



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ**

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ: ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Ανάλυση πτητικού προφίλ θυμαρίσιων μελιών με χρήση μικροεκχύλισης στερεάς
φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού

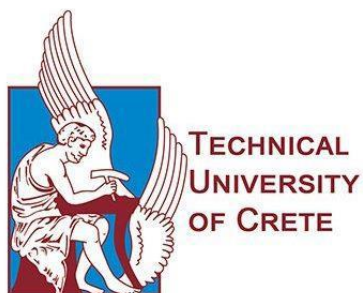
ΜΕΛΙΝΑ ΑΡΙΣΤΕΑ ΚΟΥΤΣΟΣΠΥΡΟΥ



Εξεταστική επιτροπή:

- Καθ. Ψυλλάκη Ελευθερία (επιβλέπουσα)
- Αναπλ. Καθ. Βενιέρη Δανάη
- Αναπλ. Καθ. Παρανυχιανάκης Νικόλαος

Χανιά, Ιούλιος 2023



Technical University of Crete

School of Chemical engineering and Environmental engineering

Analysis of the volatile profile of thyme honey samples using vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction

MELINA ARISTEA KOUTSOSPYROU



Examination committee:

- Professor Psillaki Elefteria (supervisor)
- Professor Venieri Danai
- Professor Paranychianakis Nikolaos

Chania, July 2023

"Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης".

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξήχθη κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022, στο εργαστήριο Υδατικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος, του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Ψυλλάκη Ελευθερία για την εμπιστοσύνη της, την καθοδήγηση της και την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει η Αγγελική Πατεράκη, η οποία μου πρόσφερε τις συμβουλές, τις γνώσεις και κυρίως την υπομονή της στο εργαστήριο καθώς και τη συμβολή της στη συγγραφή αυτής της διπλωματικής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την κ. Βενιέρη Δανάη και τον κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν.

Σημαντικό ρόλο έπαιξαν οι φίλοι μου που περάσαμε πέντε υπέροχα φοιτητικά χρόνια στα Χανιά. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το αξίζουν οι γονείς μου που με στηρίζουν τόσα χρόνια και είναι δίπλα μου σε ότι χρειαστώ.

Περιεχόμενα

Περίληψη	10
Abstract.....	11
1. Εισαγωγή.....	12
1.1. Το μέλι	12
1.1.1. Διατροφική αξία και ανθρώπινη υγεία.....	12
1.1.2. Κατηγορίες μελιού	13
1.1.3. Μελισσοκομία.....	19
1.2. Παλυνολογία (Palynology) – Μελισσοπαλυνολογία (melissopalynology)	20
1.3. Γεωγραφική και βοτανική προέλευση μελιού – Αυθεντικότητα μελιού	20
1.3.1. Γεωγραφική και βοτανική προέλευση θυμαρίσιου μελιού.....	24
1.4. Επεξεργασία μελιού.....	24
1.5. Η αναγκαιότητα της κατεργασίας ενός δείγματος.....	25
1.6. Τεχνικές εκχύλισης	26
Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction – SPE)	26
1.7. Τεχνικές Μικροεκχύλισης.....	27
1.7.1 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης SPME	27
1.7.1.1 Αρχή λειτουργίας	27
1.7.1.2 Πλεονεκτήματα τεχνικής SPME.....	29
1.7.1.3. Μειονεκτήματα τεχνικής SPME	29
1.7.2. Παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση εκχύλισης της SPME	29
1.7.3. Επίδραση επιστρωμάτων ίνας SPME	30
1.8. Επίδραση τρόπου δειγματοληψίας- Απευθείας Εμβάπτιση – Direct immersion – Solid phase microextraction (DI – SPME).....	32
1.8.1 Επίδραση τρόπου δειγματοληψίας στον υπερκείμενο χώρο (HS – SPME).....	32
Κατανομή των τριών φάσεων – Θεωρία της ισορροπίας της τεχνικής HS – SPME .	33
Πλεονεκτήματα εφαρμογής HS – SPME.....	37
1.8.2. Εφαρμογή HS – SPME στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε δείγματα μελιού.	38
1.8.3. Συντελεστές που επηρεάζουν την κατανομή οργανικών ενώσεων μεταξύ διαφορετικών φάσεων.....	39
Συντελεστής Λιποφιλίας ή κατανομής οκτανόλης / νερού K_{ow}	39
Σταθερά Henry K_H	39
1.8.4. Τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vac HS – SPME)	40
1.10. Σκοπός της εργασίας	46
2. Πειραματικό μέρος	47

2.1. Υλικά και Εργαστηριακός εξοπλισμός	47
2.1.1. Χημικά Αντιδραστήρια	47
2.1.2. Όργανα και συσκευές	47
2.2. Τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Headspace Solid Phase Microextraction; HS – SPME)	51
2.2.1 Πειραματική διαδικασία	51
2.3. Τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vacuum assisted headspace solid phase microextraction; Vac HS – SPME)	51
2.3.1 Πειραματική διαδικασία	51
2.4. Ανάλυση και ανίχνευση χημικών ενώσεων με την χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας	52
2.5. Ποιοτικός και Ποσοτικός Χαρακτηρισμός των Χημικών Ενώσεων	52
3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση	54
3.1. Ταυτοποίηση ενώσεων με τη χρήση των χρόνων συγκράτησης	54
3.2. Βελτιστοποίηση SPME	55
3.2.1. Ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων στο μέλι με χρήση HS – SPME	58
3.2.2. Μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ενώσεων στόχων που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού	59
3.3. Μελέτη του ρυθμού εκχύλισης των ενώσεων – μάρτυρες κατά την εφαρμογή της τεχνικής HS – SPME σε συνθήκες κενού και ατμόσφαιρας	60
3.4. Επίδραση της θερμοκρασίας (extraction temperature) στο ρυθμό εκχύλισης των αναλυτών σε συνθήκες ατμοσφαιρικής και μειωμένης πίεσης	61
3.5. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης (extraction time) στο ρυθμό εκχύλισης των αναλυτών σε συνθήκες ατμοσφαιρικής και μειωμένης πίεσης	62
3.6. Πτητικό προφίλ θυμαρίσιου μελιού Α	68
3.7. Σύγκριση μεθόδων (HS – SPME και Vac HS – SPME)	69
Λόγος Vac HS – SPME / HS – SPME	69
4. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του Ν. Χανίων	71
5. Ποιοτικός Χαρακτηρισμός και σύγκριση του προφίλ πτητικών ενώσεων μεταξύ θυμαρίσιου και άλλων ειδών μελιού	74
5.1. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ στο μέλι της Βελανιδιάς	77
5.2. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ στο μέλι της πορτοκαλιάς	77
5.3. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ στο μέλι της κουμαριάς	77
5.4. Ποιοτική σύγκριση του πτητικού προφίλ μελιών διαφορετικής βοτανικής προέλευσης	77
6. Συμπεράσματα και Προοπτικές	78

7. Βιβλιογραφία.....	80
-----------------------------	-----------

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Βήματα κατά την Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE).....	26
Εικόνα 2: Εξωτερική (Α) και εσωτερική (Β) σχηματική απεικόνιση της συσκευής SPME ..	27
Εικόνα 3: Κατηγορίες εμπορικά διαθέσιμων επιστρώσεων (coatings) ινών SPME. Απεικόνιση της χημικής δομής των πιο κοινών πολυμερικών υλικών που χρησιμοποιούνται ως επιστρώματα SPME	30
Εικόνα 4: Οδηγός επιλογής επιστρώματος SPME λαμβάνοντας υπόψιν την πτητικότητα των ενώσεων όσο και το εύρος του μοριακού βάρους	31
Εικόνα 5: (1) Γεωμετρία της μεθόδου HS – SPME, (2) Μονοδιάστατο μοντέλο της διαδικασίας διάχυσης τριών φάσεων (Yiantzi Evangelia, 2014)	34
Εικόνα 6: Τρόποι δειγματοληψίας με την συσκευή SPME; (Α) Βύθιση της ίνας εντός του διαλύματος (DI – SPME). (Β) Έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο (HS – SPME).....	37
Εικόνα 7:Πιπέτα Gilson των 100 μl.....	47
Εικόνα 8:Βιδωτό φιαλίδιο με το δείγμα.....	48
Εικόνα 9:Βιδωτό μεταλλικό πώμα (και οι 2 όψεις).....	48
Εικόνα 10:Ίνα Smart SPME	49
Εικόνα 11:Αντλία κενού	49
Εικόνα 12: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας	50
Εικόνα 13: Χρωματογράφημα από την ανάλυση του πτητικού προφίλ δείγματος θυμαρίσιου μελιού (Α) εφαρμόζοντας την τεχνική HS – SPME (μαύρο) με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C η θερμοκρασία εκχύλισης και την τεχνική Vac HS – SPME (ροζ) με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 45 °C η θερμοκρασία εκχύλισης.....	56
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα του πτητικού προφίλ δείγματος θυμαρίσου μελιού με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C η θερμοκρασία εκχύλισης. Απαριθμούνται οι ενώσεις-μάρτυρες που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του δείγματος.....	57
Εικόνα 15: Σύγκριση των χρωματογραφημάτων που αποκτήθηκαν από την ανάλυση του πτητικού προφίλ δειγμάτων μελιού θυμαρίσιου (μαύρο), βελανιδιάς (ροζ), πορτοκαλιάς (πορτοκαλί) και κουμαριάς (κίτρινο) εφαρμόζοντας την τεχνική HS – SPME. Συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C θερμοκρασία εκχύλισης. Σε κάθε χρωματογράφημα παρουσιάζονται ενώσεις-μάρτυρες που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του εκάστοτε μελιού.....	76

Περιεχόμενα σχημάτων

Σχήμα 1: Βήματα χειρισμού της τεχνικής SPME κατά την δειγματοληψία.....	28
Σχήμα 2: Εικόνα από την τομή των στρωμάτων επίστρωσης της ίνας DVB-CAR-PDMS .	31
Σχήμα 3: Το εύρος τιμής στον συντελεστή Henry (kH) σχετίζεται με το σημείο που παρουσιάζεται αντίσταση στον ρυθμό εξάτμισης των ημι-πτητικών και πτητικών ενώσεων. Η επίδραση που θα έχει η εφαρμογή της τεχνικής Vac-HS-SPME μπορεί να προβλεφθεί σε δείγματα νερού και σε δείγματα που περιέχουν νερό (Psillakis, 2017)	42
Σχήμα 4: Στην HS – SPME η κατανομή των ενώσεων μεταξύ των τριών φάσεων καθορίζεται από το στάδιο της εξάτμισης (evaporation/ volatilization step), το οποίο συμβαίνει στην διεπιφάνεια μήτρας/υπερκείμενης φάσης και από το στάδιο της προσρόφησης των αναλύτων στη φάση εκχύλισης της ίνας (analyte uptake by the extracting phase), το οποίο συμβαίνει στην διεπιφάνεια της υπερκείμενης φάσης/φάση εκχύλισης ίνας. Σε αυτές τις δυο διεπιφάνειες δημιουργούνται διαφορετικού είδους αντιστάσεις με βάση τη θεωρία των δύο μεμβρανών (two-film) (Psillakis, 2020).....	43
Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού που εφαρμόστηκε για την μελέτη των πτητικών χημικών ενώσεων στο Χανιώτικο θυμαρίσιο μέλι.....	53

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Κατηγορίες μελιού και χαρακτηριστικά της κάθε κατηγορίας	18
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά μονοποικιλιακών ελληνικών μελιών	23
Πίνακας 3: Πληροφορίες για την μέθοδο HS – SPME που έχει χρησιμοποιηθεί στην διεθνή βιβλιογραφία για την ανάλυση διαφορετικών ειδών μελιού (ανθόμελα και μελιτώματα)	38
Πίνακας 4: Μελέτη παραγόντων για την βελτιστοποίηση της τεχνικής HS – SPME, Vac HS – SPME	52
Πίνακας 5: Παράμετροι μεθόδου αυτόματου δειγματολήπτη για την εκχύλιση-απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων από δείγματα θυμαρίσιου μελιού με περιοχή προέλευσης τα Χανιά.....	52
Πίνακας 6: Παράμετροι μεθόδου αέριας χρωματογραφίας (GC) για την εκχύλιση-απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων από δείγματα θυμαρίσιου μελιού με περιοχή προέλευσης τα Χανιά.....	53
Πίνακας 7: Παράμετροι μεθόδου φασματομετρίας μάζας (MS) για την εκχύλιση-απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων από δείγματα θυμαρίσιου μελιού με περιοχή προέλευσης τα Χανιά.	53
Πίνακας 8: Σύσταση του μείγματος αλκανίων που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του δείκτη Kovats κατά την ταυτοποίηση των ενώσεων στόχων που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού.....	54
Πίνακας 9: Βέλτιστες συνθήκες για την μέθοδο HS – SPME με συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και για την μέθοδο HS – SPME με συνθήκες κενού	55
Πίνακας 10: Σύνοψη των χημικών ενώσεων που υποδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού. Παράθεση πληροφοριών όπως η χημική κατηγορία, ο μοριακός τύπος, αριθμός CAS, χρόνος κατακράτησης (R.T), θεωρητική και πειραματική τιμή του δείκτη συγκράτησης Kovats (R.I lib και R.I exp) και σύνοψη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (πτητικότητα, μοριακό βάρος, σταθερά Henry, δείκτες logk _{ow} , logk _{oa} , σημείο βρασμού) των χημικών ενώσεων που υποδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού	58
Πίνακας 11: Λόγοι εμβαδών των ενώσεων από τις τεχνικές HS – SPME και Vac HS – SPME (Vac HS – SPME / HS – SPME).....	70

Πίνακα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Γραφική αναπαράσταση της μορφής που έχει η καμπύλη για τον χρόνο εκχύλισης ενώσεων με χαμηλή ταχύτητα εξάτμισης στον υπερκείμενο χώρο (low affinity for the headspace) κατά την επικράτηση συνθηκών κενού (διακεκομμένες γραμμή) και κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης (συνεχόμενη γραμμή). Το διάγραμμα αυτό δείχνει την επίδραση του κενού όταν η δειγματοληψία HS – SPME πραγματοποιείται σε στάδιο προ-ισορροπίας (pre-equilibrium) και ισορροπίας (equilibrium) (Psillakis, 2017).....	41
Διάγραμμα 2: Οι πτητικές ενώσεις Nonanal και Decanal για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί).....	63
Διάγραμμα 3: Οι πτητικές ενώσεις Phenethyl alcohol και Nonanoic acid, ethyl ester για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)..	64
Διάγραμμα 4: Οι πτητικές ενώσεις Carvacrol και 3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)..	65
Διάγραμμα 5: Η πτητική ένωση Benzaldehyde για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί).....	66
Διάγραμμα 6: Η πτητική ένωση Benzeneacetaldehyde για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί).....	66
Διάγραμμα 7: Η πτητική ένωση .beta.-Damascenone για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί).....	67
Διάγραμμα 8: Παρουσίαση του πτητικού προφίλ του δείγματος θυμαρίσιου μελιού Α και της πτητικής ένωσης Benzeneacetaldehyde σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) σε θερμοκρασία 60 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min και σε συνθήκες κενού (πορτοκαλί) σε θερμοκρασία 45 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min	68
Διάγραμμα 9: Λόγοι των εμβαδών των ενώσεων από τις τεχνικές Vac HS – SPME και HS – SPME (Vac HS – SPME / HS – SPME)	70
Διάγραμμα 10: Πτητικό προφίλ ενώσεων-στόχων για την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού για τα δείγματα Β, Γ και Δ . Η απομόνωση των ενώσεων έγινε με την χρήση της HS-SPME, σε θερμοκρασία 60 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min	73
Διάγραμμα 11: Ρυθμός Εκχύλισης της ένωσης – μάρτυρα Benzeneacetaldehyde στα 4 δείγματα θυμαρίσιου μελιού, η απομόνωση της οποίας επιτευχθεί με την χρήση της HS-SPME, σε θερμοκρασία 60 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min	73

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολούνται με την ανάλυση ποικίλων τροφίμων, με γνώμονα την χρήση όσο το δυνατόν περισσότερο οικολογικών μεθόδων. Η παρούσα διπλωματική αναφέρεται στο μέλι, τη διατροφική του αξία και τη γεωγραφική και βοτανική του προέλευση. Συγκεκριμένα εστιάζει στην ανάλυση του πτητικού προφίλ δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού με τη χρήση της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vacuum assisted headspace solid phase microextraction; Vac HS – SPME) και τη σύγκρισή της με την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Headspace solid phase microextraction; HS – SPME). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου (Vac HS – SPME) αποτελεί η επιτάχυνση του χρόνου εκχύλισης. Επιπλέον, είναι μια διαδικασία απλή και γρήγορη διότι οι όγκοι των δειγμάτων που τίθενται για ανάλυση είναι μικροί. Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν ως παράμετροι η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης και η επίδραση του κενού. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (HS – SPME) και υπό κενό (Vac HS – SPME) σε δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α από το νομό Χανίων. Με τη μείωση της πίεσης επιτυγχάνεται η αύξηση της κινητικής και ελαττώνεται η αντίσταση μεταφοράς ενώσεων από τη στερεά στην αέρια φάση. Ως βέλτιστες συνθήκες για την HS – SPME θεωρήθηκαν η θερμοκρασία ίση με 60 °C και ο χρόνος εκχύλισης ίσος με 40 min. Για την Vac HS – SPME, ως βέλτιστες συνθήκες θεωρήθηκαν η θερμοκρασία ίση με 45 °C και ο χρόνος εκχύλισης ίσος με 40 min. Επιπλέον αναλύθηκαν δείγματα θυμαρίσιου μελιού Β, Γ και Δ από το νομό Χανίων με τη χρήση της μεθόδου HS – SPME με στόχο τη σύγκριση τους με το δείγμα Α. Επιπροσθέτως έγιναν αναλύσεις και σε διαφορετικά είδη μελιού και πιο συγκεκριμένα σε δείγματα μελιού βελανιδιάς, πορτοκαλιάς και κουμαριάς από το νομό Άρτας με σκοπό τον ποιοτικό χαρακτηρισμό και τη σύγκριση του προφίλ πτητικών ενώσεων μεταξύ αυτών και του θυμαρίσιου μελιού. Συμπερασματικά, η μέθοδος Vac HS – SPME έχει καλύτερη απόδοση εκχύλισης και παράλληλα οι συνθήκες κενού βοήθησαν στην ταυτοποίηση περισσότερων ενώσεων – μαρτύρων και κυρίως απαιτεί λιγότερο χρόνο εκχύλισης για να βρεθεί το ίδιο αποτέλεσμα.

Abstract

In recent years, more and more researchers have been involved in the analysis of a variety of foods, with a view to using as ecological methods as possible. This thesis is about honey, its nutritional value as well as its geographical and botanical origin. In particular, it focuses on the analysis of the volatile profile of thyme honey samples using the Vacuum assisted headspace solid phase microextraction (Vac HS – SPME) method and its comparison with the Headspace Solid Phase Microextraction (HS – SPME) method under atmospheric pressure. The main advantage of this method (Vac HS – SPME) is the acceleration of the extraction time. In addition, it is a simple and fast procedure because the volumes of samples put up for analysis are small. In this work, temperature, extraction time and the effect of vacuum were studied as parameters. Furthermore, an optimization of the solid phase microextraction method in the supernatant space under atmospheric pressure (HS – SPME) and vacuum (Vac HS – SPME) conditions was carried out on a sample of thyme honey A. By reducing the pressure, an increase of kinetics is achieved and the resistance of compound transfer from the solid to the gas phase is reduced. The optimum conditions for HS – SPME were considered to be a temperature equal to 60 °C and an extraction time equal to 40 min. For Vac HS – SPME, the optimum conditions were considered to be a temperature equal to 45 °C and an extraction time equal to 40 min. In addition, samples of thyme honey B, C and D from the prefecture of Chania were analysed using the method HS – SPME in order to compare them with sample A. Moreover, analyses were also performed on different types of honey and more specifically on samples of oak, orange and arbutus honey from the prefecture of Arta in order to compare and characterize the quality of the volatile compounds profile between those and thyme honey. In conclusion, the Vac HS – SPME method has better extraction efficiency and at the same time the vacuum conditions helped to identify more target compounds and, more importantly, requires less extraction time to achieve the same result.

1. Εισαγωγή

1.1. Το μέλι

Από τους αρχαίους χρόνους, το μέλι παρουσιάζεται ως μια σημαντική θρεπτική φυσική ουσία και συμπεριλαμβάνεται στην διατροφή πολλών πολιτισμών. Η παραγωγή του μελιού γίνεται από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera*, οι οποίες συλλέγουν νέκταρ φυτών (λουλουδιών) ή εκκρίσεις μελιτώματος και το μετατρέπουν μέσω της ανάμιξης του με ειδικές ύλες του σώματος τους. Έπειτα γίνεται η απόθεση, η αφυδάτωση, η εναπόθεση και η φύλαξη του στις κηρήθρες της κυψέλης έτσι ώστε να γίνει η ωρίμανση του (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014; Σπύρου Κωνσταντίνα, 2021).

Το μέλι αποτελεί ένα προϊόν που καταναλώνεται σε όλο τον κόσμο εξαιτίας της διατροφικής και θεραπευτικής του αξίας. Το κάθε είδος μελιού έχει αποκτήσει τις ιδιότητές του από τη βοτανική και γεωγραφική προέλευσή του. Είναι πολύ σημαντικό να διασφαλιστεί η αυθεντικότητα και η ποιότητα του μελιού αλλά και να αναγνωριστεί κάποια περίπτωση πιθανής απάτης καθώς και να αποθαρρυνθεί η κερδοσκοπία. Η βιολογική αξία του μελιού οφείλεται στη παρουσία των σακχάρων, αμινοξέων, ενζύμων, οργανικών οξέων, βιταμινών, μετάλλων, φαινολών και πτητικών ενώσεων (Vazquez et al., 2021).

1.1.1. Διατροφική αξία και ανθρώπινη υγεία

Το μέλι είναι ένα προϊόν πλούσιο σε συστατικά και ουσίες, γεγονός που το αναδεικνύει ως μια από τις πιο θρεπτικές τροφές. Το νερό αποτελεί ένα από τα πιο βασικά συστατικά του μελιού σε ποσοστό 14-20%, αλλά το μεγαλύτερο μέρος του μελιού καταλαμβάνουν τα φυσικά σάκχαρα όπως η φρουκτόζη, η γλυκόζη και η σακχαρόζη σε ποσοστό 75-85%. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες, τα ιχνοστοιχεία, τα ένζυμα αλλά και οι βιταμίνες (σε μικρές ποσότητες) είναι συστατικά που συμβάλουν στην διάκριση του μελιού για την άριστη θρεπτική αξία του. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι περιεχόμενες ουσίες του μελιού συμβιώνουν με καθορισμένες βέλτιστες αναλογίες αλλά όπως επίσης και ο τρόπος που επιδρούν στον οργανισμό του ανθρώπου (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

Το μέλι έχει θεσπιστεί ως προϊόν της Μεσογειακής δίαιτας, η οποία είναι ευρέως γνωστή και συντελεί στην υγεία και μακροζωία των ανθρώπων. Η πλειοψηφία των μελισσιών στην Ευρώπη βρίσκονται στην Ελλάδα, στην Ισπανία και στη Γαλλία, με την Ελλάδα να κατέχει τη μεγαλύτερη πυκνότητα μελισσών ανά μονάδα επιφάνειας εδάφους στην Ευρώπη. Σε διεθνές επίπεδο η Ελλάδα επιδιώκει μια από τις πρώτες θέσεις σε μελίσινα αλλά και σε παραγωγή μελιού, αναλογικά με τον πληθυσμό και την έκταση της (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

Οι μέλισσες συμβάλλουν στη διατήρηση των οικοσυστημάτων και της βιοποικιλότητας καθώς επιτυγχάνουν την αναπαραγωγή των φυτών μέσω της επικονίασης. Επιπλέον, διατηρούν την επικονιαστική αποθήκη του πλανήτη σε σημαντικό βαθμό γεμάτη ενώ οι αγριομέλισσες μειώνονται δραστικά εξαιτίας των ανθρώπινων δραστηριοτήτων.

Η παραγωγή μελιού στην Ευρώπη γίνεται σε όλες τις χώρες με διαφορετικές συνθήκες παραγωγής, αποδόσεις και μελισσοκομικές πρακτικές. Οι χώρες στη νότια Ευρώπη (Ρουμανία, Ισπανία, Ουγγαρία, Γερμανία, Ιταλία, Ελλάδα, Γαλλία και Πολωνία) παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες μελιού καθώς το κλίμα και οι συνθήκες επηρεάζουν ευνοϊκά τη μελισσοκομία. Η Ευρωπαϊκή Ένωση βρίσκεται στη δεύτερη θέση στην παραγωγή μελιού, το 2022 μετά την Κίνα, με περίπου 218.000 τόνους μελιού.

Στην Ελλάδα υπάρχουν πάρα πολλά μελίσσια με τη πλειοψηφία να είναι εγκατεστημένα σε ευρωπαϊκές πλαισιοκυψέλες και το υπόλοιπο σε εγχώριες διαφόρων τύπων. Παρόλο που η μελισσοκομία είναι διαδεδομένη σε όλη τη χώρα, κάποιες περιοχές όπως η Χαλκιδική, η Καβάλα, η Φθιώτιδα, η Εύβοια, η Αττική, η Αρκαδία, το Ηράκλειο και τα Χανιά έχουν αυξημένο μελισσοκομικό ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, η Μακεδονία αποτελεί τη περιοχή με τις περισσότερες μελισσοκομικές μονάδες, το μεγαλύτερο αριθμό μελισσιών, τη μεγαλύτερη παραγωγή μελιού καθώς και τους περισσότερους επαγγελματίες μελισσοκόμους (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

Η ποιότητα του Ελληνικού μελιού είναι υψηλή κυρίως εξαιτίας του ξηροθερμικού κλίματος που επικρατεί στο μεγαλύτερο μέρος της χώρας που βοηθά την ανάπτυξη διαφόρων μελισσοκομικών φυτών κυρίως αρωματικών που δίνουν στο μέλι υψηλή γευστική αξία. Το Ελληνικό μέλι παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα που το καθιστά ξεχωριστό σε γεύση και άρωμα. Η ιδιομορφία αυτή του Ελληνικού μελιού οφείλεται στη σχετικά μικρή απόδοση των κυψελών, παρά την μεγάλη πυκνότητα αυτών στη χώρα μας, γεγονός που αποδίδεται στην μοναδική χλωρίδα και στο διαφορετικό μικροκλίμα.

Ποικίλες μελέτες παρουσιάζουν το μέλι ως προϊόν που είναι σημαντικό για την υγεία του ανθρώπου εξαιτίας λειτουργικών ιδιοτήτων που οφείλονται στη χλωρίδα από όπου προέρχεται το κάθε είδος μελιού. Παράγοντες βιολογικοί, φυτικοί και κλιματολογικοί επηρεάζουν την σύνθεση των δραστικών συστατικών στα φυτά. Οι ιδιότητες αυτές πιθανόν συνδέονται με την υψηλή οσμωτική ικανότητα του μελιού, την υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, τις αντιμικροβιακές ιδιότητες και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η αντιβακτηριδιακή ικανότητα του μελιού ωφελεί τον άνθρωπο στη θεραπεία εγκαυμάτων, γαστρεντερικών διαταραχών, κρίσεων άσθματος, στη αντιμετώπιση μολυσμένων και μακριάς διάρκειας πληγών καθώς και δερματικών ελκών, καταρράκτη αλλά και άλλων οφθαλμικών παθήσεων (Καρούσου Δήμητρα, 2019).

1.1.2. Κατηγορίες μελιού

Το μέλι διαχωρίζεται με βάση την προέλευση ή τον τρόπο παραλαβής του. Το μέλι χωρίζεται σε δυο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση του, στο μέλι ανθέων (ανθόμελο) ή μέλι νέκταρος και στο μέλι μελιτώματος. Το μέλι ανθέων είναι το μέλι που παρασκευάζεται από το νέκταρ των λουλουδιών και μπορεί να είναι είτε αμιγώς καθαρό είτε μείγμα από νέκταρ πολλών λουλουδιών. Όταν το μέλι ανθέων έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά επονομάζεται από το φυτό από το οποίο προέρχεται. Μέλια ανθέων είναι το θυμαρίσιο μέλι, της πορτοκαλιάς, της ερείκης, του ηλίανθου, του βαμβακιού, της καστανιάς κ.α. Το μέλι μελιτώματος παρασκευάζεται από τα εκκρίματα εντόμων που εντοπίζονται πάνω στα ζωντανά μέρη των φυτών ή εκκρίσεις προερχόμενες από ζώντα μέρη των φυτών. Το μέλι πεύκου και ελάτου αποτελούν είδη μελιού μελιτώματος (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

Πιο αναλυτικά, το μέλι ανθέων παρουσιάζεται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας και μάλιστα κατέχει το 20% της παραγωγής της χώρας. Το χρώμα του είναι ανοιχτό κίτρινο προς καφέ, έχει βελούδινο άρωμα, γλυκιά γεύση και κρυσταλλώνεται σε 4 με 6 μήνες.

