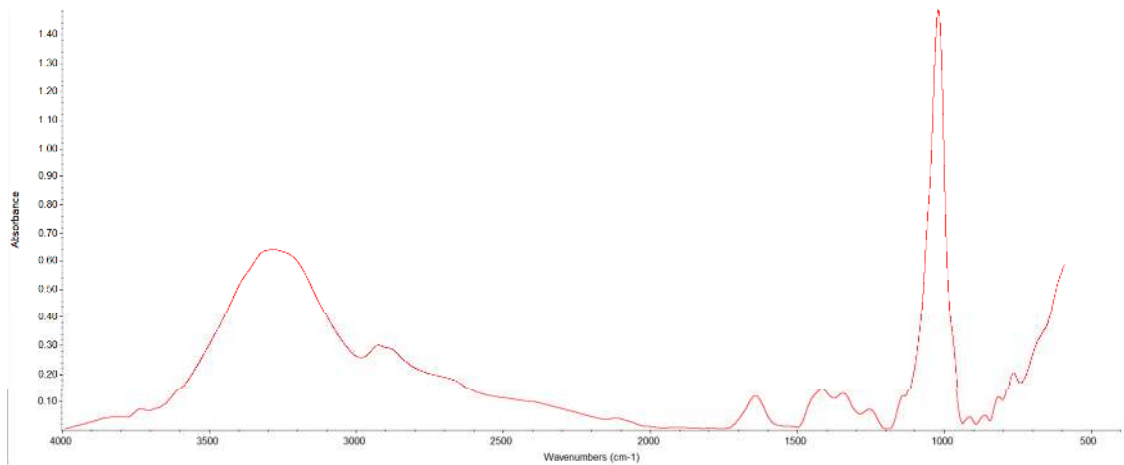
Ereik_xalk_2019_89



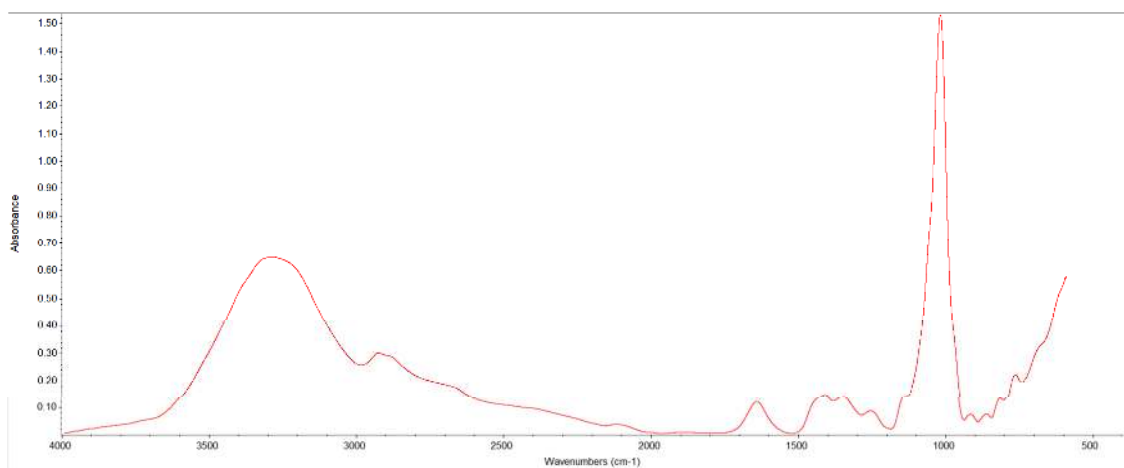
Ereik_xalk_2019_94



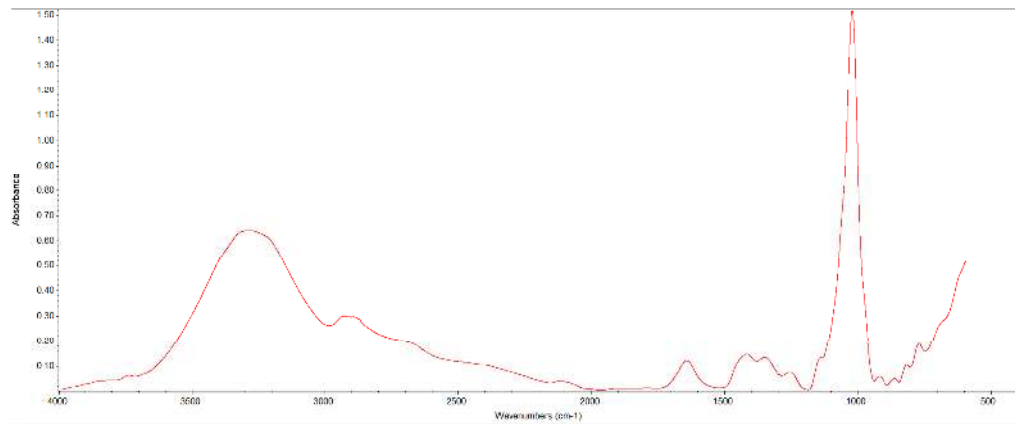
Ereik_xalk_2019_110



