



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

**Μεταβολομική μελέτη ελληνικών
μελιών με χρήση
φασματοσκοπίας NMR, για τη
διερεύνηση της γεωγραφικής και
βοτανικής προέλευσης –
Απομόνωση και ταυτοποίηση
μορίων-βιοδεικτών**

Gabriela Belén Lemus Ringele

Χημικός

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων»

Αθήνα 2020

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Φαρμακευτική Σχολή

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης:

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας: Μεταβολομική μελέτη ελληνικών μελιών με χρήση φασματοσκοπίας NMR, για τη διερεύνηση της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης – Απομόνωση και ταυτοποίηση μορίων-βιοδεικτών

Φοιτήτρια:

Gabriela Belén Lemus Ringele, A.M: 181104

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Επ. Καθ. Μαρία Χαλαμπαλάκη (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου

Καθηγητής Λέανδρος Α. Σκαλτσούνης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, Επ. Καθ. Μαρία Χαλαμπαλάκη, Καθ. Λέανδρος Α Σκαλτσούνης, Καθ. Σοφία Μητάκου, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την εργασία μου.

Οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην επ. Καθηγήτρια κ. Μαρία Χαλαμπαλάκη, υπεύθυνη της παρούσας εργασίας, για το ενδιαφέρον και όλη τη βοήθεια που μου έχει δώσει όλα αυτά τα χρόνια που είμαι στην Ελλάδα, για την καθοδήγηση, για τις συμβουλές, όχι μόνο σε επαγγελματικό επίπεδο, αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη και δύναμη που μου έδινε όταν το χρειαζόμουν για να συνεχίσω.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, που με δέχτηκε στο εργαστήριο όταν ήρθα στην Ελλάδα, για τις ευκαιρίες και το ενδιαφέρον που έχει δείξει για να με βοηθήσει σε διαφορετικές καταστάσεις κατά τη διάρκεια αυτών των ετών.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου για τον ιδιαίτερο ενδιαφέρον που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου προγράμματος.

Ευχαριστώ θερμά την Περιφέρεια Βορείου Αιγαίου μέσω της οποίας κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ το ΕΥ πρόγραμμα MediHealth (MSCA-RISE-2016-HORIZON2020) που μου έδωσε την δυνατότητα να έρθω στην Ελλάδα πριν 4 χρόνια.

Ευχαριστώ την μεταδιδάκτορα Κατερίνα Αργυροπούλου για τις συμβουλές και βοήθειά της στην αρχή της μελέτης. Ευχαριστώ τον μεταδιδάκτορα Σωτήρη Κατσίκη, για τις γνώσεις τους και βοήθεια στο κομμάτι του NMR και τις στατιστικές αναλύσεις. Ευχαριστώ τον διδάκτορα Βαγγέλη Αξιώτη για τη συλλογή των δειγμάτων και τη συνεργασία.

Ευχαριστώ τα κορίτσια της γραμματείας, την Φωτεινή, την Εβίτα, τη Μαρία και την κα. Μαρία για την βοήθεια σε όλες τις γραφιοκρατικές διαδικασίες που χρειαζοντούσαν για να μπορέσω να παραμείνω στο εργαστήριο και στην χώρα.

Ευχαριστώ τον άνθρωπο εκείνο που ήταν η έμπνευσή μου να συνεχίσω σε αυτό το τμήμα της επιστήμης, την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Ελένη Σακαβίτση. Η οποία επίσης έγινε η πρώτη μου φίλη όταν πρωτοήρθα στην Ελλάδα. Ευχαριστώ τη βοήθειά της και όλη την υποστήριξη, που ήταν δίπλα μου για να ξεπεράσουμε μαζί κάθε δυσκολία που είχα να αντιμετωπίσω. Την ευχαριστώ για όλες τις γνώσεις και τη δύναμη που δίνει. Ευχαριστώ και τον Φώτη και την οικογένεια της για την βοήθεια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Γεωργία Σαρικάκη και την διδάκτορα Θεοδώρα Νίκου για τη βοήθεια, τις συμβουλές και τη φιλία τους, ένα τεράστιο

ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Μιχαλίδη, για την απίστευτη βοήθεια που μου έδωσε στα πειραματικά. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Σταύρο, για την συμβουλές και πληροφορίες που μου παρείχε κάθε φορά που το χρειαζόμουν., Ευχαριστώ και τον υποψήφιο διδάτορα Άκη Αμούντζια για την βοήθεια και υποστήρηξή του. Ευχαριστώ την Ειρήνη, τη Νάντια για την φιλία και υποστήρηξή τους. Ευχαριστώ τη Βάσια Σούρσου για την βοήθειά της στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Πέννυ Στάμου, που ήταν πολύ σημαντική υποστήριξη στα μαθήματα, και γενικά καθ'όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Ευχαριστώ τον Πέτρο Γκ., τη Δανάη και τη Μαρία για την βοήθεια και υποστήριξη τους. Ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, γιατί με τον έναν ή με τον άλλον τρόπο όλοι με έχουν βοηθήσει.

Ευχαριστώ και στους φίλους μου Τατιάννα, Ιάσωνα και Κατερίνα, για την υποστήριξη, την παρέα, τις συμβουλές και τις ωραίες στιγμές που έχουμε μοιραστεί μαζί.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Ελληνική μου οικογένεια, η οικογένεια Βανιώτη. Ευχαριστώ τον μπαμπά Θεόδωρο και τη μαμά Ιούλη, για τη φροντίδα, βοήθεια και την οικογενειακή αγάπη. Ένα τεράστιο ευχαριστώ, στον άνθρωπο εκείνο που πλέον δεν είναι φίλη, αλλά αδερφή, στην Μαριάννα, για όλα τα τρελά και όμορφα πράγματα που έχουμε περάσει μαζί, και για την παρουσία και βοήθειά της στις δύσκολες στιγμές. Ευχαριστώ τον Γιάννη για την βοήθεια και φροντίδα του. Είμαι πραγματικά ευγνώμων που έχω την ευκαιρία να μοιραστώ την ευτυχία μαζί του.

Και τέλος ευχαριστώ τους φίλους μου στην Χιλή καθώς και την οικογένειά μου, που, παρόλο που είμαι μακριά, έχω την απόλυτη υποστήριξή τους. Και ευχαριστώ ειδικά τον μπαμπά μου, που χάρη σ' αυτόν δεν θα ήμουν εδώ αυτή τη στιγμή.

Gabriela Belén Lemus Ringele

Αθήνα, 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	12
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΤΟ ΜΕΛΙ	13
Α) Σύσταση του μελιού	15
Β) Παράμετροι ποιότητας του μελιού	21
Γ) Νόθευση και Αυθεντικότητα	25
1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ	30
Α) Τι είναι Μεταβολομική;	30
Β) Σχεδιασμός μεταβολομικής μελέτης	31
Γ) Αυθεντικότητα μελιού και ομικές προσεγγίσεις	39
Δ) Αυθεντικότητα Ελληνικού μελιού	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	48
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ν°1	49
Α) Προετοιμασία του δείγματος – Ανάπτυξη μεθοδολογίας παραλαβής φαινολικών συστατικών	49
Β) Ποιοτικός έλεγχος εκχυλισμάτων	54
Γ) Κλασμάτωση και απομόνωση συστατικών	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	74
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ν°2	75
3.1) ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	75
3.2) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΟΥ	76
Α) Εφαρμογή ρητινών	76
Β) Υγρή-υγρή εκχύλιση	79
Γ) Τελικό πρωτόκολλο και εκχύλιση δειγμάτων	86
3.3) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	86
Α) Προετοιμασία των δειγμάτων	86
Β) Ανάλυση με NMR	87
Γ) Φασματοσκοπικά αποτελέσματα	88
3.4) ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ-ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	90

A) Επεξεργασία και Μείωση δεδομένων (Data reduction).....	91
B) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ.....	92
B.1) Ανάλυση κύριων συνιστωσών - Principal Components Analysis (PCA)	92
B.2) Μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτικής Ανάλυσης (Orthogonal partial least squares discriminant analysis / OPLS-DA)	93
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	97
Γ.1) Ανάλυση κύριων συνιστωσών - Principal Components Analysis (PCA)	97
Γ.2) Μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτικής Ανάλυσης Ανάλυση ορθογωνίων μερικών ελάχιστων τετραγώνων – (Orthogonal partial least squares discriminant analysis (/ OPLS-DA).....	98
3.5) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	101
A) 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη	102
B) Methyl syringate (MS).....	103
Γ) π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA).....	104
Δ) 2-cis-4-trans-αμπισισικό οξύ (Absciscic acid - ABA)	105
Ε) Κυνουρενικό οξύ (KYNA)	106
3.6) Αξιολόγηση της ποιότητας και της αυθεντικότητας	107
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	113
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	138
A) Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων.....	138
B) Κλασμάτωση.....	160
Γ) Φασματοσκοπικά δεδομένα των απομονωμένων συστατικών	162
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	168
B) Εφαρμογή ρητινών.....	170
Γ) Υγρή-υγρή εκχύλιση	171
Δ) Τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης.....	180
Ε) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ	183

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μέλι είναι μία φυσική πηγή διατροφής, που χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα και στη σημερινή εποχή, τόσο το μέλι όσο και τα προϊόντα του χρησιμοποιούνται σε πολλά σκευάσματα και προϊόντα διατροφής, καλλυντικών αλλά και φυτοθεραπευτικών. Ωστόσο, λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας του, η αυθεντικότητα και η νοθεία είναι σημαντικά ζητήματα, κυρίως ως προς τη γεωγραφική και τη βοτανική προέλευση. Έτσι, υπάρχει μεγάλο επιστημονικό αλλά και εμπορικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθοδολογιών για τον ποιοτικό έλεγχο του μελιού και κυρίως της αυθεντικότητάς του, με έμφαση στις φαινόλες που αποτελούν και τους κύριους βιοδραστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες του μελιού.

Έτσι, ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη αλλά και η εφαρμογή μεθόδων μεταβολικού προφίλ (μεταβολομικής) εστιάζοντας στις φαινόλες, για την ανάδειξη της αυθεντικότητας του μελιού βάσει γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης, με τη χρήση της φασματοσκοπίας Πυρηνικού και Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συλλογή 76 αντιπροσωπευτικών δειγμάτων μελιού από τα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου (Λήμνος, Αγ. Ευστράτιος, Λέσβος, Ψαρά, Χίος, Ικαρία, Σάμος, Φουρνοι Κορσεών) από μελισσοπαγωγούς με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (μεταδεδομένα) τα οποία και υποβλήθηκαν στη μεταβολομική μελέτη. Συγκεκριμένη μέθοδο εκχύλισης και παραλαβής των φαινολών, επεξεργασίας των δεδομένων και στατιστικής ανάλυσης με τη χρήση επιβλεπόμενων και μη επιβλεπόμενων μεθόδων, εφαρμόστηκαν για την κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης και αποτύπωσης της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης των υπό ανάλυση δειγμάτων μελιού. Επιπλέον, μέσω της μεταβολομικής πραγματοποιήθηκε ανάδειξη μορίων-βιοδεικτών ενώ με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS) δόθηκε η δυνατότητα χαρακτηρισμού μεγάλου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών και δημιουργία βάσης φασματομετρικών δεδομένων. Τέλος, η μέθοδος STOCYSY χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση βιοδεικτών βάσει των δεδομένων NMR. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, το αναματόμελο διαφοροποιείται σημαντικά από τις άλλες ποικιλίες μελιού, καθώς και τα δείγματα θυμαρίσιου μελιού μπορούν επίσης να ομαδοποιηθούν και να διακριθούν. Από την άλλη πλευρά, το ανθόμελο και το μέλι φυτών, όπως αναμένεται, δεν μπορούν εύκολα να διαχωριστούν. Σύμφωνα με το διάγραμμα φορτίων φαίνεται ότι οι περισσότεροι δείκτες που είναι υπεύθυνοι για τη διαφοροποίηση ανήκουν σε λιπόφιλες ουσίες. Ωστόσο, το 5-HMF είναι επίσης στατιστικά σημαντικό για το θυμαρίσιο μέλι.

Παράλληλα, εξαιτίας της πολύπλοκης φύσης και των ιδιαίτερων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του μελιού (υψηλό ιξώδες και περιεκτικότητα σε σάκχαρα) έγινε προσπάθεια ανεύρεσης μεθόδου ποσοτικής παραλαβής των περιεχομένων φαινολών. Διάφοροι μέθοδοι με τη χρήση υγρής-υγρής εκχύλισης, ρητινών προσρόφησης και συνδιασμός τους δοκιμάστηκαν προκειμένου να επιλεγεί η βέλτιστη. Βάσει αυτής, ένα μέλι χρησιμοποιήθηκε ως οδηγός τόσο για την ανάπτυξη των μεθόδων όσο και για την απομόνωση χαρακτηριστικών δευτερογενών μεταβολιτών. 2 μεταβολίτες απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και συγκεκριμένα το κυνourενικό οξύ (KYNA) και την 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF). Το KYNA είναι βιοδείκτης του μελιού καστανιάς και η παρουσία του αποδεικνύει ότι το υπό μελέτη δείγμα μελιού μπορεί να περιέχει νέκταρ από καστανιές, ενώ το 5-HMF είναι πολύ σημαντικό για τον ποιοτικό έλεγχο του μελιού και μπορεί να υποδεικνύει ακατάλληλες συνθήκες επεξεργασίας ή αποθήκευσης .

ABSTRACT

Honey is a natural food source, used since antiquity and today, both honey and its products are used in many preparations and food products, cosmetics and phytotherapeutic. However, due to its great economic importance, authenticity and adulteration are important issues especially in terms of geographical and botanical origin. Thus, there is great scientific and commercial interest in the development of methodologies for the quality control of honey and especially its authenticity with emphasis on phenols, which are the main bioactive secondary metabolites of honey.

Thus, the main objective of the present study was the development and application of metabolic profile methods (metabolomics) focusing on phenols, to highlight the authenticity of honey based on geographical and botanical origin, using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) . More specifically, 76 representative honey samples were collected from the islands of the North Aegean (Lemnos, Agios Efstratios, Lesvos, Psara, Chios, Ikaria, Samos, Fourni Korseon) by beekeepers with specific characteristics (metadata) which were subjected to metabolomics. A specific method of extraction and receipt of phenols, data processing and statistical analysis using supervised and unsupervised methods, were applied to construct models for predicting and recording the botanical and geographical origin of the honey samples under analysis. In addition, through metabolomics, biomarker molecules were highlighted, while with the help of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), it was possible to characterize a large number of secondary metabolites and create a spectrometric database. Finally, the STOCSY method was used to identify biomarkers based on NMR data. Based on the results obtained, heather honey differs significantly from the other varieties of honey, while thyme honey samples can also be grouped and distinguished. On the other hand, blossom and plant honey, as expected, cannot be easily separated. According to the S-loadings plot, it appears that most of the markers responsible for differentiation belong to lipophilic substances. However, 5-HMF is also statistically significant for thyme honey.

At the same time, due to the complex nature and special physicochemical characteristics of honey (high viscosity and sugar content) an attempt was made to find a method for quantitative receipt of phenols. Various methods using liquid-liquid extraction, adsorption resins and a combination thereof have been tested to select the optimal one. Based on this, a honey sample (HON28) was used as a guide both for the development of the methods and for the isolation of characteristic secondary metabolites. Two metabolites were isolated and identified namely kynurenic acid (KYNA) and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF).

KYNA is a biomarker of chestnut honey and its presence proves that the honey sample under study may contain chestnut nectar, while 5-HMF is very important for the quality control of honey and may indicate inappropriate processing or storage conditions.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το μέλι είναι ένα πολύ σημαντικό προϊόν κυρίως λόγω της διατροφικής και θεραπευτικής του αξίας. Αυτός είναι και ένας από τους σημαντικότερους λόγους που αποτελεί στόχο νοθείας, και βρίσκεται μεταξύ των δέκα πιο συχνά νοθευμένων προϊόντων παγκοσμίως, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ωστόσο, συνεχώς αυξανόμενη είναι η ζήτηση τόσο από τους καταναλωτές όσο και από ελεγχτικούς οργανισμούς της κατανάλωσης ποιοτικών και αυθεντικών προϊόντων μελιού, συχνά με αποδεδειγμένη ονομασία βοτανικής ή/και γεωγραφικής προέλευσης. .