Είδος μελιού (ανθόμελου)	Χαρακτηριστικά
Θυμαρίσιο μέλι	<p>Το θυμαρίσιο μέλι έχει άριστη ποιότητα εξαιτίας του ιδιαίτερου αρώματος και της ξεχωριστής γεύσης του.</p> <p>Αποτελεί είδος μελιού με μικρό ποσοστό εγχώριας παραγωγής ίσο με 10%. Παράγεται κυρίως σε νησιά καθώς και σε ηπειρωτικές περιοχές όπου φυτρώνουν ποικίλα είδη θυμαριού.</p> <p>Ένα χαρακτηριστικό που προσδιορίζει το θυμαρίσιο μέλι είναι τα μεγάλα ποσοστά του ενζύμου διαστάσης και προλίνης. Στο θυμαρίσιο μέλι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, δηλαδή τα σάκχαρα, περιέχονται σε ποσοστό μικρότερο από 60%.</p> <p>Έχει ιδιαίτερη και ευχάριστη γεύση. Εξαιτίας των μεγάλων συγκεντρώσεων φρουκτόζης, το θυμαρίσιο μέλι αφήνει μια αίσθηση «καυσίματος» στο λάρυγγα.</p> <p>Το θυμαρίσιο μέλι είναι τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες καθώς και ενισχύει την ενεργητικότητα και τις ανθρώπινες φυσικές δυνάμεις. Είναι ανοιχτόχρωμο, έχει ιδιαίτερο και εξαιρετικό άρωμα και η διάρκεια κρυστάλλωσης του είναι από 6 μέχρι 18 μήνες σχετικά με τον αμιγή χαρακτήρα του μελιού.</p>
Μέλι Ερείκης	<p>Στην Ελλάδα φύονται τέσσερις ποικιλίες φυτών ερείκης που παράγουν διαφορετικούς τύπους μελιού.</p> <p>Αρχικά υπάρχει η φθινοπωρινή ερείκη '<i>Erica Verticillata</i>', η οποία παράγει σημαντικές ποσότητες σκουρόχρωμου μελιού σε πολλές περιοχές της χώρας με υψηλή θρεπτική αξία.</p> <p>Έπειτα υπάρχει η ανοιξιότικη ερείκη '<i>Erica arborea</i>', η οποία έχει ανοιχτό χρώμα και περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης.</p> <p>Γενικά, το μέλι ερείκης έχει χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα με ιδιαίτερη γεύση και άρωμα και το χρονικό διάστημα κρυστάλλωσης είναι μεταξύ 1 και 3 μηνών.</p> <p>Ακόμη υπάρχει η Κουμαριά '<i>Arbutus unedo</i>' και του Ροδόδεντρο '<i>Rhododendron</i>'.</p>
Μέλι Κουμαριάς	<p>Για τα μελίσσια είναι θρεπτικό και τονωτικό, ωστόσο για τους ανθρώπους έχει πικρή γεύση και μικρή εμπορική αξία. Δεν γίνεται συγκομιδή του μελιού από τις κυψέλες, αντίθετα παραμένει στη κυψέλη ως απόθεμα για το χειμώνα.</p>

Μέλι Ροδόδεντρου	<p>Το μέλι αυτό περιέχει 400 διαφορετικά είδη. Στην Ελλάδα παράγεται από τα φυτά Αζαλέα, Κάλμια και Ασκληπία πριν ωριμάσουν και προμηθεύουν μια ουσία, την ανδρομεδοτοξίνη, η οποία είναι τοξική για τον άνθρωπο καθώς και για τις μέλισσες. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του μελιού η τοξίνη αυτή απαλείφεται.</p>
Μέλι Ηλίανθου	<p>Η παραγωγή του μελιού ηλίανθου γίνεται από το νέκταρ του <i>Helianthus annuus</i> L. Το είδος αυτό ευημερεί σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τις υψηλές τιμές παραγωγής που φτάνει μέχρι και τα 40 κιλά ανά μελίσσι, ενώ η εμπορική του αξία δεν είναι μεγάλη. Έχει βουτυρένια γεύση αλλά εξαιτίας των μεγάλων συγκεντρώσεων υγρασίας έχει ως αποτέλεσμα να ξινίζει σχετικά εύκολα. Σημαντικό είναι ότι περιέχει σημαντική ποσότητα πολυφαινόλων, που είναι σπουδαίες για την ανθρώπινη διατροφή. Παρουσιάζει ευαισθησία στη θέρμανση λόγω της μικρής συγκέντρωσης του ενζύματος διασάση. Επειδή έχει μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης παρουσιάζεται ανομοιομορφη κρυστάλλωση.</p>
Μέλι Καστανιάς	<p>Αποτελεί την εξαίρεση των ανθόμελων καθώς σύμφωνα με την Ε.Ε. έχει χαρακτηριστικά μελιτώματος. Παράγεται από νέκταρ αλλά και από μελιτώδεις εκκρίσεις του φυτού <i>castanea sativa</i>. Οι μελιτώδεις εκκρίσεις λαμβάνουν μέρος στο χρονικό διάστημα από το Μάιο έως τον Ιούλιο. Χαρακτηριστικά του είναι οι υψηλές τιμές pH, αγωγιμότητας τέφρας και συγκεντρώσεων ενζύμων. Το χρώμα αλλάζει με βάση τη περιοχή από την οποία προέρχεται, από ανοιχτό καφέ σε σκούρο καφέ και μαύρο όταν πρόκειται για μελίτωμα. Η γεύση όπως και η οσμή του είναι έντονη και πικρή.</p>
Μέλι Εσπεριδοειδών	<p>Είναι αρωματικό μέλι και κρυσταλλώνει γρήγορα. Χαρακτηριστικό του μελιού εσπεριδοειδών είναι η μικρή περιεκτικότητα συγκέντρωσης του ενζύμου διάσαση.</p>
Μέλι Πορτοκαλιάς	<p>Καταλαμβάνει περίπου το 10% της παραγωγής μελιού στην Ελλάδα. Έχει ιδιαίτερη γεύση και έντονο άρωμα ενώ έχει ανοιχτό χρώμα και επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα η κρυστάλλωση του.</p>

Μέλι Ασφάκας	<p>Το μέλι Ασφάκας παράγεται σε μικρές ποσότητες, κυρίως στις δυτικές περιοχές της Ελλάδας.</p> <p>Χαρακτηριστικά του είναι το ιδιαίτερο κίτρινο χρώμα, η γλυκιά του γεύση και το ελαφρύ του άρωμα.</p> <p>Η χρονική διάρκεια της κρυστάλλωσης του είναι 4 με 6 μήνες.</p>
Μέλι Βαμβακιού	<p>Συμπεριλαμβάνεται στις καθαρές κατηγορίες μελιού της Ελλάδας. Το είδος αυτό παράγεται από το νέκταρ των ανθέων αλλά και από εκκρίσεις μελιτώματος διάφορων εντόμων που παρασιτούν στο φυτό.</p> <p>Χαρακτηριστικά του μελιού από βαμβάκι είναι η υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, η χαμηλή συγκέντρωση γυρεόκοκκων (2-7%) και οι πολλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου που συνεισφέρουν στην σπουδαία βακτηριοκτόνο δράση σε σχέση με άλλες ποικιλίες μελιού.</p> <p>Ως ανθόμελο έχει ανοιχτό χρώμα και στη διάρκεια της κρυστάλλωσης του μετατρέπεται σε γαλακτόχρωμο με ιδιαίτερη βουτυρένια γεύση.</p>
Είδος μελιού (μέλι μελιτώματος)	Χαρακτηριστικά
Μέλι Βαμβακιού	<p>Ως μέλι μελιτώματος, το μέλι βαμβακιού είναι ανοιχτόχρωμο σε αντίθεση με το χρώμα που έχουν συνήθως τα μέλια μελιτώματος. Επίσης κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης του μετατρέπεται σχεδόν σε άχρωμο.</p>

<p>Μέλι Πεύκου</p>	<p>Στην Ελλάδα το μέλι που παράγεται περισσότερο ετησίως είναι το πευκόμελο σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%.</p> <p>Παράγεται από τις μελιτώδεις εκκρίσεις του εντόμου 'Marchalina hellenica' που είναι γνωστό και ως «παράσιτο» του πεύκου. Εμφανίζεται σε αρκετές περιοχές της χώρας όπως η Θάσος, η Χαλκιδική, η Εύβοια, η Σκόπελος, η Σκιάθος, η Ζάκυνθος, η Ρόδος, η Κρήτη κ.α.</p> <p>Το χρώμα του αλλάζει με βάση τη εποχή που παράγεται. Την Άνοιξη έχει ανοιχτό και διαυγές χρώμα με χαρακτηριστικό άρωμα. Στο ίζημα που δημιουργείται βρίσκονται γυρεόκοκκοι πεύκου.</p> <p>Εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητας του σε γλυκόζη, το μέλι του πεύκου αργεί να κρυσταλλώσει. Τα καθαρά πευκόμελα διατηρούν τη ρευστή μορφή τους για σημαντικό χρονικό διάστημα, μεγαλύτερο από ενάμιση χρόνο. Στη περίπτωση μη αμιγούς πευκόμελου, δηλαδή που έχει αναμειχθεί με άλλα είδη μελιού όπως ερείκης, βαμβακιού και ηλίανθου, η κρυστάλλωση του επιτυγχάνεται σε 2 με 5 μήνες.</p> <p>Έχει σπουδαία θρεπτική αξία εξαιτίας των ποικίλων ουσιών που περιέχει με υψηλές συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων, γεγονός που καθιστά τα Ελληνικά πευκόμελα σπουδαία και ύψιστης θρεπτικής αξίας.</p>
<p>Μέλι Ελάτου</p>	<p>Στη χώρα μας το γνώριμο είδος ελάτης είναι η ελάτη η κεφαλληνιακή 'Abies Cephalonia' και εντοπίζεται κυρίως στα νότια του Ολύμπου, στην Ευρυτανία, στο Περιούλι, στο Καρπενήσι, στον Ταΰγετο, στην Αρκαδία, στην Πάρνηθα και σε άλλα μέρη.</p> <p>Τα πιο σημαντικά έντομα από τα οποία συλλέγονται τα μελιτώματα και οι εκκρίσεις για την παραγωγή του μελιού από έλατο ονομάζονται 'Physokermes hemicryphus'. Το έντομο αυτό παρασιτεί και στην κεφαλληνιακή ελάτη και συνεισφέρει σε καλύτερη απόδοση παράγοντας έως και 30 κιλά μέλι σε κάθε μελίσσι.</p> <p>Το μέλι αυτό διαφέρει λόγω της ιδιαίτερης γεύσης και εμφάνισης του, όμως αλλάζει ανάλογα με τη περιοχή από όπου προέρχεται.</p> <p>Χαρακτηριστικό του είναι ότι έχει μεγαλύτερη τιμή pH σε σχέση με άλλες κατηγορίες μελιού. Είναι πιθανή μια αλλοίωση του εξαιτίας του αργού ρυθμού συγκριτικά με άλλα είδη αλλά κυρίως με τα ανθόμελα που έχουν μικρή τιμή pH.</p>

Μέλι Βελανιδιάς	<p>Παράγεται κυρίως δυτικά της Μακεδονίας και μαζεύεται στο χρονικό διάστημα από το μήνα Ιούνιο μέχρι τον Αύγουστο.</p> <p>Χαρακτηριστικά του είναι το ιδιαίτερο σκούρο χρώμα που μπορεί να μετατραπεί και σε μαύρο, το έντονο άρωμα του, η ήπια στυφή του γεύση και η υψηλή περιεκτικότητα σε ιχνοστοιχεία.</p> <p>Η κρυστάλλωση του μελιού της Βελανιδιάς είναι αρκετά αργή, συνήθως ξεκινά δύο χρόνια μετά την αποκομιδή του.</p>
-----------------	--

Πίνακας 1: Κατηγορίες μελιού και χαρακτηριστικά της κάθε κατηγορίας

(Δαμιανός Δημήτριος, 2018; Καραμπουρνιώτη Σοφία, 2008; Σπύρου Κωνσταντίνα, 2021)

Το μέλι χωρίζεται σε άλλες δυο κατηγορίες, τα μονοφθαλικά και τα πολύφυλλα ή πολυφθαλικά. Τα μονοφθαλικά μέλια παράγονται από μέλισσες που καταναλώνουν ένα είδος φυτού και επονομάζεται από το όνομα του φυτού αυτού. Τα πολύφυλλα ή πολυφθαλικά μέλια παράγονται από αρκετά φυτά που κανένα από αυτά δεν υπερτερεί, όπως το μέλι του δάσους ή το μέλι των ανθισμένων λιβαδιών. (Σπύρου Κωνσταντίνα, 2021)

1.1.3. Μελισσοκομία

Η μελισσοκομία αποτελεί κλάδο της εντομολογίας που μελετά τη ζωή της μέλισσας (*Apis mellifera* L.) και ονομάζεται η τέχνη της εκτροφής των μελισσών. Η μελισσοκομία καθίστανται αναγκαία για το περιβάλλον αφενός γιατί παρέχει ωφέλιμα προϊόντα και αφετέρου διότι μέσω της επικονιαστικής της δράσης, οι μέλισσες ενισχύουν τη γονιμοποίηση των φυτικών ειδών σε ποσοστό 60-70%. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι αυτές οι δράσεις της μέλισσας δίνουν στη φύση πολύ μεγαλύτερο όφελος από τη συνολική αξία των προϊόντων της μελισσοκομίας. Έτσι, είναι φανερό ότι η μελισσοκομία είναι μια από τις λίγες οικονομικές ανθρώπινες δραστηριότητες που συμβάλει στην σωστή διαχείριση των φυσικών πόρων και είναι φιλική προς το περιβάλλον. Επιπλέον, η μέλισσα κρίνεται ως το πιο σημαντικό έντομο στο πλανήτη καθώς εκτός από τις παραπάνω προσφορές της, έχει γίνει εκτίμηση της οικονομικής συνδρομής της στην ΕΕ λόγω της επικονίασης της και η τιμή φτάνει τα 4250 εκατομμύρια (Δαμιανός Δημήτριος, 2018).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η Ασία είναι η χώρα με τη μεγαλύτερη παραγωγή μελιού στον κόσμο. Δεύτερη θέση στη λίστα καταλαμβάνει η Ευρώπη και έπειτα ακολουθεί η Αμερική. Η Ευρωπαϊκή Ένωση κατέχει την πρώτη θέση στην αγορά εισαγωγής μελιού παγκοσμίως ενώ αντίθετα η Κίνα είναι η κυρίαρχη χώρα εξαγωγής μελιού σε όλο τον κόσμο. Πολύ σημαντικό γεγονός είναι ότι έχει αυξηθεί εκθετικά η κατανάλωση φυσικών προϊόντων και ως αποτέλεσμα το μέλι έχει αξιοσημείωτη θέση στη διαίτα των ανθρώπων.

Η μελισσοκομία στην Ελλάδα υπάρχει από τα παλιά χρόνια και αποτελεί μια σπουδαία συνιστώσα στην οικονομία της χώρας. Η Ελλάδα είναι μια χώρα η οποία έχει τις κατάλληλες κλιματολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες που σε συνδυασμό με τη μεγάλη ποικιλία σε χλωρίδα οδήγησαν στην εξέλιξη του μελισσοκομικού κλάδου. Η μελισσοκομία είναι ευρέως διαδεδομένη στην περιοχή της Χαλκιδικής, η οποία καλύπτει το 1/5 της Ελληνικής παραγωγής. Οι περιοχές που ακολουθούν έπειτα από τη Χαλκιδική είναι η Καβάλα, η Θάσος, η Φθιώτιδα, η Εύβοια, τα νησιά του Αιγαίου, η Αττική, η Αρκαδία, το Ηράκλειο και τα Χανιά (Παπανικολάου Νικόλαος, n.d.).

Στην Ελλάδα η παραγωγή του μελιού ανέρχεται περίπου σε 15 χιλιάδες τόνους που αντιστοιχεί στο 15% της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Αντίθετα οι Έλληνες καταναλώνουν περίπου 1,5 κιλό έκαστος ενώ στην Αμερική καταναλώνουν οι πολίτες περίπου 400 γρ. κατά κεφαλήν. Έτσι προκύπτει ότι η παραγωγή του μελιού στην Ελλάδα έχει ευδοκιμήσει πολύ συγκριτικά με τη παγκόσμια αγορά. (Παπανικολάου Νικόλαος, n.d.).

1.2. Παλυνολογία (Palynology) – Μελισσοπαλυνολογία (melissopalynology)

«Παλυνολογία (palynology) ονομάζεται η επιστήμη που αφοσιώνεται στη μελέτη των γυρεόκοκκων και των σπορίων». Η λέξη παλυνολογία προκύπτει ετυμολογικά από το ελληνικό ρήμα «παλύνω» που υποδηλώνει «αλείφω» ή «πασπαλίζω» και έγινε χρήση αυτής της λέξης για πρώτη φορά από τους Hyde and Williams το 1944. Οι γυρεόκοκκοι έχουν τη δυνατότητα να εκμεταλλευθούν ως δείκτης με αποτέλεσμα να παρέχεται η δυνατότητα μελέτης της φυτογεωγραφίας του παρελθόντος, της εξέλιξης των φυτών και του κλίματος, των χαρακτηριστικών του εδάφους, των αλλεργιών και τη σχέση μεταξύ εντόμων και φυτών (Καραμπουρνιώτη Σοφία, 2008).

«Μελισσοπαλυνολογία (melissopalynology) ονομάζεται ο κλάδος της παλυνολογίας που εστιάζεται στη βοτανική και γεωγραφική προέλευση του μελιού μελετώντας την περιεχόμενη γύρη και άλλα χαρακτηριστικά που βρίσκονται στο ίζημα του μελιού με μικροσκοπική ανάλυση». Ο Pfister ήταν ο πρώτος που μίλησε για την ανάλυση των γυρεόκοκκων στο μέλι και περιεργάστηκε το φάσμα των γυρεόκοκκων σε μια πληθώρα ευρωπαϊκών μελιών. Η μελισσοπαλυνολογική ανάλυση έχει εξακριβωθεί ότι είναι σπουδαία σε συσχέτιση με άλλα αναλυτικά κριτήρια, με πιο σημαντική την οργανοληπτική εξέταση για την κατάταξη του μελιού (Καραμπουρνιώτη Σοφία, 2008).

1.3. Γεωγραφική και βοτανική προέλευση μελιού – Αυθεντικότητα μελιού

Από παλιά επιλέγονταν η τεχνική της Μελισσοπαλυνολογίας (Melissopalynology) για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της βοτανικής προέλευσης του μελιού. Μελισσοπαλυνολογία είναι η εξέταση της γύρης, που περιέχεται στο μέλι μέσω μικροσκοπικής εξέτασης.

Τα βασικά μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλη χρονική διάρκεια που απαιτείται, οι εξειδικευμένες γνώσεις που χρειάζονται καθώς και η απαραίτητη εμπειρία. Επιπλέον, η διεργασία κατά την οποία καταμετρούνται οι κόκκοι της γύρης είναι επίπονη, κάτι το οποίο επιφέρει δυσχέρεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της διάκρισης των φυτικών ποικιλιών. Για να βρεθεί η βοτανική προέλευση του μελιού, είναι απαραίτητη η σχετική συχνότητα της γύρης από τα φυτά που εκκρίνουν νέκταρ. Οι απόψεις δίστανται σχετικά με τη χρήση της υφιστάμενης γύρης στο μέλι ως στόχο για τον προσδιορισμό της βοτανικής του προέλευσης. Σύμφωνα με τον Molan, η δράση των μελισσών και οι μολύνσεις από τις εργασίες των μελισσοκόμων έχουν τη δυνατότητα να μεταβάλλουν το περιεχόμενο της γύρης, γεγονός που δεν καθιστά τη μέθοδο αυτή την καλύτερη δυνατή. Επίσης, μέσω αυτής της τεχνικής δεν υπάρχει δυνατότητα να γίνει ταυτοποίηση της φυτικής προέλευσης ειδών μελιού από φυτά βαμβακιού ή “castor oil”. Ένα ακόμα είδος μελιού που δεν είναι εύκολη η μικροσκοπική ανάλυση της γύρης αποτελεί το Ελληνικό μέλι εσπεριδοειδών. Αυτό το πρόβλημα έγκειται στη μεγάλη ομοιότητα κάποιων γυρεόκοκκων.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια για να βρεθεί η κατάλληλη μέθοδος για να γίνεται ο προσδιορισμός της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης του μελιού είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με τη μικροσκοπική ανάλυση. Κάποια ασφαλή κριτήρια που κοντεύουν να θεσπιστούν συμπεριλαμβάνουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως σάκχαρα (μονοσακχαρίτες και ολιγο-σακχαρίτες), αμινοξέα και πρωτεΐνες, οργανικά οξέα, πτητικά συστατικά, φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά συστατικά, μέταλλα, ιχνοστοιχεία, κ.α.

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), η Αέρια Χρωματογραφία (GC), η Αέρια Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματοσκοπία μαζών (GC/MS), η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης / Φασματοσκοπία μαζών (LC/MS), η Φασματοσκοπία μαζών Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP/MS), η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), η Φασματοσκοπία λόγου Ισοτόπων (IRMS), η Φασματοσκοπία Υπέρυθρου (FTIR) και η Φασματοσκοπία Φθορισμού αποτελούν ενόργανες τεχνικές που επιλέγονται για το προσδιορισμό της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης των τροφίμων (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

Το φυσικό μέλι κατέχει κάποια χαρακτηριστικά τα οποία παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη γεωγραφική και βοτανική του προέλευση. Τα ανθόμελα εμπεριέχουν γυρεόκοκκους σε διάφορες ποσότητες που μπορούν να αναγνωριστούν στο ίζημα του δείγματος και έτσι να γίνει η αντιστοίχιση αυτών με τα φυτικά είδη της περιοχής παραγωγής του μελιού. Υπάρχει πιθανότητα, το μέλι να προέρχεται από ένα ή περισσότερα φυτά και συνεπώς να αποτελείται από μίγμα γυρεόκοκκων οι οποίοι καθίστανται δείκτες προέλευσης του.

Ποικίλες γεωγραφικές περιοχές χαρακτηρίζουν ιδιαίτερους συνδυασμούς φυτών και παράλληλα είτε οι κλιματικές διαφορές είτε η γεωγραφική απομόνωση διευκολύνουν την διάκριση των ειδών μελιού. Στα είδη μελιού με μεγάλη εμπορική αξία κατέχει σημαντική θέση η μελέτη της γεωγραφικής προέλευσης.

Οι φυσικοχημικές παράμετροι που συντελούν στην διάκριση της γεωγραφικής προέλευσης είναι η υγρασία, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το pH, τα ένζυμα και η υδροξυ-μεθυλοφουρφυράλη (HMF) με ποσοστό διάκρισης 51,67 με 83% για τα ισπανικά μέλια και 75% για τα γαλλικά. Ακόμη μία παράμετρος αποτελούν τα ανόργανα συστατικά αλλά παρά το γεγονός ότι ο βαθμός διάκρισης είναι σχετικά μεγάλος, οι μελετητές έχουν παρατηρήσει υψηλή διακύμανση τιμών και πιθανές μολύνσεις από τον εξοπλισμό και τους περιέκτες. Μόνο στα ανθόμελα και στα μέλια κωνοφόρων, δηλαδή στα μέλια που έχουν διαφορετική βοτανική προέλευση, αναλύονται τα σάκχαρα που δίνουν τη μέγιστη διαφοροποίηση.

Στη πλειοψηφία των μελετών συστήνεται να συνδυαστούν τα κριτήρια με στόχο τον προσδιορισμό μέχρι και 30 ξεχωριστών παραμέτρων παράλληλα με τη χρήση και άλλων μεθόδων ανάλυσης. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο κόστος αλλά και περισσότερο χρόνο. Μια φερέγγυα μέθοδος για την εύρεση της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης ενός δείγματος μελιού αποτελεί ο συνδυασμός της μελισσοπαλυνολογικής ανάλυσης με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι ιδιαίτεροι συνδυασμοί των γυρεόκοκκων χαρακτηρίζουν τη μοναδικότητα της γεωγραφικής προέλευσης του είδους μελιού. Ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις που ανακαλύπτονται συγκεκριμένοι γυρεόκοκκοι φυτών που αποτελούν μοναδικά χαρακτηριστικά μιας περιοχής. Μια χαρακτηριστική περίπτωση είναι οι γυρεόκοκκοι ενδημικών φυτών (Καραμπουρνιώτη Σοφία, 2008).

Γενικά, για να προσδιοριστεί η βοτανική και η γεωγραφική προέλευση ενός είδους μελιού χρησιμοποιούνται τα πτητικά συστατικά και οι φυσικοχημικές παράμετροι. Η γεύση, το άρωμα, το χρώμα και η υφή αποτελούν τα ξεχωριστά χαρακτηριστικά του μελιού και προκύπτουν είτε από το είδος των λουλουδιών είτε από τα φυτά που συλλέγεται το νέκταρ ή το μελίτωμα από τις μέλισσες με σκοπό να παραχθεί το μέλι. Μικρότερο ποσοστό μεταβολής στα χαρακτηριστικά του μελιού κατέχουν η φυσιολογία των μελισσών, οι συνήθειες της αναζήτησης τροφής, οι κλιματικές συνθήκες και η επεξεργασία έπειτα από τη συλλογή. Είναι αναμενόμενο, το μέλι που θα παραχθεί να είναι κυρίως ένα μίγμα γεύσεων, διότι οι μέλισσες πηγαίνουν σε κάθε είδος λουλουδιού που είναι δυνατό να φτάσουν και έτσι

αυτό που συνήθως προωθείται στην αγορά ονομάζεται απλώς μέλι ή μέλι ανθέων. Έτσι είναι φανερό ότι το μέλι καθίσταται ως ένα ιδιαίτερα σύνθετο υπόστρωμα για μελέτη καθώς τα πτητικά συστατικά που περιλαμβάνει είναι αρκετά με διαφορετικές χημικές δομές και σε μικρές περιεκτικότητες σε μια «μήτρα» σακχάρων με βασικό συστατικό τις πολικές ουσίες. Κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνση των σακχάρων, που είναι τα βασικά συστατικά στο μέλι, εξαιτίας της ελάχιστης συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών πριν την απομόνωση τους.

Για να επιτευχθεί η εκχύλιση τέτοιων ενώσεων προτού πραγματοποιηθεί η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μαζών (GC-MS) έχουν προηγηθεί διάφορες τεχνικές κάποιες από τις οποίες έχουν πλεονεκτήματα ενώ άλλες έχουν μειονεκτήματα. Μια παράμετρος που διαφοροποιεί σε μεγάλο βαθμό το ποσοστό ανάκτησης αποτελεί η πολικότητα της κάθε ένωσης, η οποία αλλάζει τη σύσταση των πτητικών ενώσεων του μελιού με βάση το σύστημα εκχύλισης. Όταν χρησιμοποιείται θερμότητα υπάρχει πιθανότητα να σχηματιστεί φουράνιο ή και παράγωγά του εξαιτίας της επίδρασής της στα σάκχαρα ή στα αμινοξέα. Ακόμη δημιουργούνται νέα παράγωγα, που δεν ανήκουν στα πτητικά συστατικά του μελιού, όταν γίνεται οξείδωση ή αποσύνθεση των ευαίσθητων συστατικών.

Δημιουργούνται προβλήματα ασφάλειας και υγείας εξαιτίας των οργανικών διαλυτών, οι οποίοι εκτός από ακριβοί είναι και τοξικοί. Για να μην δημιουργηθούν παράγωγα της θερμικής επεξεργασίας όπως το φουράνιο αλλά και να αποφευχθούν τα ακριβά και τοξικά οργανικά διαλύματα, χρησιμοποιούνται νέες μέθοδοι τελευταία. Κάποιες από αυτές τις μεθόδους αποτελούν: η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η εκχύλιση υπερκείμενης φάσης (HS) και η μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (SPME). Στην περίπτωση ανάλυσης του υπερκείμενου χώρου πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι η επεξεργασία γίνεται σε ένα μη επεξεργασμένο δείγμα χωρίς διαλύτη (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

Για να τακτοποιηθεί ένα δείγμα μελιού είναι απαραίτητα τα φυσικοχημικά, οργανοληπτικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του τα οποία ορίζουν μια συγκεκριμένη κατηγορία αμιγούς μελιού. Ως αμιγές ορίζεται το μέλι εκείνο που με βάση τα χαρακτηριστικά του κατατάσσεται σε μια κατηγορία μελιού συγκεκριμένης φυτικής προέλευσης.

Για να γίνει αυτή η ταυτοποίηση τα συστατικά διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τα φυσικοχημικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του μελιού που πιστοποιούν την ταυτότητα του μελιού με γνώμονα τα νομοθετημένα ποιοτικά κριτήρια και πιο συγκεκριμένα τα σάκχαρα, τα ένζυμα, η υδροξυ-μεθυλο-φουρφουράλη, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οξύτητα, το φάσμα των γυρεοκόκκων κ.α. Μαζί με τη συνδρομή των γυρεοκόκκων αυτά τα χαρακτηριστικά δίνουν πληροφορίες για την βοτανική προέλευση των μελιών.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά τις ενώσεις που προέρχονται από τη χλωρίδα της περιοχής σε μικρές συγκεντρώσεις οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να μας παραχωρήσουν δεδομένα σχετικά με τη γεωγραφική προέλευση των αμιγών κατηγοριών μελιού. Οι πτητικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή, τα ελεύθερα αμινοξέα και ο συνδυασμός γυρεοκόκκων αποτελούν παραδείγματα αυτών των ενώσεων.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για να γίνει ταυτοποίηση των αμιγών τύπων ελληνικού μελιού πεύκου, ελάτης, καστανιάς, ερείκης, θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλίανθου σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, άρθρο 67α «Ταυτοποίηση αμιγών ελληνικών μελιών πεύκου, ελάτης, καστανιάς, ερείκης, θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλίανθου, Απόφαση 127/2004, 18/02/2005».

Είδος μελιού	Πεύκο	Έλατο	Καστανιά	Ερείκη	Θυμάρι	Πορτοκαλιά	Βαμβάκι	Ηλιάνθος
Υγρασία (%)		≤18,5						
Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (mS/cm)	≥0,9	≥1,0	≥1,1		≤0,6	≤0,45		
% Κύριος γυρεόκοκκος των γυρεοκόκκων των νεκταρογόνων φυτών			≥87	≥45	≥18*	≥3	≥3	≥20
HDE/P**	Ποικίλει	Ποικίλει						
PK/10g***	Ποικίλει	Ποικίλει						
	Σημαντική παρουσία χαρακτηριστικών στοιχείων μελιτωμάτων (μύκητες-καπνιές)	Απλή παρουσία χαρακτηριστικών στοιχείων μελιτωμάτων (μύκητες)						

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά μονοποικιλιακών ελληνικών μελιών

*Το ποσοστό των συνοδών γυρεοκόκκων ενός είδους φυτού δεν πρέπει να ξεπερνά το 45%

**Honeydew elements/Pollen (στοιχεία μελιτωμάτων/γυρεόκοκκοι νεκταρογόνων φυτών)

*** PK/10g: Συνολικός αριθμός γυρεοκόκκων/10g

(Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014)

1.3.1. Γεωγραφική και βοτανική προέλευση θυμαρίσιου μελιού

Το θυμαρίσιο μέλι, ανάλογα τη χώρα, προέρχεται από διαφορετικά είδη. Ποικίλα είδη του *Thymus* spp. – *Lamiaceae* βρίσκονται στις χώρες της Μεσογείου. Για παράδειγμα, το θυμαρίσιο μέλι που παράγεται στην Ιταλία προέρχεται από το είδος *Thymus capitatus* ενώ στην Ελλάδα παράγεται από μια μίξη διάφορων ειδών του *Thymus* και άλλων του *Labiatae* και στην Ισπανία και στην Γαλλία προέρχονται κυρίως από το είδος *Thymus vulgaris*.

Το θυμαρίσιο μέλι κατέχει σπουδαία εμπορική αξία, με αποτέλεσμα να υπάρχει σημαντική ποικιλία ποσοστών γυρεόκοκκων που προσδιορίζουν τον αμιγή χαρακτήρα του. Οι τιμές των ποσοστών των γυρεόκοκκων στα μέλια της Ελλάδας με οργανοληπτικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά θυμαρίσιου μελιού εντοπίστηκαν μεταξύ 7,8% και 85,1%. Σύμφωνα με την τρέχουσα νομοθεσία, το θυμαρίσιο μέλι είναι απαραίτητο να περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό από 18% γυρεόκοκκους θυμαριού σε σύνολο 90.000 ανά 10 γραμμάρια μελιού. Στα θυμαρίσια μέλια της Ελλάδας υπάρχουν και επιπλέον γυρεόκοκκοι, όπως *Castanea*, *Cistus*, *Citrus*, *Compositae*, *Brassicaceae*, *Erica* spp., *Prunus/Pyrus*, *Robinia*, *Taraxacum*, *Trifolium* και *Vicia* σε διάφορα ποσοστά (Δαμιανός Δημήτριος, 2018).

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (Άρθρο 67α: <<Ταυτοποίηση αμιγών ελληνικών μελιών πεύκου, ελάτης, καστανιάς, ερείκης, θυμαριού, πορτοκαλιάς, βαμβακιού, ηλιάνθου, Απόφαση 127/2004, 18/02/2005,>>) οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν ένα μέλι θυμαρίσιο είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα με τιμή μικρότερη ή ίση με 0,6 mS/cm και το ποσοστό του κύριου γυρεόκοκκου των γυρεόκοκκων των νεκταρογόνων φυτών με τιμή μεγαλύτερη ή ίση του 18 και μικρότερη του 45% (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

1.4. Επεξεργασία μελιού

Στις μέρες μας χρησιμοποιείται η φυγόκεντρος τεχνική για την εξαγωγή του μελιού ως η πιο ασφαλής και αποδοτική μέθοδος. Μετά το τέλος της παραπάνω τεχνικής, το μέλι αποθηκεύεται σε μεγάλα δοχεία ή βάζα. Κατά τη διάρκεια που το μέλι παραμένει αποθηκευμένο σε αυτά τα δοχεία για λίγες ημέρες, πραγματοποιείται η διαύγαση του μελιού. Κατά τη διάρκεια της διαύγασης ανυψώνονται στην επιφάνεια φυσαλίδες αέρα καθώς και μικροσκοπικά κομμάτια κεριού με αποτέλεσμα να σχηματιστεί στρώμα αφρού. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας με τη βοήθεια κοσκίνων απομακρύνονται αυτά τα σώματα.

Επόμενη διαδικασία αποτελεί το φιλτράρισμα, δηλαδή η ταχεία διοχέτευση του μελιού μέσα από ειδικά φίλτρα υπό πίεση και υψηλή θερμοκρασία (60-71 °C). Κατά τη διάρκεια του φιλτραρίσματος απομακρύνονται γυρεόκοκκοι, κολλοειδή, μικρές φυσαλίδες αέρα δεδομένου ότι αυτά παραμένουν στο στραγγισμένο μέλι. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η καθυστέρηση της κρυστάλλωσης του μελιού. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το φιλτραρισμένο μέλι όντως βρίσκεται σε υγρή κατάσταση για περισσότερο χρονικό διάστημα από ότι ένα μέλι που δεν έχει φιλτραριστεί.

Πολύ σημαντικό είναι ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ποικίλων προελεύσεων μελιού η χρήση θερμότητας, με στόχο την καλύτερη ανάμιξη των μελισσοκομικών προϊόντων. Επιπλέον, η θερμική επεξεργασία αποτρέπει για κάποιο χρονικό διάστημα την κρυστάλλωση. Για να παραχθεί το καλύτερο τελικό μελισσοκομικό προϊόν είναι απαραίτητο σε κάθε στάδιο

παραγωγής του μελιού (συγκέντρωση, τυποποίηση, συσκευασία, σήμανση και τελική διάθεση προς κατανάλωση) η μέγιστη τιμή θερμότητας να ισούται με 35 °C με μέγιστη απόκλιση 1 °C. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μέλι από τις Ελληνικές επιχειρήσεις να διακρίνεται και στην Ελλάδα αλλά και στο εξωτερικό. Το Ελληνικό μέλι είναι διάσημο για τα εξής χαρακτηριστικά του: το υψηλό επίπεδο φυσικοχημικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, την υψηλή βιολογική αξία και τα υψηλά επίπεδα ποιότητας (Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014).