Ereik_xalk_2019_117

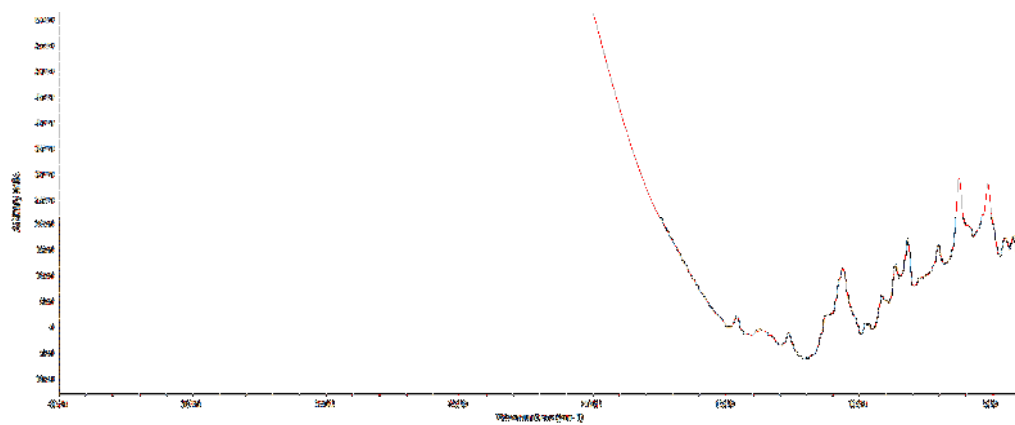


Ereik_xalk_2019_137

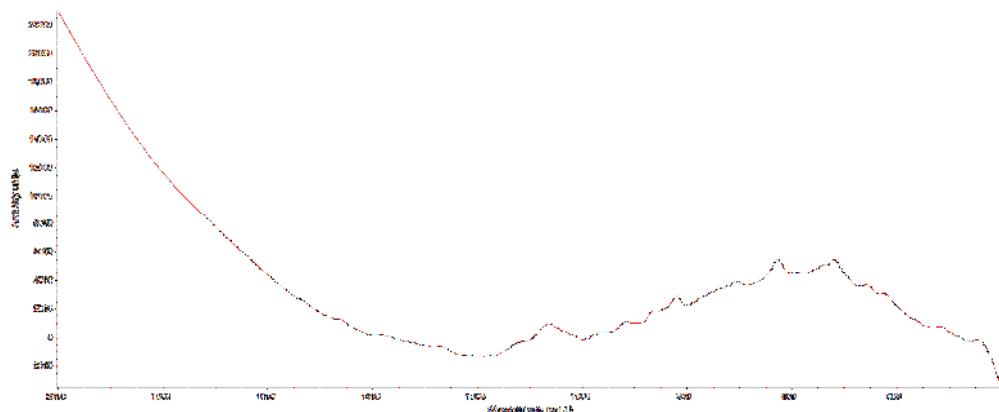


Παράρτημα 3

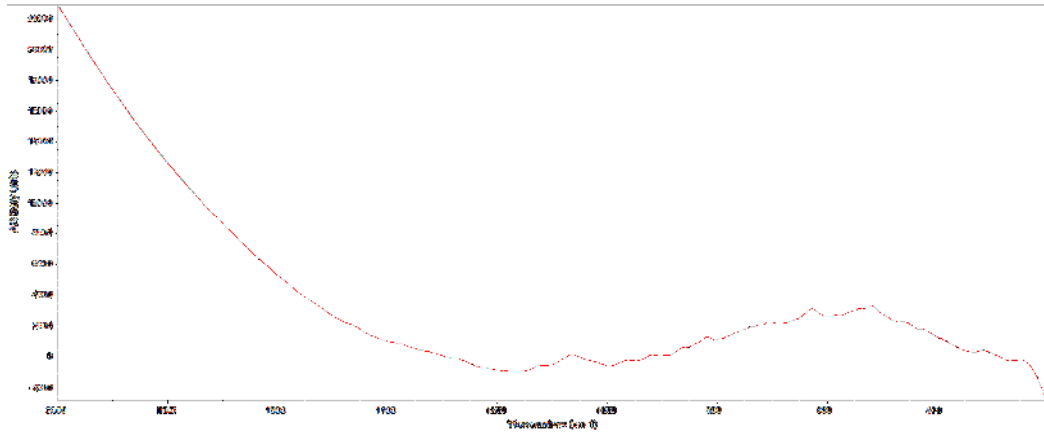
Ereik_2019_107