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή μεθόδων μεταβολομικής για τον ποιοτικό έλεγχο του μελιού και συγκεκριμένα της αυθεντικότητας βάσει γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, έμφαση δόθηκε στη διερεύνηση των φαινολών Ελληνικών μελιών από την περιοχή του Α. Αιγαίου ενώ η μελέτη μεταβολικού προφίλ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR. Παράλληλο στόχο της μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την ποσοτική παραλαβή των φαινολών του μελιού με διάφορες μεθόδους εκχύλισης καθώς και η απομόνωση και ταυτοποίηση χαρακτηριστικών δευτερογενών μεταβολιτών του.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΤΟ ΜΕΛΙ

Το μέλι αποτελεί ένα προϊόν διατροφής που χαρακτηρίζεται από γλυκιά γεύση και παχύρρευστη υφή (υψηλό ιξώδες). Παράγεται κυρίως από τις μέλισσες, από το νέκταρ των λουλουδιών ή εκκρίσεις φυτών. Είναι ένα φυσικό, υγιεινό προϊόν και είναι ίσως από τα πιο πολύπλοκα τρόφιμα που παράγονται από τη φύση. Αποτελεί, το παλαιότερο και σίγουρα το μόνο φυσικό γλυκαντικό μέσο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον άνθρωπο χωρίς καμία επεξεργασία (Consonni, Cagliani, & Cogliati, 2012; Skiadas & Lascaratos, 2001). Οι μέλισσες είναι μακράν η πιο σημαντική πηγή μελιού που υπάρχει στο εμπόριο. Σχεδόν όλο το μέλι στην παγκόσμια αγορά παράγεται από το είδος *Apis mellifera* (Εικόνα 1), αλλά μπορεί επίσης να παραχθεί από άλλα είδη του γένους *Apis* και από άλλα έντομα (Crane, 1991).

Κατά την παραγωγή του μελιού, οι εργάτριες μέλισσες μεταφέρουν το νέκταρ στον σάκο μελιού τους, όπου αναμιγνύεται με εκκρίσεις πλούσιες σε ένζυμα. Η μέλισσα μεταφέρει το μείγμα στην κυψέλη, και το μοιράζεται με τις μέλισσες που προσέχουν το μελίσσι. Αυτές οι μέλισσες μοιράζονται επίσης το μείγμα μεταξύ τους οπότε και μεσολαβεί το στάδιο της ωρίμανσης, αναμειγνύοντάς το με περαιτέρω ποσότητες αδενικών εκκρίσεων και αφαιρώντας νερό. Η διαδικασία ωρίμανσης συνεχίζεται έως ότου η πρώτη ύλη να χάσει περίπου το 50% της περιεκτικότητάς της σε νερό. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, και μετέπειτα στην αποθήκευση, το μέλι υφίσταται περίπλοκες ενζυμικές αντιδράσεις για τις οποίες υπάρχουν ελάχιστα γνωστά στοιχεία. Ωστόσο, τα δύο βασικά βήματα για την παρασκευή μελιού είναι η απομάκρυνση του νερού και η υδρόλυση της σακχαρόζης που περιέχεται στο νέκταρ (Siddiqui, 1970).

Το μέλι μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με τη φυτική του προέλευση ως ανθόμελο ή μελίτωμα. Οι μέλισσες παράγουν ανθόμελο από το νέκταρ των λουλουδιών των ανθισμένων φυτών. Αντίθετα, το μελίτωμα παράγεται από εκκρίσεις φυτών ή εντόμων κυρίως από την οικογένεια Arhididae (Εικόνα 1). Το μέλι που παράγεται από έντομα δεν συγκαταλέγεται στα περιττώματα, επειδή ο φυτικός χυμός δεν χωνεύεται στο στομάχι του εντόμου (Pita-Calvo & Vázquez, 2018). Τυπικό παράδειγμα ανθόμελου είναι το θυμαρίσιο μέλι και το αναματόμελο (μέλι από ερείκη), ενώ παραδείγματα μελιτώματος είναι το μέλι από πεύκο και έλατο. Η σύνθεση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αποδίδεται στο μέλι ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση (Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti, & Kontominas, 2014). Το μέλι του εμπορίου μπορεί να είναι μικτό, δηλαδή μπορεί να είναι μέλι από νέκταρ πολλών φυτών (πολυποικιλιακό) ή μέλι που έχει δημιουργηθεί από ένα συγκεκριμένο είδος φυτού και αναφέρεται

ως μονοποικιλιακό (monofloral). Το μονοποικιλιακό μέλι ανάλογα με τη βοτανική του προέλευση έχει ξεχωριστό άρωμα, γεύση και χρώμα λόγω των διαφορών του νέκταρος. Στην Ελλάδα, ορισμένες κοινές πηγές νέκταρ περιλαμβάνουν το θυμάρι και τα εσπεριδοειδή (*Citrus* spp.), κυρίως άνθη πορτοκαλιού (Karabagias, 2019).



Εικόνα 1. Μέλισσα του είδους *Apis mellifera* (αριστερά). Τα Aphididae (δεξιά) είναι μια πολύ μεγάλη οικογένεια εντόμων, η οποία εκκρίνει το μελίτωμα.

Το μέλι, εκτός του ότι θεωρείται ένα από τα θαύματα της φύσης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως εξαιτίας των θεραπευτικών του ιδιοτήτων. Χαρακτηρίζεται από αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική και προβιοτική δράση. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες του μελιού αποδίδονται στις φαινολικές ενώσεις, στα αμινοξέα και στις βιταμίνες που περιέχει. Άλλες βιολογικές ιδιότητες που παρουσιάζει το μέλι είναι η αντιδιαβητική, η αντιυπερτασική, η αντιφλεγμονώδης και η αντιβιοτική δράση. Επίσης, χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, για επούλωση πληγών, γαστρεντερικές παθήσεις, έχει αντιική δράση κατά του απλού έρπητα, καθώς και αντικαρκινική δράση. (Abdel-Naby Awad & Hamad, 2018; Ahmed & Othman, 2013; De-melo, Almeida-muradian, Sancho, Pascual-maté, & Pascual-mate, 2018; Eteraf-Oskouei & Najafi, 2013; Ramli, Chin, Zarkasi, & Ahmad, 2018; Rana et al., 2018; Tsiapara et al., 2009; Waykar & Alqadhi, 2016). Μια άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή του μελιού εντοπίζεται στις επιστήμες περιβάλλοντος. Πιο συγκεκριμένα το συναντάμε στη βιοπαρακολούθηση για τη συλλογή πληροφοριών, διότι είναι ικανό να εντοπίσει περιβαλλοντική μόλυνση, όπως η υπερβολική χρήση φυτοφαρμάκων και η ραδιοενεργός μόλυνση από πυρηνικούς σταθμούς. Επιπλέον, το μέλι είναι ιδανικός βιοδείκτης για την ανίχνευση μόλυνσης με αρσενικό σε διάφορες περιοχές, σε χώρες όπως η Χιλή για παράδειγμα, όπου έχει υψηλή ηφαιστειακή δραστηριότητα κατά μήκος ολόκληρης της χώρας, καθώς και πλήθος βιομηχανιών εξόρυξης μετάλλων (Abdullah, Gary, & Marla, 2007; Bargańska, Iębioda, & Namieśnik, 2016; Bastías et al., 2013; Blasco et al., 2004; Fermo, Beretta, Facino,

Gelmini, & Piazzalunga, 2013; Fodor & Molnar, 1993; García et al., 2006; K. C. Jones, 1987; Kacaniová et al., 2009; Markowicz et al., 2007; Panseri et al., 2014).

A) Σύσταση του μελιού

Από χημικής απόψεως, το μέλι είναι ουσιαστικά ένα υδατικό διάλυμα που αποτελείται από υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Περιέχει επίσης ένα ευρύ φάσμα άλλων συστατικών σε μικρότερες συγκεντρώσεις, όπως πρωτεΐνες, φαινολικές ενώσεις, ελεύθερα αμινοξέα, οργανικά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα που είναι απαραίτητα για την ανθρώπινη υγεία.

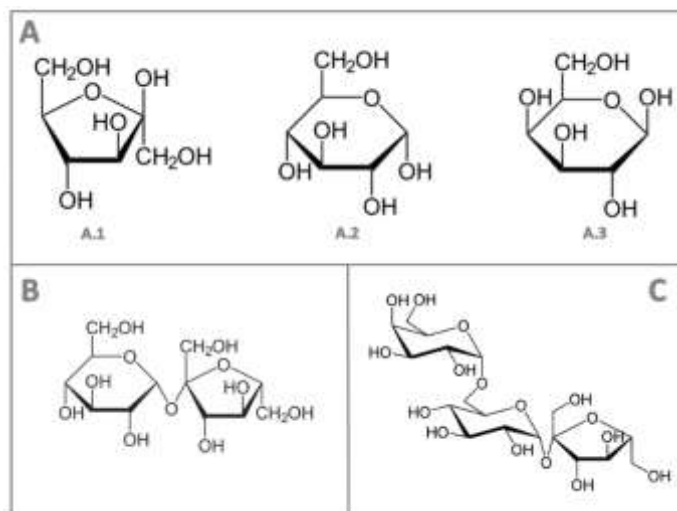
A.1) Νερό

Η περιεκτικότητα νερού στο μέλι σχετίζεται άμεσα με διαφορετικούς παράγοντες, όπως η βοτανική και γεωγραφική προέλευση του νέκταρος, του εδάφους και των κλιματικών συνθηκών, της περιόδου συλλογής, του βαθμού ωρίμανσης, της επεξεργασίας, κ.α. Φυσιολογικά, η υγρασία κυμαίνεται μεταξύ 13 και 25%. Τα μέλια με πολύ χαμηλή περιεκτικότητα νερού είναι δύσκολα στο χειρισμό και στην επεξεργασία. Ορισμένες άλλες ιδιότητες του μελιού, όπως το χρώμα, η κρυστάλλωση, το ιξώδες, η γεύση και η πυκνότητα επηρεάζονται επίσης από την περιεκτικότητα σε νερό. Επειδή το μέλι είναι ένα πολύ υγροσκοπικό προϊόν, είναι σημαντικό να αποφεύγεται η πρόσληψη υγρασίας από το περιβάλλον κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της συσκευασίας.

A.2) Σάκχαρα

Το μέλι είναι ένα υπέρκορο διάλυμα όπου οι υδατάνθρακες είναι τα κύρια συστατικά και αντιπροσωπεύουν περίπου το 95% του ξηρού βάρους του. Τα κύρια σάκχαρα του μελιού είναι δύο μονοσακχαρίτες, η D-γλυκόζη (23-38%) και η D-φρουκτόζη (32-44%), ενώ περιέχει μικρές ποσότητες άλλων μονοσακχαριτών, όπως η γαλακτόζη. Σε όλους σχεδόν τους τύπους μελιού, η φρουκτόζη είναι το κύριο σάκχαρο. Επίσης, περιέχει πολλούς ολιγοσακχαρίτες που έχουν ανιχνευθεί σε μικρές ποσότητες (5-15%), όπως η μαλτόζη, η σακχαρόζη (Εικόνα 2), η τουρανόζη, η τρεαλόζη, η γεντιβιόζη, κ.α. Το μελίτωμα, από την άλλη, περιέχει συνήθως χαμηλότερα επίπεδα μονοσακχαριτών και υψηλότερες ποσότητες τρισακχαριτών (πχ. ραφινόζη). Επιπλέον, έχει υψηλότερη περιεκτικότητα

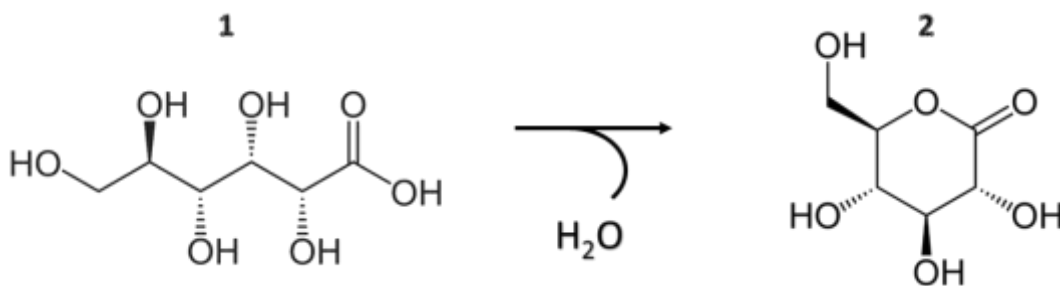
μαλτόζης σε σύγκριση με το ανθόμελο. Κάποιες δομές των κύριων αυτών σακχάρων παραντίθενται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Α. Μονοσακχαρίτες (Α.1-Φρουκτόζη, Α.2- Γλυκόζη, Α.3-Γαλακτόζη), Β. Δισακχαρίτης (Σακχαρόζη), C. Τρισακχαρίτης (Ραφινόζη)

A.3) Οργανικά οξέα

Τα οξέα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 0.5% των συνολικών στερεών, αλλά είναι μία από τις πιο σημαντικές κατηγορίες ενώσεων, καθώς επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες όπως την οξύτητα, το άρωμα, το χρώμα, τη γεύση και τη διατήρηση του μελιού, καθιστώντας δύσκολη την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Τα οργανικά οξέα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, προέρχονται κυρίως από το νέκταρ ή παράγονται από την πέψη των σακχάρων που υπάρχουν στο νέκταρ με ένζυμα που εκκρίνονται από τις μέλισσες. Το μέλι περιέχει οργανικά οξέα σε ισορροπία με τις αντίστοιχες λακτόνες τους. Το γλυκονικό οξύ (gluconic acid) είναι το κύριο οργανικό οξύ που υπάρχει στο μέλι, και αντιπροσωπεύει το 70-90% του συνόλου των οξέων, ενώ βρίσκεται σε ισορροπία με την γλυκολακτόνη (glucolactone – Εικόνα 3). Επίσης, στο μέλι έχουν βρεθεί περισσότερα από 30 διαφορετικά μη-αρωματικά οργανικά οξέα, όπως το βουτυρικό (butyric), κιτρικό (citric), φορμικό (formic), γαλακτικό (lactic), οξαλικό (oxalic), φουμαρικό (fumaric), πυρουβινικό (pyruvinic) οξύ, κ.α (An et al., 2020; De-melo et al., 2018).



Εικόνα 3. Η γλυκονολακτόνη (2) είναι ένας λακτονικός εστέρας του γλυκονικού οξέος. Αυτός ο εστέρας σχηματίζεται με την απομάκρυνση του νερού από το γλυκονικό οξύ (1).

A.4) Λιπίδια

Μικρές ποσότητες λιπιδικών ενώσεων (περίπου 0.04%) έχουν βρεθεί στο μέλι. Μερικά από αυτά είναι γλυκερίδια, στερόλες και φωσφολιπίδια. Επίσης, έχουν εντοπιστεί διαφορετικά λιπαρά οξέα όπως το παλμιτικό, ελαϊκό, λαυρικό και λινελαϊκό οξύ. Το ελληνικό μέλι διαθέτει λιπίδια, όπως υδρογονάνθρακες, κεριά, εστέρες χοληστερόλης, χοληστερόλη, λιπαρές αλκόολες, κλπ (Bergmann-Verlag, Karoulas, Mastronicolis, & Galanos, 1977). Η περιεκτικότητα σε λιπίδια του μελιού προέρχεται από τα φυτά και κυρίως από υπολείμματα κεριού.

A.5) Περιεκτικότητα σε μέταλλα

Η περιεκτικότητα μετάλλων στο μέλι είναι γενικά χαμηλή, που κυμαίνεται μεταξύ 0.02 και 0.3% στο ανθόμελο, ενώ στο μελίτωμα μπορεί να φτάσει το 1% του συνόλου. Οι παραλλαγές μπορεί να σχετίζονται με το έδαφος και τις κλιματολογικές συνθήκες, τη συλλογή, τις τεχνικές μελισσοκομίας και το υλικό που συλλέγουν οι μέλισσες κατά τη διάρκεια της τροφής τους. Τα μέταλλα απορροφούνται διαλυμένα σε νερό, στη μορφή των αλάτων τους, και μετακινούνται από τις ρίζες στον χυμό του φυτού (plant sap), και στη συνέχεια αντλούνται στο νέκταρ και τη γύρη. Το κάλιο είναι το κύριο στοιχείο, που αντιπροσωπεύει το 80% του συνόλου. Επίσης, νάτριο, ασβέστιο, μαγνήσιο, χαλκός, σίδηρος και μαγγάνιο μπορούν να βρεθούν στο μέλι. Σε γενικές γραμμές, τα σκούρα μέλια περιέχουν περισσότερα μέταλλα (0.2%) από τα ανοιχτόχρωμα (0.04%) (Karabagias, Louppis, Kontakos, Papastephanou, & Kontominas, 2017).

A.6) Ένζυμα, αμινοξέα και πρωτεΐνες

Το φυσικό μέλι περιέχει μικρές ποσότητες ενζύμων όπως η όξινη φωσφατάση, η καταλάση και η β-γλυκοσιδάση. Οι μέλισσες προσθέτουν αυτά τα ένζυμα για να ολοκληρώσουν τη διαδικασία ωρίμανσης του νέκταρος. Μερικά ένζυμα προέρχονται από το νέκταρ, το μελίτωμα ή τη γύρη, ενώ άλλες πιθανές προελεύσεις θα μπορούσαν να είναι μικροοργανισμοί του μελιού. Η περιεκτικότητα ενζύμων εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία, τη βοτανική προέλευση, τη ροή του νέκταρος, καθώς και από τη διατροφή, την ηλικία και τη φυσιολογική κατάσταση της μέλισσας (De-melo et al., 2018).