1.5. Η αναγκαιότητα της κατεργασίας ενός δείγματος

Ένα πολύ σημαντικό βήμα πριν από οποιαδήποτε χημική ανάλυση είναι η σωστή διαχείριση ενός δείγματος. Τα σφάλματα που μπορεί να προκύψουν στο στάδιο αυτό αποτελούν την βασικότερη πηγή σφαλμάτων σε όλη την αναλυτική διαδικασία, οδηγώντας πολλές φορές στην δημιουργία λανθασμένων και αναξιόπιστων αποτελεσμάτων. Τα σφάλματα αυτά πηγάζουν συνήθως από τα πολλαπλά βήματα που ακολουθούνται κατά την επεξεργασία του δείγματος, τα οποία γίνονται συνήθως χειροκίνητα. Για την αποφυγή λοιπόν όσο το δυνατόν περισσότερων σφαλμάτων είναι αναγκαία η ανάπτυξη μεθοδολογιών κατεργασίας δειγμάτων, οι οποίες αποτελούνται από λίγα, γρήγορα και απλά βήματα.

Στα βήματα που ακολουθούνται στο στάδιο της κατεργασίας ενός δείγματος, συνήθως συμπεριλαμβάνεται ένα βήμα εκχύλισης, για την απομόνωση των ενώσεων στόχων (targets analytes) σε μια φάση πιο συμβατή με το σύστημα της ενόργανης ανάλυσης. Στην περίπτωση λοιπόν περίπλοκων μητρών, όπως είναι η περίπτωση των τροφίμων, οι ενώσεις στόχοι προ συγκεντρώνονται.

Σύμφωνα με τις αρχές της Πράσινης Αναλυτικής Χημείας (GAC), η κατεργασία ενός δείγματος θα πρέπει να στοχεύσει στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων που ελαχιστοποιούν στο μέγιστο τη χρήση οργανικών διαλυτών όσο και τον όγκο του δείγματος που απαιτείται. Στην περίπτωση ανίχνευσης αναλυτών με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, μεθοδολογίες βασισμένες στην διαδικασία της προσρόφησης έχουν αποδειχτεί ιδιαιτέρως αποτελεσματικές, επιτρέποντας την απευθείας μικροεκχύλιση, ιδίως των πτητικών και ήμι-πτητικών ενώσεων, από όλους σχεδόν τους τύπους δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των αέριων, των στερεών και των υγρών μητρών.

1.6. Τεχνικές εκχύλισης

Οι τεχνικές εκχύλισης βασίζονται στην κατανομή των ουσιών μεταξύ δύο φάσεων οι οποίες αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους (Βικτωρία Σαμανίδου, n.d.). Η μέθοδος της εκχύλισης έχει πολλές εκδοχές ανάλογα με την φυσική κατάσταση του εκφυλιστικού μέσου και της φάσης του δότη (Φουντούλη Ευδοκία, 2019).

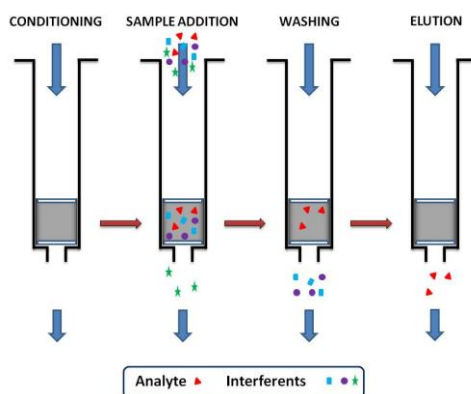
Οι κύριες τεχνικές εκχύλισης είναι οι παρακάτω:

- Εκχύλιση υγρού – υγρού (LLE)
- Εκχύλιση στερεού – υγρού (SLE)
- Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction – SPE)

Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι μια μέθοδος προετοιμασίας και εμπλουτισμού ενός δείγματος. Γίνεται εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από υδατικά δείγματα μέσω ενός στερεού προσροφητικού υλικού (ως εκχυλιστική φάση). Ένα από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ο μικρός χρόνος εκχύλισης καθώς και η μειωμένη απαίτηση σε μεγάλους όγκους διαλυτών. Επιπλέον, κατέχει δυνατότητα αυτοματοποίησης που επιφέρει αποτελέσματα με σημαντική ακρίβεια διότι αποφεύγεται η ανθρώπινη παρέμβαση ανάμεσα στο στάδιο προ-συγκέντρωσης και το στάδιο ανάλυσης (Βικτωρία Σαμανίδου, n.d.; Μουσουράκη Αντωνία, 2012).

Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης περιορίζεται στην εκχύλιση ημι-πτητικών και μη πτητικών ενώσεων και περιορίζεται από την θερμοκρασία του διαλύτη εκρόφησης. Στο στάδιο της εξάτμισης παρατηρούνται απώλειες της ποσότητας των αναλυτών, κάτι το οποίο είναι ανεπιθύμητο. Επιπλέον, η τεχνική αυτή περιέχει αρκετά στάδια, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση του κινδύνου σφάλματος στην διάρκεια της διαδικασίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειωθεί ακόμα περισσότερο η ευαισθησία της μεθόδου (Βικτωρία Σαμανίδου, n.d.; Μουσουράκη Αντωνία, 2012).



Εικόνα 1: Βήματα κατά την Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)

1.7. Τεχνικές Μικροεκχύλισης

Οι τεχνικές μικροεκχύλισης αποτελούν σμίκρυνση των κλασσικών τεχνικών εκχύλισης LLE και SPE. Ο όρος της μικροεκχύλισης εμπεριέχει μια ομάδα διαφορετικών τεχνικών όπως είναι η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Micro – Extraction, SPME) και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Micro – Extraction – LPME) (Βικτωρία Σαμανίδου, n.d.; Τζανέτου Δήμητρα, 2021).

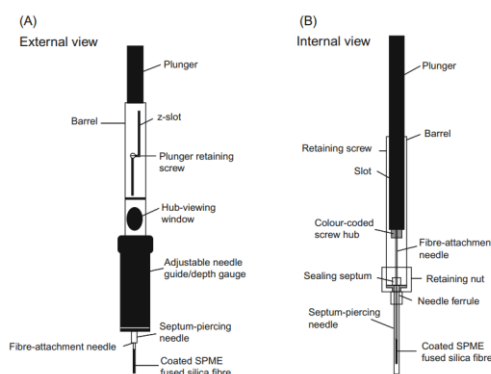
Οι παραπάνω τεχνικές εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης LLE, SPME. Πιο συγκεκριμένα:

1. Ευκολότερη προετοιμασία δείγματος
2. Μειωμένη κατανάλωση εκχυλιστικού μέσου
3. Μειωμένο κόστος
4. Μειωμένη απαιτούμενη ποσότητα δείγματος
5. Επιτάχυνση του φαινομένου μεταφοράς μάζας στις διαδικασίες της ρόφησης και εκρόφησης
6. Αποφυγή φραξίματος του αναλυτικού οργάνου από προσμίξεις

1.7.1 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης SPME

1.7.1.1 Αρχή λειτουργίας

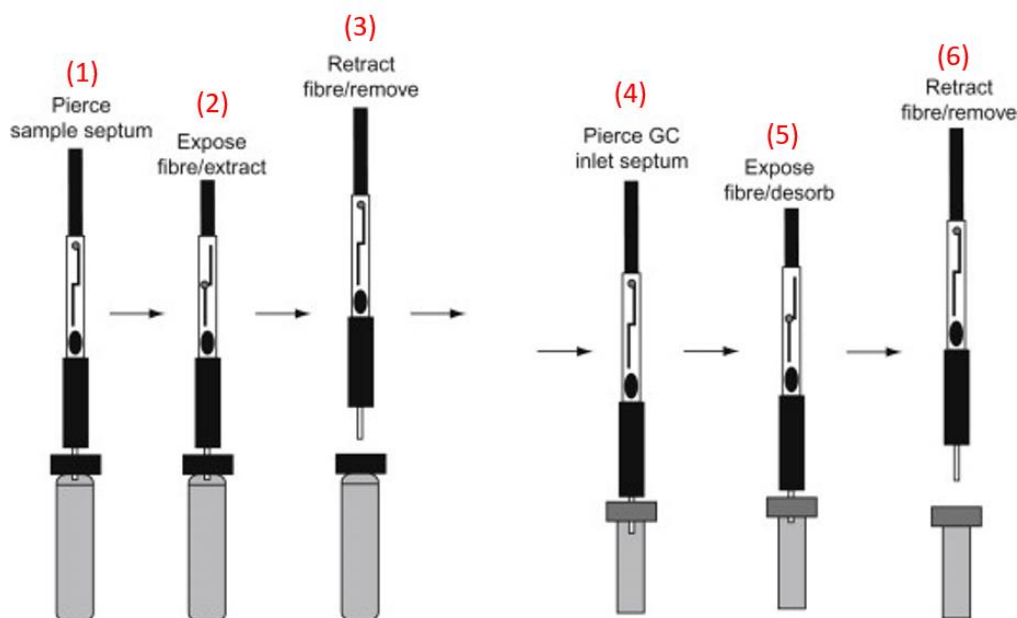
Η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) εδώ και τρεις δεκαετίες έχει γνωρίσει μεγάλη αποδοχή, καθώς πρόκειται για μια πολύ απλή διαδικασία, η οποία δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών και επιπλέον ενσωματώνει τη διαδικασία της δειγματοληψίας, εκχύλισης, συμπύκνωσης και εισαγωγής του δείγματος σε ένα μόνο σύστημα. Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται για την απομόνωση ενώσεων υψηλής και μέτριας πτητικότητας. Οι αναλύτες κατανέμονται, βάση της σταθεράς κατανομής τους, μεταξύ της μήτρας και της πολυμερικής στατικής φάσης με την οποία είναι επικαλυμμένη μια λεπτή τριχοειδής ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica gel). Όταν το σύστημα φτάσει σε ισορροπία, η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται παραμένει σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος, και ανεξάρτητα του επιπλέον χρόνου εκχύλισης (Psillakis, 2020a, 2017a).



Εικόνα 2: Εξωτερική (A) και εσωτερική (B) σχηματική απεικόνιση της συσκευής SPME

(Shirey, 2012)

Η δειγματοληψία των ενώσεων – στόχων γινόταν μέχρι πρότινος χειροκίνητα, χρησιμοποιώντας μια σύριγγα μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME fiber holder) ακολουθώντας τα βήματα στο σχήμα 1. Πρώτο βήμα είναι η διάτρηση του ελαστικού διαφράγματος (septum) που υπάρχει στο πώμα του φιαλιδίου από το έμβολο (1). Στη συνέχεια το έμβολο πιέζεται προς τα κάτω, η ίνα εξάγεται (2) και είτε βυθίζεται στο διάλυμα (εκχύλιση μη πτητικών ουσιών) είτε εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο (εκχύλιση πτητικών ουσιών) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (σχήμα 1). Με το πέρας της δειγματοληψίας, η ίνα επανεισάγεται στη συσκευή SPME holder με την κίνηση του εμβόλου προς τα πάνω και το έμβολο αποσύρεται από το φιαλίδιο (3). Η συσκευή SPME holder εισάγεται στο σύστημα έγχυσης της υγρής ή αέριας χρωματογραφίας και η ίνα εκτίθεται ξανά για ορισμένο χρονικό διάστημα (desorption time). Στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας οι αναλύτες παρασύρονται από ισχυρό διαλύτη, στην περίπτωση της αέριας χρωματογραφίας εκροφούνται από φέρον αέριο, προχωρώντας κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης όπου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ενώσεων. Τα παραπάνω βήματα πλέον γίνονται αυτοματοποιημένα με την χρήση αυτόματου δειγματολήπτη, ο οποίος είναι συζευγμένος σε GC ή HPLC.



Σχήμα 1: Βήματα χειρισμού της τεχνικής SPME κατά την δειγματοληψία

(Shirey, 2012)

1.7.1.2 Πλεονεκτήματα τεχνικής SPME

1. Εύκολη χρήση
2. Χαμηλό κόστος
3. Φιλική προς το περιβάλλον
4. Δυνατότητα Αυτοματοποίησης
5. Μειωμένη ποσότητα/Απουσία Διαλύτη
6. Επιτάχυνση φαινομένου μεταφοράς μάζας
7. Υψηλή επιλεκτικότητα
8. Υψηλή ευαισθησία
9. Υψηλή ακρίβεια
10. Χαμηλά όρια ανίχνευσης

(Μουσουράκη Αντωνία, 2012)

1.7.1.3. Μειονεκτήματα τεχνικής SPME

1. Περιορισμένος χρόνος ζωής ίνας (φθορές λόγω ανάδευσης/ υψηλής θερμοκρασίας κατά την εκρόφηση/ πολύπλοκη μήτρα)
2. Αντίσταση στη μεταφορά μάζας από δείγμα σε ίνα
3. Μικρός όγκος εκχυλιστικής φάσης→εξαγωγή μικρής ποσότητας αναλυτών από το δείγμα έναντι της αρχικής συγκέντρωσης τους.
4. Χαμηλή επαναληψιμότητα και γραμμικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών όταν η μήτρα είναι βρώμικη (Μουσουράκη Αντωνία, 2012)

1.7.2. Παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση εκχύλισης της SPME

Κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου SPME ελέγχονται διάφοροι παράγοντες προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. Η ικανότητα εκχύλισης της μεθόδου συσχετίζεται με την ποσότητα των ενώσεων που θα εκχυλιστούν από τη στατική φάση. Μερικοί παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό εκχύλισης είναι οι παρακάτω:

1. Υλικό επικάλυψης της ίνας (SPME coating)
2. Τρόπος εφαρμογής της ίνας
3. Ρυθμός ανάδευσης δείγματος (agitation speed)
4. Χρόνος δειγματοληψίας (Extraction time)
5. Θερμοκρασία δειγματοληψίας (Extraction temperature)
6. Ιοντική ισχύ διαλύματος (salting out effect)
7. Θερμοκρασία και χρόνος εκρόφησης (Desorption time and temperature)
8. Αρχική συγκέντρωση ουσιών στο δείγμα
9. Όγκος δείγματος και υπερκείμενης φάσης
10. pH

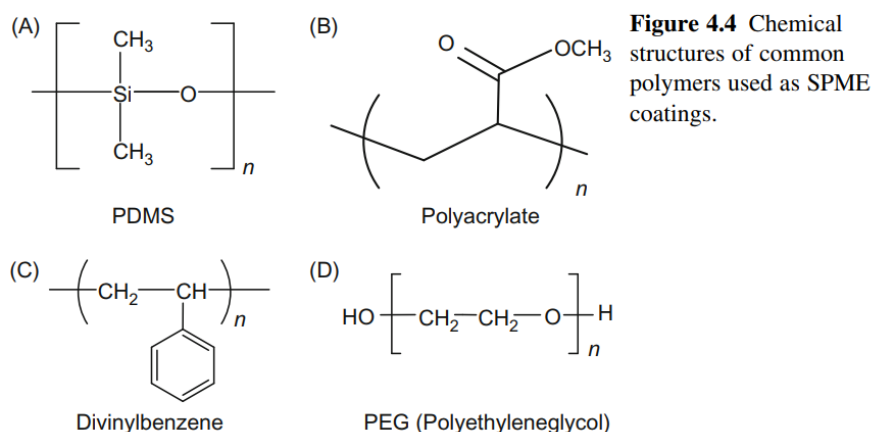
(Μουσουράκη Αντωνία, 2012)

1.7.3. Επίδραση επιστρωμάτων ίνας SPME

Στο πέρασμα των χρόνων κατασκευάστηκαν διάφορα είδη επιστρωμάτων για τις ίνες SPME, τα οποία είναι πλέον εμπορεύσιμα για την επιτυχή απομόνωση μιας μεγάλης γκάμας χημικών ενώσεων, διαφορετικής πολικότητας, πτητικότητας και μοριακού βάρους. Στην εικόνα 3 γίνεται μια σύνοψη των εμπορικά διαθέσιμων τύπων επιστρωμάτων (coatings SPME), επισημαίνοντας το μηχανισμό εκχύλισης και το είδος της πολικότητας. Στην εικόνα 4 επίσης γίνεται αναφορά σχετικά με την επιλογή του σωστού επιστρώματος με βάση το μοριακό βάρος και την πτητικότητα των αναλυτών.

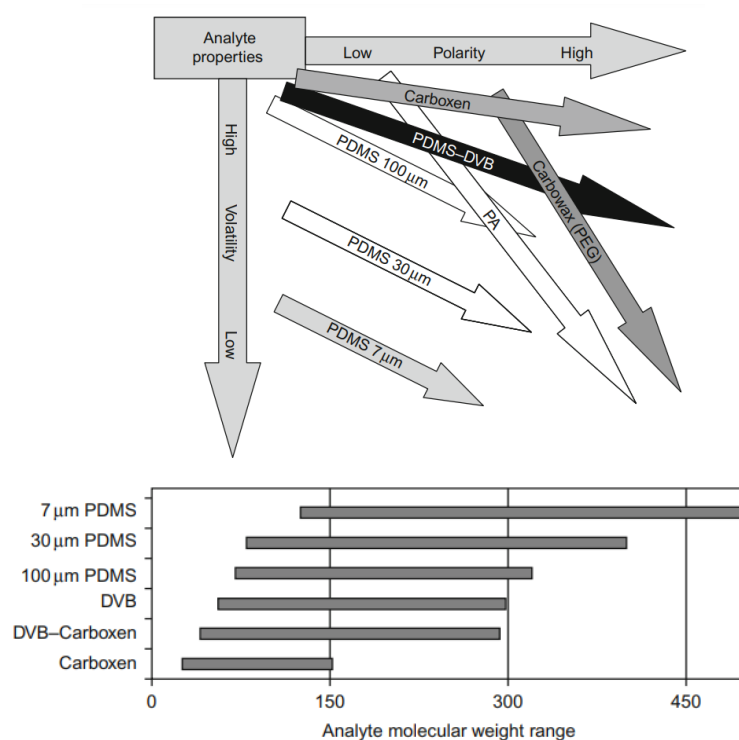
Συνήθως για την απομόνωση ενώσεων με μεγάλη πολικότητα επιλέγονται επιστρώματα υψηλής πολικότητας, όπως για παράδειγμα το Polyacrylate (PA). Για τις μη πολικές ενώσεις επιλέγονται αντίστοιχα μη πολικά πολυμερικά υλικά, όπως το πολύ-διμέθυλο-σιλοξάνιο (PDMS). Κατά την μη στοχευμένη ανάλυση περίπλοκων δειγμάτων (untargeted analysis), όπως είναι η περίπτωση των τροφίμων, χρειάζεται να γίνει απομόνωση ενός μίγματος αναλυτών που με διαφορετική πολικότητα, πτητικότητα και μοριακό βάρος. Σε αυτού του είδους την περίπτωση συνίσταται η χρήση ινών που έχουν ως επίστρωμα διαφορετικά πολυμερικά υλικά. Το πιο συνηθισμένο επίστρωμα είναι το DVB/CAR/PDMS.

Type of Coating	Extraction Mechanism	Polarity
7 μm PDMS	Absorbent	Non-polar
30 μm PDMS	Absorbent	Non-polar
100 μm PDMS	Absorbent	Non-polar
85 μm PA	Absorbent	Polar
60 μm PEG (Carbowax)	Absorbent	Polar
15 μm Carbowax Z–PDMS	Adsorbent	Bipolar
65 μm PDMS–DVB,	Adsorbent	Bipolar
55 $\mu\text{m}/30 \mu\text{m}$ DVB/Carboxen–PDMS	Adsorbent	Bipolar
85 μm Carboxen–PDMS	Adsorbent	Bipolar



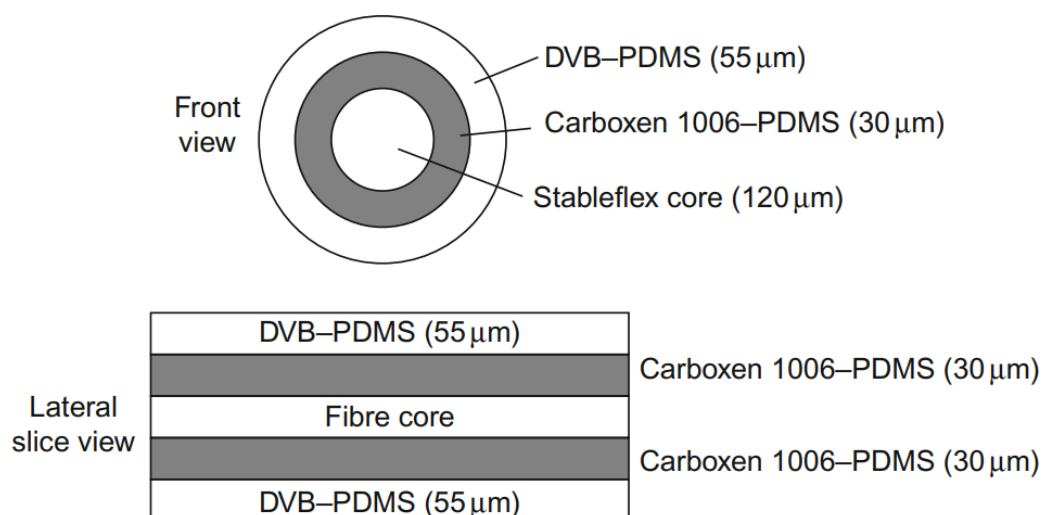
Εικόνα 3: Κατηγορίες εμπορικά διαθέσιμων επιστρώσεων (coatings) ινών SPME. Απεικόνιση της χημικής δομής των πιο κοινών πολυμερικών υλικών που χρησιμοποιούνται ως επιστρώματα SPME

(Shirey, 2012)



Εικόνα 4: Οδηγός επιλογής επιστρώματος SPME λαμβάνοντας υπόψιν την πτητικότητα των ενώσεων όσο και το εύρος του μοριακού βάρους

(Shirey, 2012)



Σχήμα 2: Εικόνα από την τομή των στρωμάτων επίστρωσης της ίνας DVB-CAR-PDMS

(Shirey, 2012)

1.8. Επίδραση τρόπου δειγματοληψίας- Απευθείας Εμβάπτιση – Direct immersion – Solid phase microextraction (DI – SPME)

Στην τεχνική DI-SPME, γίνεται απευθείας μεταφορά των αναλυτών από το δείγμα-μήτρα στην στατική φάση της ίνας. Ο χρόνος που απαιτείται για να επέλθει κατάσταση ισορροπίας συχνά περιορίζεται όταν γίνεται χρήση της ανάδευσης. Αυτός ο τρόπος δειγματοληψίας δεν ενδείκνυται στην περίπτωση ανάλυσης περίπλοκων δειγμάτων, όπως είναι τα τρόφιμα, καθώς η εμβάπτιση της ίνας εντός του δείγματος επιφέρει φθορά στην ίνα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Συνήθως, μετά την δειγματοληψία ακολουθείται ένα στάδιο καθαρισμού της ίνας, κατά το οποίο η ίνα εμβαπτίζεται σε κάποιο διαλύτη για μικρό χρονικό διάστημα (Βικτωρία Σαμανίδου, n.d.).

Η φυσική σύσταση του μελιού δυσχεραίνει την ανάλυση του πτητικού του προφίλ με την χρήση αυτού του τρόπου δειγματοληψίας. Επιπλέον, το αρωματικό προφίλ του μελιού συνίσταται από ένα μίγμα ενώσεων υψηλής και μέτριας πτητικότητας, κατ' επέκταση η εμβάπτιση της ίνας στο δείγμα του μελιού θα επέφερε την φθορά της καθώς επίσης την απομόνωση μόνο των ημι-πτητικών ενώσεων.

1.8.1 Επίδραση τρόπου δειγματοληψίας στον υπερκείμενο χώρο (HS – SPME)

Στην τεχνική HS – SPME, η ίνα είναι εκτεθειμένη στον υπερκείμενο χώρο χωρίς να έρχεται σε επαφή με το δείγμα. Οι ουσίες κατανέμονται μεταξύ ενός συστήματος τριών φάσεων (δείγμα-υπερκείμενος χώρος- ίνα) και ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου να επέλθει ισορροπία εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών. Αυτός ο τρόπος δειγματοληψίας ευνοεί την εκχύλιση κύριων πτητικών ενώσεων. Η αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των τριών φάσεων επέρχεται γρηγορότερα σε σχέση με την περίπτωση των λιγότερο πτητικών ενώσεων. Οι μικροί ρυθμοί εκχύλισης που καταγράφονται για την περίπτωση των ημι-πτητικών ενώσεων οφείλονται στην αδυναμία αυτών των ενώσεων να φτάσουν στην υπερκείμενη φάση (low tendency for the headspace), καθώς παρεμποδίζονται από ένα στρώμα αέρος, το οποίο υπάρχει πάνω από την επιφάνεια του δείγματος. Η μεταφορά μάζας αυτών των συστατικών γίνεται με πολύ αργό ρυθμό, επομένως απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να επέλθει ισορροπία.

Διάφορες είναι οι στρατηγικές που ακολουθούνται προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος εξισορρόπησης στην περίπτωση των λιγότερο πτητικών ενώσεων. Οι συνήθεις πρακτικές που ακολουθούνται είναι η χρήση ανάδευσης και η θέρμανση του δείγματος. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του συντελεστή διάχυσης των λιγότερο πτητικών ενώσεων, το οποίο επιτρέπει την βελτίωση του ρυθμού εκχύλισης, καταγράφοντας μικρότερους χρόνους ισορροπίας. Ωστόσο, με την αύξηση της θερμοκρασίας υπάρχει ο κίνδυνος να γίνει αποσύνθεση του δείγματος και να δημιουργηθούν πιθανά παραπροϊόντα. Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να επιφέρει ελάττωση στο διαχωρισμό των ουσιών που είναι στο στόχαστρο και να ευνοήσουν την αέρια φάση συγκριτικά με τη φάση εκχύλισης και να μειώσει το χρόνο ισορροπίας (Psillakis, 2020).

Κατανομή των τριών φάσεων – Θεωρία της ισορροπίας της τεχνικής HS – SPME

Η θεωρία ισορροπίας και η κινητική θεωρία της τεχνικής HS – SPME επεξηγούνται μέσω ενός συστήματος τριών φάσεων στο οποίο εμπλέκονται μια υγρή πολυμερική επικάλυψη (πολυμερικής μεμβράνης), ο υπερκείμενος χώρος και ένα υδατικό διάλυμα. Η ποσότητα των αναλυτών που απορροφούνται από την υγρή πολυμερική μεμβράνη σχετίζεται με την συνολική ισορροπία των αναλυτών στο σύστημα τριών φάσεων.

Η συνολική ποσότητα ενός αναλύτη πρέπει να είναι η ίδια κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, οπότε έχουμε:

$$C_o V_s = C_f^\infty V_f + C_s^\infty V_s + C_g^\infty V_g$$

Όπου:

- C_o η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο υδατικό διάλυμα
- C_f^∞, C_s^∞ και C_g^∞ οι συγκεντρώσεις ισορροπίας του αναλύτη στην πολυμερική μεμβράνη, στο υδατικό διάλυμα και στον υπερκείμενο χώρο αντίστοιχα
- V_f, V_s και V_g οι όγκοι της πολυμερικής μεμβράνης, του υδατικού διαλύματος και του υπερκείμενου χώρου αντίστοιχα

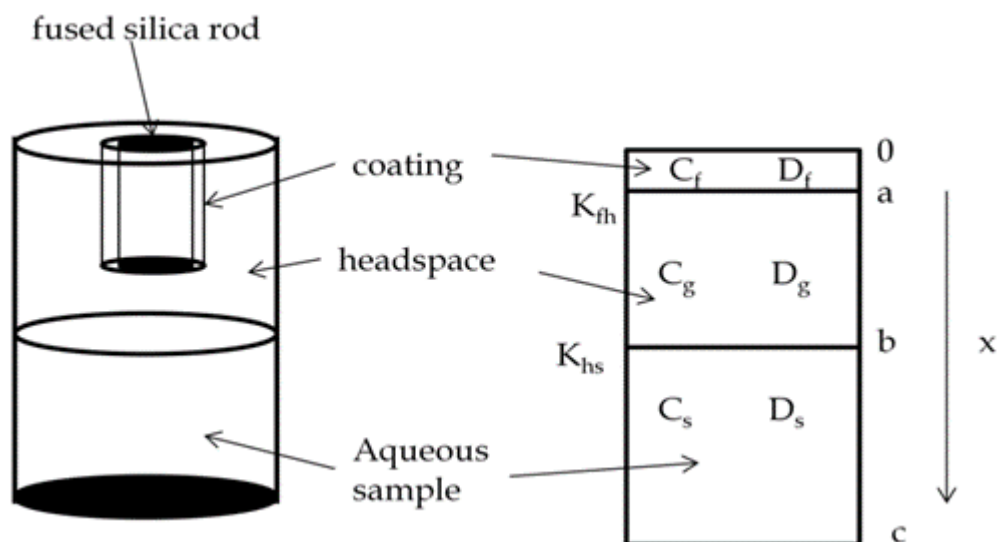
Εάν ορίσουμε τον συντελεστή κατανομής πολυμερικής μεμβράνης/αερίου ως $K_f = \frac{C_f^\infty}{C_g^\infty}$ και τον συντελεστή κατανομής αερίου/νερού ως $K_g = \frac{C_g^\infty}{C_s^\infty}$, η ποσότητα του αναλύτη που απορροφάται από την πολυμερική μεμβράνη, $n = C_f^\infty V_f$, μπορεί να εκφραστεί ως:

$$n = \frac{C_o V_f V_s K_f K_g}{V_f K_f K_g + V_g K_g + V_s}$$

Όπου:

- n , η μάζα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την πολυμερική μεμβράνη

Η παραπάνω εξίσωση περιγράφει τη μάζα που απορροφάται από την πολυμερική μεμβράνη με την επίτευξη της ισορροπίας. Σε μια πολυφασική ισορροπία, η κινητήρια δύναμη είναι η διαφορά μεταξύ των χημικών δυναμικών ενός αναλύτη σε τρεις φάσεις. Σε ένα σύστημα τριών φάσεων, σε συνθήκες ισορροπίας, η ποσότητα του αναλύτη που απορροφάται είναι ανεξάρτητη από τη θέση της ίνας στο σύστημα. Στην παραπάνω εξίσωση, οι τρεις όροι στον παρονομαστή δίνουν ένα μέτρο της χωρητικότητας του αναλύτη της κάθε φάσης: της ίνας ($V_f K_f K_g$), του υπερκείμενου χώρου ($V_g K_g$) και του δείγματος (V_s). Θεωρώντας ότι το φιαλίδιο που περιέχει το δείγμα είναι πλήρως γεμάτο με την υδατική μήτρα (χωρίς υπερκείμενο χώρο), ο όρος $V_g K_g$ στον παρονομαστή μπορεί να απαλειφθεί και να προκύψει σύστημα δύο φάσεων.



Εικόνα 5: (1) Γεωμετρία της μεθόδου HS – SPME, (2) Μονοδιάστατο μοντέλο της διαδικασίας διάχυσης τριών φάσεων (Yiantzi Evangelia, 2014)

$$n = C_f^\infty V_f = \frac{K_f K_g V_s V_f}{K_f K_g V_f + K_g V_g + V_s} C_s^o$$

Όπου:

- K_f και K_g οι σταθερές κατανομής ισορροπίας για τον αναλύτη μεταξύ του υπερκείμενου χώρου και της πολυμερικής μεμβράνης (επικάλυψη της ίνας) και μεταξύ της συμπυκνωμένης φάσης και του υπερκείμενου χώρου της αντίστοιχα
- V_f , V_g και V_s οι όγκοι της πολυμερικής μεμβράνης SPME, του υπερκείμενου χώρου και του δείγματος αντίστοιχα
- C_s η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στη μήτρα του δείγματος
- C_f η συγκέντρωση του αναλύτη στην επικάλυψη της ίνας σε κατάσταση ισορροπίας

Πριν από την ισορροπία κατανομής σε ένα κλειστό σύστημα τριών φάσεων περιορισμένου όγκου, η διαδικασία δειγματοληψίας HS – SPME αποτελεί μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Επέρχεται χημική ισορροπία μεταξύ του υδατικού διαλύματος και του υπερκείμενου χώρου. Μόλις η ίνα εκτεθεί στον υπερκείμενο χώρο αρχίζει να απορροφά γρήγορα μόρια αναλύτων από την αέρια φάση. Μόλις η συγκέντρωση του αναλύτη στον υπερκείμενο χώρο πέσει κάτω από το επίπεδο ισορροπίας σε σύγκριση με την υδατική φάση, τα μόρια του αναλύτη αρχίζουν να μετακινούνται από το υγρό δείγμα στον υπερκείμενο χώρο. Για τις ημι-πτητικές ενώσεις, η εξάτμιση από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο είναι το βήμα που καθορίζει το ρυθμό της HS – SPME, με αποτέλεσμα η διαδικασία της εξισορρόπησης να είναι αργή. Συνήθως, οι χρόνοι ισορροπίας (ελαττώνονται) με την εφαρμογή ανάδευσης ή με την αύξηση της θερμοκρασίας δειγματοληψίας, ωστόσο αυτές οι παράμετροι πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά κατά τη βελτιστοποίηση της HS – SPME.