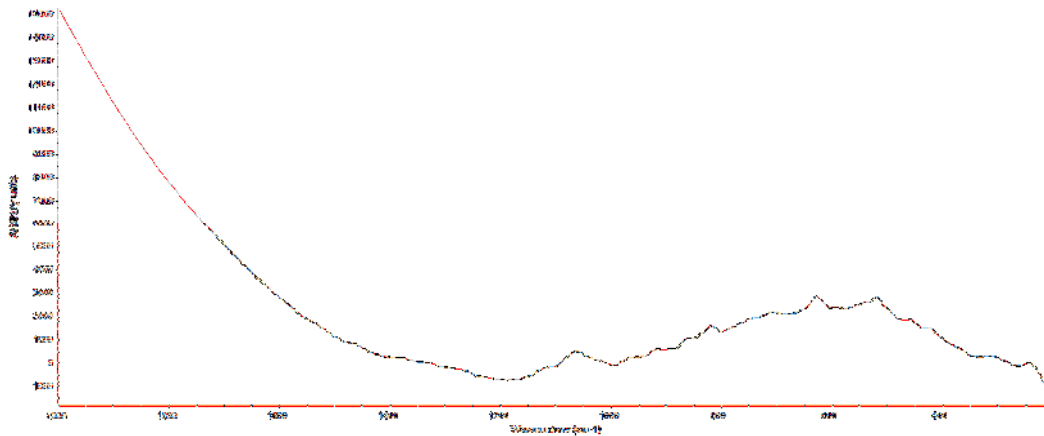
Ereik_and_2019_21



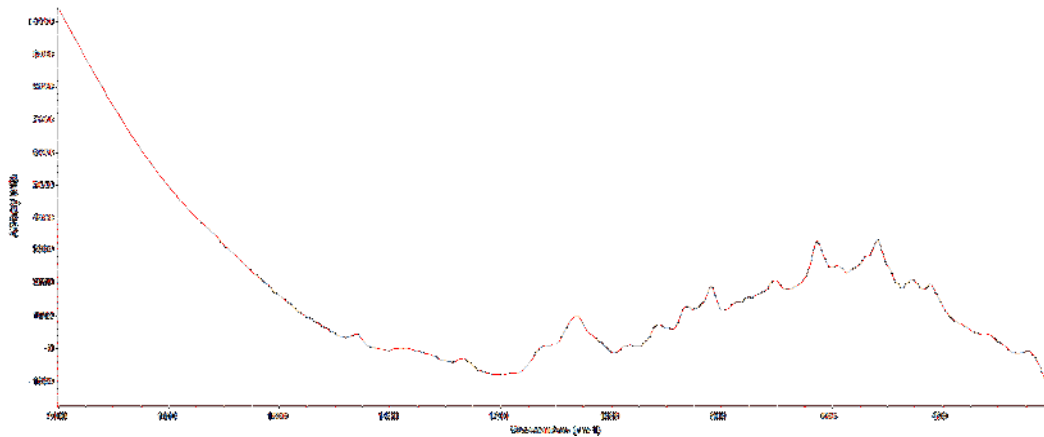
Ereik_and_2019_39



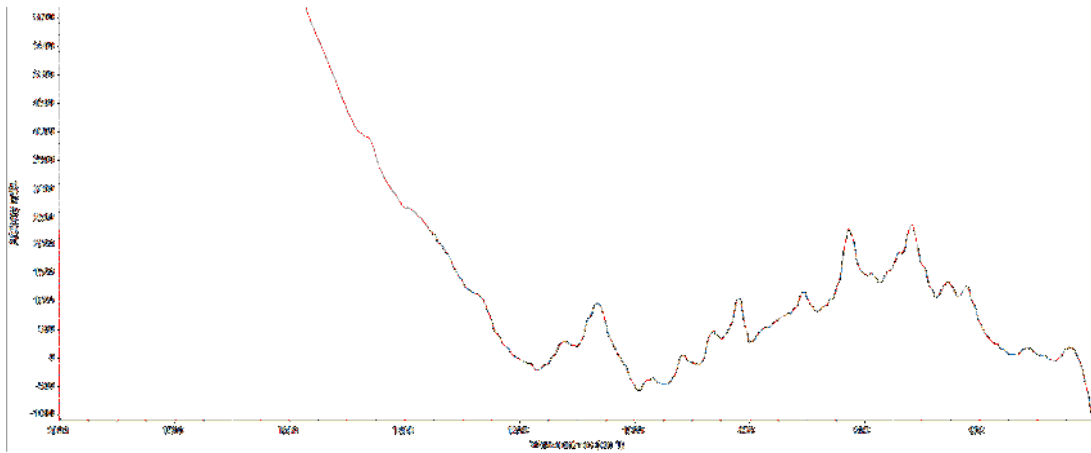
Ereik_and_2019_71