Τα αμινοξέα όπως, μεταξύ άλλων, η προλίνη, το γλουταμικό οξύ, η αλανίνη, η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η λευκίνη έχουν ανιχνευθεί στο μέλι, όπου η προλίνη είναι η πιο άφθονη και κυμαίνεται μεταξύ 50 και 85% των ολικών αμινοξέων. Η προέλευση των αμινοξέων του μελιού οφείλεται σε εκκρίσεις μελισσών και στο φυτό προέλευσης δηλαδή το αντίστοιχο νέκταρ και γύρη. Τα μοτίβα αμινοξέων είναι γενικά παρόμοια στα μέλια, αλλά με διαφορές λόγω των τύπων του νέκταρος και του μελιτώματος από το οποίο παράγεται το μέλι (Davies, 1975; Iglesias, De Lorenzo, Polo, Martín-Álvarez, & Pueyo, 2004).

Οι πρωτεΐνες προέρχονται από τους σιελογόνους αδένες των μελισσών και από τα φυτά (νέκταρ, μελίτωμα και κυρίως από τη γύρη). Ανιχνεύθηκαν λευκωματίνες (albumins), σφαιρίνες (globulins), πρωτεάσες και νουκλεοπρωτεΐνες. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μπορεί να κυμαίνεται από 0.1 έως 0.5% αν και ορισμένα μέλια όπως το αναματόμελο (*Calluna vulgaris*) έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα (1-2%).

A.7) Πτητικά συστατικά

Το μέλι από διαφορετικές βοτανικές πηγές έχει διακριτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την αποδοχή και επιλογή του προϊόντος από τους καταναλωτές. Το άρωμα και η γεύση του μελιού σχετίζονται με τις πτητικές ενώσεις, καθώς και με σάκχαρα, οξέα, αμινοξέα, τανίνες και φαινολικά συστατικά. Οι αρωματικές ενώσεις υπάρχουν στο μέλι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ως σύνθετα μείγματα πτητικών συστατικών διαφορετικής δομής και σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (Cuevas-Glory, Pino, Santiago, & Sauri-Duch, 2007). Περισσότερες από 600 ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί ως πτητικά που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες, που προέρχονται από διάφορες βιοσυνθετικές οδούς όπως τερπενοειδή, παράγωγα βενζολίου, αλκοόλες, κετόνες, αλδεΐδες, εστέρες, οξέα, υδρογονάνθρακες και κυκλικές ενώσεις (da Costa et al., 2018). Οι

αρωματικές ουσίες του μελιού διαφέρουν ανάλογα με τη βοτανική προέλευση, τη φυσιολογία της μέλισσας και τις κλιματολογικές συνθήκες. Ορισμένες αλκοόλες και διακλαδισμένες αλδεΐδες είναι πιθανό να παράγονται από μικροβιακό μεταβολισμό, ενώ τα παράγωγα φουρανίου και πυρανίου προέρχονται από την αντίδραση Maillard, που προκαλείται κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας και των συνθηκών αποθήκευσης.

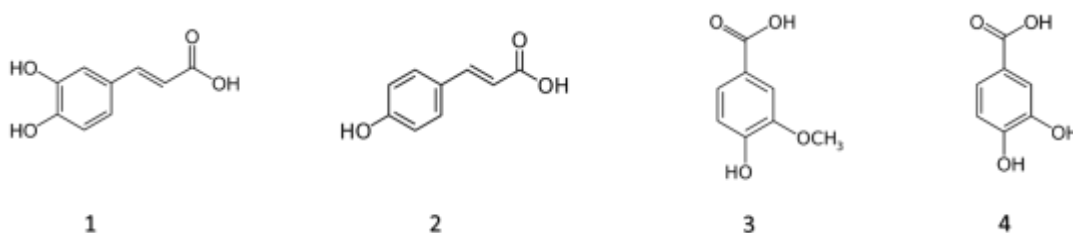
A.8) Φαινολικές ουσίες

Οι πολυφαινόλες είναι μια ετερογενής κατηγορία χημικών ουσιών και μπορούν να χωριστούν σε флаβονοειδή (φλαβονόλες, флаβόνες, флаβανόλες, флаβανόνες, ανθοκυανιδίνες, χαλόνες και ισοφλαβόνες) και μη флаβονοειδή (φαινολικά οξέα). Όλες αυτές οι ενώσεις είναι συχνά προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών φαινολικών ομάδων που σχετίζονται με περισσότερο ή λιγότερο πολύπλοκες δομές. Η φαινολική σύσταση του μελιού μπορεί να προέρχεται από το νέκταρ, τη γύρη, την πρόπολη ή/και το κερί μέλισσας και, κατά συνέπεια, εύλογα αναμένεται ότι θα είναι διαφορετική ανάλογα με την προέλευσή του. Στην πραγματικότητα, το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στο μέλι επηρεάζεται έντονα από τη φυτική και γεωγραφική προέλευση, καθώς και από τις κλιματολογικές συνθήκες του τόπου συλλογής. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ταξινόμηση και τον έλεγχο αυθεντικότητας, ειδικά στην περίπτωση του μονοποικιλιακού μελιού (Cianciosi et al., 2018; Ouchemoukh et al., 2017).

A.8.1) Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αναφέρονται ως μια πολυπληθής και χαρακτηριστική ομάδα φαινολικών ενώσεων που απαντάται στο μέλι. Το προφίλ αυτών των ενώσεων έχει προσδιοριστεί σε διάφορα μέλια και θεωρείται ένα χρήσιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό της φυτικής προέλευσης του μελιού. Τα φαινολικά οξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο υποομάδες ανάλογα με τη δομή τους: τα υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκινναμικά οξέα. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα έχουν μια γενική δομή C1-C6, που προέρχεται από το βενζοϊκό οξύ. Αυτά τα παράγωγα περιλαμβάνουν το π-υδροξυβενζοϊκό, βανιλικό, συριγγικό, γαλλικό και ελλαγικό οξύ. Τα υδροξυκινναμικά οξέα έχουν γενική δομή C3-C6. Παράγωγα υδροξυκινναμικού οξέος, όπως καφεϊκό, σιναπικό, φερουλικό και κουμαρικό οξύ βρίσκονται στο μέλι. (Da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa, & Fett, 2016; Pascual-Maté, Osés, Fernández-Muiño, & Sancho, 2018). Φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ και το π-κουμαρικό οξύ στο μέλι

καστανιάς, καθώς και το πρωτοκατεχικό οξύ στο μελίτωμα έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες. Τα φαινολικά οξέα είναι ενώσεις με πολλαπλές βιολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων αντικαρκινικών, αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών. Παράγωγα υδροξυβενζοϊκού οξέος, όπως το πρωτοκατεχικό οξύ και το βανιλικό οξύ, καθώς επίσης μορφές υδροκυκινναμικού οξέος όπως το π-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ (Εικόνα 4), είναι συστατικά με σημαντική αντικαρκινική δράση (Spilioti et al., 2014; Yao, Jiang, Singanusong, Datta, & Raymont, 2004).



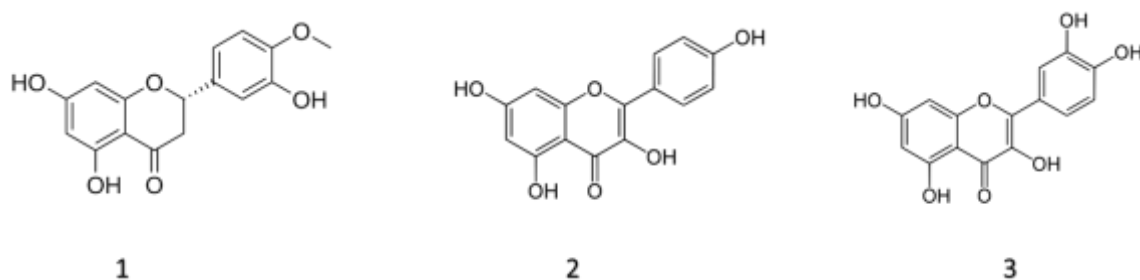
Εικόνα 4. Δομές κάποιων παραγώγων υδροκυκινναμικού οξέος: (1) καφεϊκό οξύ, (2) π-κουμαρικό οξύ, και κάποιων παραγώγων βενζοϊκού οξέος: (3) Βανιλικό οξύ και (4) πρωτοκατεχικό οξύ, που έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες.

A.8.2) Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη οικογένεια φυτικών φαινολικών χρωστικών ουσιών. Έχουν δομή C6-C3-C6, που περιλαμβάνει δύο βενζολικούς δακτύλιους συνδεδεμένους με ένα δακτύλιο πυρανίου, και ανάλογα με τη δομική πολυπλοκότητά τους, ιδιαίτερα στην κατάσταση οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου, τα φλαβονοειδή υποδιαιρούνται σε φλαβονόλες (κερκετίνη, ρουτίνη και καμπφερόλη), φλαβόνες (χρυσίνη, λουτεολίνη και απιγενίνη), φλαβανόλες (όπως κατεχίνη), φλαβονόνες (εσπεριτίνη, πινοσεμπρίνη και πινομπανσίνη) (Εικόνα 5), ισοφλαβόνες, ανθοκυανίνες και χαλκόνες. Τα κύρια φλαβονοειδή που προέρχονται από άνθη στο μέλι αποτελούν άγλυκες μορφές, αλλά έχουν επίσης ανιχνευτεί και αντίστοιχοι γλυκοσίδες. Τα φλαβονοειδή, είναι πολύ σημαντικά συστατικά, τα οποία μπορούν να προέρχονται από φυτά, γύρη και πρόπολη (Da Silva et al., 2016; Hao, Chen, Zhao, & Tian, 2011). Γενικά, περισσότερο από το 90% των φλαβονοειδών προέρχεται κυρίως από την πρόπολη, ενώ βρίσκονται στο μέλι σε διάφορες συγκεντρώσεις, ανάλογα με τον βαθμό μόλυνσης από της κυψέλη με πρόπολη.

Τα φλαβονοειδή συμβάλουν σημαντικά στην αντιοξειδωτική δράση του μελιού, φέρνοντας ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών στις περισσότερες περιπτώσεις εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλομάδων (και άλλων

υποκαταστατών), καθώς και τον τύπο της γλυκοζυλιώσης. (Da Silva et al., 2016; Pascual-Maté et al., 2018).



Εικόνα 5. Δομές κάποιων φλαβονοειδών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες: (1) Εσπεριτίνη (2) Καμπφερόλη, (3) Κερκετίνη

Β) Παράμετροι ποιότητας του μελιού

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν με ποικίλη σύσταση που επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η βοτανική και η γεωγραφική προέλευση, η ένταση της ροής του νέκταρος, οι κλιματολογικές συνθήκες, οι χειρισμοί των μελισσοκόμων, η διαδικασία της συσκευασίας, ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης, κλπ. Η νομοθεσία δεν μπορεί πάντα να ακολουθεί την πολυπλοκότητα των παραλλαγών του μελιού, και υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι παράμετροι του αυθεντικού και του μη επεξεργασμένου μελιού δε συμμορφώνονται με τα κριτήρια ποιότητας. Η τρέχουσα κατάσταση με τη νομοθεσία για το μέλι περιπλέκει ακόμη περισσότερο, καθώς ορισμένες χώρες έχουν εκδώσει εθνικές διατάξεις και αποφάσεις για την αντιμετώπιση του χάσματος στην Ευρωπαϊκή και διεθνή νομοθεσία, παρά τις συστάσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οι διαφορές μεταξύ των εθνικών διατάξεων ενισχύουν τις δυσκολίες εφαρμογής των κανονισμών και καθιστούν την ανάγκη ομοιομορφίας στη νομοθεσία για το μέλι επιτακτική. Ωστόσο, υπάρχουν μερικές βασικές παράμετροι που πρέπει να ελεγχθούν για να προσδιοριστεί η ποιότητα του μελιού που κυκλοφορεί στην αγορά. Στις επόμενες παραγράφους, περιγράφονται ορισμένες από αυτές.

Το πρότυπο «Codex Alimentarius Standard» για το μέλι που υιοθετήθηκε από την Επιτροπή Codex Alimentarius το 1981, που αναθεωρήθηκε το 1987 και το 2001, έχει εθελοντική εφαρμογή και εφαρμόζεται σε πολλές περιπτώσεις με βάση την εθνική νομοθεσία, ενώ η Οδηγία του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης «Directive 2001/110/EC», που τροποποιήθηκε με την «2014/63/EU», ορίζει τις παραμέτρους παραγωγής και εμπορίας του μελιού εντός των Κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

B.1) Βοτανική προέλευση

Το μέλι μπορεί να χαρακτηριστεί ως ανθόμελο («floral ή vegetable honey»), εάν προέρχεται εξ ολοκλήρου ή «κυρίως» από την αναφερόμενη πηγή και διαθέτει τα οργανοληπτικά, φυσικοχημικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά αυτής. Το φιλτραρισμένο μέλι δεν μπορεί να παρέχει πληροφορίες που αναφέρονται στη βοτανική του προέλευση. Παραδοσιακά, η βοτανική προέλευση του μελιού καθορίζεται με τη μέθοδο ανάλυσης γύρης (μελισσοπαλυνολογική ανάλυση). Αν και η ανάλυση γύρης μπορεί να έχει αρκετούς περιορισμούς, ο συνδυασμός με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη φυσικοχημική ανάλυση δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Η εικόνα 6 δείχνει την ελάχιστη ποσότητα γύρης που έχει οριστεί μέχρι στιγμής σε πέντε ευρωπαϊκές χώρες για να ορίσει το μέλι ως «κυρίως» σχετικά με τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης.

Pollen grains	Croatia (%)	Greece (%)	Germany (%)	Italy (%)	Serbia (%)
<i>Arbutus unedo</i>	10	—	80		
<i>Brassica napus</i>	60	—	—		20
<i>Calluna vulgaris</i>	20	—	—		85
<i>Castanea sativa</i>	85	87	90		
<i>Citrus</i> spp.	10 (5 ^a)	3	20	10	
<i>Gossypium</i> (cotton- <i>Erica</i> spp.		3	45		
<i>Eucalyptus</i> spp.		45	85		
General monofloral	45	45	45		
<i>Medicago sativa</i>					> 30
<i>Lavandula</i> spp.	10 (5 ^a)				
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	60				
<i>Robinia pseudoacacia</i>	20		—		20
<i>Rosmarinus officinalis</i>					20
<i>Salvia officinalis</i>	15 (10 ^a)				
<i>Satureja montana</i>	20				
<i>Taraxacum officinalis</i>					20
<i>Thymus</i> spp.	—	18		15	
<i>Tilia</i> spp.	25 (10 ^a)		20		25
<i>Trifolium, melilotus</i>			70		
<i>Helianthus</i>	—	20	50		40

Εικόνα 6. Ελάχιστο ποσοστό γύρης που απαιτείται για τον χαρακτηρισμό των monofloral honey σε πέντε ευρωπαϊκές χώρες σύμφωνα με την εθνική τους νομοθεσία: ή διατάξεις, αποφάσεις ή οδηγίες.

B.2) Γεωγραφική προέλευση

Η αναγραφή της χώρας παραγωγής είναι απαραίτητη επάνω στην ετικέτα. Συγκεκριμένα, η ευρωπαϊκή οδηγία ορίζει ότι πρέπει να αναφέρεται η χώρα ή οι χώρες προέλευσης όπου έχει συλλεχθεί το μέλι. Ωστόσο, σύμφωνα με την οδηγία, εάν το μέλι προέρχεται από περισσότερα του ενός κράτη μέλη ή από μία τρίτη χώρα, η ένδειξη αυτή μπορεί να αντικατασταθεί από τις λέξεις «μείγμα μελιού ΕΕ», «μείγμα μελιού εκτός ΕΕ» ή «μείγμα μελιού ΕΕ και εκτός ΕΕ». Στην Ελλάδα, στα

περισσότερα από τα εισαγομένα μέλια, η χώρα προέλευσης είχε αντικατασταθεί από τη λέξη «μείγματα», αν και μερικά από αυτά είναι μονοποικιλιακά μέλια.

B.3) Φυσικοχημικές παράμετροι

Στη συνέχεια, θα δοθεί μια σύντομη περιγραφή των ποιοτικών κριτηρίων σύνθεσης για το μέλι. Μια περίληψη δίνεται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 7).