Η VAC HS – SPME προορίζεται για την ανάλυση ενώσεων των οποίων η μεταφορά μάζας από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο είναι το βήμα που καθορίζει τον ρυθμό. Έχει αποδειχθεί ότι η δειγματοληψία HS – SPME χωρίς ισορροπία υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερη κινητική εκχύλισης λόγω της ενίσχυσης των ρυθμών εξάτμισης παρουσία ενός υπερκείμενου χώρου χωρίς αέρα.

Το θεωρητικό μοντέλο που αποδεικνύει την εξάρτηση της διαδικασίας δειγματοληψίας HS – SPME από την πίεση σε συνθήκες μη ισορροπίας θεωρώντας την εξάτμιση των οργανικών διαλυμένων ουσιών από το νερό ως αντίδραση πρώτης τάξης και λαμβάνοντας υπόψη το χημικό ισοζύγιο μάζας γύρω από το υδάτινο σώμα παρουσιάζεται παρακάτω:

$$V_s \frac{dC_s}{dt} = -K_L A (C_s - C_i)$$

Όπου:

- C_i η συγκέντρωση του αναλύτη στην διεπιφάνεια νερού – αέρα $\left[\frac{mol}{m^3}\right]$
- A η περιοχή διεπιφανειακής επαφής μεταξύ του δείγματος και της αέριας φάσης $\left[\frac{m}{h}\right]$
- K_L ο συνολικός συντελεστής μεταφοράς μάζας στην διεπιφάνεια αέριας φάσης - δείγματος που σχετίζεται με τη σταθερά του ρυθμού εξάτμισης $[kj\ h^{-1}]$ με $K_L = k_L$ με L το βάθος του διαλύματος $[m]$ σε δοχείο με ομοιόμορφη διατομή

Οι Liss, Slater και αργότερα οι Mackay και Leinonen ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν το K_L χρησιμοποιώντας τη θεωρία των δυο μεμβρανών και την υπόθεση ότι η συνολική αντίσταση στη μεταφορά μάζας προκύπτει από τις αντιστάσεις μέσω των δυο λεπτών μεμβρανών (αερίου και υγρού) παρακείμενα στην διεπιφάνεια αερίου – υγρού, δηλαδή

$$K_L = \left[\frac{1}{k_L} + \frac{RT}{K_H k_g} \right]^{-1}$$

Όπου:

- k_L και k_g $\left[\frac{m}{h}\right]$ οι συντελεστές μεταφοράς μάζας υγρού – μεμβράνης και αερίου – μεμβράνης αντίστοιχα
- K_H $\left[\frac{atm\ m^3}{mol}\right]$ η σταθερά του νόμου του Henry που ορίζεται ως ο λόγος της μερικής πίεσης προς την υδατική συγκέντρωση
- T η απόλυτη θερμοκρασία
- R η σταθερά των αερίων

Για μια οργανική διαλυμένη ουσία με υψηλό K_H , η μεγαλύτερη αντίσταση στη μεταφορά μάζας βρίσκεται στην υγρή φάση, δηλαδή $K_L \approx k_L$. Αντίθετα, για μια διαλυμένη οργανική ουσία με χαμηλό K_H , η αντίσταση στη μεταφορά μάζας από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο συγκεντρώνεται στην αέρια φάση, δηλαδή $K_L \approx K_H k_g / RT$.

Εάν η ένωση έχει ενδιάμεση τιμή K_H , τόσο οι αντιστάσεις μεταφοράς μάζας στην αέρια όσο και στην υγρή φάση είναι σημαντικές.

Η εκκένωση του μεγαλύτερου μέρους του αέρα από το θάλαμο δειγματοληψίας πριν από την εισαγωγή υγρού δείγματος μειώνει σημαντικά τη συνολική πίεση του συστήματος P_{tot} και αυξάνει το συντελεστή μοριακής διάχυσης της ένωσης D_g .

Δεδομένου ότι το k_g σχετίζεται αναλογικά με το D_g η μείωση της πίεσης θα αυξήσει επίσης το k_g και για τις ενώσεις με χαμηλό K_H το K_L θα αυξηθεί επίσης, δεδομένου ότι για αυτές τις ενώσεις η αντίσταση μεταφοράς μάζας συγκεντρώνεται στην αέρια φάση, δηλαδή $K_L \approx K_H k_g / RT$.

Αυτή η ενίσχυση των ρυθμών εξάτμισης έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αντίδραση του δείγματος στις πτώσεις της συγκέντρωσης των αναλύτων στον υπερκείμενο χώρο, όπως παρατηρείται κατά τη διαδικασία πολλαπλών σταδίων της δειγματοληψίας μη ισορροπίας HS – SPME.

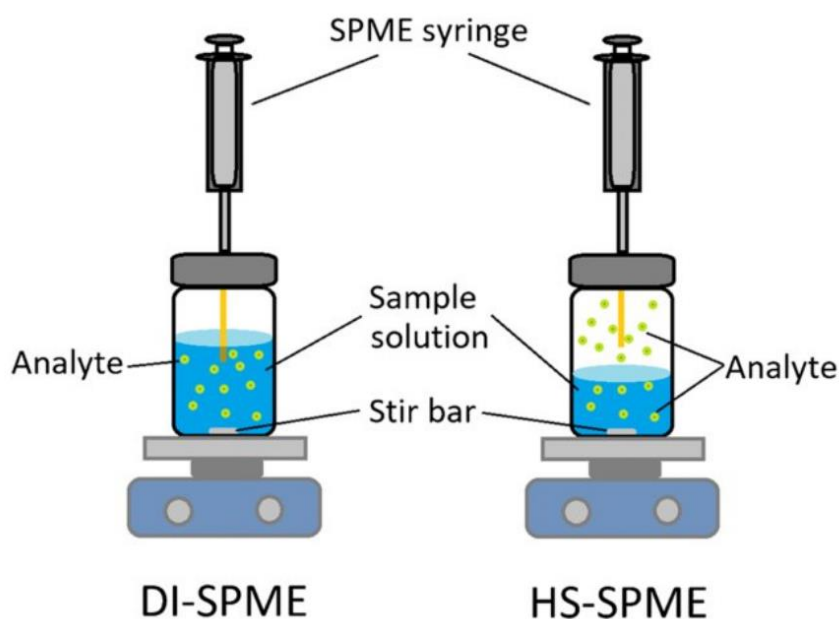
Συνεπώς, για τις ημι-πτητικές ενώσεις, όπου η εξάτμιση από τη συμπυκνωμένη φάση προς τον υπερκείμενο χώρο είναι το βήμα που καθορίζει τον ρυθμό και η αντίσταση μεταφοράς μάζας της αέριας φάσης ελέγχει τον ρυθμό εξάτμισης, η ισορροπία HS – SPME εγκαθίσταται ταχύτερα όταν η δειγματοληψία γίνεται υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης.

Οι ρυθμοί εξάτμισης από μια συμπυκνωμένη φάση μπορεί να επηρεάζονται σημαντικά από τις ιδιότητες της οργανικής ουσίας, όπως η σταθερά του νόμου του Henry. Από την άλλη πλευρά, οι παράμετροι δειγματοληψίας του υπερκείμενου χώρου, όπως ο όγκος του υπερκείμενου χώρου και η ανάμιξη της συμπυκνωμένης φάσης, μπορεί να έχει επίδραση στην ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την ίνα.

Η κατανόηση των επιδράσεων τόσο των ιδιοτήτων των διαλυμένων ουσιών όσο και των παραμέτρων δειγματοληψίας στη τεχνική Vac HS – SPME είναι ζωτικής σημασίας για την πρόβλεψη, τον συντονισμό και τον έλεγχο της απόδοσης της μεθόδου, ώστε να επιτευχθεί αυξημένη ευαισθησία σε σύντομους χρόνους δειγματοληψίας (Psillakis et al., 2012a; Yiantzi Evangelia, 2014).

Πλεονεκτήματα εφαρμογής HS – SPME

Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η προστασία της ίνας από πιθανή καταστροφή εξαιτίας του υποστρώματος του δείγματος και της μεταφοράς σε αυτήν μη πτητικών ουσιών. Επίσης μεταβολή των παραμέτρων της μήτρας του δείγματος, όπως είναι το pH, επιτρέπεται χωρίς να κινδυνεύει να αλλοιωθεί το υλικό επικάλυψης της ίνας. Οι πτητικές ενώσεις που έχουν παρθεί από την υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος αποτρέπουν την προσρόφηση μη πτητικών συστατικών υψηλού μοριακού βάρους στην ίνα, σε σχέση με τις πτητικές ενώσεις που παραλαμβάνονται απευθείας από το δείγμα, και έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής της ίνας.



Εικόνα 6: Τρόποι δειγματοληψίας με την συσκευή SPME; (Α) Βύθιση της ίνας εντός του διαλύματος (DI – SPME). (Β) Έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο (HS – SPME)

(Shirey, 2012)

1.8.2. Εφαρμογή HS – SPME στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε δείγματα μελιού.

Η μέθοδος HS – SPME έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων μεταξύ αυτών και για την ανάλυση μελιού. Ο Πίνακας 3 συνοψίζει διαφόρους παραμέτρους από μεθοδολογίες HS – SPME που έχουν εφαρμοστεί για την μελέτη του πτητικού προφίλ δειγμάτων μελιού από διάφορα άνθη και μελιτώματα.

Δείγματα μελιού που έχουν αναλυθεί με τεχνική HS – SPME				
Είδη μελιού	Ποσότητα δείγματος μελιού	Χρόνος εκχύλισης	Θερμοκρασία	Πηγή
Ανθόμελα	1,2 g	30 min	60 °C	(Vazquez et al., 2021)
Μελιτώματος	1,2 g	30 min	60 °C	
Ρείκι	1,2 g	30 min	60 °C	
Καστανιάς	1,2 g	30 min	60 °C	
Βατόμουρου	1,2 g	30 min	60 °C	
Θυμαρίσιο	2 g	30 min	45 °C	(Karabagias et al., 2014)
Καστανιάς	3 g	60 min	60 °C	(Aliferis et al., 2010)
Βαμβακιού	3 g	60 min	60 °C	
Ελάτου	3 g	60 min	60 °C	
Ρείκι	3 g	60 min	60 °C	
Πεύκου	3 g	60 min	60 °C	
Θυμαρίσιο	3 g	60 min	60 °C	
Εσπεριδοειδών	3 g	60 min	60 °C	

Πίνακας 3: Πληροφορίες για την μέθοδο HS – SPME που έχει χρησιμοποιηθεί στην διεθνή βιβλιογραφία για την ανάλυση διαφορετικών ειδών μελιού (ανθόμελα και μελιτώματα)

1.8.3. Συντελεστές που επηρεάζουν την κατανομή οργανικών ενώσεων μεταξύ διαφορετικών φάσεων

Παρακάτω παρουσιάζονται οι συντελεστές που επηρεάζουν την κατανομή των οργανικών ενώσεων μεταξύ των διαφορετικών φάσεων.

Συντελεστής Λιποφιλίας ή κατανομής οκτανόλης / νερού K_{ow}

Ο λιποφιλικός χαρακτήρας μιας ένωσης μπορεί να αποδοθεί εάν προσδιορίσουμε τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ νερού K_{ow} . Ως συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού K_{ow} μιας ένωσης A ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης της A στην οκτανόλη προς την συγκέντρωση της A στο νερό. Η σχέση αυτή δείχνει ότι ενώσεις με αυξημένες τιμές K_{ow} έχουν αυξημένο λιποφιλικό χαρακτήρα.

$$K_{ow} = \frac{[A_{οκτ.}]}{[A_{νερό}]}$$

Σταθερά Henry K_H

Ως σταθερά του νόμου Henry K_H ορίζεται η κατανομή μιας οργανικής ένωσης σε ένα σύστημα αποτελούμενο από μια αέρια και μια υδατική φάση σε ισορροπία που περιγράφεται από το συντελεστή κατανομής αέριας φάσης – υδατινής φάσης. Ουσιαστικά ως σταθερά Henry ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ένωσης στην αέρια φάση προς την συγκέντρωση αυτής στην υδατική φάση σε συνθήκες ισορροπίας.

Η σταθερά Henry υπολογίζεται ως εξής:

$$K_H = \frac{P_i}{C_w}$$

όπου, P_i η συγκέντρωση των ενώσεων στην αέρια φάση υπό τη μορφή μερικής πίεσης (atm)

και C_w η συγκέντρωση των ενώσεων στην υδατική φάση υπό τη μορφή της μοριακότητας (mol/L)

Γενικά, η σταθερά Henry δείχνει πόσο μεγαλύτερη είναι η τάση διαφυγής της ένωσης όταν αυτή βρίσκεται υπό μορφή αερίου συγκριτικά με την αντίστοιχη τάση διαφυγής της ένωσης όταν αυτή βρίσκεται διαλυμένη στο νερό. Οι τιμές της σταθεράς Henry κυμαίνονται μεταξύ 10^{-3} και 10^{-4} (atm*L)/mol και έχουν τη δυνατότητα να διαφέρουν έως και επτά τάξεις μεγέθους. Οι ενώσεις με μεγάλη πτητικότητα και μικρή διαλυτότητα στο νερό παρουσιάζουν μεγάλη σταθερά K_H , έχοντας την τάση να μεταφέρονται από την υδατική στην αέρια φάση (Μουσουράκη Αντωνία, 2012).

1.8.4. Τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vac HS – SPME)

Γενικά όπως αναφέραμε στις προηγούμενες παραγράφους οι ημι-πτητικές ενώσεις παρουσιάζουν αργούς ρυθμούς εξάτμισης, εφόσον ο συντελεστής μεταφορά μάζας τους από την μήτρα στον υπερκείμενο χώρο είναι χαμηλός. Αποτέλεσμα αυτού είναι η καταγραφή παρατεταμένων χρόνων ισορροπίας και η παρουσία μειωμένων εκχυλιζόμενων ποσοτήτων ουσιών στην ίνα (Psillakis, 2020; Psillakis et al., 2012; Trujillo-Rodríguez et al., 2017).

Η εφαρμογή συνθηκών χαμηλής πίεσης στο φιαλίδιο πριν την διαδικασία της δειγματοληψίας με HS – SPME, έχει αποδειχτεί ότι επιδρά θετικά στο ρυθμό εξάτμισης των ημι-πτητικών ενώσεων, συντελώντας στην γρηγορότερη αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ των τριών φάσεων ιδιαίτερα κατά την επιβολή ήπιων θερμοκρασιών (Psillakis, 2017). Το κενό όπως έχει διαπιστωθεί δεν επιδρά στο ρυθμό εκχύλισης των πολύ πτητικών ενώσεων, καθότι ο ρυθμός εξάτμισης τους είναι πολύ γρήγορος κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης και η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται κυρίως από την υδάτινη φάση και όχι από την αέρια (Psillakis, 2017).

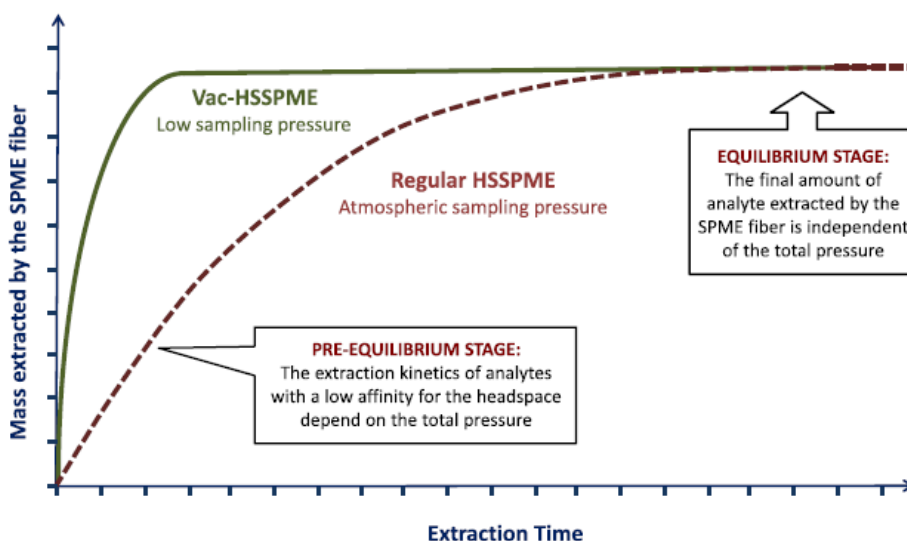
Η παραπάνω προσέγγιση, γνωστή και ως Vac HS – SPME, έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία για την μελέτη πληθώρας δειγμάτων, βιολογικής και περιβαλλοντικής φύσεως καθώς επίσης έχουν εξεταστεί περίπλοκες μήτρες όπως είναι τα τρόφιμα (Delbecque et al., 2022; Psillakis, 2020, 2017; Vakinti et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας πληθαίνουν οι δημοσιεύσεις σχετικά με την μελέτη του πτητικού προφίλ διαφόρων τροφίμων με την χρήση της Vac HS – SPME, όπως είναι το γάλα (Trujillo-Rodríguez et al., 2017), το κρασί (Vakinti et al., 2019), το τυρί (Sýkora et al., 2020), το ελαιόλαδο (Mascres et al., 2020) και το ψάρι (Delbecque et al., 2022). Τα αποτελέσματα όλων αυτών των δημοσιεύσεων συνάδουν στο συμπέρασμα ότι η επιβολή συνθηκών μειωμένης πίεσης μπορεί να μειώσει με μεγάλη επιτυχία το χρόνο εκχύλισης των ενώσεων-στόχων στο μισό συνδυαστικά με την εφαρμογή κάποιας ήπιας θερμοκρασίας (Psillakis, 2020).

Η τεχνική Vac HS – SPME πλεονεκτεί έναντι της HS – SPME αφού (Psillakis, 2020):

1. Ευνοείται η εκχύλιση των ημι-πτητικών ενώσεων
2. Η εφαρμογή του κενού αναιρεί την ανάγκη θέρμανσης του δείγματος, αποφεύγοντας με τον τρόπο αυτό την αποσύνθεση του δείγματος και τον πιθανό σχηματισμό παραπροϊόντων.
3. Επιτυγχάνεται εκχύλιση μεγαλύτερου αριθμού ενώσεων κατά την ανάλυση περίπλοκων δειγμάτων.
4. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για την μελέτη περίπλοκων δειγμάτων
5. Εύκολη χρήση και εγκατάσταση στον εργαστηριακό χώρο
6. Αυτοματοποιημένη διαδικασία

Όπως κάθε τεχνική έτσι και η Vac HS – SPME παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα (Psillakis, 2020) όπως:

1. Ανάπτυξη φαινομένων ανταγωνισμού κατά την διαδικασία της προσρόφησης των ενώσεων στο επίστρωμα της ίνας (competitive and displacement adsorption phenomena).
2. Τα ειδικά πώματα που απαιτούνται κατά την εκχύλιση του δείγματος δεν είναι μέχρι στιγμής εμπορικά διαθέσιμα.
3. Η αλληλεπίδραση των μορίων νερού με την ίνα SPME μπορεί να αναιρέσει την συνεργατική δράση των συνθηκών χαμηλής πίεσης και θέρμανσης στην απόδοση της εκχύλισης των αναλυτών.



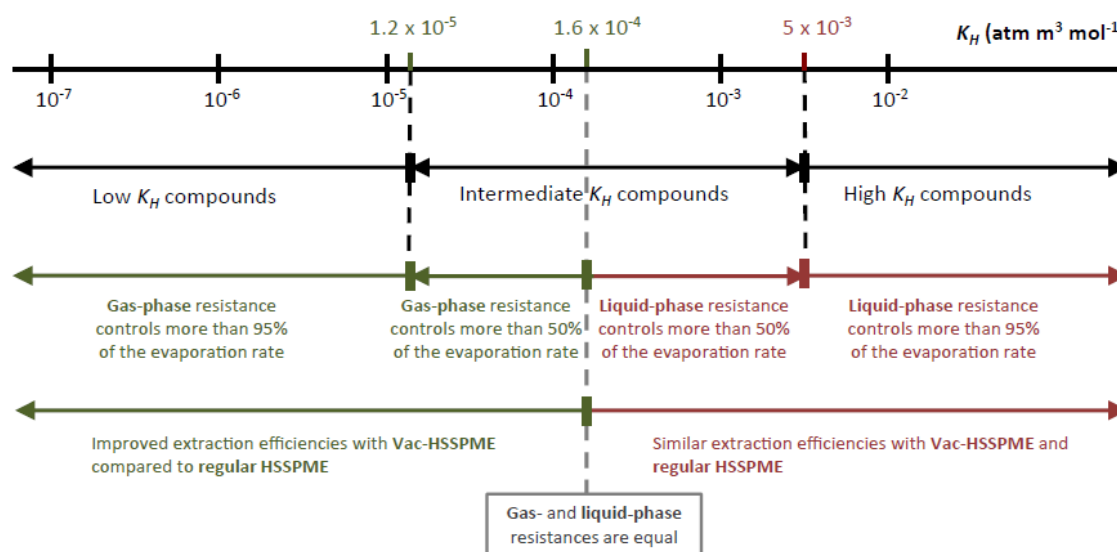
Διάγραμμα 1: Γραφική αναπαράσταση της μορφής που έχει η καμπύλη για τον χρόνο εκχύλισης ενώσεων με χαμηλή ταχύτητα εξατμίσης στον υπερκείμενο χώρο (low affinity for the headspace) κατά την επικράτηση συνθηκών κενού (διακεκομμένες γραμμή) και κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης (συνεχόμενη γραμμή). Το διάγραμμα αυτό δείχνει την επίδραση του κενού όταν η δειγματοληψία HS – SPME πραγματοποιείται σε στάδιο προ-ισορροπίας (pre-equilibrium) και ισορροπίας (equilibrium) (Psillakis, 2017)

Η επίδραση των συνθηκών πίεσης στην κατάσταση ισορροπίας της HS – SPME

Σύμφωνα με τη θεωρία της θερμοδυναμικής, σε κατάσταση ισορροπίας, οι μερικές πιέσεις και οι συγκεντρώσεις equilibrium είναι ανεξάρτητες της συνολικής πίεσης αφού οι συντελεστές κατανομής της σταθεράς Henry επηρεάζονται μόνο σε πολύ υψηλές τιμές πιέσεις ($P > 500$ kPa). Συνεπώς, όταν έχει επέλθει ισορροπία κατανομής, η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών αναμένεται να είναι η ίδια πραγματοποιώντας δειγματοληψία είτε σε συνθήκες κενού είτε ατμοσφαιρικής πίεσης (Psillakis, 2017; Τζανέτου Δήμητρα, 2021).

Η μείωση της πίεσης σε στάδιο που προηγείται της ισορροπίας, αναμένεται να οδηγήσει σε αύξηση της κινητικής των ημι-πτητικών ενώσεων.

Η εφαρμογή συνθηκών μειωμένης πίεσης κατά τη διάρκεια της HS – SPME πριν επέλθει η ισορροπία στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ ίνας και υπερκείμενης φάσης (Non equilibrium Vac HS – SPME) ενισχύει την κινητική της διαδικασίας. Η θεωρία πίσω από αυτό εξηγείται με βάση το μοντέλο δύο μεμβρανών (two film model). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, μεταξύ των τριών φάσεων του συστήματος (μήτρα, υπερκείμενη φάση, ίνα), υπάρχουν δυο ενδιάμεσα στρώματα (liquid and gas films) στην διεπιφάνεια μεταξύ δείγματος και υπερκείμενης φάσης. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων-στόχων προς μελέτη είναι εκείνες που καθορίζουν σε ποιο από τα δυο στρώματα υγρό ή αέριο θα υπάρχει αντίσταση, ώστε οι ενώσεις αυτές να μην μπορούν να μεταφερθούν στην υπερκείμενη φάση. Στο σχήμα 3 περιγράφεται το είδος αντίστασης που παρουσιάζει κάποια ένωση – στόχος με βάση τον συντελεστή της σταθεράς Henry.



Σχήμα 3: Το εύρος τιμής στον συντελεστή Henry (K_H) σχετίζεται με το σημείο που παρουσιάζεται αντίσταση στον ρυθμό εξάτμισης των ημι-πτητικών και πτητικών ενώσεων. Η επίδραση που θα έχει η εφαρμογή της τεχνικής Vac-HS-SPME μπορεί να προβλεφθεί σε δείγματα νερού και σε δείγματα που περιέχουν νερό (Psillakis, 2017)

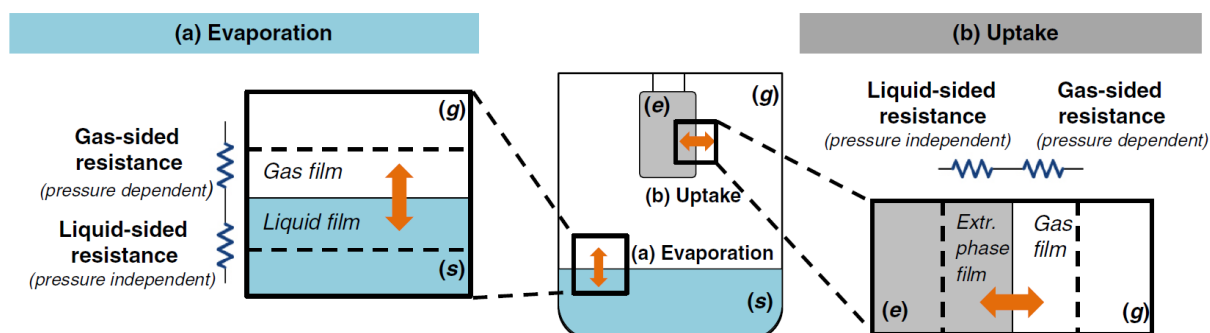
Η επίδραση της εφαρμογής χαμηλών συνθηκών πίεσης κατά την εφαρμογή της HS – SPME σε υδάτινα δείγματα ή δείγματα που περιέχουν νερό, προβλέπεται σύμφωνα με το κριτήριο K_H . Σύμφωνα με αυτό:

Οι συνθήκες κενού αναμένεται να έχουν θετική επίδραση σε ενώσεις που έχουν συντελεστή Henry με τιμή μικρότερη από $K_H \leq 1,6 \times 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$. Στις συγκεκριμένες ενώσεις το σημείο που προκαλεί αντίσταση στη μεταφορά μάζας είναι η αέρια φάση (gas film) και κυριαρχεί σε ποσοστό 50% έναντι του ρυθμού εξάτμισης. Ενώσεις με τιμή συντελεστή Henry μικρότερη από $K_H \leq 1,2 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ αναμένεται να έχουν πολύ μεγάλη βελτίωση στο ρυθμό εκχύλισης τους παρουσία κενού. Σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός εξάτμισης εμφανίζει αντίσταση στην αέρια φάση σε ποσοστό 99%. Οι ενώσεις που εμφανίζουν συντελεστή Henry με τιμή μεγαλύτερη από με $K_H \geq 1,6 \times 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ δεν αναμένεται να επηρεαστούν σημαντικά από τις συνθήκες κενού. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν αντίσταση στην υδάτινη φάση (liquid film) η οποία κυριαρχεί σε ποσοστό 50% του ρυθμού εξάτμισης. Τέλος οι ενώσεις με συντελεστή Henry με $K_H \geq 5 \times 10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ δεν θα έχουν καμία απολύτως επίδραση από το κενό (Psillakis, 2017).

Η επίδραση του συνθηκών κενού στο στάδιο προσρόφησης του αναλυτή (analyte uptake)

Η μεταφορά μάζας στον υπερκείμενο χώρο κρίνεται μια γρήγορη διαδικασία καθώς οι συντελεστές διάχυσης στην αέρια φάση υπερτερούν από τους συντελεστές διάχυσης στην υγρή φάση κατά περίπου 10^4 με 10^5 φορές. Η διαδικασία εξάτμισης των ημι-πτητικών ουσιών από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο αποτελεί το αργό βήμα του σταδίου εκχύλισης, ενώ η απορρόφηση του αναλύτη από την ίνα SPME χαρακτηρίζεται ως σχετικά γρήγορη διαδικασία. Ωστόσο, η απορρόφηση του αναλύτη μπορεί να αποτελέσει το αργό βήμα στη συνολική κινητική της εκχύλισης και να οδηγήσει σε μεγάλους χρόνους εξισορρόπησης, ανάλογα με τις ιδιότητες της φάσης εκχύλισης και των ενώσεων στόχων.

Η μεταφορά των πτητικών ενώσεων στην αέρια φάση γίνεται με γρήγορο ρυθμό και με ευκολία καθώς αντιπροσωπεύονται από υψηλή τάση ατμών, μεγάλες τιμές σταθερά Henry K_H αλλά και από σχετικά μικρά μοριακά βάρη. Ωστόσο, οι ημι-πτητικές ενώσεις με χαμηλή τάση ατμών, μικρές τιμές K_H και μεγάλα μοριακά βάρη έχουν και αυτές τη δυνατότητα να μεταφερθούν στην αέρια φάση. Απαραίτητη προϋπόθεση για να επιτευχθεί αυτή η μεταφορά είναι οι ημι-πτητικές ενώσεις να είναι υδρόφοβες, που σημαίνει ότι κατέχουν μεγάλο συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) και χαμηλές διαλυτότητες στο νερό (Psillakis, 2020; Μουσουράκη Αντωνία, 2012).



Σχήμα 4: Στην HS – SPME η κατανομή των ενώσεων μεταξύ των τριών φάσεων καθορίζεται από το στάδιο της εξάτμισης (evaporation/ volatilization step), το οποίο συμβαίνει στην διεπιφάνεια μήτρας/υπερκείμενης φάσης και από το στάδιο της προσρόφησης των αναλυτών στη φάση εκχύλισης της ίνας (analyte uptake by the extracting phase), το οποίο συμβαίνει στην διεπιφάνεια της υπερκείμενης φάσης/φάση εκχύλισης ίνας. Σε αυτές τις δυο διεπιφάνειες δημιουργούνται διαφορετικού είδους αντιστάσεις με βάση τη θεωρία των δύο μεμβρανών (two-film) (Psillakis, 2020)

Μελέτη παραμέτρων και η επίδραση αυτών κατά την βελτιστοποίηση της τεχνικής Vac-HS-SPME.

Η θετική επίδραση της εφαρμογής συνθηκών χαμηλής πίεσης μπορεί να συνδυαστεί με άλλες πειραματικές παραμέτρους, ούτως ώστε να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση στο ρυθμό εκχύλισης των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων-στόχων. Έτσι λοιπόν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου Vac - HS – SPME μελετάται η ταυτόχρονη επίδραση του κενού με άλλους παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος εκχύλισης και το είδος της μήτρας. Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών ώστε να βελτιστοποιηθεί η τεχνική Vac - HS – SPME εξαρτάται κάθε φορά από την φύση και την περιπλοκότητα του δείγματος που μελετάται, καθώς επίσης και από τις ιδιότητες των ενώσεων-στόχων και το είδος της εκχυλιστικής φάσης.

(i) Επίδραση επικράτησης συνθηκών κενού συνδυαστικά με την θερμοκρασία

Κατά την εφαρμογή της HS – SPME πραγματοποιώντας δειγματοληψία σε θερμοκρασία δωματίου, εκχυλίζονται κυρίως ενώσεις με υψηλή πτητικότητα. Η εκχύλιση των λιγότερο πτητικών ενώσεων συνήθως επιτυγχάνεται με τη θέρμανση του δείγματος, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό το χρόνο που απαιτείται για να επέλθει η ισορροπία τους στο σύστημα τριών φάσεων και αυξάνοντας την συγκέντρωσή τους στην υπερκείμενη φάση.

Με βάση τη θεωρία, η θέρμανση του δείγματος κατά την επικράτηση συνθηκών κενού, θα αναμέναμε να βελτιώνει ακόμη περισσότερο την κινητή εκχύλιση των ενώσεων. Εντούτοις, η παραπάνω θεώρηση δεν μπορούσε να επιβεβαιωθεί πάντοτε πειραματικά. Συγκριτικά με την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης, η επιβολή κενού και θέρμανσης οδήγησε σε μειωμένους ρυθμούς εκχύλισης των ενώσεων. Η παραπάνω παρατήρηση, αργότερα ερμηνεύτηκε ως αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων υγρασίας στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου λόγω θέρμανσης. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρήθηκε κυρίως κατά την χρήση SPME ινών με επίστρωμα PDMS (absorbent type SPME fiber) (Psillakis, 2020).

Με βάση τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών, η μεθοδολογία Vac-HS-SPME βελτιστοποιείται πραγματοποιώντας ήπια θέρμανση κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, και η απόδοση της εκχύλισης κάτω από αυτές τις συνθήκες παρατηρήθηκε ότι είναι παρόμοια ή και καλύτερη σε σχέση με τα αποτελέσματα που πάρθηκαν σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και αυξημένης θέρμανσης (Psillakis, 2020).