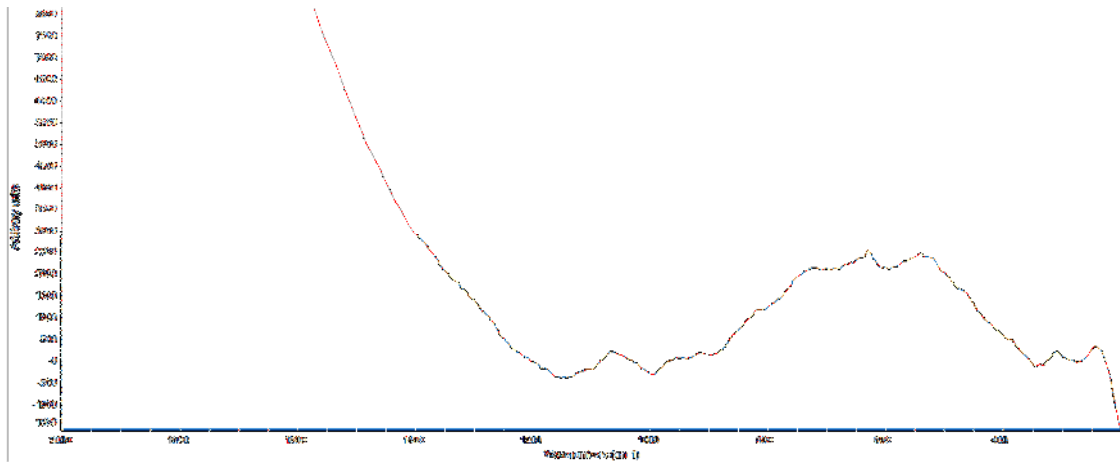
Ereik_and_2019_72



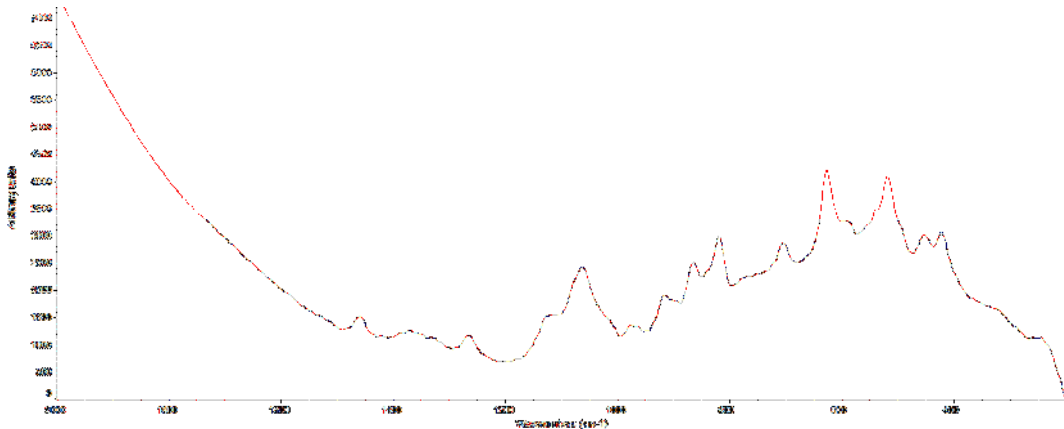
Ereik_lak_2019_156



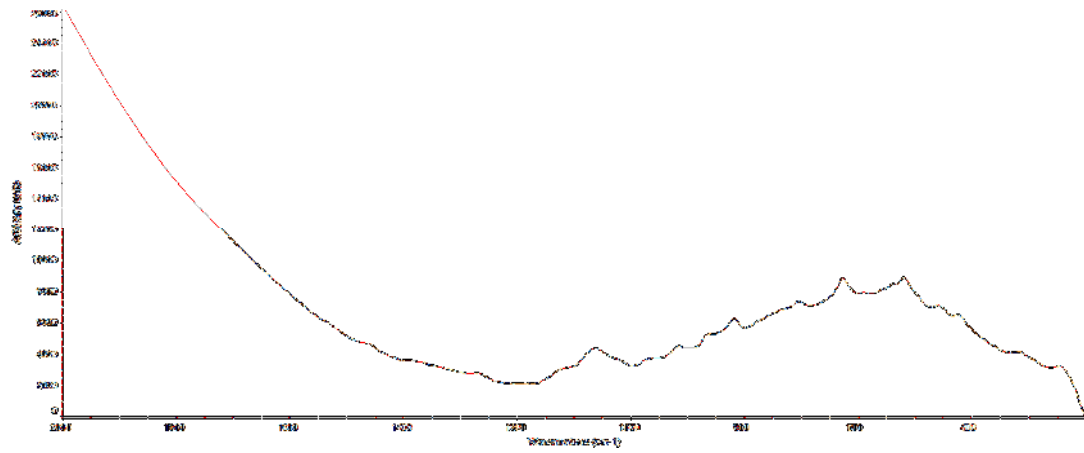
Ereik_thess_2019_108