Composition criteria	Directive 2001/110 EU			
	Blossom honey		Honeydew honey [†]	Revised CODEX 2001
	General	Exceptions		
Moisture %	<20	<i>Calluna</i> and baker's honey <23 Baker's honey from <i>Calluna</i> <25	<20	The same No indication for baker's honey
Fructose + glucose %	>60	—	>45	The same
Sucrose %	<5	<i>Robinia</i> , <i>Medicago</i> , <i>Banksia</i> , <i>Hedysarum</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Eucryphia</i> spp. and <i>Citrus</i> <10 <i>Lavandula</i> & <i>Borago</i> <15	<5	The same
Water-insoluble %	<0.1	Pressed honey <0.5	<0.1	The same
Electrical conductivity $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$	<0.8	<i>Chestnut</i> , <i>Arbutus</i> , <i>Erica</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Tilia</i> , <i>Calluna</i> , <i>Manuka</i> and <i>Melaleuca</i>	>0.8	The same
Free acid $\text{meq}\cdot\text{kg}^{-1}$	<50	Baker's honey <80	<50	The same
Diastase activity DN ¹⁰⁰	>8	baker's honey and honey with low natural enzyme content: >3 when HMF is less than $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	>8	Honeys with low natural enzyme content: > 3 DN
HMF $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ¹⁰⁰	<40	baker's honey Honeys of tropical climate and blends of these honey <80	<40	Honeys of tropical climate and blends: < 80

Εικόνα 7. Κριτήρια σύνθεσης για το μέλι σύμφωνα με τον Codex Alimentarius και την EU Directive 2001/110/EC

B.3.1) Περιεκτικότητα σε υγρασία

Το μέλι που παράγεται από μέλισσες έχει περιεκτικότητα σε υγρασία που εξαρτάται από τη βοτανική προέλευση, τους χειρισμούς των μελισσοκόμων και τις κλιματολογικές συνθήκες. Συνήθως, το μέλι από καλά σφραγισμένες κυψέλες έχει περιεκτικότητα σε νερό μικρότερη από το 18%. Πολύ σπάνια γίνεται υπέρβαση αυτής της τιμής. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Codex Alimentarius και συγκεκριμένη Ευρωπαϊκή Οδηγία θέτουν όρια για την περιεκτικότητα σε υγρασία όχι περισσότερο από το 21%, με εξαίρεση ορισμένους τύπους monofloral honey, όπως το μέλι ερείκης (ή αναματόμελο / *Calluna vulgaris*) που επιτρέπεται να έχει έως και 23%.

B.3.2) Περιεκτικότητα σε φρουκτόζη και γλυκόζη

Σύμφωνα με το υπάρχον κανονιστικό πλαίσιο το άθροισμα της περιεκτικότητας σε φρουκτόζη και γλυκόζη για το ανθόμελο πρέπει να υπερβαίνει το 60%, και για το μελίτωμα και τα μείγματα μελίτωμα/ανθόμελο το 45%. Το άθροισμα της γλυκόζης και της φρουκτόζης καλύπτεται από τα περισσότερα ανθόμελα. Οι χαμηλότερες τιμές οφείλονται κυρίως σε φυσικά μείγματα με εκκρίσεις μελιτώματος ή μίγματα μετά από ανθρώπινη παρέμβαση. Σε αντίθεση με αυτό, υπάρχουν τύποι μελιτώματος όπως το μέλι από έλατο και πεύκο που μπορεί να έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αυτά τα δύο σάκχαρα.

B.3.3) Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη

Γενικότερα η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη οφείλει να είναι μικρότερη από 5% με εξαίρεση ορισμένα δείγματα όπως το μέλι εσπεριδοειδών και το μέλι ευκάλυπτου. Η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη του μελιού από ευκάλυπτο είναι γενικά μικρότερη, περίπου 4.2%, ενώ το μέλι από πικραλίδα ή ταραξάκο (*Taraxacum officinale*) μπορεί ορισμένες φορές να έχει περιεκτικότητα σε σακχαρόζη υψηλότερη από 5%. Για μέλια που είναι μείγματα (ανθόμελο/μελίτωμα), η περιεκτικότητα δεν μπορεί να είναι περισσότερο από 10%.

B.3.4) Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Το ανθόμελο και το μέλι μελιτώματος διαφοροποιούνται όσον αφορά την ηλεκτρική αγωγιμότητα. Ηλεκτρική αγωγιμότητα μικρότερη από $0.8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ εμφανίζει το ανθόμελο, και υψηλότερη από $0.8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ το μελίτωμα, με εξαίρεση το μέλι καστανιάς, το μέλι από ευκάλυπτο, το αναματόμελο, το μέλι μανούκα, κ.α.

B.3.5) Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της διαστάσης και περιεκτικότητας σε 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF) μετά την επεξεργασία και ανάμειξη

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία, δηλαδή η μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της διαστάσης αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο ποιότητας του μελιού μαζί με την περιεκτικότητα σε 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη δοκιμασία, ο αριθμός διαστάσης (DN) της κλίμακας Schade συνήθως υπερβαίνει τα 25 ενώ το όριο είναι 8 DN και μόνο για το μέλι της πορτοκαλιάς είναι 3 DN. Σε περιπτώσεις φρέσκου, μη επεξεργασμένου μελιού με χαμηλή

περιεκτικότητα σε ένζυμα, η τιμή πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 D με την 5-HMF να απουσιάζει ή να είναι πολύ χαμηλό. Όταν οι παράμετροι είναι εντός των ορίων, αποτελεί ένδειξη ότι το μέλι είναι νωπό και καλοδιατηρημένο. Μία μονάδα διαστάσης αντιστοιχεί σε δραστηριότητα ενζύμου 1 g δείγματος μελιού, το οποίο μπορεί να υδρολύσει 0.01 g αμύλου σε 1 h στους 40 °C (Μπακανόριτσος, Βαβουλίδου, & Τσιρογιάννης, 2000).

Το ποσοστό της 5-HMF αυξάνεται με το χρόνο συντήρησης και τη θερμοκρασία, γι' αυτό και η μέτρηση της θεωρείται κριτήριο ελέγχου αυτών των επεμβάσεων. Σύμφωνα με τον Rodgers (Rodgers PEW. Honey quality control chapter 12:314-325. In: Honey a Comprehensive Survey (ed. E. Crane), Heinemann London 1978, pp608.) το νωπό μέλι σπάνια ξεπερνά το όριο των 10 mg/kg. Οι υψηλότερες τιμές της 5-HMF που έχουν αναφερθεί σε φρέσκα, μη επεξεργασμένα δείγματα είναι έως 15 mg kg⁻¹ με μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή τα 40 mg.kg⁻¹. Τα μέλια με χαμηλή φυσική δραστηριότητα διάστασης, δεν πρέπει να έχουν 5-HMF περισσότερο από 15 mg.kg⁻¹. Η διασάση αδρανοποιείται και η 5-HMF σχηματίζεται όταν το μέλι θερμαίνεται, όπως για παράδειγμα κατά την ανάμειξη ή γενικότερα την επεξεργασία. Και οι δύο αλλαγές συμβαίνουν επίσης και κατά την αποθήκευση. Όταν η διασάση πέσει κάτω από το όριο των 8 DN ή η HMF υπερβαίνει τα 40 mg.kg⁻¹, η ποιότητα του μελιού θεωρείται υποβαθμισμένη.

B.3.6) Άλλοι παράμετροι

- Περιεκτικότητα σε αδιάλυτα στερεά στο νερό: Γενικά όχι πάνω από 0.1%
- Περιεκτικότητα σε τέφρα: Γενικά όχι πάνω από 0.6%
- Οξύτητα: όχι περισσότερο από 40 meq/kg

(Communities, 1984; WHO and FAO, 2019)

Γ) Νόθευση και Αυθεντικότητα

Η νοθεία αναφέρεται συνήθως στην ανάμειξη ξένης ύλης (ουσίας), κατώτερης και μερικές φορές επιβλαβούς ποιότητας, με τρόφιμα ή ποτά που προορίζονται για πώληση. Η νοθεία μελιού εμφανίστηκε στην παγκόσμια αγορά τη δεκαετία του 1970 όταν το σιρόπι καλαμποκιού με υψηλή περιεκτικότητα φρουκτόζης άρχισε να παράγεται βιομηχανικά.

Εκτός από τις φυσικές πολύτιμες ιδιότητες του, το μέλι χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό σε μεγάλο αριθμό προϊόντων διατροφής, αλλά η εμπορική του αξία είναι σημαντικά υψηλότερη από άλλα κοινά χρησιμοποιούμενα γλυκαντικά, όπως σιρόπια ραφιναρισμένης ζάχαρης από καλαμπόκι, ζαχαροκάλαμο και σιρόπια φυσικής προέλευσης (ρύζι, φρούτα, σταφύλια). Ως εκ τούτου, με σκοπό το οικονομικό κέρδος, υπάρχει ο πειρασμός να νοθευτεί το μέλι, αραιώνοντάς το με φθηνά σιρόπια ζάχαρης που προσομοιώνουν το προφίλ υδατανθράκων μελιού. Με βάση τη βιβλιογραφία, το ελαιόλαδο, το γάλα, το μέλι, το σαφράν, ο χυμός πορτοκαλιού, ο καφές και ο χυμός μήλου, είναι τα επτά πιο πιθανά συστατικά τροφίμων που θα στοχοποιηθούν για νοθεία (Fakhlaei et al., 2020).

Η νοθεία στο μέλι μπορεί να προσεγγιστεί από τρεις διαφορετικές οπτικές. Η πρώτη αφορά στον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, η δεύτερη το ποινικό μέρος, αφού αποτελεί απάτη, και η τρίτη το κόστος στην οικονομία. Το ζήτημα της επικυνδυνότητας ενάντια στη δημόσια υγεία συνίσταται κυρίως στην προσθήκη μη ελεγχόμενων συστατικών και ουσιών που ενδέχεται να επηρεάσουν αρνητικά την ανθρώπινη υγεία. Το νομικό ζήτημα περιγράφεται στον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης που απαγορεύει την προσθήκη οποιονδήποτε ουσιών στο μέλι, ενώ το οικονομικό ζήτημα αναφέρεται στον κυρίως στον αθέμιτο ανταγωνισμό των νοθευμένων προϊόντων σε σύγκριση με τα αυθεντικά μέλια (Geană, Ciucure, Costinel, & Ionete, 2020; Oroian, Paduret, & Ropciuc, 2018; Oroian, Ropciuc, Paduret, & Todosi, 2018).

Όπως αναφέρθηκε, τα σάκχαρα είναι τα κύρια συστατικά του μελιού. Επομένως, η νοθεία με την προσθήκη υδατανθράκων είναι ένας τύπος απάτης που πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά. Όσον αφορά τη νοθεία του μελιού έχουν βρεθεί δυο τρόποι με τους οποίους πραγματοποιείται, ο άμεσος και ο έμμεσος.

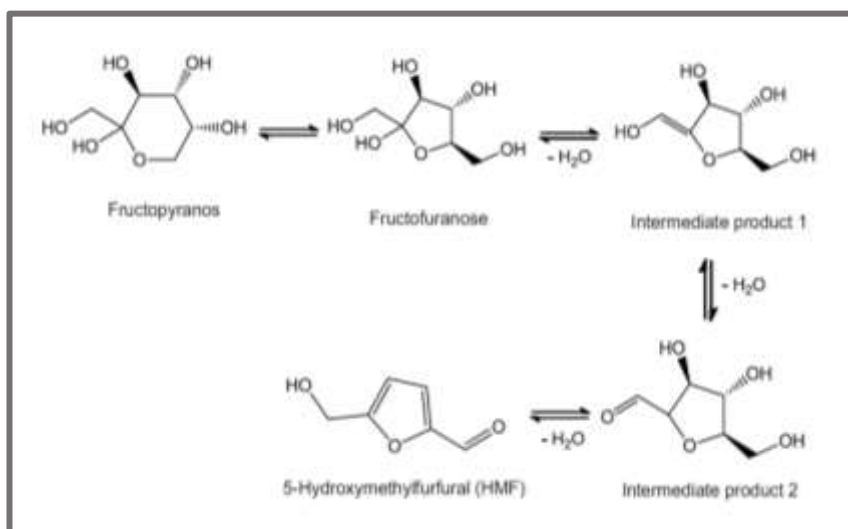
- **Ο άμεσος τρόπος** είναι η χρήση σιροπιών σακχάρων κατά τη διαδικασία της παραγωγής και επεξεργασίας του μελιού με σκοπό να αυξήσουν την ποσότητα του προϊόντος διατηρώντας υψηλή τιμή. Αυτή η πράξη, όμως, έχει επιβλαβείς συνέπειες για τους καταναλωτές, ιδίως για καταναλωτές που πρέπει να είναι πολύ προσεκτικοί στο τι καταναλώνουν όπως οι διαβητικοί (Islam, Khalil, Islam, & Gan, 2014).
- **Ο έμμεσος τρόπος** νοθείας του μελιού κατά την παραγωγή του, αναφέρεται στην επέμβαση της διατροφής των μελισσών που θα παράξουν το μέλι. Συγκεκριμένα, δίνεται στις μέλισσες για κατανάλωση, μέλι μαζί με χημικές ουσίες και βιομηχανικώς παραγόμενα σιρόπια. Η έμμεση νοθεία δίνει στους ειδικούς ένα δύσκολο έργο κατά την εκτίμηση της ποιότητας του μελιού (Naila, Flint, Sulaiman, Ajit, & Weeds, 2018).

Η φρουκτόζη και η γλυκόζη είναι οι δύο βασικοί δείκτες για την ποιοτική ανάλυση του μελιού. Τα νοθεύματα, όπως τα ιμβερτοποιημένα σιρόπια, μπορούν να προσαρμοστούν ώστε να μιμούνται το φυσικό προφίλ σακχαρόζης-γλυκόζης-φρουκτόζης του μελιού, καθιστώντας πιο δύσκολη την ανίχνευση της νοθείας με τις παραδοσιακές μεθόδους (De-melo et al., 2018; Karabagias, 2019). Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, διάφορες αναλυτικές μέθοδοι με σκοπό την ανίχνευση ύπαρξης νοθείας σε δείγματα μελιού έχουν αναπτυχθεί. Οι μέθοδοι αυτοί στοχεύουν στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σαχάρων, των βιοδεικτών στο μέλι για τον καθορισμό της βοτανικής και της γεωγραφικής προέλευσης, καθώς και άλλων παραμέτρων όπως η αγωγιμότητα του νερού και το χρώμα. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο σε αυτές τις αναλύσεις είναι ο προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της διαστάσης, η ηλεκτροχημική ανάλυση, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC), η ανάλυση ισοτόπων άνθρακα, καθώς και διάφορες παραλλαγές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), αέρια χρωματογραφία (GC), αέρια χρωματογραφία σε συνδιασμό με φασματομετρίας μάζας (GC-MS), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), Φασματοφωτομετρία Εγγύς Υπερύθρου (NIR), θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης, φασματοσκοπία Raman, κ.α. Οι πιο σύγχρονες αυτές μέθοδοι τις περισσότερες φορές μπορούν να υποκαταστήσουν με τις παραδοσιακές μεθόδους, αλλά είναι πολύ πιο γρήγορες και αυτοματοποιημένες (Naila et al., 2018; Nespeca, Vieira, Júnior, Neto, & Ferreira, 2020).

Πέρα από την «επί σκοπού» παραποίηση του μελιού για τη μείωση του κόστους παραγωγής με χρήση κάποιου σιροπιού αντί για νέκταρ, η νοθεία του μπορεί να συμβεί και με μη εσκεμμένο τρόπο κατά διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσής του. Είναι δυνατή η δημιουργία τοξικών ουσιών που προκύπτουν από αντιδράσεις, γνωστές ως αντρίδράσεις Maillard. Η βασική τοξική ουσία που παράγεται από αυτές τις αντιδράσεις και έχει εντοπιστεί σε διατροφικά προϊόντα όπως το γάλα, τους χυμούς φρούτων και το μέλι είναι η 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF – *Εικόνα 8*). Οι αντιδράσεις Maillard λαμβάνουν χώρα στο μέλι έπειτα από θέρμανσή του, που γίνεται με σκοπό τη διατήρησή του για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα ως φρέσκο.

Η 5-HMF είναι μια κυκλική αλδεΐδη που παράγεται κατά την όξινη αποσύνθεση των μονοσακχαριτών και έτσι εμφανίζεται φυσικά σε όλα τα προϊόντα όπου το νερό συνυπάρχει με τους μονοσακχαρίτες σε ένα όξινο μέσο. Η παρουσία απλών σακχάρων στο μέλι και πολλών οξέων είναι μια ευνοϊκή προϋπόθεση για την παραγωγή αυτής της ουσίας που επηρεάζεται από τη θερμοκρασία κατά την εκχύλιση, την υγροποίηση ή κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε ακατάλληλες συνθήκες.

Η ποσότητα της 5-HMF έχει χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη νόθευσης του μελιού με σιρόπι καλαμποκιού φρουκτόζης. Η ποσότητά της, παραδείγματος χάρη, σε νοθευμένο μέλι με 50% HFCS (σιρόπι καλαμποκιού υψηλής φρουκτόζης) είναι υπερδιπλάσια από αυτή που παρουσιάζει το καθαρό μέλι. Ως εκ τούτου, η 5-HMF θεωρείται μία από τους κύριους δείκτες ποιότητας πολλών προϊόντων. Σε ορισμένες μελέτες έχει αναφερθεί ότι προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, όπως κυτταροτοξικότητα στους βλεννογόνους, στο δέρμα και στο αναπνευστικό σύστημα, χρωμοσωμικές εκτροπές, και καρκινογένεση σε ανθρώπους και ζώα (Kukuroná, Karoničoná, Greif, Kohajdoná, & Lehkožinoná, 2006; Sharpla, Solayman, Alam, Khalil, & Gan, 2018). Επίσης, έχει μελετηθεί εκτενώς και ενώ υπάρχουν έρευνες, που αποδεικνύουν ότι σε φρέσκο μέλι (μη επεξεργασμένο) δεν ανιχνεύεται η ουσία αυτή (E. A. Tosi, Ré, Lucero, & Bulacio, 2004), άλλες εργασίας έχουν αποδείξει την ύπαρξή της και σε μη επεξεργασμένο μέλι σε μικρές ποσότητες (Chakir, Romane, Marcazzan, & Ferrazzi, 2016).