(ii) Επίδραση της επικράτησης συνθηκών κενού συνδυαστικά με τον χρόνο εκχύλισης

Η θετική επίδραση της τεχνικής Vac HS – SPME έχει παρατηρηθεί κυρίως στους αναλύτες που χρειάζονταν πολύ χρόνο για να ισορροπήσουν κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης. Σε όλες τις δημοσιεύσεις που έχει εφαρμοστεί η Vac HS – SPME, η κινητή εκχύλιση των αναλυτών βελτιώθηκε στο μισό χρόνο δειγματοληψίας, ταυτοποιώντας τις περισσότερες φορές μεγαλύτερο αριθμό αναλυτών από ότι όταν χρησιμοποιούνταν η κλασσική HS – SPME (Psillakis, 2020).

Κατά την χρήση ινών με εκχυλιστική φάση τύπου adsorbent, συνίσταται η επιβολή μικρών χρόνων εκχύλισης για να αποφευχθούν φαινόμενα ανταγωνιστής προσρόφησης (competitive adsorption and displacement phenomena). Πιο συγκεκριμένα, αυτό που έχει παρατηρηθεί είναι ότι κατά την επικράτηση συνθηκών κενού η προσρόφηση των αναλυτών στην εκχυλιστική φάση επιταχύνεται, δημιουργώντας φαινόμενα ανταγωνισμού στα σημεία

πρόσδεσης. Οι πιο ελαφριές ενώσεις εκτοπίζονται από ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους (Psillakis, 2020)

(iii) Επίδραση της επικράτησης συνθηκών κενού και είδος μήτρας

Η μεθοδολογία Vac HS – SPME έχει εφαρμοστεί για την μελέτη περίπλοκων μητρών και όλες οι δημοσιεύσεις αναφέρουν την γρηγορότερη εκχύλιση των ενώσεων σε συντομότερο χρόνο κατά την εφαρμογή ήπιας θέρμανσης σε σχέση με την εφαρμογή της HS – SPME σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Το πρώτο είδος περίπλοκης μήτρας που μελετήθηκε με την χρήση της Vac HS – SPME ήταν τα στερεά δείγματα. Η προσθήκη νερού ήταν μια στρατηγική που ευνόησε την διάχυση των ενώσεων από το στερεό δείγμα στον υπερκείμενο χώρο (Psillakis, 2020).

Ένα άλλο είδος περίπλοκης μήτρας που μελετήθηκε σε παλιότερες μελέτες ήταν οι ρητίνες από λιβάνι (frankincense resins). Κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης της μεθόδου Vac HS – SPME, το πρόβλημα της απώλειας των ενώσεων – στόχων αντιμετωπίστηκε εφαρμόζοντας συνθήκες κενού σε κατεψυγμένο δείγμα (Capetti et al., 2020). Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα συνδύασε την εφαρμογή του κενού με την ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της γρήγορης αέριας χρωματογραφίας (fast gas chromatography), ταυτοποιώντας 51 ενώσεις σε μόλις 51 λεπτά έναντι 120 λεπτών που ήταν ο χρόνος εκχύλισης σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Η μελέτη του αποτυπώματος που προκύπτει από τις αρωματικές πτητικές ενώσεις στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο ήταν μια πολύ ενδιαφέρουσα πρόκληση για να εφαρμοστεί η τεχνολογία Vac HS – SPME, λόγω της λιπόφιλης φύσης του δείγματος. Η επιβολή συνθηκών κενού συντέλεσε στο να αποφευχθεί η θέρμανση του δείγματος στους 80 °C. Ο βαθμός εκχύλισης των ενώσεων που εκκλύονται στην αρχή της ανάλυσης δεν επηρεάστηκαν από τις συνθήκες κενού. Η απόδοση όμως της εκχύλισης των ενώσεων που εκκλύονται προς το τέλος της ανάλυσης βελτιώθηκε σημαντικά έναντι κατά την χρήση της HS – SPME σε συνθήκες 1 atm. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα, η επιβολή ήπιας θέρμανσης συνδυαστικά με την χρήση κενού ήταν η καλύτερη στρατηγική κίνηση, προκειμένου να μειωθεί το ιξώδες του δείγματος, γεγονός που οδήγησε στην απόκτηση ενός πλούσιου προφίλ αρωματικών ενώσεων (Mascrez et al., 2020).

Τέλος, η τεχνική Vac HS – SPME εφαρμόστηκε για την ανίχνευση των πτητικών συστατικών που εκπέμπονται *In vivo* από τη ρόγα ενός σταφυλιού. Στην δημοσίευση αυτή συνολικά ανιχνεύτηκαν 39 ενώσεις, κάνοντας δειγματοληψία στον εναέριο χώρο της ρόγας μη επεμβατικά και υπό συνθήκες κενού (Rice et al., 2019).

1.10. Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε δείγματα μονοποικιλιακού θυμαρίσιου μελιού από το Νομό Χανίων, με απώτερο σκοπό την ανίχνευση των πτητικών ενώσεων στόχων οι οποίες αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού. Ο προσδιορισμός των παραπάνω ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενόργανης ανάλυσης και πιο συγκεκριμένα με την εφαρμογή Αέριας Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (**Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS)**). Η απομόνωση των ενώσεων-στόχων επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας για πρώτη φορά την τεχνική της **Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού**, γνωστή και ως **Vacuum Assisted Headspace Solid Phase Microextraction (Vac HS – SPME)**. Η παραπάνω μέθοδος βελτιστοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση των παραγόντων της θερμοκρασίας (**extraction temperature**) και του χρόνου εκχύλισης (**extraction time**) ως προς τον ρυθμό εκχύλισης- απόδοσης των ενώσεων – στόχων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επικράτηση συνθηκών κενού συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης (HS – SPME). Με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών, η εφαρμογή της τεχνική Vac HS – SPME βελτιώνει τον ρυθμό εκχύλισης χημικών ενώσεων χαμηλής πτητικότητας (semi volatiles), ενώσεων δηλαδή που εμφανίζουν χαμηλό ή ενδιάμεσο προς χαμηλό δείκτη k_H , καταγράφοντας συντομότερους χρόνους εκχύλισης με την ταυτόχρονη επιβολή ήπιας θερμοκρασίας. Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής Vac HS – SPME στην ανάλυση του θυμαρίσιου μελιού ήταν ένα από τα βασικά ζητήματα αυτής της εργασίας, το οποίο και εξετάστηκε. Η διαπίστωση διαφορών στο αποτύπωμα δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές του Νομό Χανίων ήταν ένα επίσης ένα ζήτημα που διερευνήθηκε ποιοτικά, ενώ τέλος το αποτύπωμα του θυμαρίσιου μελιού συγκρίθηκε αναλύοντας άλλα ανθόμελα ελληνικής προέλευσης (μέλι πορτοκαλιάς, κουμαριάς και βελανιδιάς).

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά και Εργαστηριακός εξοπλισμός

2.1.1. Χημικά Αντιδραστήρια

- Ακετόνη της εταιρίας Honeywell, Riedel-deHaën, Sigma- Aldrich με καθαρότητα $\geq 99,5\%$
- Μίγμα αλκανίων (C_{10} - C_{30}), 1000 $\mu\text{g/mL}$ σε εξάνιο της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Εσωτερικό πρότυπο Benzophenone 10 ppm/ σε αιθανόλη
- Διάλυμα NaCl 10%w/v
- Απορρυπαντικό RBS® 35

2.1.2. Όργανα και συσκευές

- Σιφώνι πληρώσεως των 5 ml
- Πιπέτα Gilson των 100 μl
- Γυάλινα βιδωτά φιαλίδια υπερκείμενης φάσης των 20 mL; διαστάσεων 22x75 mm; Restek, USA
- Βιδωτά μεταλλικά πώματα με ανοικτή κορυφή των 18 mm με 17,5 mm κόκκινο
- PTFE/λευκό σιλικόνης διάφραγμα 1,5 mm πάχους
- Ειδικής κατασκευής πώματα για φιαλίδιο υπερκείμενης φάσης με κενό στο οποίο εφαρμόζεται διάφραγμα Thermogreen® LB-2
- Ίνες Smart SPME; Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS); df50/30 μm / 1 cm length
- Αντλία κενού MZ 2C NT; Vacuubrand GMBH & Co. KG; Wertheim, Germany
- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας; Απλό τετράπολο GCMS-QP2020 NX; Shimadzu, Japan
- Άπολη τριχοειδής στήλη Mega-5 HT; 30m x 0.25mm x 0.25 μm ; LegnanolItaly
- Ζυγαριά ακριβείας; PrecisaXT 120A
- Φούρνος Ξήρανσης



Εικόνα 7: Πιπέτα Gilson των 100 μl



Εικόνα 8:Βιδωτό φιαλίδιο με το δείγμα



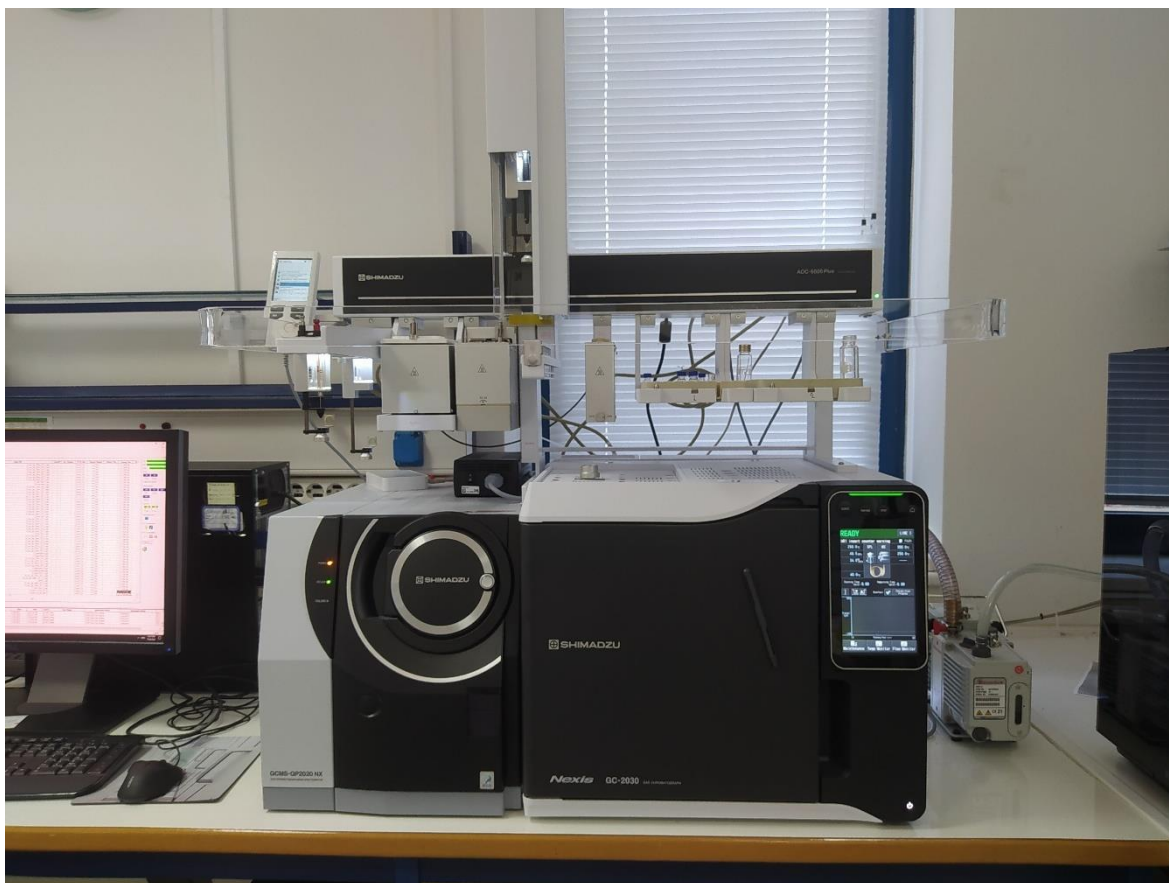
Εικόνα 9:Βιδωτό μεταλλικό πώμα (και οι 2 όψεις)



Εικόνα 10: Ίνα Smart SPME



Εικόνα 11: Αντλία κενού



Εικόνα 12: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

2.1.3. Πλύσιμο φιαλιδίων και πωμάτων

Για την αποφυγή επιμολύνσεων, τα φιαλίδια πριν από οποιαδήποτε χρήση πλένονταν αρχικά με ειδικό σαπούνι RBS® 35 και στη συνέχεια με υπερκάθαρο νερό. Ακολουθούσε η ξήρανση τους σε θερμοκρασία 60 °C για δυο περίπου ώρες. Τα μεταλλικά πώματα πλένονταν με νερό βρύσης και στη συνέχεια με υπερκάθαρο νερό και ακετόνη.

2.1.4. Κατεργασία Δειγμάτων

Σε γυάλινο βιδωτό φιαλίδιο υπερκείμενης φάσης των 20 mL, γινόταν προσθήκη 2 g δείγματος θυμαρίσιου μελιού, 2 mL διαλύματος NaCl περιεκτικότητας 10% w/v και 20 μ L εσωτερικού προτύπου βενζοφαινόνης συγκέντρωσης 10 ppm/ σε αιθανόλη. Τα φιαλίδια σφραγίζονταν με μεταλλικό πώμα και στη συνέχεια βυθίζονταν σε λουτρό υπερήχων για 30 min, για την ομογενοποίηση του μίγματος. Τα φιαλίδια αποθηκεύονταν στην κατάψυξη, στους -22 °C έως ότου αναλυθούν.

2.2. Τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Headspace Solid Phase Microextraction; HS – SPME)

2.2.1 Πειραματική διαδικασία

Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν για την βελτιστοποίηση της μεθόδου HS – SPME παρατίθενται στον πίνακα 4. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αυτόματου δειγματολήπτη. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δείγμα θυμαρίσιου μελιού από το δείγμα Α. Στον πίνακα 5 παρατίθενται αναλυτικά οι πληροφορίες για την μέθοδο της τεχνικής HS – SPME, η οποία έγινε με την χρήση του αυτόματου δειγματολήπτη, με σκοπό την απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων στα διάφορα δείγματα μελιού. Για την εκάστοτε πειραματική συνθήκη (χρόνο εκχύλισης και θερμοκρασία), οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η απομόνωση των ενώσεων έγινε με τη χρήση ινών τύπου Smart SPME; Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS); df 50/30 μm / 1 cm length. Πιο συγκεκριμένα, τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε ειδικές θέσεις (racks) του αυτόματου δειγματολήπτη. Το δείγμα μεταφερόταν σε ειδικό θάλαμο (incubator). Εκεί γινόταν ανάδευση του δείγματος με ταχύτητα 250 rpm και θέρμανση σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για 15 min μέχρι να επέλθει ισορροπία στο σύστημα. Στη συνέχεια η ίνα SPME εκτεινόταν στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα διατηρώντας την ίδια θερμοκρασία. Μετά το πέρας της δειγματοληψίας γινόταν μεταφορά της ίνας στον εισαγωγέα της αέριας χρωματογραφίας και ακολουθούσε η ανάλυση του δείγματος στο GC-MS.

2.3. Τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vacuum assisted headspace solid phase microextraction; Vac HS – SPME)

2.3.1 Πειραματική διαδικασία

Η βελτιστοποίηση της τεχνικής πραγματοποιήθηκε μελετώντας τις ίδιες παραμέτρους με αυτές που μελετήθηκαν στην τεχνική HS – SPME (Πίνακας 4). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση αυτόματου δειγματολήπτη εις τριπλούν. Πριν την εφαρμογή της τεχνικής Vac HS – SPME, στα κατεψυγμένα δείγματα γινόταν εφαρμογή ειδικά σχεδιασμένου μεταλλικού μαγνητικού πώματος, το οποίο έφερε στο κέντρο οπή, η οποία σφραγιζόταν με διάφραγμα Thermogreen® LB-2. Στη συνέχεια, όσο το δείγμα διατηρούνταν κατεψυγμένο εξασφαλιζόνταν στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου συνθήκες χαμηλής πίεσης με την χρήση της αντλίας κενού MZ 2CNT, της εταιρείας Vacuubrand GMBH&Co. KG. Το δείγμα ήταν πολύ σημαντικό να παραμένει κατεψυγμένο κατά την δημιουργία των συνθηκών κενού, προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμιση των χημικών ενώσεων. Η αντλία κενού λειτουργούσε για 30 sec. Μετά το βήμα αυτό, το δείγμα τοποθετούνταν στον αυτόματο δειγματολήπτη και ακολουθούνταν η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.1.

2.4. Ανάλυση και ανίχνευση χημικών ενώσεων με την χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας

Ο διαχωρισμός και ανάλυση των δειγμάτων έγινε με την χρήση συστήματος απλού τετραπόλου GCMS-QP2020 NX. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) με ταχύτητα ροής 1 mL/ min. Ο διαχωρισμός του μίγματος επιτεύχθηκε με την χρήση άπολης κολώνας Mega-5 HT (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου και όλες οι λεπτομέρειες για την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας παρατίθενται στους πίνακες 6 και 7.

2.5. Ποιοτικός και Ποσοτικός Χαρακτηρισμός των Χημικών Ενώσεων

Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με την χρήση του προγράμματος Shimadzu GCMS Solution (Shimadzu, Japan). Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε συγκρίνοντας την ομοιότητα των φασμάτων MS με αυτά που υπάρχουν στις βιβλιοθήκες NIS, Willey ($\geq 80\%$) και συγκρίνοντας την πειραματική τιμή του δείκτη LRI με την θεωρητική τιμή με βάση τη βιβλιογραφία. Το εύρος διακύμανσης του LRI ήταν ± 10 . Ο δείκτης LRI υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τους χρόνους έκλυσης των αλκανίων (C₁₀-C₃₀) (συγκέντρωση 1000 mgL⁻¹ σε εξάνιο) μαζί με τούς χρόνους έκλυσης των πτητικών ενώσεων που βρέθηκαν.

Παράγοντες Βελτιστοποίησης	
Θερμοκρασία εκχύλισης (°C)	30, 45, 60
Χρόνος εκχύλισης (min)	20,30,40,60

Πίνακας 4: Μελέτη παραγόντων για την βελτιστοποίηση της τεχνικής HS – SPME, Vac HS – SPME

Παράμετροι για την μέθοδο του Αυτόματου Δειγματολήπτη	
Conditioning Temperature (°C)	250
Pre Conditioning Time (min)	10
Incubation Temperature (°C)	30, 45, 60
Incubation Time (min)	15
Agitator speed (rpm)	250
Sample Vial Depth (mm)	20
Sample Extraction Time (min)	10,20,30,40,60
Sample Desorption Time (min)	10
Post Conditioning Time (min)	5
Analysis Time (min)	42
Sample Vial Penetration Speed (mm/s)	20
Injector Penetration Speed (mm/s)	100

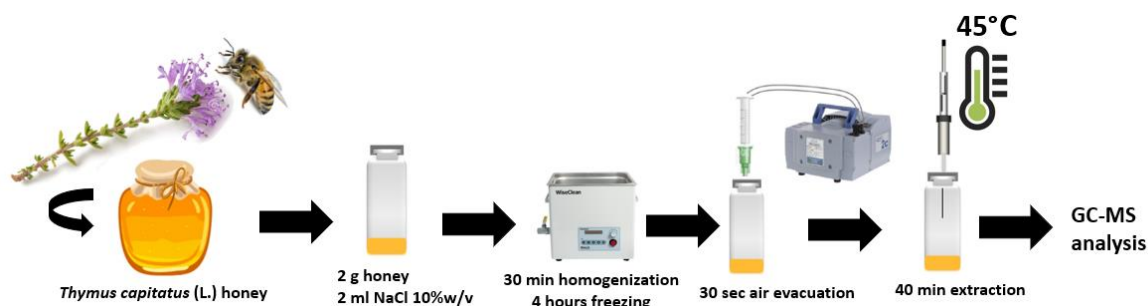
Πίνακας 5: Παράμετροι μεθόδου αυτόματου δειγματολήπτη για την εκχύλιση-απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων από δείγματα θυμαρίσιου μελιού με περιοχή προέλευσης τα Χανιά.

Παράμετροι για την μέθοδο του GC		
Injector Temperature (°C)	250	
Column Flow (mL/min)	1	
Injection Mode	Splitless	
Split Ratio	30	
Column Oven Temperature Program		
Rate (°C / min)	Temperature (°C)	Hold time (min)
-	60	1
8	100	0
5	260	2

Πίνακας 6: Παράμετροι μεθόδου αέριας χρωματογραφίας (GC) για την εκχύλιση-απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων από δείγματα θυμαρίσιου μελιού με περιοχή προέλευσης τα Χανιά

Παράμετροι για την μέθοδο του MS	
Ion Source Temperature (°C)	250
Interface Temperature (°C)	300
Range m/z	35-400

Πίνακας 7: Παράμετροι μεθόδου φασματομετρίας μάζας (MS) για την εκχύλιση-απομόνωση των πτητικών και ημι-πτητικών ενώσεων από δείγματα θυμαρίσιου μελιού με περιοχή προέλευσης τα Χανιά.



Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού που εφαρμόστηκε για την μελέτη των πτητικών χημικών ενώσεων στο Χανιώτικο θυμαρίσιο μέλι

3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

3.1. Ταυτοποίηση ενώσεων με τη χρήση των χρόνων συγκράτησης

Στον αέριο χρωματογράφο η ιχνηλάτηση των ουσιών πραγματοποιείται βάση των χρόνων συγκράτησης τους. Η ροή του φέροντος αερίου και η θερμοκρασία που πραγματοποιείται διαχωρισμός στη δεδομένη στήλη αποτελούν τις συνθήκες διαχωρισμού, οι οποίες επιδρούν πάνω στους χρόνους συγκράτησης. Στο αέριο χρωματογράφημα, οι δείκτες Kovats υποδεικνύουν τη σχετική θέση μιας κορυφής, ως προς τις κορυφές, που αναλογούν σε δύο αλκάνια ενώ τα μόρια έχουν διαφορά ενός ατόμου άνθρακα. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε πείραμα, πριν την ανάλυση των δειγμάτων μελιού με μείγμα αλκανίων, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.5.

Αλκάνια	Molecular formula	R.T.	CAS Number
Decane	C ₁₀ H ₂₂	6,235	124-18-5
Undecane	C ₁₁ H ₂₄	8,23	1120-21-4
Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	10,495	112-40-3
Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	12,915	629-50-5
Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	15,37	629-59-4
Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	17,785	629-62-9
Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	20,125	544-76-3
Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	22,37	629-78-7
Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	24,515	593-45-3
Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	26,56	629-92-5
Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	28,52	112-95-8
Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	30,395	629-94-7
Docosane	C ₂₂ H ₄₆	32,19	629-97-0
Tricosane	C ₂₃ H ₄₈	33,915	638-67-5
Tetracosane	C ₂₄ H ₅₀	35,57	646-31-1
Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	37,16	629-99-2
Hexacosane	C ₂₆ H ₅₄	38,66	630-01-3
Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	39,91	593-49-7
Octacosane	C ₂₈ H ₅₈	40,985	630-02-4
Nonacosane	C ₂₉ H ₆₀	41,935	630-03-5
Triacontane	C ₃₀ H ₆₂	42,875	638-68-6

Πίνακας 8: Σύσταση του μείγματος αλκανίων που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του δείκτη Kovats κατά την ταυτοποίηση των ενώσεων στόχων που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού.

3.2. Βελτιστοποίηση SPME

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως σκοπό την εφαρμογή της μεθοδολογίας της μικροεκχύλισης στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vac HS – SPME) για πρώτη φορά για τον ποιοτικό προσδιορισμό των πτητικών οργανικών ενώσεων που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού.

Η μεθοδολογία HS – SPME βελτιστοποιήθηκε σε συνθήκες χαμηλής πίεσης (Vac HS – SPME) και σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (συμβατική HS – SPME) μελετώντας την επίδραση του χρόνου και την θερμοκρασία εκχύλισης. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα τυχαίο δείγμα θυμαρίσιου μελιού με προέλευση από το Ν. Χανίων της Κρήτης (δείγμα Α). Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση της συμβατικής μεθόδου HS-SPME και στη συνέχεια της Vac HS – SPME. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων που αποκτήθηκαν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Shimadzu GC-MS Solution. Η ταυτοποίηση των ενώσεων – μαρτύρων έγινε συγκρίνοντας τις πειραματικές τιμές του δείκτη Kovats (R.I.exp) με τις θεωρητικές τιμές του δείκτη που υπάρχουν στην διεθνή βιβλιογραφία (R.I.lib). Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν ως πιθανοί μάρτυρες βοτανικής προέλευσης είχαν τιμή του δείκτη R.I.exp με διακύμανση ± 10 μονάδες σε σχέση με την θεωρητική τιμή του δείκτη (R.I.lib). Για την επιλογή των συγκεκριμένων ενώσεων λήφθηκαν υπόψιν τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνητικών δημοσιεύσεων με παρόμοιο ερευνητικό σκοπό.

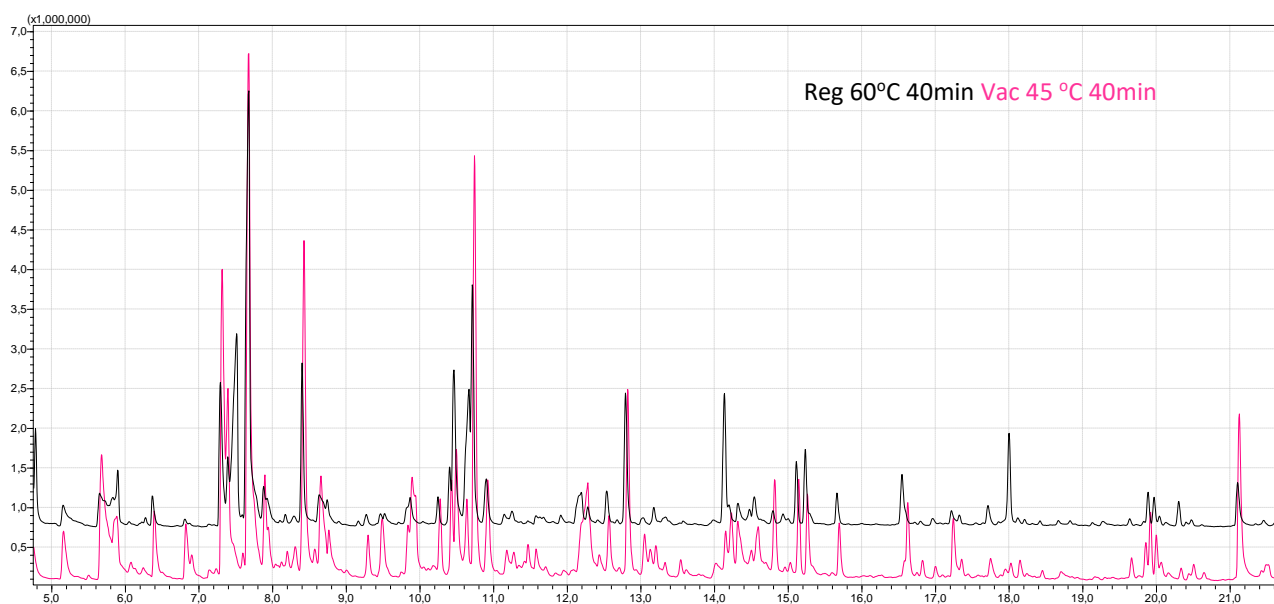
Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές Καραμπάγιας Ι. και Αλιφέρης Κ. έχουν προσδιορίσει τις πιθανές ενώσεις-μάρτυρες που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού, εφαρμόζοντας την συμβατική μεθοδολογία HS – SPME. Οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης στην έρευνα που διεξήγαγε ο Καραμπάγιας Ι. (Karabagias et al., 2014) ήταν οι εξής: 30 min χρόνος εκχύλισης και 45 °C η θερμοκρασία εκχύλισης, ενώ στην έρευνα του Αλιφέρη Κ. (Aliferis et al., 2010) ήταν οι εξής: 60 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C η θερμοκρασία εκχύλισης. Βασιζόμενοι στις συγκεκριμένες έρευνες των δυο μελετητών, εντοπίστηκαν ως πιθανοί μάρτυρες βοτανικής προέλευσης οι εννέα πτητικές ενώσεις, που παρουσιάζονται στο πίνακα 10. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη μελέτη για αυτές τις εννέα χημικές ενώσεις .

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ως βέλτιστη συνθήκη για την μέθοδο HS – SPME με συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης η θερμοκρασία 60 °C και τα 40 min χρόνου εκχύλισης. Αντιθέτως, οι βέλτιστες συνθήκες για την μέθοδο HS – SPME με συνθήκες κενού επιλέχθηκαν οι 45 °C για τη θερμοκρασία και τα 40 min για το χρόνο εκχύλισης.

Βέλτιστες συνθήκες		
Περιπτώσεις	Θερμοκρασία	Χρόνος
Συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Reg HS – SPME)	60 °C	40 min
Συνθήκες κενού (Vac HS – SPME)	45 °C	40 min

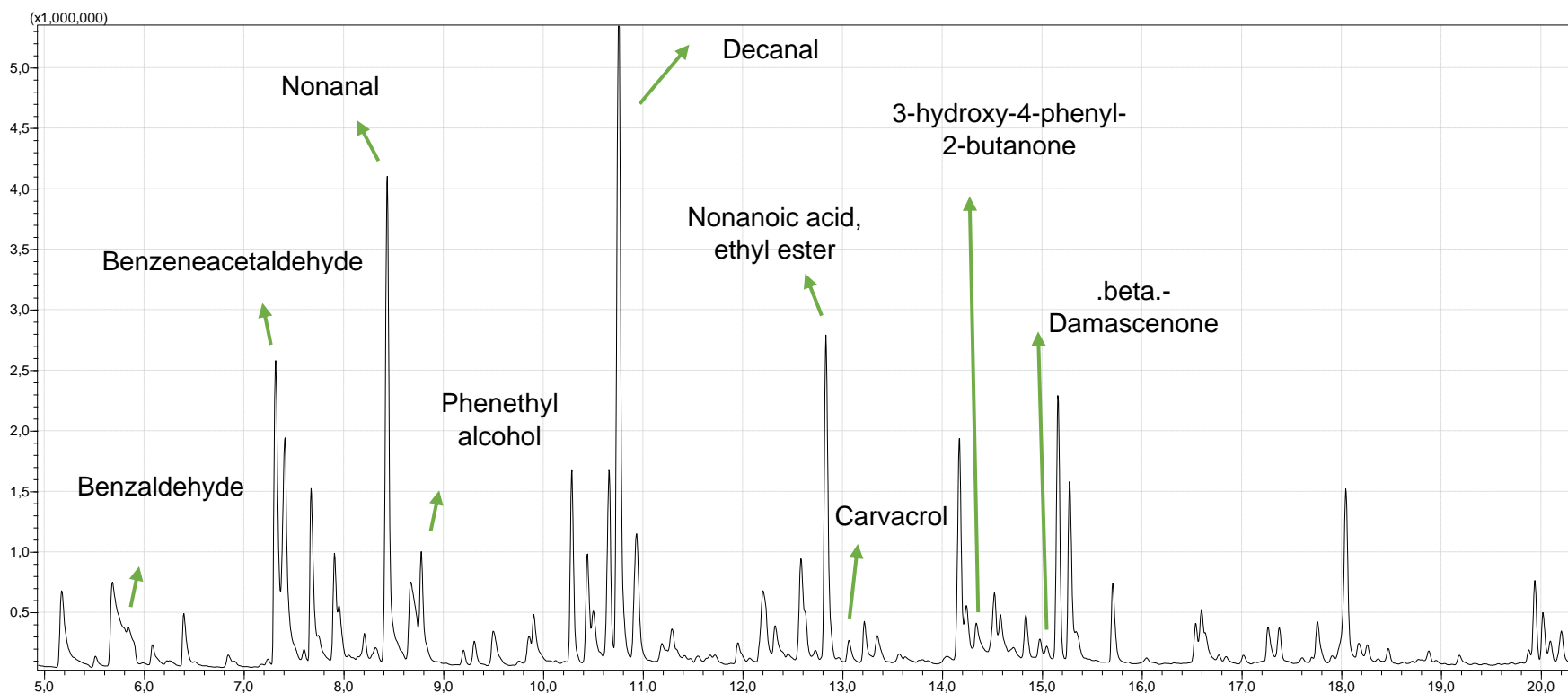
Πίνακας 9: Βέλτιστες συνθήκες για την μέθοδο HS – SPME με συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και για την μέθοδο HS – SPME με συνθήκες κενού

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα με το πτητικού προφίλ δείγματος θυμαρίσιου μελιού με τις τεχνικές HS – SPME (μαύρο) και Vac HS – SPME (ροζ).