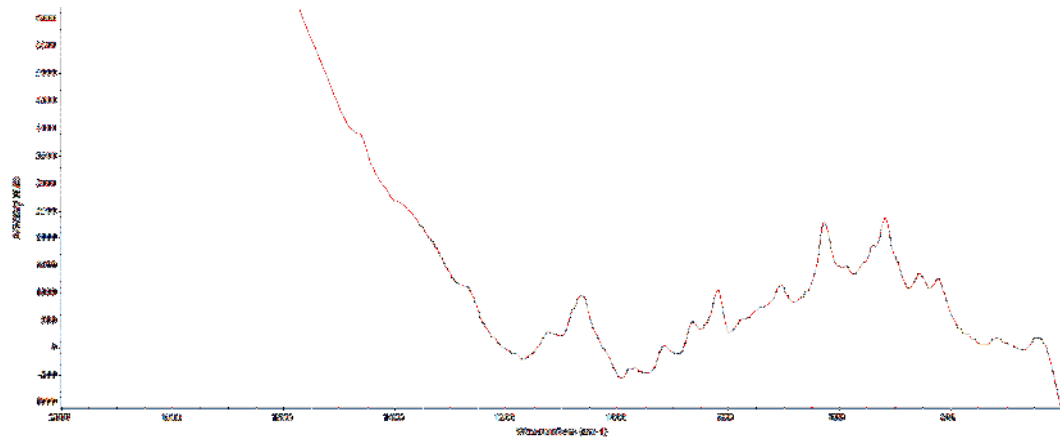
Ereik_xalk_2019_73



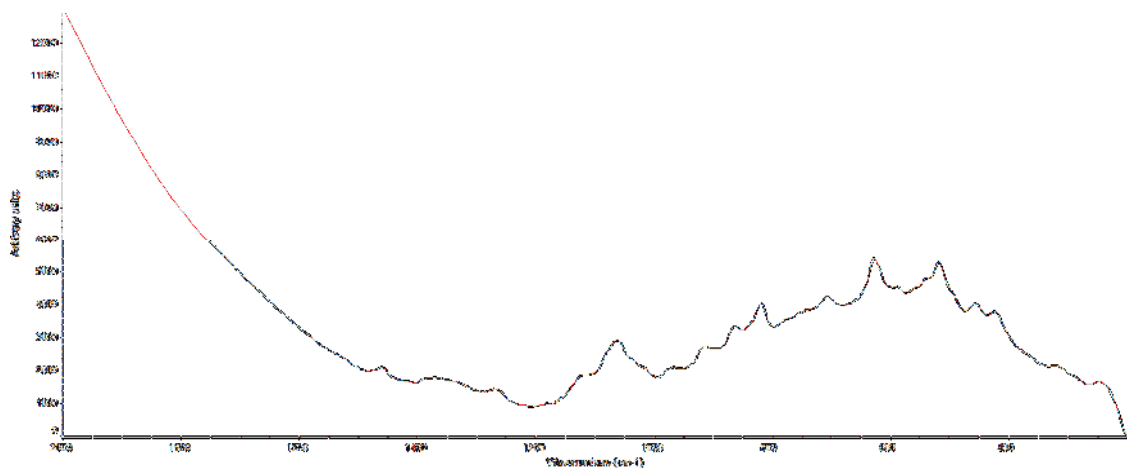
Ereik_xalk_2019_94



Ereik_xalk_2019_110



Ereik_xalk_2019_117



Ereik_xalk_2019_137