Εικόνα 8. Σχηματισμός 5-HMF στο μέλι

Η αυθεντικότητα του μελιού είναι πρωταρχικής σημασίας τόσο για τους καταναλωτές όσο και για τους μελισσοκόμους, και βασίζεται σε μελέτες για τον προσδιορισμό της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης. Για τον προσδιορισμό της αυθεντικότητας του μελιού σχετικά με την προέλευση, μέθοδο επιλογής αποτελεί η μελισσοπαλυνολογική ανάλυση, δηλαδή η αποτύπωση και ταυτοποίηση των περιεχόμενων γυρεοκόκκων. Ιδιαίτερες δυσκολίες σε αυτή τη μέθοδο σχετίζονται με την ανάγκη καλής γνώσης και εμπειρίας της μορφολογίας της γύρης και τη διαθεσιμότητα μιας ολοκληρωμένης συλλογής κόκκων γύρης. Επιπλέον, η πηγή ορισμένων μελιών, για παράδειγμα βαμβακιού και καστορέλαιου, δεν μπορεί να αναγνωριστεί από αυτήν την ανάλυση. Εναλλακτικά ή

και σε συνδυασμό με αυτή τη μέθοδο, τις τελευταίες δεκαετίες, εφαρμόστηκαν νέες μέθοδοι που βασίζονται στην αναγνώριση φυσικών προϊόντων (βιοδείκτες) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ίδιο σκοπό. Οι βιοδείκτες μπορούν να είναι πτητικές, φαινολικές και αζωτούχες ενώσεις, καθώς και φυσικοχημικές παράμετροι (Karabagias, Vavoura, Nikolaou, et al., 2014; Ruoff et al., 2006; Stanek, Teper, Kafarski, & Jasicka-Misiak, 2019). Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων και των φλαβονοειδών έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο που βοηθά στον προσδιορισμό της προέλευσης του μελιού. Το χημικό προφίλ του μελιού, καθώς και η ταυτοποίηση των πτητικών και μη-πτητικών χημικών βιοδεικτών, αποδείχθηκαν αποτελεσματικά εργαλεία για την αξιολόγηση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης του μελιού και για τον εντοπισμό πιθανών νοθεύσεων (Aliferis, Tarantilis, Harizanis, & Alissandrakis, 2010, S. Sabatier, M.J. Amiot, M. Tacchini, 1992; Yao et al., 2003).

Για να προσδιορίσει την αυθεντικότητα του μελιού, η βιομηχανία πρέπει να έχει απλές, γρήγορες και εύχρηστες τεχνικές χωρίς να χρειάζεται ακριβός εξοπλισμός και εργαζόμενοι με υψηλή εξειδίκευση. Διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης του μελιού έχουν αναφερθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία. Η χρήση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης δεδομένων (multivariate data analysis) και οι μέθοδοι μηχανικής μάθησης (machine learning) έχουν προσελκύσει την προσοχή των ερευνητών, ειδικά λόγω της εμπειρικής επιτυχίας που παρουσιάζουν τέτοιες μέθοδοι στη διάκριση και την αυθεντικότητα των τροφίμων και πολλών άλλων προϊόντων, όπως ρύζι, αλκοολούχα ποτά, καραμέλες, καφές, χυμοί και φρούτα, παράνομα ναρκωτικά και άλλα. Όσον αφορά τη διάκριση του μελιού, έχει χρησιμοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης και την επαλήθευση της αυθεντικότητας και της νόθευσης του μελιού όπως φασματοσκοπικές τεχνικές (φασματοσκοπία ορατού (Vis), Φασματοφωτομετρία Εγγύς Υπερύθρου (NIRS), φασματοσκοπία υπερύθρου(IR) ή Raman.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η πλειονότητα των μελετών στοχεύει στον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού, με λίγες μόνο να στοχεύουν στη γεωγραφική προέλευση. Ένας πιθανός λόγος για την επιπλέον προσπάθεια των ερευνητών να εξακριβώσουν τη βοτανική προέλευση είναι ότι προκαλεί μεγαλύτερο αντίκτυπο στη σύνθεση και τις ιδιότητες του μελιού, η οποία αλλάζει ανάλογα με τη σύνθεση των εκκρίσεων που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή του (Maione, Barbosa, & Barbosa, 2019; Noviyanto & Abdulla, 2020; Schievano, Stocchero, Morelato, Facchin, & Mammi, 2012).

1.2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

Η μεταβολομική αναπτύχθηκε ιστορικά μετά τη γενωμική, τη μεταγραφομική και την πρωτεομική, και είναι η πιο πρόσφατη ομική προσέγγιση. Το πρώτο επιστημονικό εγχειρίδιο που χρησιμοποιεί τη λέξη μεταβόλωμα δημοσιεύθηκε το 1998. Δεδομένου ότι το μεταβόλωμα (ορίζεται ως το σύνολο των μεταβολιτών ενός επακριβώς καθορισμένου βιολογικού δείγματος) είναι το τελικό προϊόν της γονιδιακής έκφρασης, πιστεύεται ότι είναι μια πιο ευαίσθητη μέθοδος μέτρησης του φαινοτύπου (Ellis, Dunn, Griffin, Allwood, & Goodacre, 2007).

A) Τι είναι Μεταβολομική;

Η μεταβολομική είναι η συστηματική μελέτη των μικρών μεταβολιτών (μικρό μοριακό βάρος) ενός βιολογικού συστήματος (π.χ. κύτταρο, ιστός, ολόκληρος οργανισμός) αποτέλεσμα των βιοχημικών εργασιών ή των αντιδράσεων του δεδομένου συστήματος σε μία περιβαλλοντική πίεση. Στο σύνολό τους, αυτά τα μικρά μόρια και οι αλληλεπιδράσεις τους σε ένα βιολογικό σύστημα είναι γνωστά ως μεταβόλωμα υπό δεδομένες γενετικές, διατροφικές ή περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ακριβώς όπως η γενωμική είναι η μελέτη του DNA και των γενετικών πληροφοριών σε ένα κύτταρο, έτσι και η μεταγραφομική είναι η μελέτη του RNA και των διαφορών του στην έκφραση του mRNA. Αντίστοιχα η μεταβολομική είναι η μελέτη υποστρωμάτων και προϊόντων μεταβολισμού, τα οποία επηρεάζονται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η μεταβολομική είναι μια σημαντική προσέγγιση επειδή οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές «omics», αντανakλούν άμεσα την υποκείμενη βιοχημική δραστηριότητα και την κατάσταση των κυττάρων/ιστών. Έτσι, η μεταβολομική αντιπροσωπεύει καλύτερα το μοριακό φαινότυπο (Adamski, 2020).

Οι τεχνολογίες μεταβολομικής παρέχουν πολλές πληροφορίες για τη βασική βιολογική έρευνα σε τομείς όπως η βιολογία συστημάτων, η φαρμακευτική έρευνα, η διατροφή και η τοξικολογία. Οι εξελίξεις στη μεταβολομική οδήγησαν στη βελτίωση των μεθόδων ανάλυσης όσον αφορά την ευαισθησία και την αναπαραγωγιμότητά τους και τη μεγαλύτερη κάλυψη μεταβολιτών. Αυτό, με τη σειρά του, είχε ως αποτέλεσμα έναν αυξανόμενο αριθμό εφαρμογών στη βιοϊατρική έρευνα, καθώς και εφαρμογές στην ποιότητα τροφίμων αλλά και στη γεωπονία. Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική συμπεριλαμβάνουν τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τη φασματομετρία μάζας, σε συνδυασμό είτε με αέρια χρωματογραφία (GC-

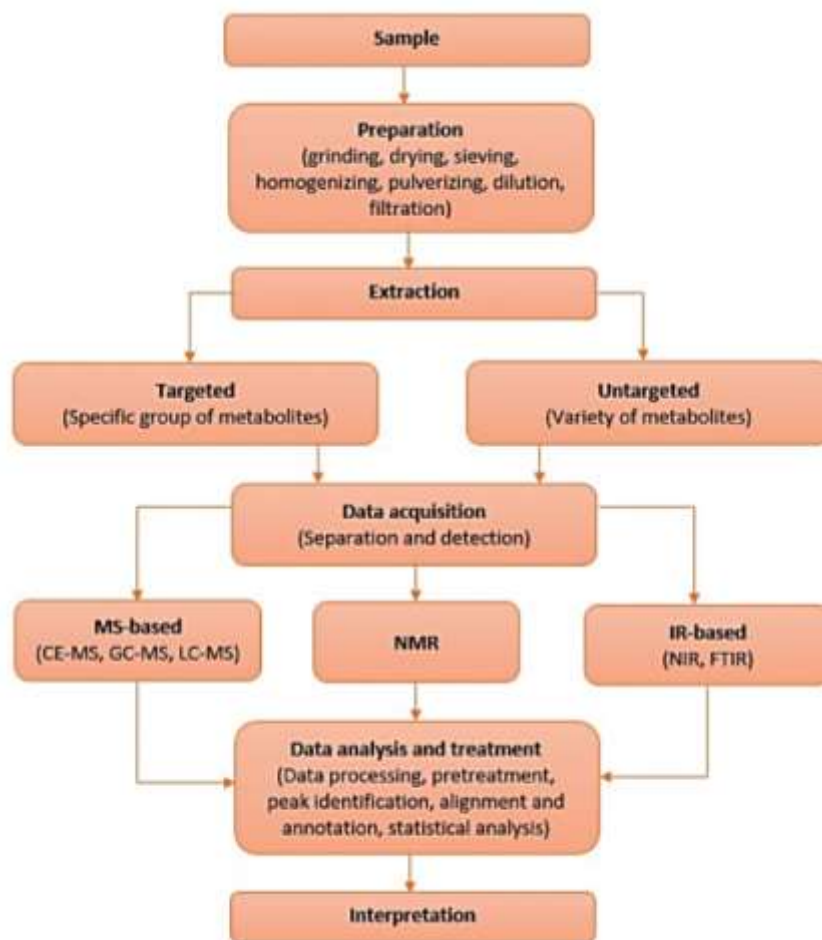
MS), είτε με υγρή χρωματογραφία (LC-MS). Βασικό στάδιο μιας μεταβολομικής μελέτης αποτελεί επίσης η χρήση στατιστικών εργαλείων και συνήθως πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων (multivariate data analysis) για την οπτικοποίηση και την εξόρυξη χρήσιμων πληροφοριών.

B) Σχεδιασμός μεταβολομικής μελέτης

Οι δύο βασικές προσεγγίσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μεταβολομική είναι οι μη στοχευμένες (untargeted, non-targeted) και οι στοχευμένες (targeted). Ανάλογα με το σκοπό της μελέτης, η επιλεγείσα προσέγγιση θα καθορίσει το σχεδιασμό του πειράματος, την προετοιμασία του δείγματος και τις αναλυτικές τεχνικές που θα χρησιμοποιηθούν. Σε στοχευμένες μελέτες σκοπός είναι ο εντοπισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός ενός περιορισμένου αριθμού γνωστών μεταβολιτών, συχνά σε μια παρόμοια κατηγορία μεταβολιτών, που έχουν παρόμοιες λειτουργίες ή εμπλέκονται στην ίδια πορεία. (Schrimpe-Rutledge, Codreanu, Sherrod, & McLean, 2016; Tan, Begley, Mullard, Hollywood, & Bishop, 2016).

Οι μη στοχευμένες μέθοδοι επικεντρώνονται στην απόκτηση δεδομένων για όσο το δυνατόν περισσότερους μεταβολίτες χωρίς κανένα δομικό περιορισμό καθώς και τη διερεύνηση γνωστών και άγνωστων μεταβολικών αλλαγών. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μη στοχευμένης μεταβολομικής είναι η συλλογή δεδομένων χωρίς προϋπάρχουσα γνώση. Ωστόσο, αυτό συνοδεύεται από την προειδοποίηση ότι σίγουρα η προετοιμασία του δείγματος και οι αναλυτικές μέθοδοι έχουν άμεσο αντίκτυπο στα αποτελέσματα που λαμβάνονται. Λόγω της διαφορετικής σύνθεσης του μεταβολισμού, τα στάδια προετοιμασίας δειγμάτων, οι μέθοδοι διαχωρισμού, ο εξοπλισμός και οι παράμετροι θα επηρεάσουν το υποσύνολο των μεταβολιτών που ανιχνεύονται. Ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα ροής μεταβολομικής ανάλυσης παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 9).

Σε μια μη στοχευμένη μέθοδος είναι σημαντικό να βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα που συλλέγονται αντικατοπτρίζουν και αντιπροσωπεύουν το υπό μελέτη βιολογικό σύστημα. Προκειμένου να προσδιοριστούν και να εξεταστούν οι πιο σημαντικοί παράγοντες που σχετίζονται με την υπόθεση που εξετάζεται, οι εξωτερικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το πείραμα πρέπει να εξαλειφθούν ή να προσδιοριστούν έτσι ώστε να μπορούν να ληφθούν υπόψη κατά την ανάλυση δεδομένων. Συνήθως η διαδικασία ξεκινάει με εκχύλιση των μεταβολιτών όπου στη συνέχεια ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των επιμέρους συστατικών μπορεί να γίνει με τη βοήθεια αναλυτικών τεχνικών όπως η LC-MS και το NMR.



Εικόνα 9. Γενικό διάγραμμα ροής μεταβολομικής ανάλυσης

ο Αναλυτικές τεχνικές

Ο απώτερος στόχος της μεταβολομικής είναι η ποιοτική και η ποσοτική ανάλυση όλων των μεταβολιτών σε έναν οργανισμό. Για την ανάλυση του μεταβολισμού, χρησιμοποιούνται σήμερα βασικές αναλυτικές τεχνικές όπως HPLC ή TLC-UV, GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS και NMR. Κάθε τεχνική έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Πίνακας 1). Μεταξύ των τεχνολογιών που είναι διαθέσιμες για την ανάλυση του μεταβόλωματος, η φασματομετρία μάζας (MS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) θεωρούνται σήμερα οι πρωταρχικές και οι πιο καθολικές (Verpoorte, Choi, Mustafa, & Kim, 2008). Πρέπει να αναφερθεί ότι δεν υπάρχει μια μοναδική αναλυτική πλατφόρμα που να μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη αναγνώριση και ποσοτικοποίηση όλων των

μεταβολιτών ενός βιολογικού δείγματος. Ως αποτέλεσμα, οι καλύτερες μελέτες μεταβολισμού χρησιμοποιούν πολλές πλατφόρμες τεχνολογίας.

Πίνακας 1. Σύγκριση αναλυτικών τεχνολογιών χρησιμοποιούμενων στις μεταβολομικές προσεγγίσεις. Η κλίμακα αξιολόγησης ξεκινάει από – έως +++ για σημαντικά μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα, αντίστοιχα.

	HPLC-DAD	GC-MS	LC-MS	MS ⁿ	NMR
Προετοιμασία δειγμάτων	++	-	-	+	+++
Επαναληψιμότητα	-	+	-	+	+++
Απόλυτη ποσοτικοποίηση	-	-	-	-	+++
Σχετική ποσοτικοποίηση	+	++	+	++	+++
Δυνατότητα ταυτοποίησης	+	++	++	++	++
Ευαισθησία	+	++	++	+++	-

1) Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic Resonance -NMR)

Το NMR είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση οργανικών και ορισμένων ανόργανων ενώσεων μέσα σε βιολογικά δείγματα. Είναι ένα ιδανικό αναλυτικό εργαλείο από πολλές απόψεις για τη μεταβολομική. Από τους πιο κοινούς πυρήνες που χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία NMR, η φασματοσκοπία πρωτονίου ^1H NMR είναι η πιο ευαίσθητη (Ellis et al., 2007; O. A. H. Jones, 2018).

Τα φάσματα ^1H NMR μίας διάστασης είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για μεταβολομικές μελέτες. Αυτό συμβαίνει επειδή η φασματοσκοπία ^1H NMR, ως τεχνική, είναι πολύ αυτοματοποιημένη, πολύ επαναλήψιμη και πολύ γρήγορη. Πράγματι, οι χρόνοι συλλογής δεδομένων ^1H NMR για ένα μόνο φάσμα είναι συχνά τόσο σύντομοι όσο λίγα λεπτά. Με τον σύγχρονο διαθέσιμο εξοπλισμό NMR, τα δείγματα μπορούν να οργανώνονται και να αφαιρούνται συνεχώς με ρομποτικούς εναλλάκτες που λειτουργούν για ημέρες ή εβδομάδες κάθε φορά. Επιπλέον, οι πληροφορίες που περιέχονται σε ένα μόνο φάσμα ενός δείγματος είναι συχνά επαρκείς για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό 50-100 μεταβολιτών κάθε φορά.