Εικόνα 13: Χρωματογράφημα από την ανάλυση του πτητικού προφίλ δείγματος θυμαρίσιου μελιού (Α) εφαρμόζοντας την τεχνική HS – SPME (μαύρο) με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C η θερμοκρασία εκχύλισης και την τεχνική Vac HS – SPME (ροζ) με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 45 °C η θερμοκρασία εκχύλισης

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα του πτητικού προφίλ δείγματος θυμαρίσου μελιού με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C η θερμοκρασία εκχύλισης. Επιπλέον απαριθμούνται οι ενώσεις – μάρτυρες που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του δείγματος.



Εικόνα 14: Χρωματογράφημα του πτητικού προφίλ δείγματος θυμαρίσου μελιού με συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C η θερμοκρασία εκχύλισης. Απαριθμούνται οι ενώσεις-μάρτυρες που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του δείγματος

3.2.1. Ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων στο μέλι με χρήση HS – SPME

Botanical markers	Chemical Category	Molecular formula	CAS Number	R.T.	R.I. exp	R.I. lib	Volatility	Molecular weight	kH (atm*m ³ /mole)	logK _{ow}	logK _{oa}	Boiling point (°C)
Benzaldehyde	Aromatic Aldehyde	C ₇ H ₆ O	100-52-7	5,800	978	968	Volatile	106.1219	2,31E-05	1,71	4,442	181,22
Benzeneacetaldehyde	Aromatic Aldehyde	C ₈ H ₈ O	122-78-1	7,315	1055	1045	Volatile	120.1485	1,85E-05	1,54	5,43	201,51
Nonanal	Aldehyde	C ₉ H ₁₈ O	124-19-6	8,425	1109	1101	Volatile	142.2386	8,02E-04	3,27	4,793	196,48
Phenethyl alcohol	Alcohol	C ₈ H ₁₀ O	60-12-8	8,750	1123	1117	Volatile	122.1644	1,78E-07	1,57	6,340	224,85
Decanal	Aldehyde	C ₁₀ H ₂₀ O	112-31-2	10,740	1211	1203	Volatile	156.2652	1,11 E-03	3,76	4,893	216,09
Nonanoic acid, ethyl ester	Esters	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	123-29-5	12,820	1296	1296	Volatile	186.2912	2,059E-03	4,3	5,461	229,67
Carvacrol	Phenolic Monoterpenoid	C ₁₀ H ₁₄ O	499-75-2	13,040	1305	1307	Volatile	150.2176	1,523E-05	3,52	7,799	236,92
3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone	Aromatic Ketone	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	5355-63-5	14,300	1359	1348	Volatile	164.2011	4,80E-09	1,34	5,81	277,47
.beta.-Damascenone	Ketone	C ₁₃ H ₁₈ O	23726-93-4	15,040	1387	1382	Volatile	190.2814	0,0002247	4,21	6,687	265,13

Πίνακας 10: Σύνοψη των χημικών ενώσεων που υποδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού. Παράθεση πληροφοριών όπως η χημική κατηγορία, ο μοριακός τύπος, αριθμός CAS, χρόνος κατακράτησης (R.T), θεωρητική και πειραματική τιμή του δείκτη συγκράτησης Kovats (R.I lib και R.I exp) και σύνοψη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (πτητικότητα, μοριακό βάρος, σταθερά Henry, δείκτες logk_{ow}, logk_{oa}, σημείο βρασμού) των χημικών ενώσεων που υποδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού

3.2.2. Μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ενώσεων στόχων που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις ενώσεις – στόχους αναμένεται να επιδράσουν στον ρυθμό εκχύλισης και μεταφοράς μάζας από τη μήτρα (στερεό δείγμα) στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου και από τον υπερκείμενο χώρο στο υλικό με το οποίο είναι επικαλυμμένη η ίνα SPME. Στην παρούσα εργασία, το σημείο βρασμού, ο δείκτης λιποφιλίας, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – αέρα αλλά και η σταθερά Henry θα αποτελέσουν πολύτιμα εργαλεία προκειμένου να εκτιμήσουμε τον ρυθμό εκχύλισης των ενώσεων – στόχων από την μήτρα στον υπερκείμενο χώρο, καθώς επίσης αν κατά την επικράτηση συνθηκών χαμηλής πίεσης θα επηρεαστεί θετικά ο ρυθμός μεταφορά μάζας των ουσιών. Αναλυτικότερα:

Οι ενώσεις με χαμηλό σημείο βρασμού χαρακτηρίζονται από υψηλή πτητικότητα. Οι ενώσεις αυτές αναμένεται να μεταφερθούν γρήγορα από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο. Χαρακτηριστικά τέτοια παραδείγματα από τις ενώσεις – μάρτυρες είναι η **Benzaldehyde**, **Benzeneacetaldehyde**, **Nonanal**, **Phenethyl alcohol**, **Decanal** και **Nonanoic acid ethyl ester**. Αντιθέτως, οι ενώσεις μάρτυρες **Carvacrol**, **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone** και **.beta.-damascenone** παρουσιάζουν σημεία βρασμού με τιμές μεγαλύτερες των 240 °C, συγκαταλέγοντας τες στην κατηγορία των ημι-πτητικών ενώσεων (semi volatiles).

Ο βαθμός λιποφιλίας μιας ένωσης είναι μια ακόμη φυσικοχημική παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό εκχύλισης των ενώσεων από την μήτρα στον υπερκείμενο χώρο. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το μέλι περιέχει υγρασία 17%, συνεπώς για τις ενώσεις που παρουσιάζουν τιμή $\log K_{ow} > 1$ αναμένουμε μια πιθανώς ευκολότερη μεταφορά από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο.

Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης αέρα ($\log K_{oa}$) δείχνει την τάση μιας ένωσης να κατανέμεται μεταξύ της ατμόσφαιρας και μιας άλλης περιβαλλοντικής οργανικής φάσης. Όλες οι υπό μελέτη ενώσεις μάρτυρες εμφανίζουν τιμές $\log K_{oa} > 4$, συνεπώς όλες οι ενώσεις στόχοι που πρόκειται να μελετήσουμε έχουν μια τάση να κατανεμηθούν περισσότερο στον υπερκείμενο χώρο σε σχέση με την μήτρα.

Τέλος, ο δείκτης της σταθερά Henry, είναι μια ακόμη φυσικοχημική παράμετρος, μέσω της οποίας προβλέπεται η θετική ή όχι επίδραση των συνθηκών χαμηλής πίεσης κατά το στάδιο της εξάτμισης των ενώσεων από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο. Με βάση την βιβλιογραφία, στην περίπτωση των υδατικών δειγμάτων όταν η σταθερά Henry μιας ουσίας είναι μικρότερη ή ίση με $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ τότε η εκχύλιση του αναλύτη θα επιταχυνθεί κάτω από συνθήκες κενού, σε σχέση με συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Αντίθετα, όταν η σταθερά Henry μιας ουσίας είναι μεγαλύτερη ή ίση με $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ η επίδραση του κενού δεν θα επηρεάσει τους ρυθμούς εκχύλισης (Psillakis, 2020a). Λαμβάνοντας υπόψιν τις τιμές του συντελεστή Henry για τις ενώσεις-μάρτυρες (πίνακας 10), θετική επίδραση στον ρυθμό εξάτμισης αναμένεται να έχουν οι ενώσεις: **Benzaldehyde**, **Benzeneacetaldehyde**, **Phenethyl alcohol**, **Carvacrol** και **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone**. Η παραπάνω εκτίμηση για την θετική επίδραση των συνθηκών κενού στον ρυθμό εξάτμισης των αναφερόμενων στόχων δεν είναι απολύτως βέβαιη γι' αυτό και θα πρέπει να επιβεβαιωθεί πειραματικά, δεδομένου ότι η φύση της μήτρας (θυμαρίσιο μέλι) δεν είναι υδατική, αλλά αρκετά σύνθετη και περίπλοκη

περιλαμβάνοντας πλήθος συστατικών όπως: σάκχαρα, νερό, οργανικά οξέα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα, ιχνοστοιχεία, ένζυμα, φλαβονοειδή, πτητικές-αρωματικές ουσίες, αλκαλοειδή, κολλοειδή, γυρεόκοκκους. Τα παραπάνω συστατικά ενδέχεται να επηρεάσουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος, μεταξύ αυτών και το ιξώδες, την ρευστότητα δηλαδή του δείγματος.

3.3. Μελέτη του ρυθμού εκχύλισης των ενώσεων – μάρτυρες κατά την εφαρμογή της τεχνικής HS – SPME σε συνθήκες κενού και ατμόσφαιρας

Ο ρυθμός εκχύλισης των εννέα ενώσεων που θεωρούνται με βάση την βιβλιογραφία μάρτυρες για την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού μελετήθηκε κατά την επικράτηση συνθηκών χαμηλής πίεσης (Vac HS – SPME) και ατμόσφαιρας (HS – SPME), δοκιμάζοντας τρεις διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας εκχύλισης (30, 45 και 60 °C) και 4 διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης (20, 30, 40 και 60 min). Τα διαγράμματα 2 έως 7 αποτυπώνουν το ρυθμό εκχύλισης για κάθε ένωση ξεχωριστά κατά την επικράτηση συνθηκών κενού (πορτοκαλί χρώμα) και ατμόσφαιρας (μπλε χρώμα).

Σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, ο ρυθμός εκχύλισης όλων των ενώσεων – στόχων βελτιώθηκε σημαντικά με την αύξηση της θέρμανσης αλλά και του χρόνου εκχύλισης. Η ανίχνευση των ενώσεων – στόχων με μεγάλη πτητικότητα, όπως είναι η **Benzaldehyde**, **Benzeneacetaldehyde**, **Nonanal** και **Decanal**, ήταν δυνατή κατά εφαρμογή ήπιας θέρμανσης (30 °C) για σύντομο χρονικό διάστημα (20 min). Αυτό δεν ήταν δυνατό για τις ενώσεις – στόχους μεγάλου μοριακού βάρους με μέτρια πτητικότητα όπως είναι η **Carvacrol**, η **.beta.-damascenone** και η **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone**. Οι παραπάνω ενώσεις χρειάστηκαν θέρμανση στους 60 °C για τουλάχιστον 30 min προκειμένου να ισορροπήσουν.

Η τεχνική Vac HS – SPME επιταχύνει το ρυθμό εκχύλισης των ημι-πτητικών ενώσεων. Οι ενώσεις **Carvacrol**, **.beta.-damascenone** και **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone** σύμφωνα με το σημείο βρασμού τους τείνουν να θεωρηθούν ημι-πτητικές. Επιπλέον η χαμηλή τιμή σταθερά Henry kH συνδράμει στην επιτάχυνση των ρυθμών εκχύλισης. Οι τρεις αυτές ενώσεις έχουν μικρή τιμή σταθερά Henry kH κάτι που δικαιολογεί ακόμη περισσότερο την επιτάχυνση των ρυθμών εκχύλισης τους.

Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση της ένωσης **Carvacrol**, η οποία παρουσίασε εξαιρετική βελτίωση κατά την εφαρμογή της τεχνικής Vac HS – SPME. Πιο συγκεκριμένα η ένωση αυτή ταυτοποιήθηκε στους 30 °C αλλά και στους 45 °C μόνο σε συνθήκες κενού, με μια εξαίρεση στους 45 °C και 60 min χρόνο εκχύλισης που εντοπίστηκε η ένωση και κάτω από συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Η ανάλυση των δειγμάτων, εξαιτίας της ανομοιογένειας τους, είχαν ως αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ένωση να εμφανιστεί σε διαφορετικές ποσότητες. Αυτό επέφερε στις συγκεκριμένες συνθήκες το σφάλμα να υπολογιστεί σχετικά υψηλό. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν το γεγονός ότι στη παρούσα εργασία το δείγμα υπό ανάλυση είναι τρόφιμο. Τα τρόφιμα είναι δείγματα που δεν είναι πανομοιότυπα και υπάρχει ανομοιογένεια, οπότε είναι πιθανό στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν να παρουσιάστηκε σφάλμα που δεν μπορεί να προβλεφθεί και να αποφευχθεί. Η ένωση **Carvacrol** αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα.

Συμπερασματικά, η τεχνική Vac HS – SPME φαίνεται ότι αποδίδει καλύτερα από την συμβατική HS – SPME καθώς εντοπίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν περισσότερες ενώσεις – στόχοι αλλά και τα σήματα είναι σημαντικά μεγαλύτερα συγκριτικά με αυτά υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

3.4. Επίδραση της θερμοκρασίας (extraction temperature) στο ρυθμό εκχύλισης των αναλυτών σε συνθήκες ατμοσφαιρικής και μειωμένης πίεσης

Η θερμοκρασία αποτελεί μια παράμετρο που επηρεάζει σημαντικά τη βελτιστοποίηση της HS – SPME διότι βελτιώνει τους συντελεστές διάχυσης και τη σταθερά Henry των ενώσεων με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων στον υπερκείμενο χώρο και την ελάττωση των χρόνων ισορροπίας.

Τα πειράματα αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκαν σε τρεις θερμοκρασίες (30, 45 και 60 °C). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των διαγραμμάτων 2 έως 7 η αύξηση της θερμοκρασίας συμβάλει θετικά στο ρυθμό εκχύλισης των ενώσεων – στόχων κατά την επικράτηση συνθηκών μειωμένης και ατμοσφαιρικής πίεσης.

Κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης, υψηλοί ρυθμοί εκχύλισης παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις στόχους με υψηλή πτητικότητα, όπως είναι η **Benzaldehyde**, **Benzeneacetaldehyde** και **Nonanal** εφαρμόζοντας ήπια θέρμανση (30 °C). Η άνοδος της θερμοκρασίας δεν συνέβαλε στην περαιτέρω αύξηση του ρυθμού εκχύλισης, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για τις συγκεκριμένες ενώσεις έχει επέλθει ισορροπία. Για τις ενώσεις – μάρτυρες με μικρότερη πτητικότητα όπως είναι οι **Decanal**, **Phenethyl alcohol**, **Nonanoic acid ethyl ester** παρατηρούμε μια βελτίωση στο ρυθμό εκχύλισης τους με την άνοδο της θερμοκρασίας από τους 30 °C στους 45 °C. Η εκχυλιστική τους απόδοση κατά την εφαρμογή ακόμη υψηλότερης θερμοκρασίας (60 °C) παρέμεινε η ίδια, συνεπώς οι παραπάνω αναφερόμενες ενώσεις φαίνεται να ισορροπούν με θέρμανση στους 45 °C. Τέλος οι ημι-πτητικές ενώσεις **Carvacrol** και **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone** απαιτούν την επιβολή υψηλής θέρμανσης (60 °C) για την επιτυχή εκχύλιση τους. Η εκχύλιση των δυο αυτών ενώσεων καταγράφεται και με την επιβολή θέρμανσης στους 45 °C συνδυαστικά με μεγάλους χρόνους δειγματοληψίας (60 min). Τέλος, η ιδιαιτέρως ημι-πτητική ένωση **.beta.-damascenone** δεν ήταν εφικτό να εκχυλιστεί σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και αυτό αιτιολογείται και αναμένεται βάση των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα, ως βέλτιστη θερμοκρασία εκχύλισης θεωρήθηκε η θερμοκρασία των 60 °C.

Κατά την επικράτηση συνθηκών μειωμένης πίεσης, οι ρυθμοί εκχύλισης όλων των ενώσεων βελτιώθηκαν σημαντικά σε σχέση με τα αποτελέσματα κατά την επικράτηση συνθηκών 1 atm. Οι ενώσεις με μέτρια πτητικότητα όπως είναι **Carvacrol** και η **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone** μπόρεσαν να εκχυλιστούν με πολύ μεγαλύτερη απόδοση με εφαρμογή ήπιας θέρμανσης 30 °C ή και 45 °C σε σχέση με την θερμοκρασία των 60 °C που χρειάστηκε σε συνθήκες 1 atm. Το πιο σημαντικό όμως ήταν η ταυτοποίηση της ένωσης **.beta.-damascenone** με την επιβολή ήπιας θέρμανσης (30 °C) συνδυαστικά με μεγάλο χρόνο εκχύλισης (60 min). Ο ίδιος ρυθμός εκχύλισης σημειώθηκε για την περίπτωση της **.beta.-damascenone** στο μισό χρόνο (30 min) κατά την εφαρμογή θέρμανσης 45 °C. Έτσι λοιπόν, η θερμοκρασία των 45 °C θεωρήθηκε η βέλτιστη κατά την επικράτηση συνθηκών κενού, εφόσον ίδιοι ή και καλύτεροι ρυθμοί εκχύλισης καταγράφηκαν σε σχέση με όταν εφαρμόστηκε υψηλότερη θερμοκρασία. Η παρουσία του κενού βοήθησε στο να εκχυλιστεί

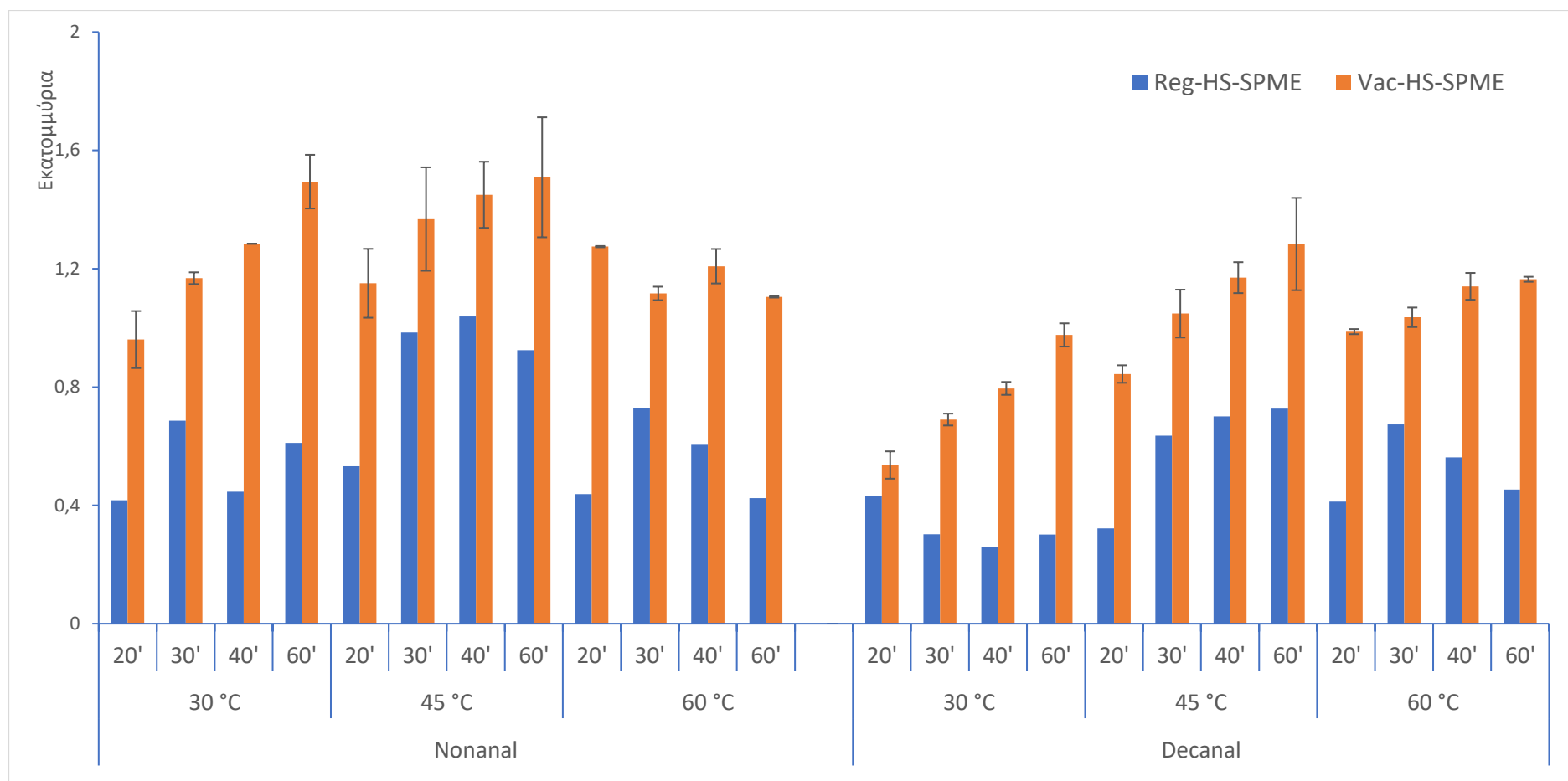
μεγαλύτερος αριθμός αναλύτων σε μεγαλύτερη απόδοση, μειώνοντας το ενεργειακό κόστος της προσέγγισης της Vac-HS-SPME.

3.5. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης (extraction time) στο ρυθμό εκχύλισης των αναλυτών σε συνθήκες ατμοσφαιρικής και μειωμένης πίεσης

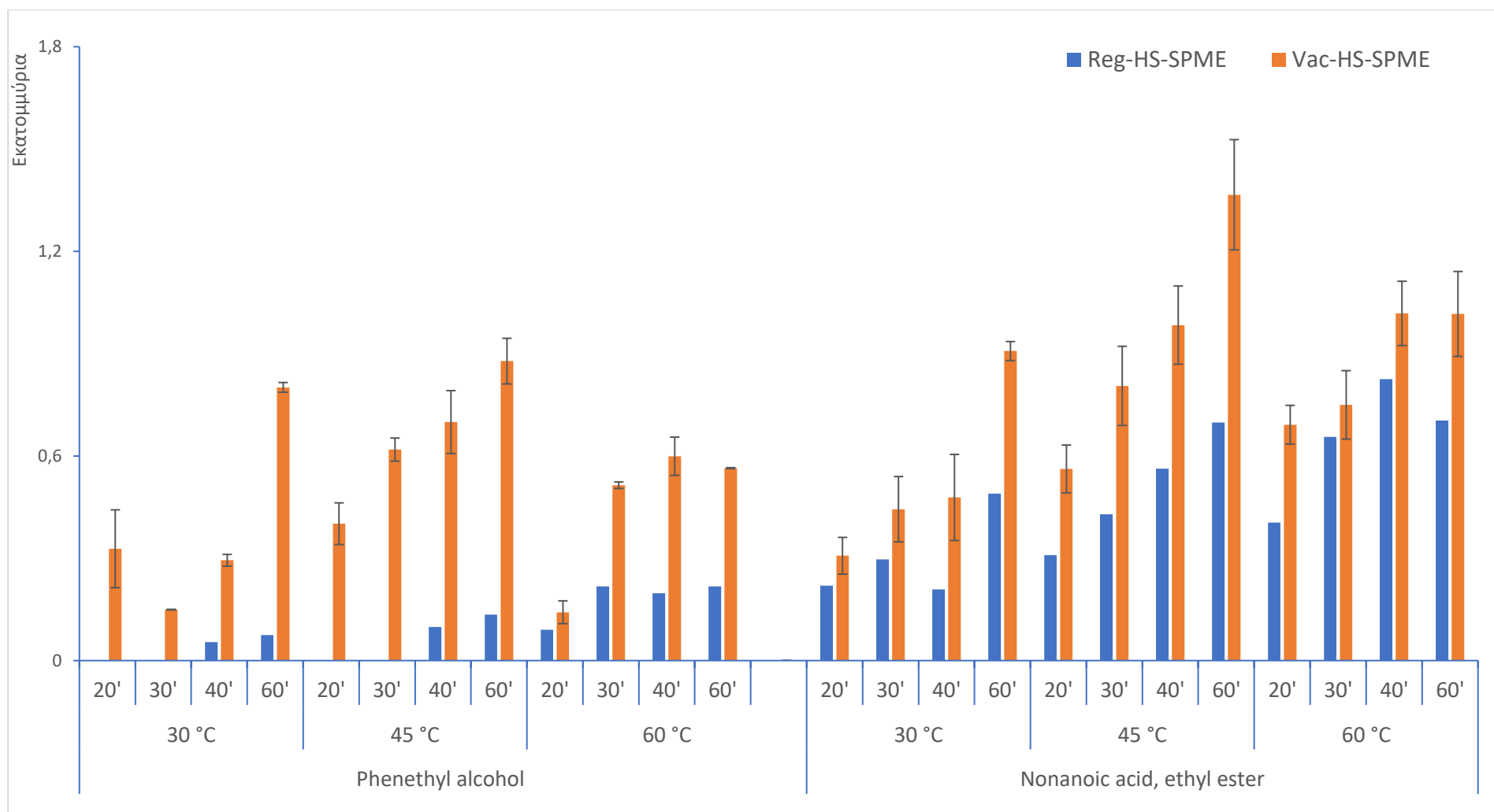
Μια επιπλέον σημαντική παράμετρος η οποία μελετήθηκε ήταν ο χρόνος εκχύλισης. Το παρών πείραμα πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις χρόνους και πιο συγκεκριμένα τα 20, 30, 40 και 60 min. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των διαγραμμάτων 2 έως 7 η αύξηση του χρόνου δειγματοληψίας συμβάλει θετικά στο ρυθμό εκχύλισης των ενώσεων στόχων κατά την επικράτηση συνθηκών μειωμένης αλλά και ατμοσφαιρικής πίεσης.

Κατά την επικράτηση και των δυο συνθηκών πίεσης, οι ενώσεις – μάρτυρες με υψηλή πτητικότητα εκχυλίστηκαν με μεγάλο ρυθμό κατά την εφαρμογή μικρών χρόνων εκχύλισης 20-30 min. Η περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης δεν επέφερε κάποια σημαντική αλλαγή στην εκχυλιστική τους απόδοση. Χαρακτηριστικά τέτοια παραδείγματα είναι οι **Decanal**, **Nonanal** και **Benzeneacetaldehyde**, οι οποίες ισορρόπησαν σε χρόνο εκχύλισης 30 min και θερμοκρασία εκχύλισης 30 °C. Οι λιγότερο πτητικές ενώσεις – μάρτυρες χρειάστηκαν μεγαλύτερο χρόνο διάστημα προκειμένου να εκχυλιστούν με μεγάλη απόδοση. Χαρακτηριστικά τέτοιο παράδειγμα είναι η περίπτωση της **Phenethyl alcohol**, η οποία προσδιορίστηκε σε συνθήκες 1 atm μετά το χρονικό διάστημα 40 min σε θερμοκρασία 30 °C και 45 °C. Αντίστοιχο παράδειγμα είναι η ένωση **Carvacrol** η οποία χρειάστηκε 60 min για να εκχυλιστεί στους 45 °C σε συνθήκες 1 atm. Ο χρόνος δειγματοληψίας όμως για τα παραπάνω δύο παραδείγματα μειώθηκε στο μισό κατά την επικράτηση συνθηκών μειωμένης πίεσης. Στην περίπτωση της **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone**, ο χρόνος δειγματοληψίας υποτετραπλασιάστηκε υπό συνθήκες κενού και η ένωση ταυτοποιήθηκε σε χρόνο 20 min και θερμοκρασία 45 °C, ενώ σε συνθήκες 1 atm απαιτήθηκαν 60 min και θέρμανση στους 45 °C. Τέλος η ημι-πτητική ένωση **.beta.-damascenone**, η οποία δεν μπόρεσε να ανιχνευτεί σε συνθήκες 1 atm, εκχυλίστηκε με επιτυχία υπό συνθήκες κενού. Ο ρυθμός εκχύλισης της αυξήθηκε με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης στην περίπτωση των 45 °C. Αντίστοιχη συμπεριφορά στον ρυθμό εκχύλισης παρατηρήθηκε και με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης στους 60 °C, αλλά τα σήματα που καταγράφηκαν στους 45 °C ήταν καλύτερα σε σχέση με τα αντίστοιχα στους 60 °C.

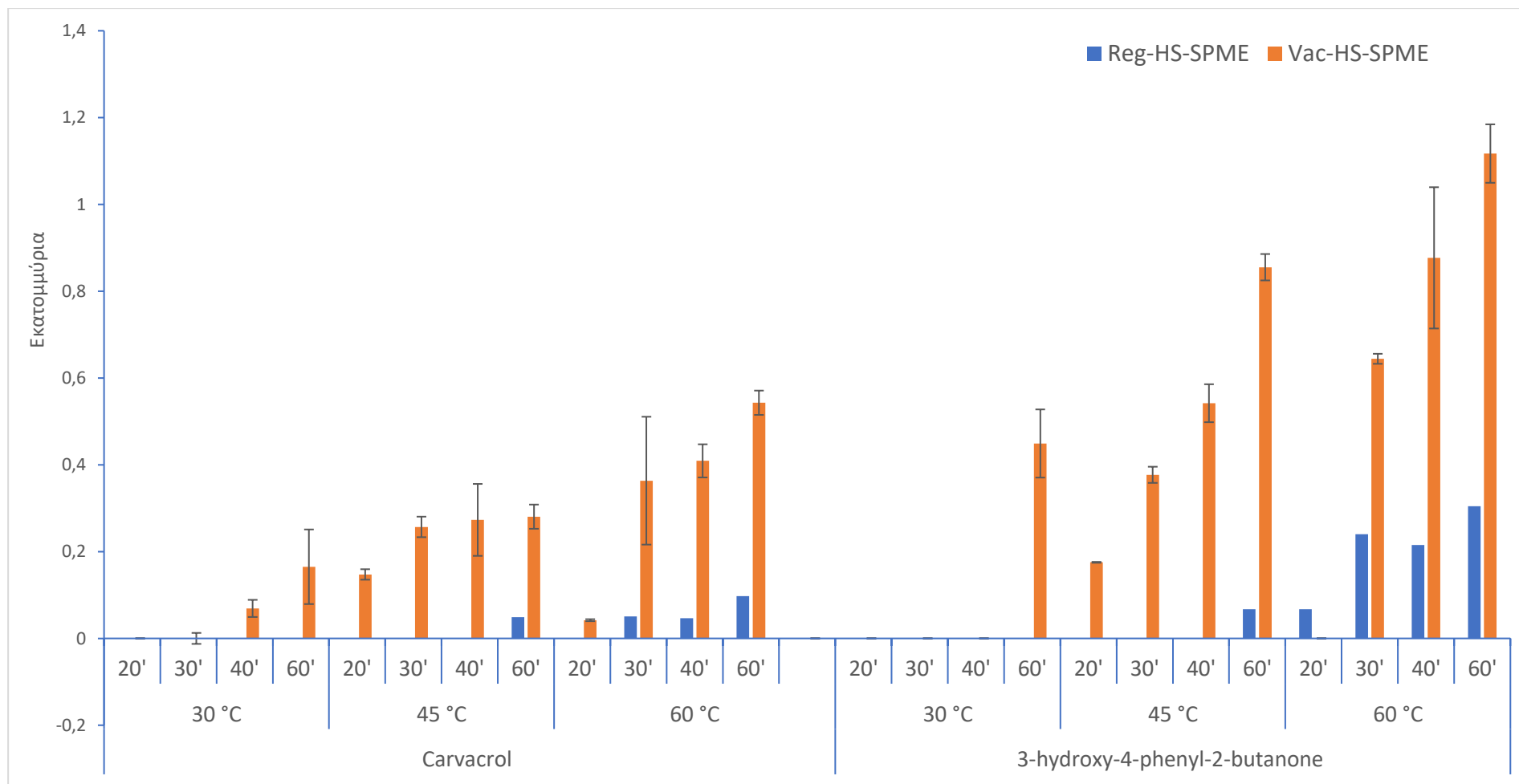
Ως καλύτερος χρόνος δειγματοληψίας και για τις δυο συνθήκες πίεσης θεωρήθηκαν τα 40 min, καθώς σε μεγαλύτερο χρόνο δειγματοληψίας όπως ήταν τα 60 min παρατηρήθηκαν φαινόμενα ανταγωνιστικής προσρόφησης.