Ως εργαλείο για τη μεταβολομική, το NMR έχει μερικά μοναδικά πλεονεκτήματα έναντι της χρωματογραφίας και των μεθόδων που βασίζονται στο MS. Παρέχει μια πολύ γρήγορη και λεπτομερή ανάλυση της χημικής σύστασης ενός δείγματος, απαιτείται μικρή προετοιμασία δείγματος, δεν είναι

καταστροφική μέθοδος και οι βελτιώσεις στον εξοπλισμό έχουν αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία. Επιπλέον, είναι ένας καθολικός ανιχνευτής στον οποίο τα σήματα δίνουν άμεσες πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή των μορίων αλλά και τη συγκέντρωσή τους. Ένα φάσμα NMR αντανακλά ένα φυσικό χαρακτηριστικό μιας ένωσης, και επομένως είναι πολύ αναπαραγωγίμο. Αυτό είναι ένα σημαντικό πλεονέκτημα καθώς σημαίνει ότι τα δεδομένα μεταβολομικής NMR ισχύουν πάντα, αρκεί να χρησιμοποιούνται οι ίδιες διαδικασίες εκχύλισης και οι ίδιοι δευτεριωμένοι διαλύτες. (Verpoorte et al., 2008). Ωστόσο, το NMR έχει επίσης ορισμένα μειονεκτήματα, με την πιο σημαντική την έλλειψη ευαισθησίας. Σε σύγκριση με το LC-MS και το GC-MS, η φασματοσκοπία NMR είναι συχνά 10 έως 100 φορές λιγότερο ευαίσθητη. Αυτό σημαίνει ότι μια τυπική μεταβολομική μελέτη που βασίζεται σε NMR επιστρέφει συνήθως πληροφορίες μόνο για 50 έως 200 αναγνωρισμένους μεταβολίτες όταν η συγκέντρωση είναι $> 1\mu\text{M}$, ενώ μια τυπική μελέτη LC-MS μπορεί να επιστρέφει πληροφορίες για 1000+ αναγνωρισμένους μεταβολίτες με συγκεντρώσεις >10 έως 100 nM (Emwas et al., 2019).

2) Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry - MS)

Λόγω των εμφανών πλεονεκτημάτων της ταχύτητας, της ευαισθησίας και του μεγάλου δυναμικού εύρους σε σχέση με άλλες τεχνικές, η MS έχει δώσει νέα διάσταση στην έρευνα. Υπάρχουν πολλές τεχνικές φασματομετρίας μάζας που βασίζονται στο διαχωρισμό ουσιών. Οι πιο χρησιμοποιούμενες είναι η αέρια και η υγρή χρωματογραφία. Η αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι το προτιμώμενο όργανο για ανάλυση πτητικών μεταβολιτών, η οποία αποδίδει υψηλή ευαισθησία και ανάλυση, εμφανή αναπαραγωγικότητα και εξαιρετικά επαναλαμβανόμενη θραυσματοποίηση. Η διαθεσιμότητα μιας φασματικής βιβλιοθήκης καθιστά την ταυτοποίηση των βιοδεικτών πιο εύκολη και χρήσιμη. Ωστόσο, η GC-MS συνήθως απαιτεί κουραστική επεξεργασία δείγματος και παραγωγοποίηση όταν οι στόχοι ανάλυσης είναι μη πτητικά συστατικά. Για αυτό το λόγο, η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) έχει γίνει η κυρίαρχη αναλυτική τεχνική στον τομέα της μεταβολομικής. Το 2004, η κυκλοφορία της υπερ-υψηλής απόδοσης LC (UPLC) αύξησε δραματικά την απόδοση των κανονικών μεθόδων LC. Επί του παρόντος, η UPLC-MS έχει γίνει η βασικότερη τεχνική στον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των μεταβολιτών (Ren, Zhang, Kong, & Wang, 2018).

Ωστόσο η μεταβολομική με MS διακρίνεται και από κάποια μειονεκτήματα. Από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι η μειωμένη επαναληψιμότητα σε σχέση με το NMR. Επίσης, δεδομένου ότι η συγκέντρωση των μεταβολιτών στους οργανισμούς ποικίλλει σημαντικά απαιτείται

συνδιαστική χρήση μεθόδων διαχωρισμού, μεθόδων εκχύλισης και ανιχνευτών MS. Στην ίδια λογική, συχνά απαιτούνται πολλές και διαφορετικές μέθοδοι προκειμένου να ανιχνευθούν διαφορετικές χημικές κατηγορίες. Τέλος, με τη συνεχή βελτίωση στις χρωματογραφικές τεχνικές και στην ευαισθησία των ανιχνευτών MS, λαμβάνεται τεράστιος όγκος δεδομένων όπου η επεξεργασία τους γίνεται μια ακόμα πρόκληση για τη μεταβολομική (Ren et al., 2018).

ο Επεξεργασία δεδομένων (^1H NMR)

Η προεπεξεργασία και επεξεργασία των δεδομένων μεταβολομικής είναι ένα πολύ σημαντικό στάδιο που χρησιμοποιείται για την απλοποίηση, την ομογενοποίηση των δεδομένων και την εξάλειψη ψευδούς μεταβλητότητας (induced variability) ώστε να λάβει χώρα η εξαγωγή της πληροφορίας. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει πολλά βήματα που είναι παρόμοια ως φιλοσοφία στο MS και NMR (Katajamaa & Orešič, 2007).

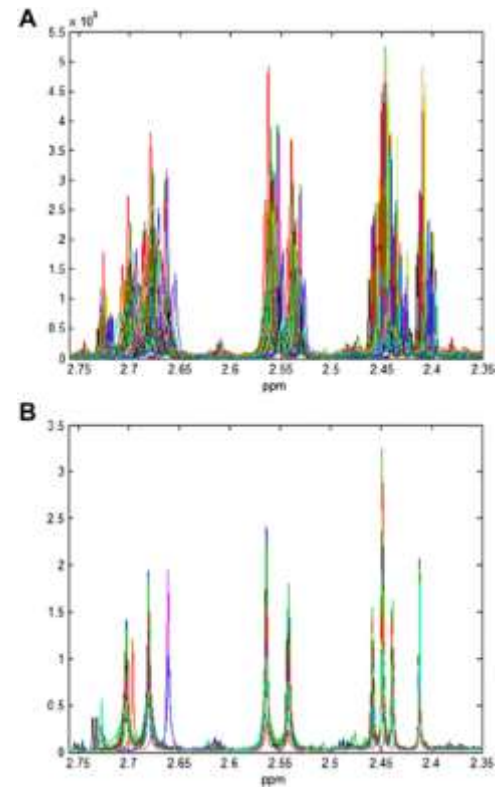
Τα βήματα επεξεργασίας δεδομένων για το NMR περιλαμβάνουν τη βαθμονόμηση συνήθως με εσωτερικό πρότυπο (calibration), τη διόρθωση φάσης και γραμμής βάσης (phase and baseline correction), την εξαίρεση μη χρήσιμων περιοχών (συνήθως διαλύτες), την ευθυγράμμιση κορυφών (alignment), τον τεμαχισμό των φασμάτων (binning ή bucketing), την κανονικοποίηση (normalization) και τέλος την κλιμακοποίηση (scaling).

ο Ο τεμαχισμός (μόνο για φάσματα NMR) εξυπηρετεί στη μείωση των δεδομένων ομαδοποιώντας τις φασματικές αποκρίσεις, χωρίς να είναι αυστηρά μέθοδος ευθυγράμμισης δεδομένων. Στη συμβατική μέθοδο, τα φάσματα χωρίζονται σε ομοιόμορφα διαχωρισμένα παράθυρα, που ονομάζονται bins ή buckets, των οποίων το πλάτος κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 0.01 και 0.05 ppm. Οι εντάσεις μέσα σε κάθε bin αθροίζονται, έτσι ώστε η περιοχή κάτω από κάθε φασματική περιοχή να χρησιμοποιείται αντί για μεμονωμένες εντάσεις. Επομένως, δημιουργείται ένα νέο μικρότερο σύνολο μεταβλητών (το καθένα είναι το αποτέλεσμα του αθροίσματος των εντάσεων) και, καθώς το πλάτος των bins έχει ρυθμιστεί ώστε να καλύπτει τη μεταβλητότητα της χημικής μετατόπισης γύρω από τις κορυφές, η κακή ευθυγράμμιση τείνει να ξεπεραστεί. Λόγω της αυθαίρετης κατανομής των κορυφών, ένα bin μπορεί να περιέχει κομμάτια από δύο ή περισσότερες κορυφές που μπορεί να επηρεάσουν την ανάλυση δεδομένων (Sousa, Magalhães, & Ferreira, 2013).

ο Η κανονικοποίηση (Εικόνα 10) εφαρμόζεται στα δεδομένα από κάθε δείγμα και περιλαμβάνει μεθόδους για να καταστούν τα δεδομένα από όλα τα δείγματα, άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Μία από τις εφαρμογές της είναι η αφαίρεση ή η ελαχιστοποίηση της μεταβλητότητας που προέρχεται από πειραματικούς χειρισμούς και δεν οφείλονται στη βιολογική μεταβλητότητα, η ανάδειξή της οποίας είναι και το επιθυμητό (induced vs biological variability). Επίσης, εάν τα φάσματα καταγράφονται χρησιμοποιώντας διαφορετικό αριθμό δειγμάτων ή χρησιμοποιούνται διαφορετικές συσκευές, οι απόλυτες τιμές παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις που καθιστούν αδύνατη την από κοινού ανάλυση των φασμάτων χωρίς κανονικοποίηση (Carozzi, Ciampa, Picone, Placucci, & Savorani, 2011).

ο Η κλιμακοποίηση αποτελεί ουσιαστικά το τελευταίο βήμα πριν τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων. Η κλιμακοποίηση αφορά στις μεταβλητές ανάλογα με την αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται που ουσιαστικά αντιστοιχούν στους μεταβολίτες. Η κλιμακοποίηση ή κλιμάκωση έχει ως στόχο τον καθορισμό του στατιστικού βάρους κάθε μεταβλητής. Στόχος των προσεγγίσεων αυτών είναι η ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων παραλλαγών των μεταβολιτών. Χρησιμοποιούνται στατιστικές μέθοδοι ώστε τα δεδομένα να ακολουθούν όσο το δυνατόν μία κανονική κατανομή και να μειωθεί η εξάπλωση των τιμών (Emwas et al., 2018a). Οι μέθοδοι κλιμακοποίησης που χρησιμοποιούν ένα μέτρο διασποράς για την κλιμάκωση περιλαμβάνουν την κλιμακοποίηση μοναδιαίας διακύμανσης (unit variance-Uv), την pareto, την κεντρική (mean centering-Ctr), εύρους (range scaling) και τη μεγάλης κλίμακας (vast scaling). Οι πλέον ευρύτεως χρησιμοποιούμενες είναι η κλιμάκωση μοναδιαίας διακύμανσης (UV) και η Pareto.

Η κλιμακοποίηση μοναδιαίας διακύμανσης (Uv), που ονομάζεται επίσης αυτόματη κλιμακοποίηση (autoscaling), εφαρμόζεται αρκετά συχνά και χρησιμοποιεί την τυπική απόκλιση ως συντελεστή κλιμάκωσης. Μετά την αυτόματη κλιμάκωση, όλοι οι μεταβολίτες έχουν μια τυπική απόκλιση μίας μονάδας και επομένως τα δεδομένα αναλύονται με βάση συσχετίσεις αντί για συνδιακυμάνσεις. Η κλιμάκοποίηση Pareto είναι πολύ παρόμοια με την αυτόματη κλιμακοποίηση. Ωστόσο, αντί της



Εικόνα 10. Φάσματα NMR δειγμάτων ούρων, Α) πρωτότυπα φάσματα και Β) κανονικοποιημένα φάσματα (Emwas et al., 2018b)

τυπικής απόκλισης, χρησιμοποιείται η τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης ως παράγοντας κλιμάκωσης (van den Berg, Hoefsloot, Westerhuis, Smilde, & van der Werf, 2006).

- **Στατιστική ανάλυση**

Στο πλαίσιο της μεταβολομικής, οι πιο συνηθισμένες προσεγγίσεις στατιστικής ανάλυσης ομαδοποιούνται σε μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική ανάλυση. Κάθε μέθοδος προσφέρει μοναδικές πληροφορίες για τη δομή και την ποιότητα των δεδομένων. Η πολυπαραμετρική ανάλυση έχει ως βάση έναν πίνακα δεδομένων (data matrix) όπου εμπεριέχονται οι σχέσεις μεταξύ όλων των μεταβλητών των υπό μελέτη δειγμάτων. Η μονοπαραμετρική ανάλυση λαμβάνει υπόψη μόνο μία μεταβλητή, με αποτέλεσμα διαφορετικά σταθμισμένα αποτελέσματα. Ο στόχος της στατιστικής ανάλυσης είναι η κατηγοριοποίηση, η οπτικοποίηση και η πρόβλεψη των ιδιοτήτων των δειγμάτων μέσω της δημιουργίας στατιστικών μοντέλων.

- ο **Πολυπαραμετρική ανάλυση**

Για την διαχείριση πολυπαραμετρικών μεταβολομικών δεδομένων υπάρχουν πολλά στατιστικά εργαλεία τα οποία στο σύνολό τους συνιστούν ένα βασικό τμήμα της χημειομετρίας. Οι διάφορες χημειομετρικές μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τον βαθμό επέμβασης του ερευνητή σε επιβλεπόμενες και μη επιβλεπόμενες. Στις επιβλεπόμενες μεθόδους είναι απαραίτητος ο *a priori* καθορισμός των ομάδων στις οποίες ανήκουν τα δείγματα. Στις μη επιβλεπόμενες ο διαχωρισμός των δειγμάτων γίνεται χωρίς να έχει προηγηθεί ταξινόμησή τους σε ομάδες. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται οι βασικοί τύποι επιβλεπόμενων και μη μεθόδων πολυπαραμετρικής ανάλυσης.

Πίνακας 2. Παραδείγματα επιβλεπόμενων και μη επιβλεπόμενων μεθόδων χημειομετρίας

Μη Επιβλεπόμενες Μέθοδοι	Επιβλεπόμενες Μέθοδοι
Principal Component Analysis (PCA)	Partial Least Squares (PLS) & PLS-DA
Hierarchical Cluster Analysis (HCA)	O-PLS & O2-PLS
Logical Blocking PCA	Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)
Non Linear Mapping (NLM)	Rule Induction
Supergravity Association Mapping (SAM)	Bayes/Nets Machine Learning

Πιο αναλυτικά, μετά από την ανάλυση των δειγμάτων μιας μεταβολομικής μελέτης, προκύπτει το προφίλ πολλαπλών παραλλαγών, που είναι δακτυλικό αποτύπωμα των εγγενών ιδιοτήτων (π.χ. φαινότυπος) για κάθε δείγμα. Για πολλαπλά δείγματα μπορούμε επομένως να κατασκευάσουμε ένα δισδιάστατο πίνακα δεδομένων (πίνακα Χ) για όλα τα δείγματα. Οι πολυπαραμετρικές αναλύσεις που βασίζονται σε μεθόδους προβολής αντιπροσωπεύουν έναν αριθμό αποτελεσματικών και χρήσιμων μεθόδων για την ανάλυση και μοντελοποίηση αυτών των πολύπλοκων δεδομένων. Οι μέθοδοι προβολής μετατρέπουν τον πίνακα πολυδιάστατων δεδομένων σε ένα μοντέλο λιγότερων διαστάσεων, που συνήθως περιέχει δύο έως πέντε διαστάσεις. Η μέθοδος ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis - PCA), η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων – διακριτικής ανάλυσης (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA) και η μέθοδος ορθογώνιων μερικών ελαχίστων τετραγώνων – διακριτικής ανάλυσης (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis - OPLSDA) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι που μπορούν να χειριστούν ατελείς, θορυβώδεις και γραμμικές δομές δεδομένων.

Η μέθοδος PCA είναι μια στατιστική τεχνική που μειώνει τις διαστάσεις των δεδομένων και βοηθά στην οπτικοποίηση, την κατανόηση και την προβολή των δεδομένων σε ένα δισδιάστατο ή τρισδιάστατο χώρο πιο εύκολο να διερευνηθεί από τον αναλυτή. (Lever, Krzywinski, & Altman, 2017). Θεωρείται μία από τις πιο αντικειμενικές και σταθερές μεθόδους ταξινόμησης της χημειομετρίας, του κλάδου της Χημείας που ασχολείται με την εφαρμογή μεθοδολογιών και στρατηγικών της στατιστικής, των μαθηματικών, και της τυπικής λογικής. Ανήκει στις μη επιβλεπόμενες μεθόδους, και αυτό σημαίνει ότι δε λαμβάνει υπόψη το σε ποιά ομάδα/κατηγορία ανήκει κάθε δείγμα. Αντιθέτως μεταχειρίζεται όλα τα δείγματα με τον ίδιο τρόπο προσπαθώντας να εντοπίσει διαφορές που προκαλούν τον διαχωρισμό τους. Η μέθοδος PCA στηρίζεται στην προβολή σημείων από έναν πολυδιάστατο χώρο σε ένα χώρο μικρότερο διαστάσεων και οι στόχοι της είναι: α) η εξαγωγή των

σημαντικότερων πληροφοριών από τον πίνακα δεδομένων, β) η μείωση των διαστάσεων του πολυπαραμετρικού χώρου, γ) η απλοποίηση της περιγραφής του συνόλου των δεδομένων, δ) η ανάλυση της σχέσης μεταξύ των παρατηρήσεων (δειγμάτων) και μεταξύ των μεταβλητών (Brereton, 2007). Η PCA συμβάλλει στην εύρεση σχέσεων και την οργάνωσή τους σε ομάδες, αλλά και στην ανίχνευση ακραίων τιμών (outliers) που δεν ανήκουν στις ήδη καθορισμένες ομάδες. Γενικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απλούστευση οποιουδήποτε πίνακα δεδομένων (Wold, Esbensen, & Geladi, 1987).