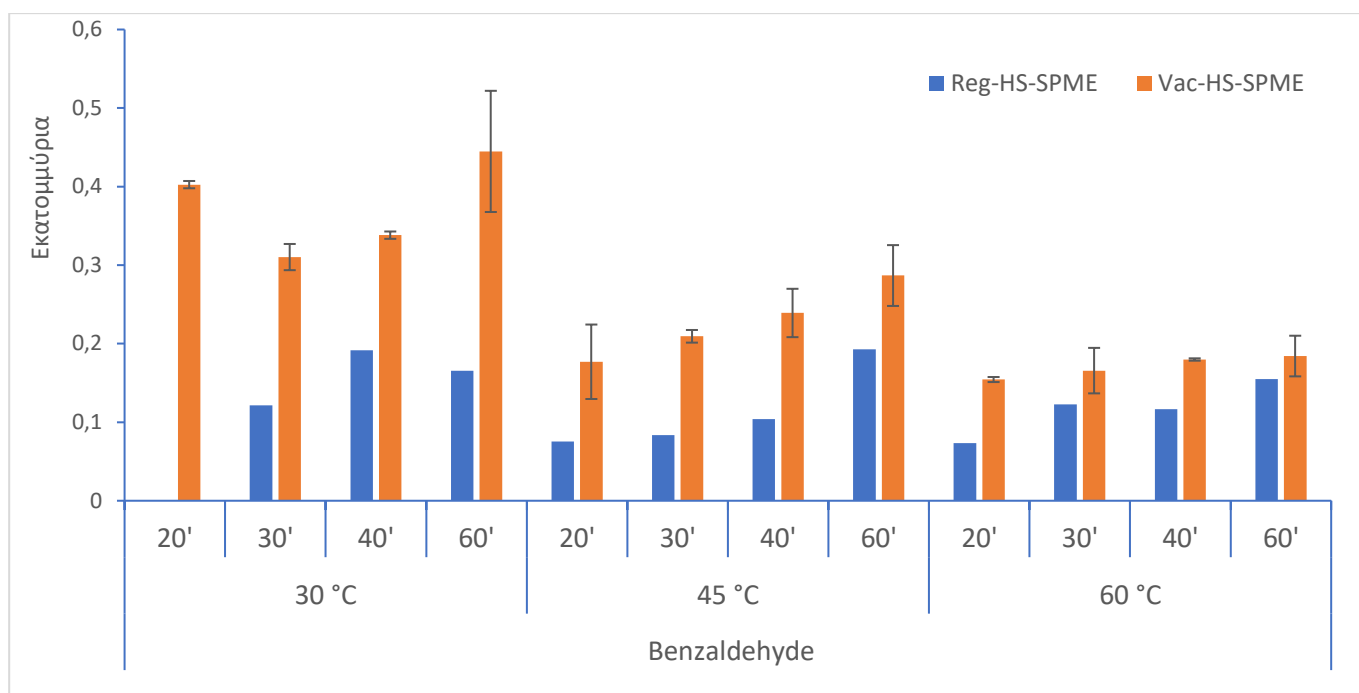
Διάγραμμα 2: Οι πτητικές ενώσεις Nonanal και Decanal για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)



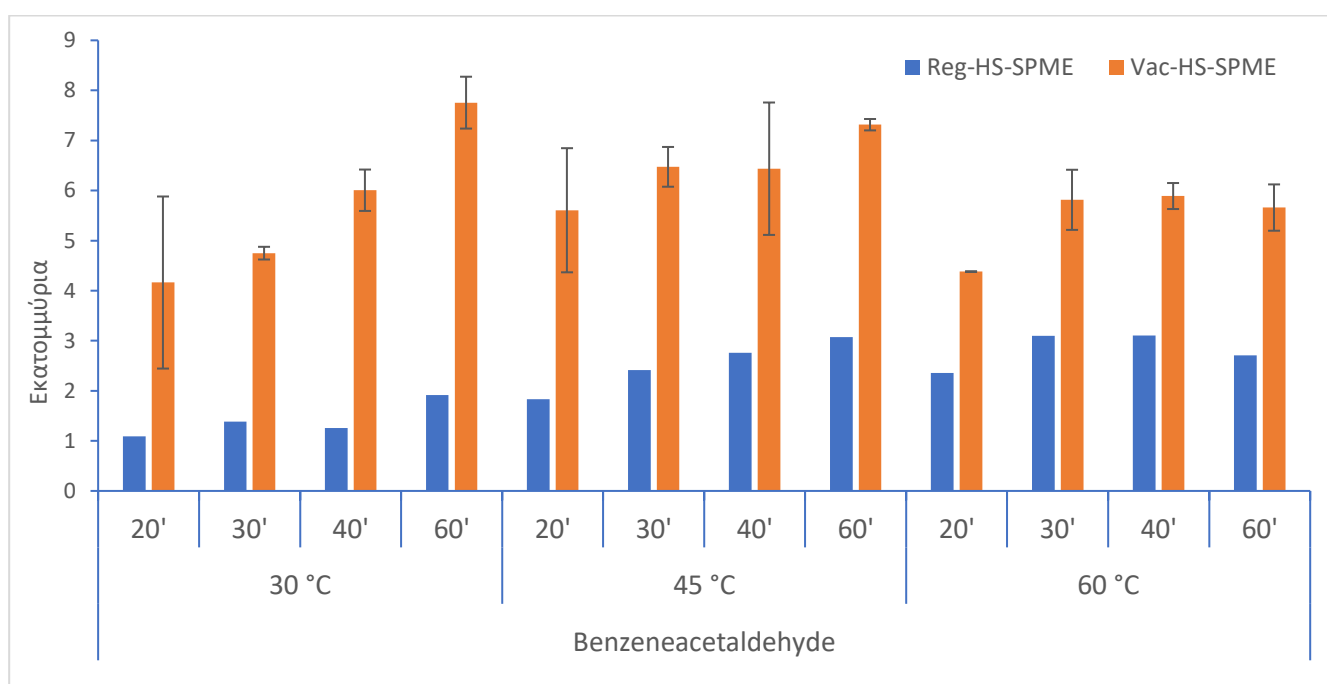
Διάγραμμα 3: Οι πτητικές ενώσεις Phenethyl alcohol και Nonanoic acid, ethyl ester για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)



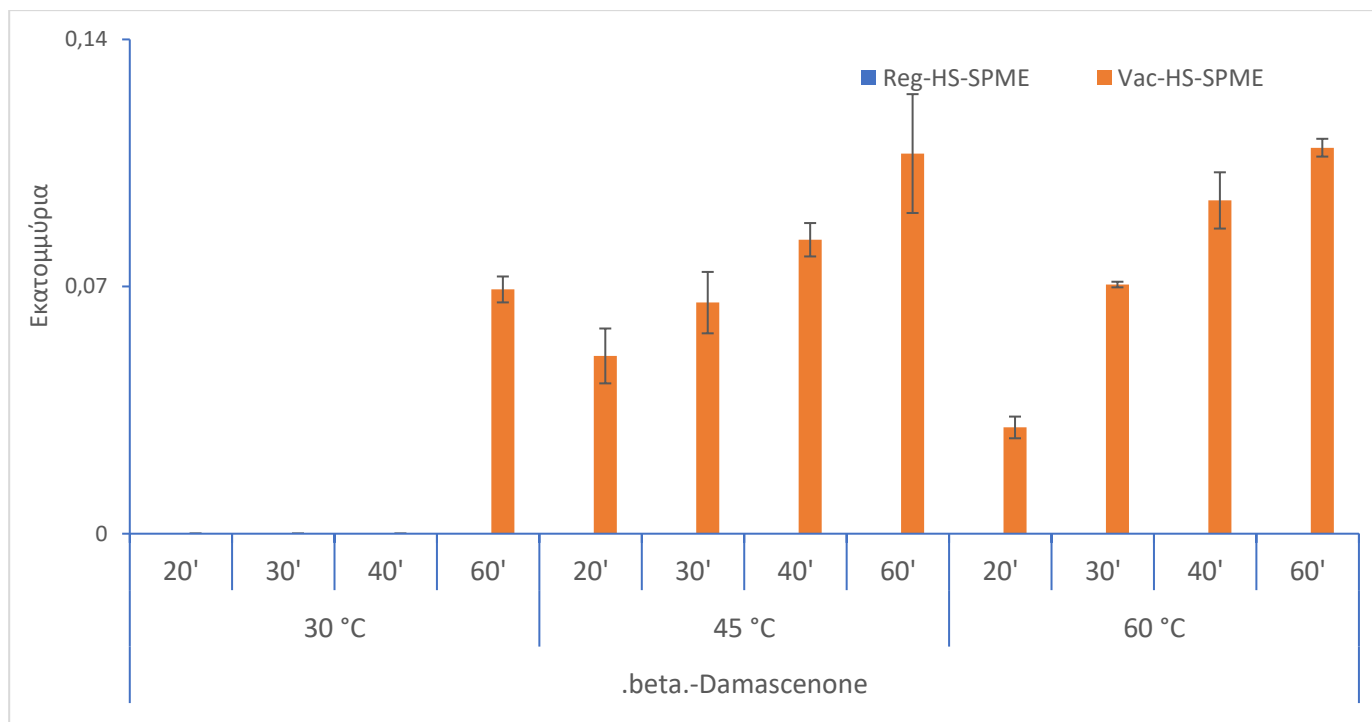
Διάγραμμα 4: Οι πτητικές ενώσεις Carvacrol και 3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)



Διάγραμμα 5: Η πτητική ένωση Benzaldehyde για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)



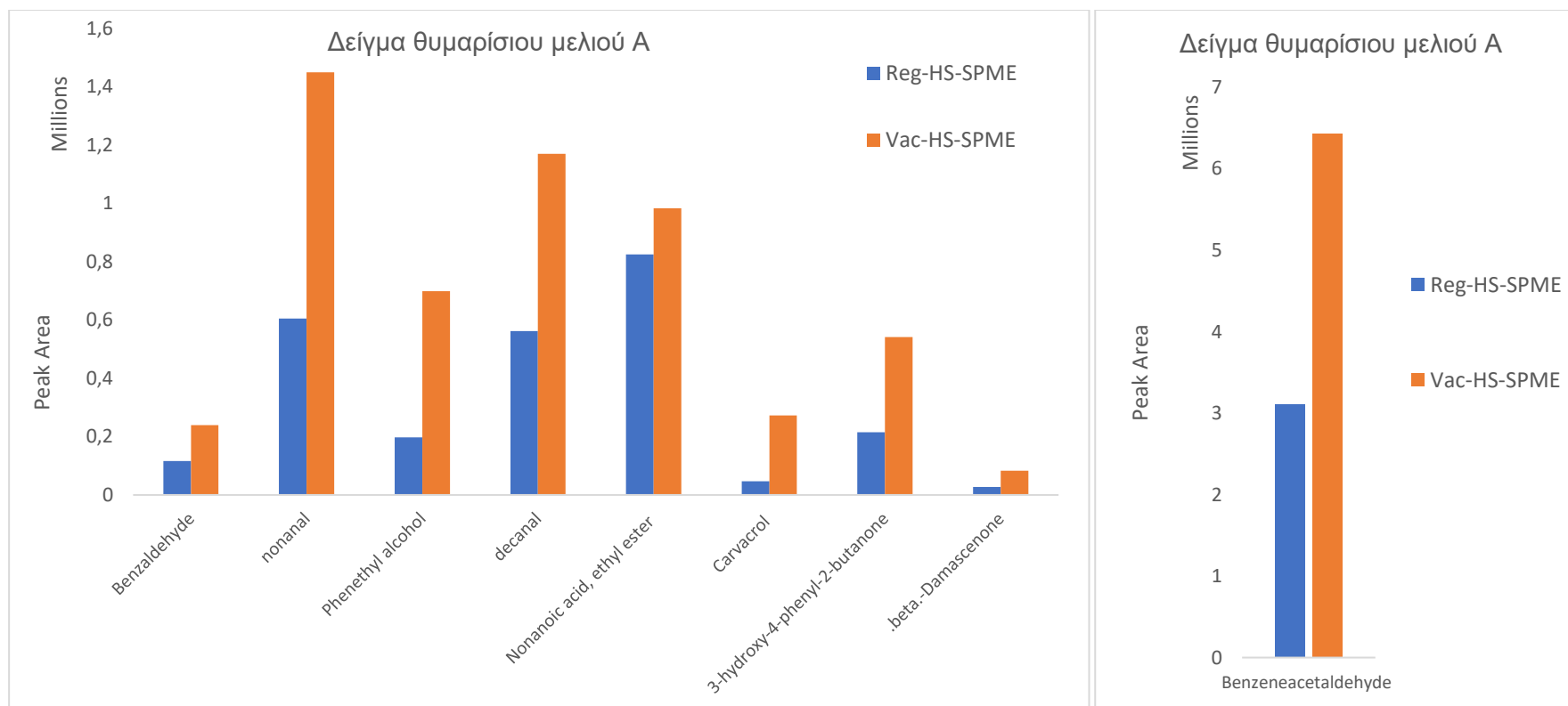
Διάγραμμα 6: Η πτητική ένωση Benzeneacetaldehyde για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)



Διάγραμμα 7: Η πτητική ένωση .beta.-Damascenone για το δείγμα θυμαρίσιου μελιού Α για όλους τους συνδυασμούς θερμοκρασιών και χρόνων εκχύλισης για συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και συνθήκες κενού (πορτοκαλί)

3.6. Πτητικό προφίλ θυμαρίσιου μελιού Α

Παρακάτω παρουσιάζεται το πτητικό προφίλ του δείγματος Α θυμαρίσιου μελιού στις βέλτιστες συνθήκες για τις περιπτώσεις ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) και κενού (πορτοκαλί). Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η τιμή της ένωσης Benzeneacetaldehyde έχει μεγάλη διαφορά με τις τιμές των άλλων ενώσεων στα περισσότερα δείγματα και για αυτό το λόγο θα παρουσιάζεται σε ξεχωριστό διάγραμμα.



Διάγραμμα 8: Παρουσίαση του πτητικού προφίλ του δείγματος θυμαρίσιου μελιού Α και της πτητικής ένωσης Benzeneacetaldehyde σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (μπλε) σε θερμοκρασία 60 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min και σε συνθήκες κενού (πορτοκαλί) σε θερμοκρασία 45 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min

3.7. Σύγκριση μεθόδων (HS – SPME και Vac HS – SPME)

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vac HS – SPME) αποδεικνύεται αποτελεσματικότερη και παράλληλα πιο πράσινη προσέγγιση σε σχέση με την συμβατική HS – SPME. Πιο συγκεκριμένα, η εκκένωση των φιαλιδίων σε χρονικό διάστημα μόλις 30 δευτερόλεπτα είχε ως απόρροια την εξοικονόμηση ενέργειας, μειώνοντας την ανάγκη για θέρμανση των δειγμάτων κατά 15 °C. Ταυτόχρονα, η επικράτηση συνθηκών χαμηλής πίεσης κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας βελτίωσε τον ρυθμό μεταφοράς μάζας όλων των ενώσεων-στόχων, καταγράφοντας καλύτερους ρυθμούς εκχύλισης σε σχέση με αυτούς που αποκτήθηκαν κατά την επικράτηση ατμοσφαιρικής πίεσης.

Μεταξύ των 9 ενώσεων στόχων, μικρότερη βελτίωση στο ρυθμό εκχύλισης φάνηκε να έχουν οι ενώσεις: **Benzaldehyde**, η **Nonanoic acid**, **ethyl ester** και η **.beta.Damascenone**. Μεγαλύτερη βελτίωση είχαν οι ενώσεις: **nonanal**, η **Phenethyl alcohol**, η **decanal**, η **Carvacrol**, η **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone**. Οι παραπάνω συμπεριφορές ήταν αναμενόμενες και δικαιολογούνται αν λάβουμε υπόψιν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, καθώς η εφαρμογή συνθηκών κενού βελτιώνει σημαντικά το ρυθμό εκχύλισης ενώσεων σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους που παρουσιάζουν μέτρια πτητικότητα και εμφανίζουν μικρή τιμή σταθερά Henry.

Λόγος Vac HS – SPME / HS – SPME

Ένας πιο ευκρινής τρόπος για την σύγκριση των δυο μεθοδολογιών είναι ο υπολογισμός του λόγου peak area ratio, ο οποίος προκύπτει αν διαιρεθεί το εμβαδόν που προκύπτει στο χρωματογράφημα για κάθε ένωση – στόχο υπό συνθήκες κενού με το εμβαδόν υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Όταν ο λόγος έχει τιμή ίση με 1, οι δυο μεθοδολογίες σημαίνει ότι αποδίδουν τον ίδιο ρυθμό εκχύλισης για την ένωση – στόχο. Το γεγονός αυτό ακόμα υποδηλώνει ότι η ένωση έχει καταλήξει σε συνθήκες ισορροπίας. Όταν ο λόγος είναι μεγαλύτερος από 1, τότε η εκχύλιση του αναλύτη έχει ευνοηθεί από την τεχνική Vac HS – SPME, ενώ όταν είναι μικρότερη από 1 τότε η εκχύλιση του αναλύτη έχει ευνοηθεί από την τεχνική HS – SPME.

Ο λόγος Peak Area (Vac HS – SPME / HS – SPME) υπολογίστηκε για της εννέα ενώσεις – μάρτυρες βοτανικής προέλευσης του δείγματος Α. Σε αυτό το σημείο να αναφέρουμε ότι κατά την εφαρμογή Vac HS – SPME η θερμοκρασία εκχύλισης είναι 45 °C ενώ κατά την εφαρμογή της HS – SPME 60 °C. Ο χρόνος εκχύλισης και στις δύο μεθοδολογίες ήταν ο ίδιος (40 min).

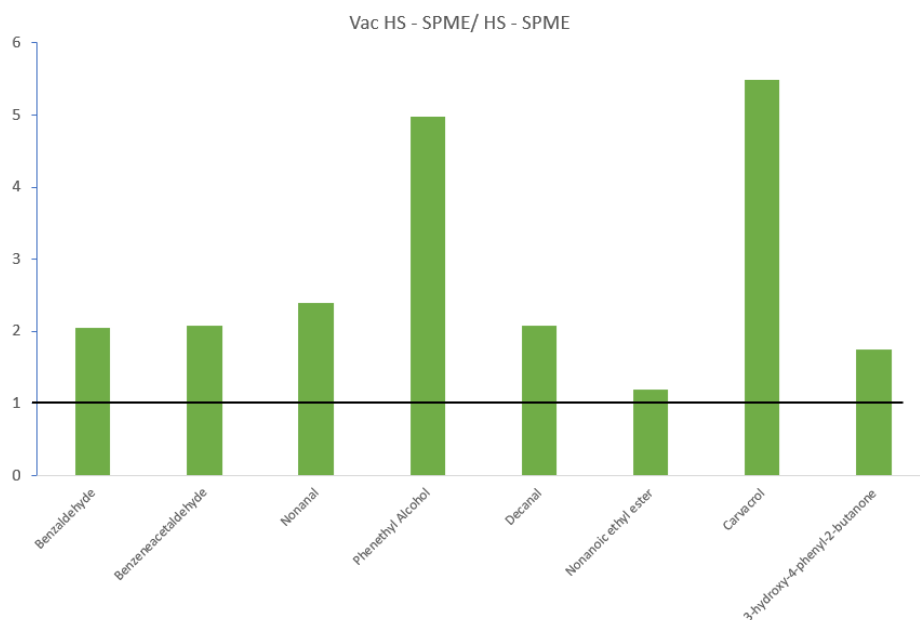
Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα του Πίνακα 11 παρατηρούμε την διπλάσια έως και πενταπλάσια απόκριση που επιτεύχθηκε στο ρυθμό εκχύλισης των περισσότερων ενώσεων – στόχων κατά την εφαρμογή συνθηκών κενού σε σχέση με την 1 atm. Η μόνη ένωση που φαίνεται να εκχυλίζεται με τον ίδιο ρυθμό κατά την εφαρμογή και των δυο συνθηκών πίεσης είναι η ένωση **Nonanoic acid ethyl ester** (peak area ratio: 1.2). Η παραπάνω ένωση έχει φτάσει σε στάδιο ισορροπίας κατά την εφαρμογή και των δυο συνθηκών πίεσης. Οι μεγάλες τιμές peak area ratio που καταγράφηκαν για τις ενώσεις – μάρτυρες **Phenethyl alcohol** και **Carvacrol** υποδεικνύουν την βελτίωση στο ρυθμό εκχύλισης τους και την αύξηση του ρυθμού μεταφοράς μάζας τους από την μήτρα στον υπερκείμενο χώρο κατά την επικράτηση συνθηκών κενού. Οι

μεγάλες τιμές ήταν αναμενόμενες αν λάβουμε υπόψιν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων ενώσεων.

Ο λόγος peak area ratio δεν μπορούσε να υπολογιστεί για την ένωση **.beta.damascenone**, διότι η ένωση αυτή ταυτοποιήθηκε μόνο με την εφαρμογή της Vac-HS-SPME.

Ενώσεις	Vac HS – SPME / HS – SPME
Benzaldehyde	2,05
Benzeneacetaldehyde	2,07
Nonanal	2,40
Phenethyl Alcohol	4,97
Decanal	2,07
Nonanoic acid, ethyl ester	1,19
Carvacrol	5,49
3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone	1,75

Πίνακας 11: Λόγοι εμβαδών των ενώσεων από τις τεχνικές HS – SPME και Vac HS – SPME (Vac HS – SPME / HS – SPME)



Διάγραμμα 9: Λόγοι των εμβαδών των ενώσεων από τις τεχνικές Vac HS – SPME και HS – SPME (Vac HS – SPME / HS – SPME)

4. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του Ν. Χανίων

Ο επόμενος στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να διερευνηθεί το πτητικό προφίλ του θυμαρίσιου μελιού, συλλέγοντας δείγματα από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές του Ν. Χανίων, προκειμένου να διαπιστωθούν διαφορές στο αποτύπωμα, πιθανότατα λόγω του διαφορετικού μικροκλίματος και υψόμετρου. Πραγματοποιήθηκε η ανάλυση τριών ακόμη δειγμάτων Β, Γ, και Δ εφαρμόζοντας τις τεχνικές μικροεκχύλισης στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής και μειωμένης πίεσης (HS – SPME και Vac HS – SPME αντίστοιχα). Στην περίπτωση της HS – SPME, η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με χρόνο εκχύλισης 40 min και θερμοκρασία 60 °C. Στην περίπτωση της Vac HS – SPME, έγινε δειγματοληψία με χρόνο εκχύλισης 40 min και θερμοκρασία 45 °C.

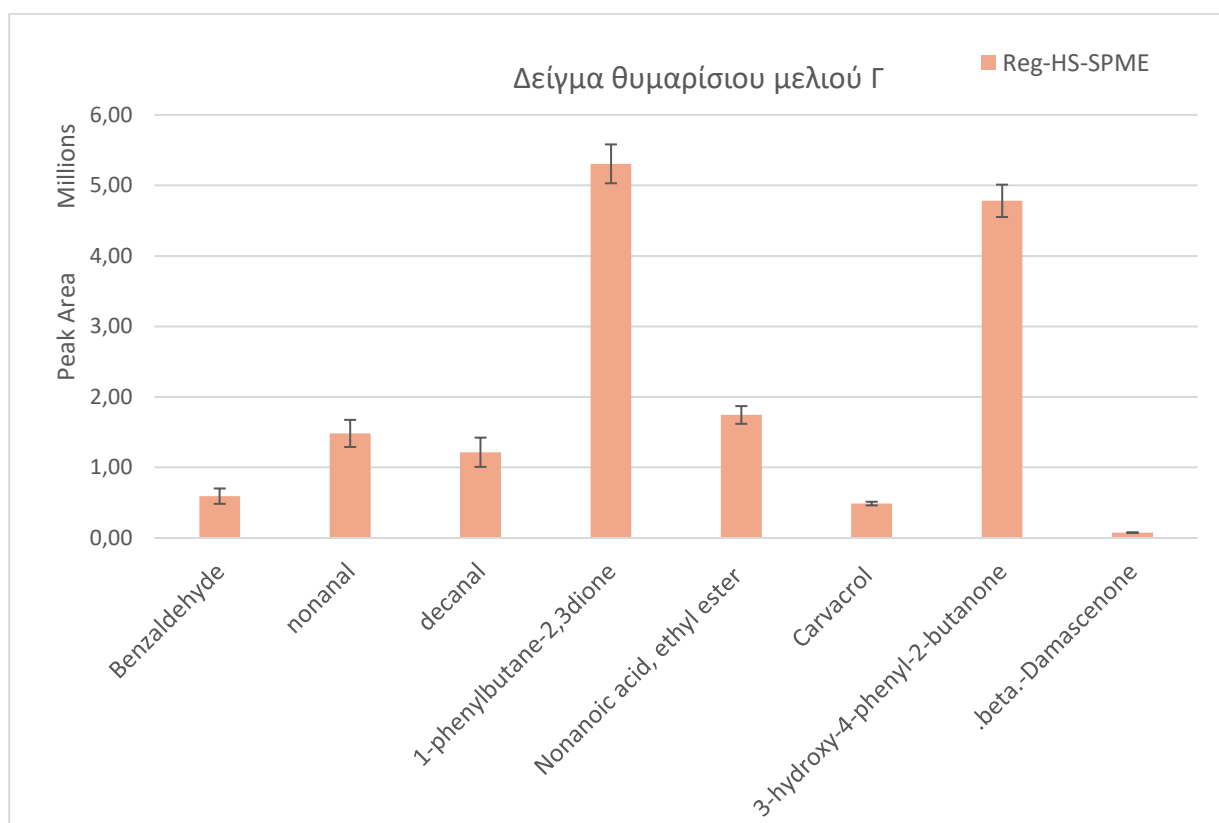
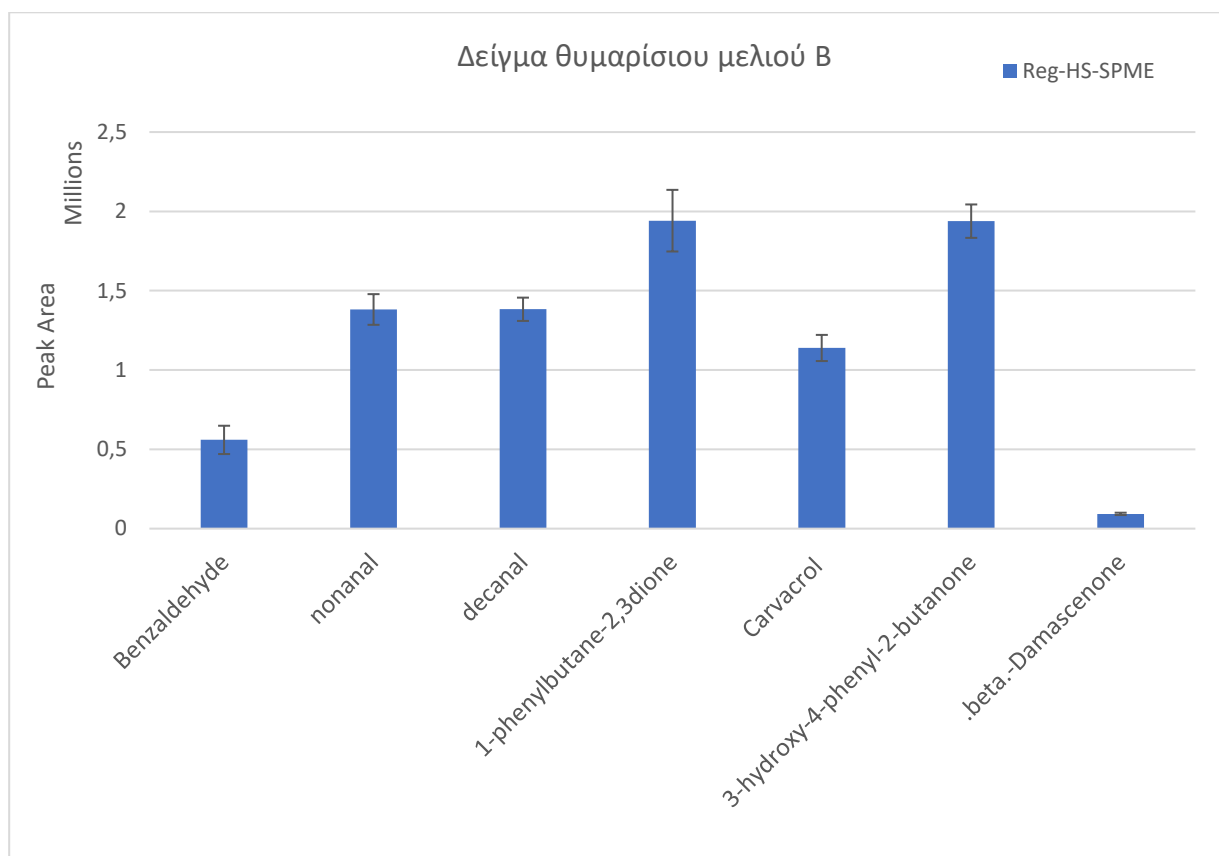
Κατά τη διάρκεια των πειραματικών μετρήσεων, η ίνα DVB/CAR/PDMS έσπασε, με αποτέλεσμα την μη ολοκλήρωση των προβλεπόμενων αναλύσεων υπό συνθήκες κενού. Για το λόγο αυτό, θα παρουσιαστούν μόνο τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις με την τεχνική HS – SPME.

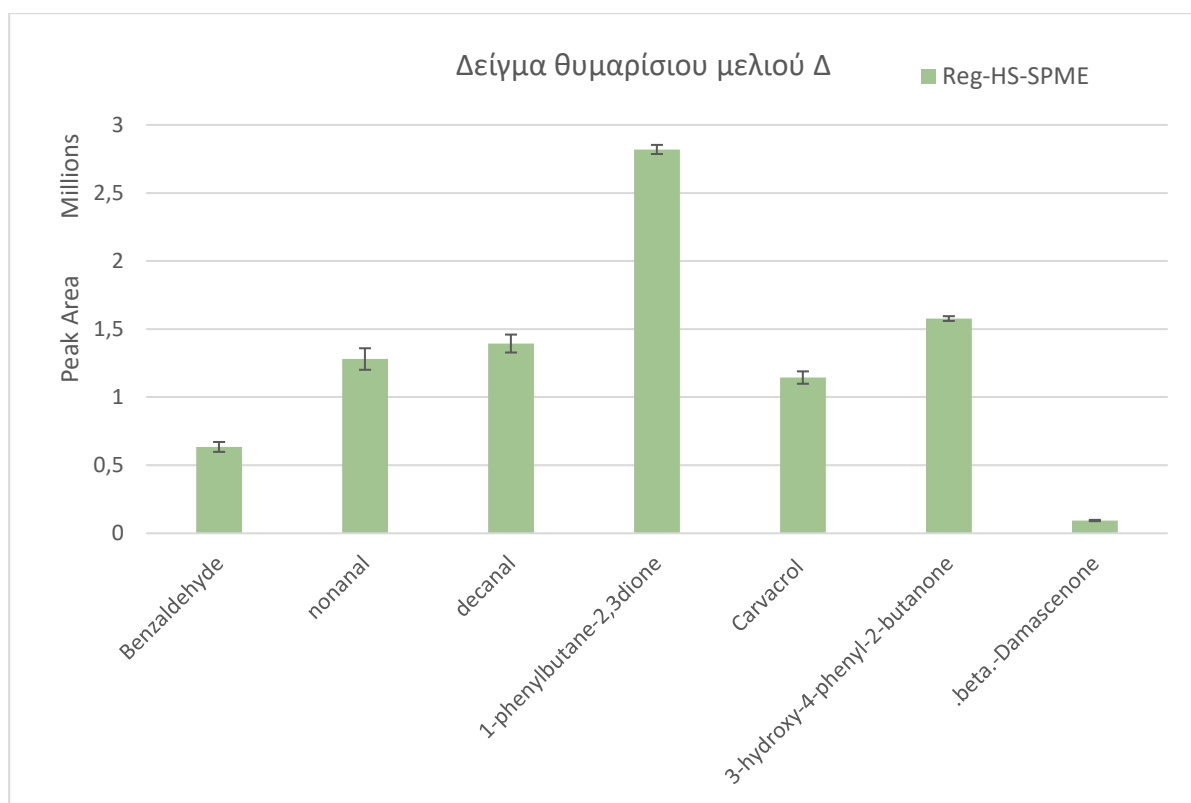
Το διάγραμμα 10 συνοψίζει τον ρυθμό εκχύλισης των εννέα ενώσεων-στόχων που ενδείκνυται για την προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του θυμαρίσιου μελιού στα δείγματα Β, Γ και Δ. Η αποτύπωση του ρυθμού εκχύλισης της Benzeneacetaldehyde στα τρία δείγματα έγινε σε ξεχωριστό διάγραμμα. Η συγκεκριμένη ένωση βρίσκεται σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν σε πολύ μεγάλη αφθονία και για το λόγο αυτό δεν μπορεί να συμπεριληφθεί σε κοινό διάγραμμα με τις άλλες ενώσεις-στόχους.

Ένα πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα που αξίζει να συμπεριληφθεί είναι η επιτυχής ταυτοποίηση της ένωσης – μάρτυρα για θυμαρίσιο μέλι **1-phenylbutane-2,3-dione** στα δείγματα Β, Γ και Δ. Η αδυναμία προσδιορισμού της συγκεκριμένης ένωσης στο δείγμα Α, πιθανότατα θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεωγραφικό υψόμετρο που ήταν τοποθετημένες οι κυψελίδες, από τις οποίες συλλέχτηκε το δείγμα Α. Το μικρόκλιμα της περιοχής συνδυαστικά με το γεωγραφικό υψόμετρο ίσως να έχει επηρεάσει την ποιοτική σύσταση του θυμαριού. Συνεπώς η ένωση **1-phenylbutane-2,3-dione** θα μπορούσε να θεωρηθεί μάρτυρας γεωγραφικής προέλευσης του θυμαρίσιου μελιού. Η εξακρίβωση ενός τέτοιου ενδεχομένου όμως απαιτεί περαιτέρω αναλύσεις μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, προκειμένου να προκύψει ένα πιο έμπιστο και ορθό συμπέρασμα.

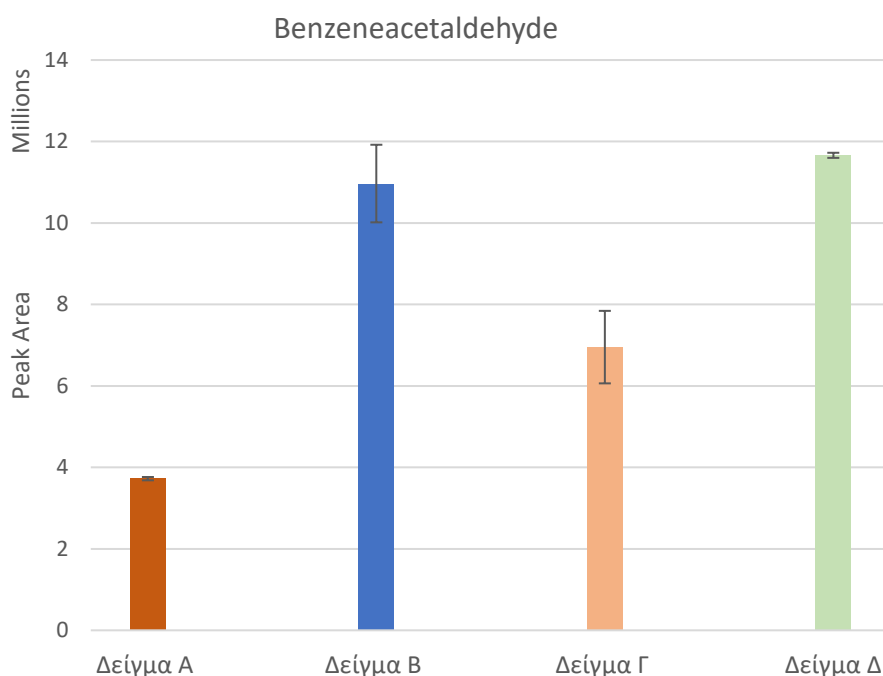
Σε γενικές γραμμές το αποτύπωμα των 4 δειγμάτων ήταν πανομοιότυπο, με το μεγαλύτερο μέρος των ενώσεων – στόχων να εντοπίζεται και στα υπόλοιπα δείγματα (Β, Γ και Δ). Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις **Phenethyl alcohol** και η **Nonanoic acid, ethyl ester** δεν βρέθηκαν στα δείγματα Β και Δ, ενώ στο δείγμα Γ δεν ανιχνεύτηκε η ένωση **Phenethyl alcohol**. Το δείγμα Β μοιάζει πολύ ποιοτικά με το δείγμα Δ, δεδομένου ότι σχεδόν όλοι οι ρυθμοί εκχύλισης των ενώσεων-στόχων ήταν πανομοιότυποι. Το δείγμα Γ διέφερε από τα υπόλοιπα τρία δείγματα, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων για τις ενώσεις **1-phenylbutane-2,3-dione** και **3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone**. Οι μικρές ποιοτικές διακυμάνσεις που εντοπίστηκαν στα 4 συνολικά δείγματα, πιθανότατα οφείλονται στην διαφορετική μικροχλωρίδα και στο υψόμετρο της εκάστοτε περιοχής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας υποδεικνύουν την δυναμική της τεχνικής HS – SPME ως προς την διάκριση δειγμάτων ανά γεωγραφική περιοχή.





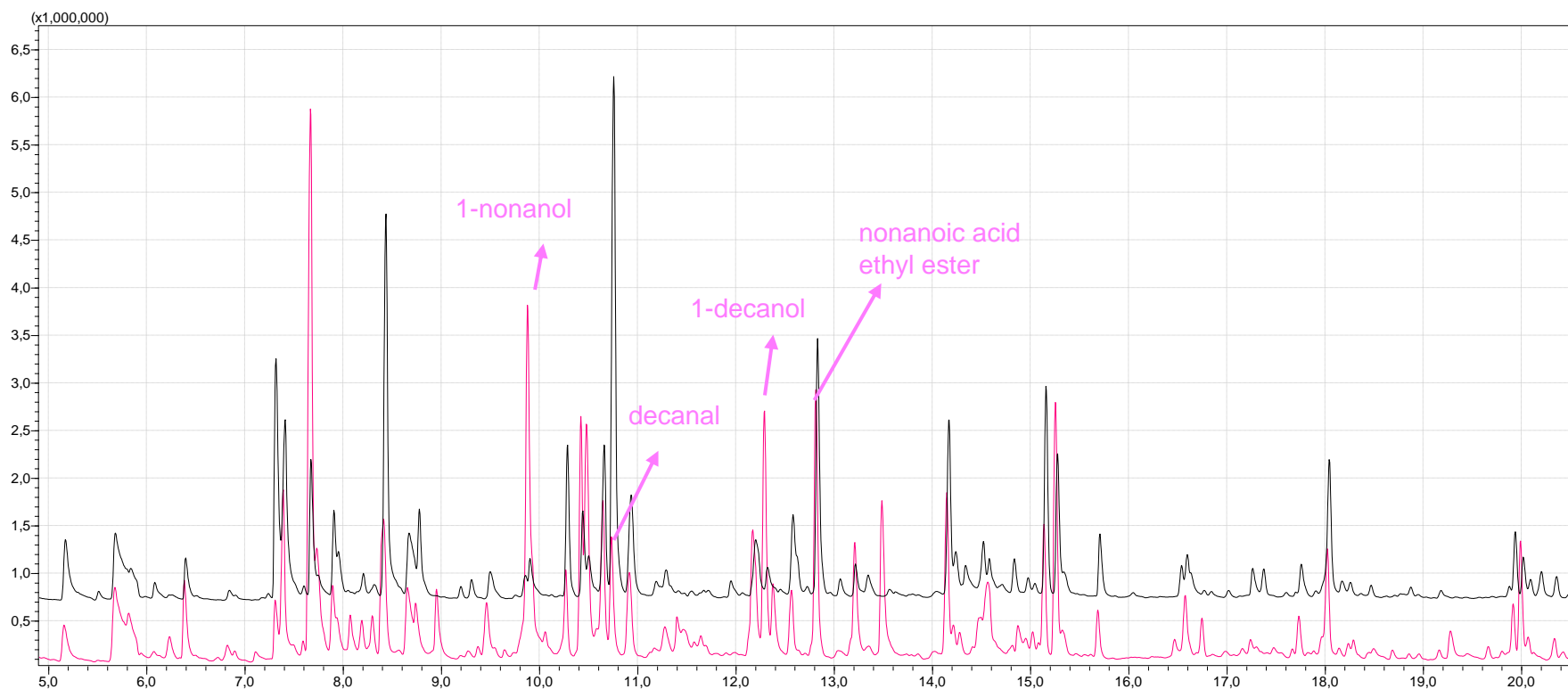
Διάγραμμα 10: Πηχτικό προφίλ ενώσεων-στόχων για την βοτανική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού για τα δείγματα Β, Γ και Δ . Η απομόνωση των ενώσεων έγινε με την χρήση της HS-SPME, σε θερμοκρασία 60 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min



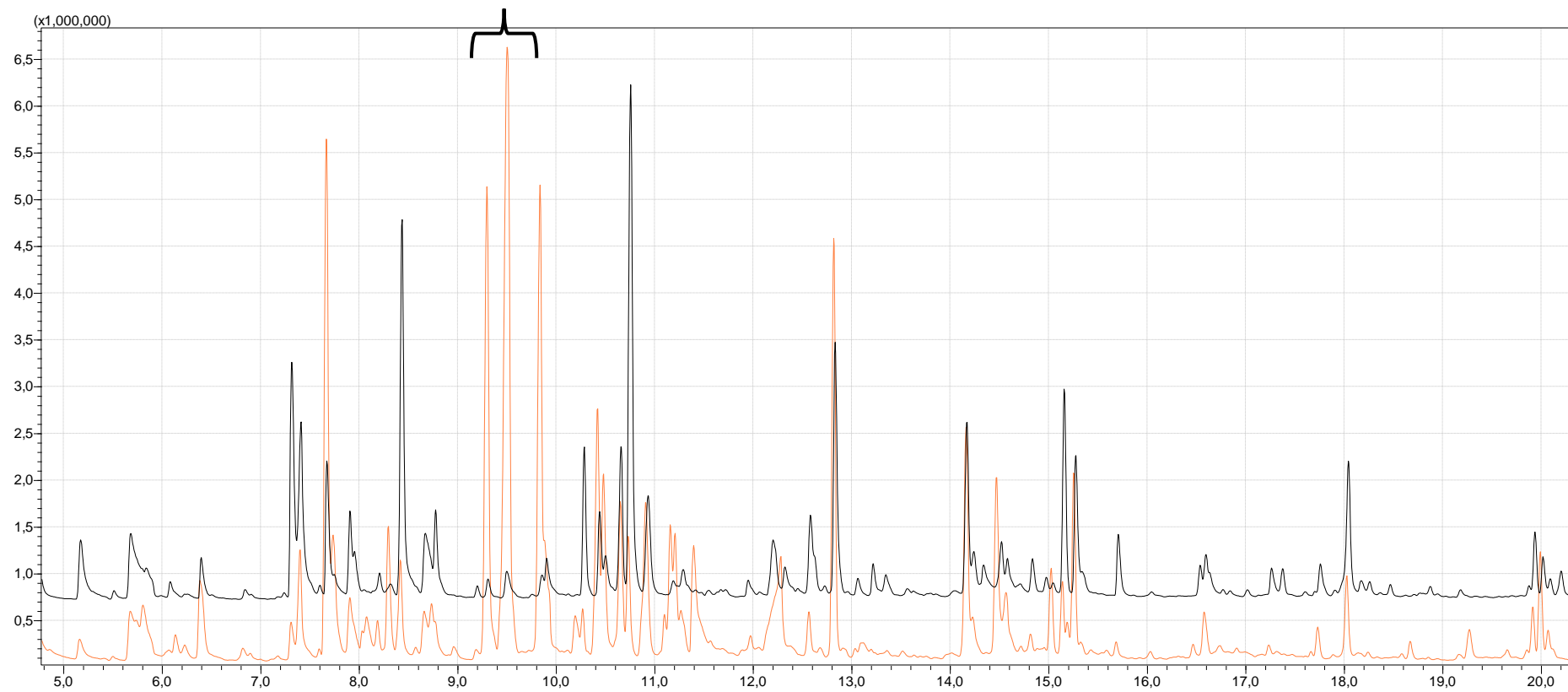
Διάγραμμα 11: Ρυθμός Εκχύλισης της ένωσης – μάρτυρα Benzeneacetaldehyde στα 4 δείγματα θυμαρίσιου μελιού, η απομόνωση της οποίας επιτευχθεί με την χρήση της HS-SPME, σε θερμοκρασία 60 °C και χρόνο εκχύλισης 40 min

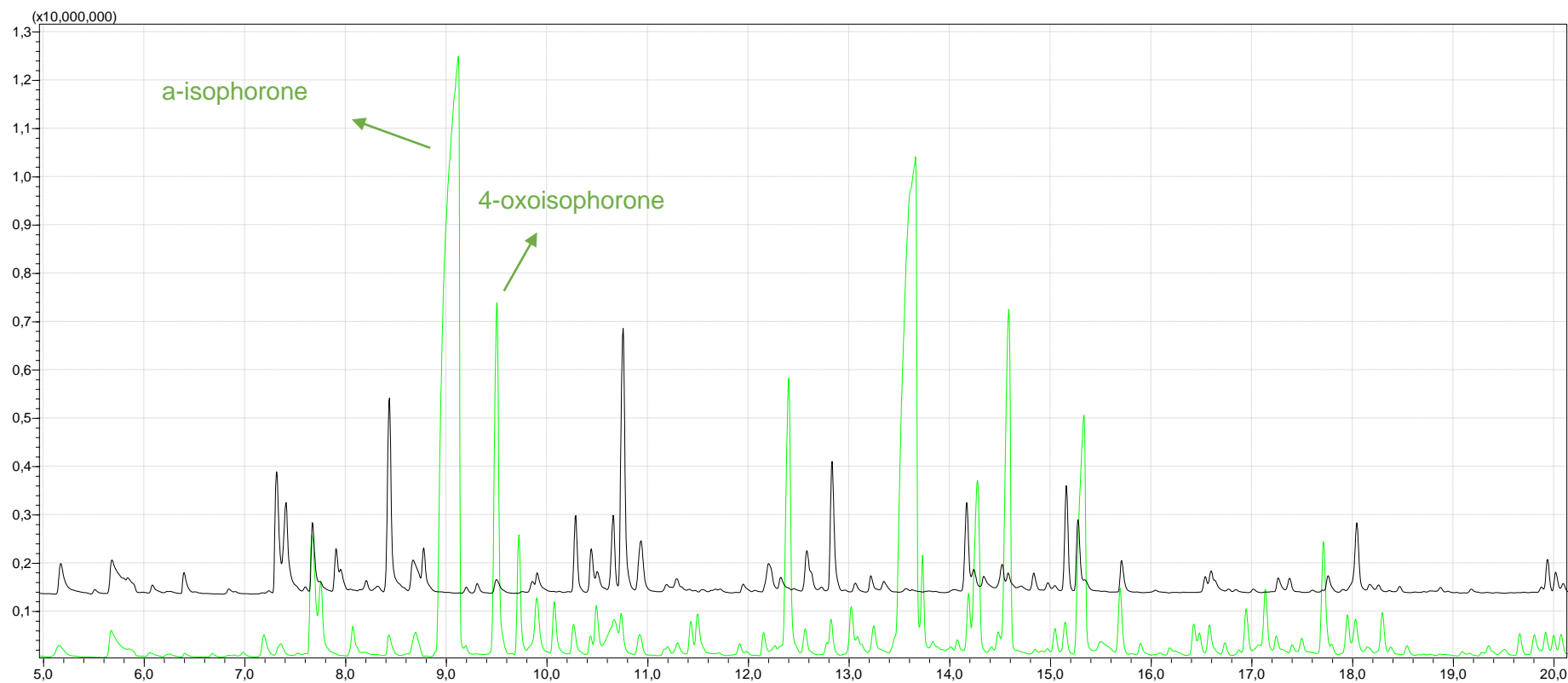
5. Ποιοτικός Χαρακτηρισμός και σύγκριση του προφίλ πτητικών ενώσεων μεταξύ θυμαρίσιου και άλλων ειδών μελιού

Το αποτύπωμα των πτητικών ενώσεων σε δείγματα μελιού βελανιδιάς πορτοκαλιάς και κουμαριάς από το Ν. Άρτας, προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας την τεχνική της Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (HS – SPME) και στη συνέχεια συγκρίθηκε με το αποτύπωμα του θυμαρίσιου μελιού (Ν. Χανίων). Απώτερος σκοπός ήταν η καταγραφή πτητικών ενώσεων που υποδεικνύουν την βοτανική προέλευση του κάθε είδους μελιού. Η απομόνωση των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε κάνοντας δειγματοληψία HS – SPME με χρόνο εκχύλισης 40 min και θερμοκρασία εκχύλισης 60 °C. Στην εικόνα 15 παρουσιάζονται τα χρωματογράφημα που αποκτήθηκαν από την ανάλυση δειγμάτων μελιού θυμαρίσιου (μαύρο), βελανιδιάς (ροζ), πορτοκαλιάς (πορτοκαλί) και κουμαριάς (κίτρινο). Σε κάθε χρωματογράφημα οι κορυφές που είναι σημαδεμένες αντιστοιχούν σε ενώσεις-μάρτυρες που ορίζουν την βοτανική προέλευση του κάθε είδους μελιού.



Ισομερείς ενώσεις Lilac aldehyde





Εικόνα 15: Σύγκριση των χρωματογραφημάτων που αποκτήθηκαν από την ανάλυση του πτητικού προφίλ δειγμάτων μελιού θυμαρίσιου (μαύρο), βελανιδιάς (ροζ), πορτοκαλιάς (πορτοκαλί) και κουμαριάς (κίτρινο) εφαρμόζοντας την τεχνική HS – SPME. Συνθήκες δειγματοληψίας: 40 min χρόνος εκχύλισης και 60 °C θερμοκρασία εκχύλισης. Σε κάθε χρωματογράφημα παρουσιάζονται ενώσεις-μάρτυρες που αναδεικνύουν την βοτανική προέλευση του εκάστοτε μελιού

5.1. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ στο μέλι της Βελανιδιάς

Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο της θεωρίας, το μέλι της βελανιδιάς ανήκει στην κατηγορία των μελιών από μελιτώματα. Το μέλι αυτό έχει ιδιαίτερη ζήτηση σε παγκόσμια κλίμακα εξαιτίας της γεύσης του, της υψηλής του θρεπτικής αξίας και λόγω των οφελών του στην ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας του Καρμπάγια Ι, οι ενώσεις που θεωρούνται πιθανές για την βοτανική προέλευση του μελιού Βελανιδιάς με προέλευση τον Ελλαδικό χώρο είναι οι παρακάτω: heptane, octane, 1-nonanol, 1-decanol, decanal, octanoic acid ethyl ester, nonanoic acid ethyl ester, decanoic acid ethyl ester, dodecanoic acid ethyl ester, tetradecanoic acid ethyl ester, hexadecanoic acid ethyl ester, meta-cymene, cis-linalool oxide και eucalyptol. Μεταξύ αυτών των ενώσεων, στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν μόνο οι εξής: 1-nonanol, decanal, 1-decanol, nonanoic acid ethyl ester (Karabagias et al., 2022).

5.2. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ στο μέλι της πορτοκαλιάς

Το μέλι πορτοκαλιάς ανήκει στην κατηγορία των εσπεριδοειδών και αποτελεί μια πολύτιμη ποικιλία μελιού με χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση. Ο Αλιφέρης Κ. (Aliferis et al., 2010) σε παλιότερη έρευνα του σχετικά με την διαφοροποίηση και κατηγοριοποίηση δειγμάτων μελιού, παρουσίασε τις παρακάτω πτητικές ουσίες ως πιθανές ενώσεις μάρτυρες για την βοτανική προέλευση του μελιού πορτοκαλιάς: ισομερείς ενώσεις Lilac aldehyde, limonene, methyl anthranilate και τα 1-p-menthen-9-al ισομερή. Στο δείγμα που αναλύθηκε ταυτοποιήθηκαν οι ισομερείς ενώσεις Lilac aldehyde.

5.3. Ποιοτικός χαρακτηρισμός του πτητικού προφίλ στο μέλι της κουμαριάς

Το μέλι της κουμαριάς παράγεται κυρίως στη νότια Ευρώπη και έχει ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, χαρακτηριστική υπόπικρη γεύση και άρωμα. Δυστυχώς υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία για την πτητική του σύνθεση. Σε έρευνα σχετική με τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων που δημιουργούν το αποτύπωμα για τη βοτανική προέλευση ενός δείγματος μελιού της Machado A., ως πιθανές πτητικές ενώσεις θεωρήθηκαν οι παρακάτω: 3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-one (α-isophorone), 3,5,5-trimethyl-3-cyclohexen-1-one (β-isophorone) και 3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-ene-1,4-dione (4-oxoisophorone). Από αυτές τις ενώσεις ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις α-isophorone και 4-oxoisophorone στο δείγμα κουμαριάς που αναλύθηκε (Machado et al., 2020).

5.4. Ποιοτική σύγκριση του πτητικού προφίλ μελιών διαφορετικής βοτανικής προέλευσης

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν την επιτυχή εφαρμογή της τεχνικής HS – SPME για την διάκριση δειγμάτων μελιού διαφορετικής βοτανικής προέλευσης. Το αποτύπωμα των πτητικών ενώσεων αποτελείται από πτητικές οργανικές ενώσεις που συναντώνται στο προφίλ όλων των μελιών, ωστόσο σε κάθε είδος μελιού, υπάρχουν χαρακτηριστικοί αναλύτες – μάρτυρες, που λειτουργούν ως ταυτότητα της βοτανικής προέλευσης. Έτσι λοιπόν, η προσέγγιση της HS – SPME μεθοδολογίας αποδεικνύεται ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο μέσω του οποίου μπορεί διασφαλισθεί η αυθεντικότητα ενός μελιού, εφαρμόζοντας μια οικονομικά προσιτή, εύκολη και φιλική στο περιβάλλον μεθοδολογία.

6. Συμπεράσματα και Προοπτικές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη και βελτιστοποίηση των παραμέτρων της τεχνικής της μικροεκχύλισης στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vac HS – SPME) με σκοπό τον προσδιορισμό των πτητικών και ημι-πτητικών οργανικών ενώσεων που μπορούν να θεωρηθούν πιθανοί μάρτυρες βοτανικής προέλευσης του θυμαρίσιου μελιού.

Κατά το πρώτο μέρος της εργασίας, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου (20, 30, 40 και 60 min) και της θερμοκρασίας εκχύλισης (30, 45 και 60 °C) κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας της μικροεκχύλισης στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες κενού (Vac HS – SPME) και υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (HS – SPME). Οι βέλτιστες συνθήκες και για τις δυο μεθοδολογίες προέκυψαν λαμβάνοντας υπόψιν τον ρυθμό εκχύλισης εννέα πτητικών οργανικών ενώσεων που θεωρούνται πιθανοί μάρτυρες βοτανικής προέλευσης του θυμαρίσιου μελιού. Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας έδειξαν ότι ο χρόνος δειγματοληψίας των 40 λεπτών είναι η ιδανικότερη χρονική διάρκεια για την εκχύλιση των ενώσεων – στόχων κατά την εφαρμογή και των δυο μεθοδολογιών. Επίσης, η θερμοκρασία των 60 °C αποδείχτηκε ιδανικότερη για την εκχύλιση των ενώσεων υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, ενώ υπό συνθήκες κενού βέλτιστη θερμοκρασία εκχύλισης επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 45 °C.

Η τεχνική Vac HS – SPME κατάφερε σε χαμηλότερη θερμοκρασία να πετύχει σχεδόν διπλάσιο σήμα για όλες τις ενώσεις με εξαίρεση το Nonanoic acid, ethyl ester. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η ένωση .beta.Damascenone ταυτοποιήθηκε από την τεχνική Vac HS – SPME ενώ υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες δεν επιτεύχθηκε η ταυτοποίηση της. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι η ένωση αυτή βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες στο δείγμα μελιού. Επομένως, είναι ξεκάθαρο ότι η τεχνική του κενού αποδίδει καλύτερα καθώς εντοπίστηκαν ενώσεις – στόχοι που σε ατμοσφαιρικές συνθήκες δεν κατάφεραν να ανιχνευθούν.

Η τεχνική Vac HS – SPME αποδείχτηκε για ακόμη μια φορά μια εναλλακτική πράσινη μεθοδολογία για την κατεργασία δειγμάτων, η οποία μπορεί να εξασφαλίσει μειωμένη ενεργειακή κατανάλωση, καταγράφοντας ίδιους ή και καλύτερους ρυθμούς εκχύλισης κατά την επιβολή ήπιας θέρμανσης κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού από διαφορετικές περιοχές του Ν. Χανίων, με σκοπό την εύρεση πιθανών ενώσεων μαρτύρων που υποδεικνύουν την γεωγραφική προέλευση. Το αποτύπωμα των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν πανομοιότυπο με ελάχιστες ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των ενώσεων-στόχων. Ενδιαφέρον πόρισμα της παρούσας έρευνας ήταν η ανίχνευση της ένωσης-μάρτυρα 1-phenylbutane-2,3-dione στα δείγματα Β, Γ και Δ αλλά όχι στο αρχικό δείγμα Α που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων των δύο μεθοδολογιών. Η ένωση – μάρτυρας 1-phenylbutane-2,3-dione ενδεχομένως να μπορεί να θεωρηθεί εκτός από ένωση κλειδί για την ανάδειξη της βοτανικής προέλευσης, ένωση – μάρτυρας για την γεωγραφική προέλευση του θυμαρίσιου μελιού. Η αδυναμία εντοπισμού της ένωσης – μάρτυρα στο δείγμα Α, ενδεχομένως να σχετίζεται με το υψόμετρο της γεωγραφικής περιοχής στην οποία είχαν τοποθετηθεί οι κυψέλες των μελισσών. Για την εξακρίβωση του παραπάνω πιθανού πορίσματος απαιτείται η ανάλυση περισσότερων δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού, τα οποία θα έχουν συλλεχτεί από διαφορετικά γεωγραφικά υψόμετρα.

Τέλος, το πτητικό προφίλ του θυμαρίσιου μελιού συγκρίθηκε με το αποτύπωμα άλλων ανθόμελων και μελιτωμάτων, με στόχο την εξακρίβωση των ενώσεων-μαρτύρων βοτανικής προέλευσης. Τα αποτελέσματα της τελευταίας μελέτης έδειξαν την επιτυχή διάκριση και διαφοροποίηση του θυμαρίσιου μελιού σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, υπογραμμίζοντας για ακόμη μια φορά την δυναμική της τεχνικής Vac HS – SPME σε θέματα σχετικά με την πιστοποίηση και αυθεντικότητα τροφίμων.

Συμπερασματικά, η τεχνική Vac HS – SPME αποδεικνύεται ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο μέσω του οποίου μπορεί να εξακριβωθεί η αυθεντικότητα ενός μελιού, χάρη στον εντοπισμό ενώσεων-μαρτύρων βοτανικής προέλευσης. Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε είναι εύκολη, γρήγορη και σχεδόν πλήρως αυτοματοποιημένη, παρέχοντας ίδια ή και καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την συμβατική τεχνική της HS – SPME. Το μειωμένο ενεργειακό κόστος της προσέγγισης Vac HS – SPME και η απουσία χρήσης οργανικών διαλυτών είναι δυο παράγοντες που συντελούν στην ανάδειξη μιας νέας αξιόπιστης πράσινης εναλλακτικής προσέγγισης για την κατεργασία δειγμάτων.

Στόχος των επόμενων ερευνών θα πρέπει να είναι η περαιτέρω εφαρμογή της πράσινης μεθοδολογίας Vac HS – SPME για τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού, από όλες τις γεωγραφικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου για την διερεύνηση πιθανών αλλαγών στο πτητικό προφίλ ανά γεωγραφικό διαμέρισμα. Για την επίτευξη μιας περισσότερο εμπειριστωμένης μελέτης, σημαντική θα ήταν η συμπερίληψη αναλύσεων δειγμάτων θυμαρίσιου μελιού από άλλες χώρες προέλευσης, έτσι ώστε να συγκριθεί το πτητικό αποτύπωμα και να προσδιορισθούν πιθανοί νέοι μάρτυρες που αναδεικνύουν την γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων. Φυσικά, η εφαρμογή της Vac HS – SPME δεν εμφανίζει κάποιο περιορισμό ως προς το είδος της μήτρας, έτσι λοιπόν η παραπάνω ιδέα περί αυθεντικοποίησης και αντιμετώπισης θεμάτων νοθείας μπορεί να εφαρμοστεί και για άλλου είδους τρόφιμα και οινοπνευματώδη ποτά.

7. Βιβλιογραφία

- Aliferis, K.A., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., Alissandrakis, E., 2010. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chem* 121, 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.098>
- Capetti, F., Rubiolo, P., Bicchi, C., Marengo, A., Sgorbini, B., Cagliero, C., 2020. Exploiting the versatility of vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction in combination with the selectivity of ionic liquid-based GC stationary phases to discriminate *Boswellia* spp. resins through their volatile and semivolatile fractions. *J Sep Sci* 43, 1879–1889. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000084>
- Delbecque, N., Mascrez, S., Psillakis, E., Purcaro, G., 2022. Sub-ambient temperature sampling of fish volatiles using vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Theoretical considerations and proof of concept. *Anal Chim Acta* 1192, 339365. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339365>
- Karabagias, I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M.G., 2014. Characterization and classification of *Thymus capitatus* (L.) honey according to geographical origin based on volatile compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Research International* 55, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.032>
- Karabagias, I.K., Karabagias, V.K., Nayik, G.A., Gatzias, I., Badeka, A. v., 2022. A targeted chemometric evaluation of the volatile compounds of *Quercus ilex* honey in relation to its provenance. *LWT* 154. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112588>
- Machado, A.M., Miguel, M.G., Vilas-Boas, M., Figueiredo, A.C., 2020. Honey volatiles as a fingerprint for botanical origin—a review on their occurrence on monofloral honeys. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25020374>
- Mascrez, S., Psillakis, E., Purcaro, G., 2020. A multifaceted investigation on the effect of vacuum on the headspace solid-phase microextraction of extra-virgin olive oil. *Anal Chim Acta* 1103, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.053>
- Psillakis, E., 2020a. The effect of vacuum: an emerging experimental parameter to consider during headspace microextraction sampling. *Anal Bioanal Chem* 412, 5989–5997. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02738-x>
- Psillakis, E., 2020b. The effect of vacuum: an emerging experimental parameter to consider during headspace microextraction sampling. *Anal Bioanal Chem*. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02738-x>
- Psillakis, E., 2017a. Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review. *Anal Chim Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.033>
- Psillakis, E., 2017b. Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review. *Anal Chim Acta* 986, 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.033>
- Psillakis, E., Mousouraki, A., Yiantzi, E., Kalogerakis, N., 2012a. Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase microextraction. *J Chromatogr A* 1244, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.006>

- Psillakis, E., Mousouraki, A., Yiantzi, E., Kalogerakis, N., 2012b. Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase microextraction. *J Chromatogr A* 1244, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.006>
- Psillakis, E., Yiantzi, E., Sanchez-Prado, L., Kalogerakis, N., 2012c. Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Improved extraction of semivolatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions. *Anal Chim Acta* 742, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.019>
- Rice, S., Maurer, D.L., Fennell, A., Dharmadhikari, M., Koziel, J.A., 2019. Evaluation of volatile metabolites emitted in-vivo from cold-hardy grapes during ripening using SPME and GC-MS: A proof-of-concept. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24030536>
- Shirey, R.E., 2012. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings, in: *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier Inc., pp. 99–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416017-0.00004-8>
- Sýkora, M., Vítová, E., Jeleň, H.H., 2020. Application of vacuum solid-phase microextraction for the analysis of semi-hard cheese volatiles. *European Food Research and Technology* 246, 573–580. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03426-x>
- Trujillo-Rodríguez, M.J., Pino, V., Psillakis, E., Anderson, J.L., Ayala, J.H., Yiantzi, E., Afonso, A.M., 2017. Vacuum-assisted headspace-solid phase microextraction for determining volatile free fatty acids and phenols. Investigations on the effect of pressure on competitive adsorption phenomena in a multicomponent system. *Anal Chim Acta* 962, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.056>
- Vakinti, M., Mela, S.M., Fernández, E., Psillakis, E., 2019. Room temperature and sensitive determination of haloanisoles in wine using vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 1602, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.047>
- Vazquez, L., Celeiro, M., Sergazina, M., Dagnac, T., Llompert, M., 2021. Optimization of a miniaturized solid-phase microextraction method followed by gas chromatography mass spectrometry for the determination of twenty four volatile and semivolatile compounds in honey from Galicia (NW Spain) and foreign countries. *Sustain Chem Pharm* 21. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100451>
- Yiantzi Evangelia, 2014. *Microextraction Under Vacuum Conditions*. Technical University of Crete, Chania.
- Βικτωρία Σαμανίδου, n.d. Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων.
- Δαμιανός Δημήτριος, 2018. Ποιοτικά χαρακτηριστικά του μελιού και οργανοληπτικοί έλεγχοι με βάση την νομοθεσία. Καλαμάτα.
- Καραμπάγιας Ιωάννης, 2014. Διαφοροποίηση της Γεωγραφικής και Βοτανικής Προέλευσης Ελληνικών δειγμάτων Μελιού με τη βοήθεια Ενόργανης Χημικής και Στατιστικής Ανάλυσης. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων , Ιωάννινα.
- Καραμπουρνιώτη Σοφία, 2008. Μελισσοπαλυνολογική ανάλυση θυμαρίσιου μελιού περιοχών της Ελλάδας. ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ.

- Καρούσου Δήμητρα, 2019. «Εμπλουτισμός μελιού Σαμοθράκης με βιοενεργά συστατικά του φυτού *Arbutus andrachne*». Θεσσαλονίκη.
- Μουσουράκη Αντωνία, 2012. Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού “Vac-HSSPME.” Χανιά.
- Παπανικολάου Νικόλαος, n.d. Οικονομική ανάλυση της μελισσοκομικής παραγωγής στην Ελλάδα.
- Σπύρου Κωνσταντίνια, 2021. Διερεύνηση της διατροφικής αξίας και της βιοδραστικότητας διαφόρων ειδών μελιού της αγοράς. Λήμνος.
- Τζανέτου Δήμητρα, 2021. Βελτιστοποίηση συνθηκών για την ανάλυση πτητικού προφίλ γαλακτοκομικών προϊόντων με μικροεκχύλιση, υπό συνθήκες κενού. Χανιά.
- Φουντούλη Ευδοκία, 2019. Δειγματοληψία υπερκείμενης φάσης υπό συνθήκες κενού πτητικών ενώσεων (BTEX) στο νερό. Χανιά.