Η μέθοδος PLS-DA είναι επιβλεπόμενη μέθοδος σε αντίθεση με την PCA και ως εκ τούτου κατηγοριοποιεί τα δείγματα ανάλογα με το σε ποια ομάδα ανήκουν και προσμετρά τις ιδιότητες της ομάδας για να επιτευχθεί σύγκριση. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε προκειμένου να γίνει ευκρινέστερος ο διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων καθώς και να βρεθούν τα σημαντικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την ομαδοποίησή τους (Barker & Rayens, 2003).

Γ) Αυθεντικότητα μελιού και οмикές προσεγγίσεις

Η ασφάλεια τροφίμων είναι θέμα παγκόσμιας σημασίας και η πρόληψη προβλημάτων υγείας που προκαλούνται από ψευδή σήμανση σε τρόφιμα ή επιμολύνσεις είναι ένα θέμα εξαιρετικής σημασίας από κοινωνικής και οικονομικής αλλά και δημόσιας υγείας. Ο πρώτος και πιο σημαντικός στόχος της ανάλυσης τροφίμων είναι η διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων και η προστασία των καταναλωτών από τη νοθεία. Ο όρος «foodomics» συνοψίζει την γενωμική, τη μεταγραφομική, την πρωτεομική, τη μεταβολομική και παρόμοιες τεχνικές υψηλής απόδοσης και υψηλής ανάλυσης που προσφέρουν σημαντικές προσεγγίσεις για την αξιολόγηση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης.

Ξεκινώντας με την αξιολόγηση της υγείας των φυτών και των ζώων ως παραγωγών τροφίμων, ακολουθούμενη από την παραγωγή και την παρακολούθηση τόσο της ποιότητας όσο και της ασφάλειας από τον παραγωγό, η διαδικασία ολοκληρώνεται στον έλεγχο της ποιότητας και της αυθεντικότητας των τροφίμων. Διαφορετικές ανοσολογικές, φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές μέθοδοι με επιλεγμένες τεχνικές ανίχνευσης εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται συχνότερα για ανάλυση και αναγνώριση επιβλαβών παραγόντων στα τρόφιμα (U. Andjelković, M. Šrajter Gajdošik, D. Gašo-Sokač, 2017). Πάρα την αξιοπιστία, οι παραδοσιακές μέθοδοι ενδέχεται να εμφανίζουν διαφορετικούς περιορισμούς που πρέπει να ξεπεραστούν προκειμένου να καταστούν τα συστήματα διαχείρισης της ασφάλειας των τροφίμων πιο αποτελεσματικά. Αυτές οι μέθοδοι μπορεί να είναι

επίπτονες και χρονοβόρες και διαθέτουν είτε πολύ γενικές είτε πολύ εστοαζμένες ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες. Η ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων για την ποιότητα και την ασφάλεια στα τρόφιμα είναι μια δύσκολη εργασία, η οποία απαιτεί μια διεπιστημονική προσέγγιση, όπως είναι η μεταβολομική. Με βάση τη βιβλιογραφία, διαφορετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε τρόφιμα για την διερεύνηση της ποιότητας και της αυθεντικότητας (Εικόνα 11), χρησιμοποιώντας μεταβολομική ανάλυση. (Adebo, Njobeh, Adebisi, Gbashi, & Kayitesi, 2017; Cevallos-Cevallos, Reyes-De-Corcuera, Etxeberria, Danyluk, & Rodrick, 2009).

Sample: Purpose of analysis	Type	Extraction and preparation	Separation-detection	Data treatment	Reference
Apples: light induced changes in peel	Untargeted/discriminative	MeOH Derivatization for GC-MS	GC-MS LC-MS	PCA	Rudolf <i>et al.</i> , 2008
Berries: polyphenol composition	Targeted/informative	Acetic acid + water C18 and Sephadex LH 20 columns	LC-MS DIMS	Compound identification	McDougall <i>et al.</i> , 2008
Broccoli, mustard, and brassica: glucosinolates composition	Targeted/informative	Hot water (90 °C) + sonication	LC-MS ⁿ	Compound identification	Rochfort <i>et al.</i> , 2008
Broccoli: variety differentiation	Untargeted/discriminative	Freeze dried MeOH + H ₂ O	LC-UV-MS DIMS	PCA, ANOVA	Luthria <i>et al.</i> , 2008
Cheese: Production control	Untargeted/informative	—	IMS	Compound identification	Vautz <i>et al.</i> , 2006
E. coli: glycolysis metabolites	Targeted/informative	Indirect thermal treatment	LC-MS	Compound identification	Schaub & Reuss, 2008
Ginseng: variety differentiation	Untargeted/discriminative	Deuterated MeOH + buffered water	NMR	PCA	Kang <i>et al.</i> , 2008
Green: tea quality	Untargeted/predictive	Freeze dried MeOH + H ₂ O + CHCl ₃	UPLC-TOF-MS	PCA, PLS	Pongsawan <i>et al.</i> , 2008
Honey: origin verification	Untargeted/discriminative/predictive	Buffered water	NMR	PLS-GP	Donskoi <i>et al.</i> , 2008
Maize: GMO identification	Untargeted/discriminative	MeOH + water + ultrasonication	CE-TOF-MS	Student's t, PCA	Levandi <i>et al.</i> , 2008
Meat: quality/safety	Untargeted/discriminative	Neutral desorption	EESI-MS	PCA	Chen <i>et al.</i> , 2007
Olive oil: origin differentiation	Targeted/discriminative	SPME	GC-Cl-MS	LDA Kruskal-Wallis and Wald-Wolfowitz tests	Cavaliere <i>et al.</i> , 2007
Pine mushrooms: quality differentiation	Untargeted/discriminative	MeOH + H ₂ O + CHCl ₃	NMR	PCA	Cho <i>et al.</i> , 2007
Potato: GM differentiation	Untargeted/discriminative	MeOH + H ₂ O + CHCl ₃ Derivatization for GC-MS	GC-MS DIMS	PCA	Catchpole <i>et al.</i> , 2005
Potato: identification of cultivars	Untargeted/discriminative/informative	Freeze dried + MeOH + water + chloroform + derivatization	GC-TOF-MS	ANOVA, PCA	Dobson <i>et al.</i> , 2008
Potato: variety differentiation	Untargeted/discriminative/informative	MeOH + H ₂ O + CHCl ₃ Derivatization for GC-MS	GC-MS DIMS	RF	Beckmann <i>et al.</i> , 2007
Soybean: GMO differentiation	Untargeted/informative	MeOH-EtOH-H ₂ O	CE-TOF-MS	Compound identification	Garcia-Villalba <i>et al.</i> , 2008
Spinach: E. coli contamination	Untargeted/discriminative	Neutral desorption	EESI-MS	PCA	Chen <i>et al.</i> , 2007
Tomato paste: changes during production	Targeted to antioxidants/informative	Targeted: H ₂ O-MeOH and MeOH-CHCl ₃	LC-antioxidant detector	ANOVA, PCA	Capanoglu <i>et al.</i> , 2008
Tomato: metabolite correlations	Untargeted/informative Untargeted/predictive	Untargeted: Formic acid-MeOH-H ₂ O Volatiles: EDTA-NaOH-H ₂ O + SPME Sugars and organic acids: MeOH + derivatization	LC-TOF-MS GC-MS	PCA, LDA, CN	Ursem <i>et al.</i> , 2008
Tomato: variety differentiation	Untargeted/discriminative	Lyophilization + MeOH + sonication	LC-TOF-MS NMR	PCA	Moco <i>et al.</i> , 2008
Tomato: volatiles analysis	Targeted/discriminative	EDTA-NaOH-H ₂ O + SPME	GC-MS	PCA, HCA	Tikanov <i>et al.</i> , 2005
Watermelon: quality evaluation	Untargeted/predictive	Buffered D ₂ O	NMR	PLS-LDA	Tarachiwin <i>et al.</i> , 2008
Wine: metabolite characterization	Untargeted/discriminative	Lyophilized + buffered D ₂ O	NMR	PCA, PLS	Son <i>et al.</i> , 2008
Yeast: aroma compounds production	Targeted/discriminative	Diethyl ether	GC-FID	PCA, PLS	Rossouw <i>et al.</i> , 2008
Yeast: strain differentiation	Untargeted/discriminative	Lyophilization + derivatization	GC-TOF-MS	PCA, HCA	Mackenzie <i>et al.</i> , 2008
Yeast: strain differentiation	Untargeted/discriminative	—	NIR	PCA LDA	Cozzolino <i>et al.</i> , 2006

Εικόνα 11. Οι πιο κοινές διαδικασίες μεταβολομικής στην ανάλυση τροφίμων

Όπως φαίνεται οι επιστήμονες σταδιακά χρησιμοποιούν προηγμένες αναλυτικές στρατηγικές σε αντίθεση με τις παραδοσιακές και κλασικές υπάρχουσες μεθοδολογίες. Οι τεχνικές διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται συνήθως για τα τρόφιμα περιλαμβάνουν την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), τη χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης (UPLC), την αέρια χρωματογραφία

(GC), την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE), ενώ οι τεχνικές ανίχνευσης περιλαμβάνουν τη φασματομετρία μάζας (MS), την τεχνική πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τη φασματοφωτομετρία εγγύς υπερύθρου (NIR).

Πριν από μερικά χρόνια, το NMR έγινε το επίκεντρο μιας πολύ αποτελεσματικής μεθόδου ποιοτικού ελέγχου υψηλής ανάλυσης στη βιομηχανία τροφίμων. Ο αριθμός των ποσοτικών εφαρμογών με NMR έχει αυξηθεί σημαντικά, ειδικά ως προς την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων μορίων (Cao, Nonaka, Komura, & Matsui, 2015; Hohmann et al., 2015). Το NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό της προέλευσης (Cagliani, Culeddu, Chessa, & Consonni, 2015; Godelmann et al., 2013; Longobardi et al., 2012), της ποιότητας και της γνησιότητας των τροφίμων. Ωστόσο, ίσως η πιο σημαντική εφαρμογή του NMR στον τομέα της ασφάλειας, είναι η χρήση αυτής της μεθόδου για τον προσδιορισμό των αλλαγών στα τρόφιμα, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, με ιδιαίτερη έμφαση στις διαδικασίες αποδόμησης και πιθανής μόλυνσης με παθογόνα των τροφίμων και τις τοξίνες τους (U. Andjelković, M. Šrajer Gajdošik, D. Gašo-Sokač, 2017).

Γενικότερα, τα περισσότερα προϊόντα διατροφής που αποτελούν στόχους νοθείας είναι εμπορικά προϊόντα υψηλής αξίας, συμπεριλαμβανομένου του μελιού. Ο ποιοτικός έλεγχος του μελιού έχει δύο κύριους σκοπούς, την επαλήθευση της αυθεντικότητάς του όσον αφορά την παραγωγή μελιού (για την αποκάλυψη πιθανής απάτης και νοθείας) και για τον προσδιορισμό της αυθεντικότητάς του όσον αφορά τις περιγραφές (S. Bogdanov, 2002). Σχετικά με την παραγωγή, η ποιότητα του μελιού μπορεί να χαρακτηρίζεται από φυσικές και χημικές παραμέτρους. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα, η υγρασία, το προφίλ αμινοξέων και ο έλεγχος της περιεκτικότητας σε 5-HMF, χαρακτηρίζουν την αυθεντικότητα και την ωριμότητα του μελιού (Bogdanov, Jurendic, Sieber, & Gallmann, 2008). Από την άλλη πλευρά, οι νοθείες σε σχέση με την περιγραφή αυξάνονται τα τελευταία χρόνια. Οι πληροφορίες της ετικέτας (γεωγραφική και βοτανική προέλευση) σπάνια υποστηρίζονται από αναλυτικά δεδομένα. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι και εργαλεία ανάλυσης για να αποδείξουν την αυθεντικότητα του μελιού και να επαληθεύσουν τη γεωγραφική και βοτανική προέλευση. Η κλασική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού περιλαμβάνει τρεις συμπληρωματικές μεθόδους: οργανοληπτική, μελισσοπαλυνολογική, και φυσικοχημική ανάλυση. Οι οργανοληπτικές αναλύσεις αξιολογούν χαρακτηριστικά όπως χρώμα, οσμή, γεύση, αφή, υφή, κλπ. Η μελισσοπαλυνολογική ανάλυση μελετά τη σύνθεση γύρης ενός μελιού που αντικατοπτρίζει τη βλάστηση στην περιοχή παραγωγής του μελιού, και είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης του

μελιού. Στην φυσικοχημική ανάλυση, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και η σύνθεση υδατανθράκων βρέθηκαν να είναι οι σημαντικότερες μεταβλητές για την ταξινόμηση των μονοποικιλιακών μελιών. Οι κλασικές μέθοδοι απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και επίσης είναι χρονοβόρες. Έχει προταθεί χημειομετρική αξιολόγηση κλασικών παραμέτρων για την πιστοποίηση του μελιού, αλλά η πλειοψηφία των μελετών διεξήχθη για να προσδιορίσει τη βοτανική προέλευση με την αξιολόγηση διαφόρων βιοδεικτών σε συνδυασμό με στατιστικά εργαλεία. (Gallego-Picó, Garcinuño-Martínez, & Fernández-Hernando, 2013). Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 3) και στο παράρτημα (ΠΠ1) συνοψίζονται μερικές βιοδείκτες που έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής χρησιμοποιώντας αναλυτικές τεχνικές.

Πίνακας 3. Μερικοί κλασικοί βιοδείκτες διαφορετικών κοιτών μελιών

Honey	Technique	Biomarker	Bibliography
Acacia	LC-MS	- Kaempferol rhamnoside - Acacetin	(Bobis, 2007; Truchado, Ferreres, Bortolotti, Sabatini, & Tomás-Barberán, 2008)
	HPLC-DAD	Ellagic acid	(Tomaands-Barberaandn, Martos, Ferreres, Radovic, & Anklam, 2001)
	NMR	- Chrysin - Pinocembrin	(Schievano, Peggion, & Mammi, 2010)
Asphodel	HPLC-DAD	Methyl syringate	(Tuberoso et al., 2009)
Chestnut	NMR	- Kynurenic acid 4-quinolone-2-carboxylic acid γ-LACT-3PKA	(Beretta, Caneva, Regazzoni, Bakhtyari, & Maffei Facino, 2008; Cho et al., 2015; Schievano et al., 2012; Truchado et al., 2009)
	LC-MS	- Spirodiquinolinone 3-(2'-piperidine)-kynurenic acid 2,3-dihydropyrrolo[1,2-α]quinazolin-5(1H)-one	(Cho et al., 2015)
Citrus spp.	HPLC-DAD	Hesperetin	(Federico Ferreres, García-Viguera, Tomás-Lorente, & Tomás-Barberán, 1993)
	GC-MS	Methyl anthranilate	(Federico Ferreres, Giner, & Tomás-Barberán, 1994)
Fir	HPLC-DAD	Protocatechuic acid	(Pita-Calvo & Vázquez, 2018)
Heather	HPLC-DAD	- Ellagic acid - Quercitrin - Syringic acid	(Federico Ferreres, Andrade, Gil, & Tomás-Barberán, 1996; Kaškonienė & Venskutonis, 2010)
	GC/FID	Absciscic acid	(Guyot, Scheirman, & Collin, 1999)
Lavender	GC-MS	- Heptanal - Nerolidol oxide - Coumarin - Hotrienol - Hexanal	(L. Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, & Pérez-Coello, 2007; Kaškonienė & Venskutonis, 2010)

		Hexanol	
Linden	NMR	1-O-β-gentiobiosyl ester 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyclohexa-1,3-dienecarboxylic acid 4-(1-methylethenyl)cyclohexa-1,3-dienecarboxylic acid	(Beretta et al., 2008; Schievano et al., 2010)
	GC/FID	- carvacrol - Estragole	(Guyot, Bouseta, Scheirman, & Collin, 1998)
Manuka	HPLC/NMR	- Methylglyoxal - Lepterdine	(Adams et al., 2008; Daniels et al., 2016)
	NMR	- Kamahine A & B - Meliracemoic acid - O-Anisic acid - Eudesmic acid	(Broom, Wilkins, Lu, & Ede, 1994; Ede, Wilkins, Lu, & Tan, 1993; Gašić, Milojković-Opsenica, & Tešić, 2017)
	UPLC-QToF MS	- Leptosperin - Phenyllactic acid 4-methoxyphenyllactic acid 2-Phenylethyl β-D-glucopyranoside - Gallic acid - Hydrocinnamic acid - Pinobanskin - Pinocembrin - Eugenic acid	(Jandrić, Frew, Fernandez-Cedi, & Cannavan, 2017)
Orange	LC-MS	Synephrine	(Tette, Guidi, Bastos, Fernandes, & Gloria, 2017)
	HPLC-CEAD	Hesperetin	(Petrus, Schwartz, & Sontag, 2011)
	NMR	8-hydroxylinalool - Caffeine	(Schievano et al., 2012)
Pine	GC-MS	1-chloro-octane - Tridecane 1-nonanal β-thujone - Benzoic acid ethyl ester 1-nonanol	(Karabagias, Nikolaou, & Karabagias, 2019; Louppis, Karabagias, Kontakos, Kontominas, & Papastephanou, 2017; Pita-Calvo & Vázquez, 2018)
Strawberry tree	GC-MS	Isophorone	(de la Fuente, Sanz, Martínez-Castro, Sanz, & Ruiz-Matute, 2007)
	LC-MS	Homogentisic Acid	(Cabras et al., 1999)
	HPLC-DAD-MS/MS	Unedone	(Tuberoso et al., 2010)
	NMR	α-isophorone 2,5-dihydroxyphenyl acetic acid	(Donarski, Jones, Harrison, Driffield, & Charlton, 2010)
Thyme	CZE	Rosmarinic acid	(Andrade, Ferreres, Gil, & Tomás-Barberán, 1997)
	GC-MS	1-(3-oxo-trans-1-butenyl)-2,6,6 trimethylcyclohexane-trans,cis-1,2,4-triol 1,2,3,5-tetramethyl-benzene - Terpinen-4-ol - Formic acid - Hexadecanoic acid	(Bouseta, Collin, & Dufour, 1992; Karabagias et al., 2019; Louppis et al., 2017)
	NMR	E-4-(1,2,4-trihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-but-3-en-2-one.	(Kassi et al., 2014)

Με βάση τον πίνακα, οι περισσότεροι από τους βιοδείκτες που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία, αντιστοιχούν σε πτητικές ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας GC/MS. Για παράδειγμα, η λεβάντα, το πεύκο και το θυμαρίσιο μέλι, καθορίζονται ως επί το πλείστον από αλδεΐδες, αλκοόλες, αλκάνια και μερικά τερπενοειδή. Ωστόσο, άλλες τεχνικές όπως την HPLC-DAD ήταν καθοριστικής σημασίας για τον προσδιορισμό της αυθεντικότητας σε μέλι όπως το ασφόδελο, το έλατο και η ερείκη. Η τεχνική UPLC-QToF/MS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των βιοδεικτών για μέλι που προέρχονται από τη Νέα Ζηλανδία, όπως το Manuka, όπου έχουν βρεθεί σημαντικές ενώσεις, όπως η λεπτοσπερίνη. Από την άλλη πλευρά, έχουν βρεθεί δείκτες για μέλι καστανιάς, φιλύρας, πορτοκαλιού και θυμαριού χρησιμοποιώντας NMR.

Δ) Αυθεντικότητα Ελληνικού μελιού

Όσον αφορά τα ελληνικά μέλια, οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι σχεδόν ανύπαρκες. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί βασίζονται στην πτητική σύνθεση του μελιού. Η ομάδα ερευνητών Alissandrakis, Kibaris, Tarantilis, Harizanis, & Polissiou, 2005 πραγματοποίησε την εκχύλιση πτητικών ενώσεων από ελληνικό μέλι βαμβακιού χρησιμοποιώντας SPME-GC / MS, όπου σε σύγκριση με άλλα μέλια, βρέθηκαν 15 ενώσεις που μπορούν να είναι πιθανοί δείκτες μελιού βαμβακιού, όπως κινναμαλδεΐδη, κινναμυλική αλκοόλη, κινναμικό οξύ, νιρίλιο και νερανύλιο, ρ-κουμαρικό οξύ, φουρουλικό οξύ κ.λπ. Το 2007, (Tananaki, Thrasyvoulou, Giraudel, & Montury, 2007) προσπάθησαν να προσδιορίσουν τη διαφοροποίηση μεταξύ ελληνικών και τουρκικών μελιών με βάση την πτητική σύστασή τους χρησιμοποιώντας GC-MS και φυσικοχημικές παραμέτρους. Δυστυχώς, αυτό δεν ήταν δυνατό λόγω της ευρείας παραλλαγής των τιμών μεταβλητών μέσα σε κάθε τύπο μελιού. Ωστόσο, τα μέλια πεύκου και των δύο χωρών θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν με δύο πτητικές ενώσεις: 3-carene (3,7,7-434 trimethylbicyclo[4.1.0]hept-3-ene) και μία άγνωστη ένωση. Αυτές οι ενώσεις βρέθηκαν στο 100% των τουρκικών δειγμάτων μελιού και δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα ελληνικού μελιού. Πτητικές ενώσεις όπως η ισοφορόνη και τα παράγωγά της έχουν αναφερθεί ως χαρακτηριστικές ενώσεις στο πτητικό κλάσμα του μελιού φράουλας (*Arbutus unedo*), και έχει επίσης περιγραφεί ότι είναι βιοδείκτης φυτικής προέλευσης της οικογένειας ερείκης. Έχει επίσης αναφερθεί ότι αυτές οι ενώσεις εμφανίζονται σε άλλους τύπους μελιού όπως το θυμαρίσιο μέλι. Από την άλλη πλευρά, αλδεΐδες έχουν βρεθεί ως τα πιο άφθονα πτητικά συστατικά του ελληνικού μελιού εσπεριδοειδών (Alissandrakis, Tarantilis, Harizanis, & Polissiou, 2007a). Το 2011, η εκχύλιση με υπερήχους χρησιμοποιήθηκε (Alissandrakis, Tarantilis, Pappas, Harizanis, & Polissiou,

2011), για να διερευνήσει τη σύνθεση των εκχυλίσμων ενώσεων από μέλι καστανιάς και μέλι ευκαλύπτου. Η 1-φαινυλαιθανόλης και 2'-αμινοακετοφαινόνης βρέθηκαν οι ισχυρότεροι βοτανικοί δείκτες του μελιού καστανιάς, ενώ στην περίπτωση του μελιού ευκαλύπτου, 2-υδροξυμέθυλ-5-μεθυλ-3-εξανόνης και 3-υδροξυμέθυλ-5-μεθυλ-3-εξανόνης, καθώς και η εξο-2-υδροξυκινεόλη προσδιορίστηκαν ως βιοδείκτες.

Ακόμα μία μελέτη (Aliferis et al., 2010) που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας SPME / GC-MS σε συνδυασμό με πολυπαραμετρική ανάλυση έχει επίσης εφαρμοστεί στην ταξινόμηση των ελληνικών μελιών (μέλι έλατου, μέλι πεύκου και πέντε μονοποικιλιακά μέλια). Η μέθοδος HS-SPME εφαρμόστηκε για την εκχύλιση πτητικών ενώσεων ακολουθούμενο από GC/MS. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε πιθανά μόρια-δείκτες υπεύθυνα για τη διάκριση και τη ταξινόμηση που αποδόθηκαν σε τερπενοειδή, φαινολικές και αλειφατικές ενώσεις.. Από την άλλη πλευρά, μια παρόμοια έρευνα πραγματοποιήθηκε από μία άλλη ομάδα (Karabagias, Badeka, et al., 2014), όπου διερεύνησε την πιθανότητα του χαρακτηρισμού και ταξινόμησης ελληνικών μονοποικιλιακών μελιών (πεύκο, θυμάρι, έλατο και άνθος πορτοκαλιού) σύμφωνα με τη βοτανική προέλευση χρησιμοποιώντας πτητικές ενώσεις με τη χρήση παρόμοιας μεθοδολογίας (HS-SPME-GC/MS) καθώς και συμβατικές φυσικοχημικές παραμέτρους και χημειομετρική ανάλυση. Διαπιστώθηκε ότι ορισμένοι αιθυλεστέρες (εξανοϊκοί, επτανοϊκοί, οκτανοϊκοί, μηνοϊκοί κ.λπ.) θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διάκριση της βοτανικής προέλευσης του μελιού, ενώ ο αιθυλεστέρας μυρμηκικού οξέος και εξαδεκανοϊκού οξέος θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάκριση της βοτανικής προέλευσης του θυμαρίσιου μελιού και 1-νονανόλης για μέλι πεύκου.

Εκτός από έρευνες σχετικά με σύσταση των πτητικών συστατικών του μελιού, διαφορετικές ομάδες έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν τη βοτανική και τη γεωγραφική προέλευση του μελιού με διαφορετικές τεχνικές. Μελισσοπαλυνολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά δείγματα ελληνικού θυμαριού μελιού για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσής του. Σπόροι γύρης *Thymus capitatus* βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν, με περιεκτικότητα που κυμαίνεται από 27 έως 95%. Από την άλλη πλευρά, μια ποιοτική ανάλυση αποκάλυψε την παρουσία των κόκκων γύρης 37 taxa που ανήκουν σε 15 οικογένειες. Μια ποσοτική ανάλυση έδειξε ότι ο συνολικός αριθμός κόκκων γύρης στα δείγματα μελιού είχε σημαντική διακύμανση μεταξύ των περιοχών, αλλά επειδή φαίνεται να επηρεάζεται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες, η ποσοτική ανάλυση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης του μελιού (S. E. Karabournioti, Tsiripidis, Thrasyvoulou, & Eleftheriou, 2009; S. Karabournioti, Thrasyvoulou, & Eleftheriou, 2006). Επίσης, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη που

διαφοροποιεί τα μέλια πεύκου, θυμαριού, ελάτου και πορτοκαλιού σύμφωνα με τη βοτανική προέλευση, με βάση το συνδυασμό περιεκτικότητας σε ορυκτά και φυσικοχημικών παραμέτρων με την κατασκευή μιας επικυρωμένης χημειομετρικής προσέγγισης. Η διακριτική ανάλυση που παρουσιάστηκε δείχνει ότι τα μέλια ελάτου και πεύκου διαφοροποιούνται από τα μέλια πορτοκαλιού και θυμαριού. Απέδειξαν ότι με βάση επιλεγμένα ορυκτά χρησιμοποιώντας MANOVA και LDA, είναι δυνατή η διαφοροποίηση του πεύκου από το θυμαρίσιο μέλι, καθώς το μέλι πεύκου είχε 92,5% υψηλότερη ολική περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα. Αυτό τεκμηριώθηκε επίσης, μετρώντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα και των δύο μελιών (Karabagias et al., 2017; Louppis et al., 2017).

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα σάκχαρα είναι οι κύριες ενώσεις του μελιού, και οι πρακτικές νοθείας βασίζονται στην προσθήκη διαφορετικών σιροπιών. Σύμφωνα με έρευνα (Karabagias et al., 2018) ο συνδυασμός ανάλυσης HPLC και NMR με βάση μεταβολίτες μαζί με φυσικοχημικά δεδομένα οδήγησε στη γεωγραφική διάκριση των ελληνικών μελιών πεύκου και ελάτου. Οι τιμές περιεκτικότητας σε φρουκτόζη (g/100g) ελληνικού μελιού πεύκου και ελάτου είναι υψηλότερες (24,30 και 22,86% αντίστοιχα) σε σύγκριση με τα γερμανικά μέλια. Το ίδιο συμβαίνει και με τη γλυκόζη, όπου το ελληνικό πεύκο και έλατο παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη ποσότητα γλυκόζης (29,49 και 25,26% αντίστοιχα) από εκείνη των γερμανικών μελιτωμάτων, ενώ οι μέσες τιμές περιεκτικότητας σε μαλτόζη που λαμβάνονται για τα μέλια ελάτου (2,16 g / 100g) είναι υψηλότερες από τις μέσες τιμές που αναφέρθηκαν για το γαλλικό μέλι ελάτου (1,70 g / 100g). Σε μια άλλη μελέτη, (Karabagias, 2019), διερευνήθηκε εάν ο συνδυασμός σακχάρων (με HPLC-RI) ή μαθηματικών μετασχηματισμών σακχάρου (περιεκτικότητα σε φρουκτόζη + γλυκόζη και φρουκτόζη / γλυκόζη) και οι ηλεκτροχημικές παράμετροι του ελληνικού θυμαριού και του μελιού εσπεριδοειδών, θα μπορούσαν να ενισχύσουν την ύπαρξη ορισμένων αξιόπιστων δεικτών ταυτοποίησης γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης μελιού χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση. Οι τιμές περιεκτικότητας σε φρουκτόζη και γλυκόζη του ελληνικού θυμαριού και του μελιού εσπεριδοειδών ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με άλλες μελέτες. Επιπλέον, το ισπανικό μέλι θυμαριού καταγράφει χαμηλότερες τιμές περιεκτικότητας σε φρουκτόζη και γλυκόζη σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που παρουσίασε ο Karabagias υποδεικνύοντας μια πιθανή επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης σε αυτές τις περιεκτικότητες σε σάκχαρα. Από την άλλη πλευρά, η περιεκτικότητα σε μαλτόζη κατέγραψε υψηλότερες τιμές σε εσπεριδοειδή σε σύγκριση με το μέλι θυμαριού. Το επίπεδο μαλτόζης στο μέλι θα μπορούσε να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη βοτανική και τη γεωγραφική προέλευση του μελιού. Δηλαδή, το μέλι μελιτώματος συνήθως έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε μαλτόζη σε σύγκριση με το μέλι άνθεων.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι φυτοχημικά συστατικά που μεταφέρονται από το φυτό στο νέκταρ και στη συνέχεια στο μέλι, και συνδέονται κυρίως με τον έλεγχο ταυτότητας βοτανικής προέλευσης, αν και η χρήση τους έχει επίσης αναφερθεί ως κατάλληλη για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης. Σε γενικές γραμμές, μια τέτοια προσέγγιση απαιτεί τη χρήση χημειομετρικών όπως υποδηλώνεται από την έρευνα (Karabagias, Vavoura, Badeka, Kontakos, & Kontominas, 2014). Οι συγγραφείς ταξινόμησαν και διαφοροποίησαν τα ελληνικά θυμαρίσια μέλια σύμφωνα με τη γεωγραφική προέλευση (Ηράκλειο, Χανιά, Κεφαλονιά και Λακωνία) με βάση επιλεγμένες φαινολικές ενώσεις και δεδομένα παραμέτρων ποιότητας συνδυασμένα με χημειομετρική ανάλυση. Η ανάλυση των φαινολικών ενώσεων (κερσετίνη, μυρικτίνη, κεμπερόλη, χρυσίνη και συριγγικό οξύ) πραγματοποιήθηκε με HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι επιλεγμένες φαινολικές ενώσεις σε συνδυασμό με συμβατικές ποιοτικές παραμέτρους και χημειομετρικά στοιχεία μπορούν να διαφοροποιήσουν το θυμαρίσιο μέλι (92% σωστή πρόβλεψη) ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευσή του. Δυστυχώς, χρησιμοποιώντας μόνο τις δοκιμασμένες φαινολικές ενώσεις, ο ρυθμός ταξινόμησης δεν ήταν πολύ ικανοποιητικός (66,7%) σε αντίθεση με την τιμή των φυσικοχημικών παραμέτρων. (97,1% σωστή πρόβλεψη).

Το προφίλ φαινολικών οξέων του μελιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική και τη γεωγραφική του προέλευση. Μία ομάδα ερευνητών (Spilioti et al., 2014) πραγματοποίησε ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας HPLC φαινολικών οξέων σε ένα εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα 12 μελιών που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές στην Ελλάδα. Διαπίστωσαν ότι το μέλι κωνοφόρων (από πεύκο και έλατο) περιείχε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτοκατεχικού και καφεϊκού οξέος (μέσος όρος: 6640 και 397mg/kg μελιού αντίστοιχα) από το θυμαρίσιο και το μέλι εσπεριδοειδών (μέσος όρος πρωτοκουτικού και καφεϊκού οξέος: 437,6 και 116 mg / kg μέλι αντίστοιχα). Προσδιόρισαν επίσης το *p*-υδροξυβενζοϊκό οξύ ως βιοδείκτη του θυμαρίσιου μελιού.

Όπως παρατηρείται, όλες οι μελέτες που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία γίνονται χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως GC/MS και HPLC, για τη μελέτη πτητικών, σακχάρων και ανόργανων συστατικών. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν μελέτες που να βασίζονται στο φαινολικό κλάσμα του **ελληνικού μελιού** με χρήση του NMR σε συνδυασμό με χημειομετρία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ν°1

2.1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΡΙΩΝ-ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Α) Προετοιμασία του δείγματος – Ανάπτυξη μεθοδολογίας παραλαβής φαινολικών συστατικών

Το μέλι είναι ένα προϊόν περίπλοκο στο χειρισμό, κυρίως λόγω του μεγάλου του ιξώδους. Επίσης διακρίνονται από την έντονη παρουσία σακχάρων ενώ τα φαινολικά συστατικά αποτελούν ένα μόνο μικρό ποσοστό. Έτσι, ο πρώτος στόχος των διαδικασιών κατεργασίας του μελιού είναι η παραγωγή ενός εκχυλίσματος εμπλουτισμένου με φαινολικά συστατικά με την ταυτόχρονη απομάκρυνση των σακχάρων. Η εκχύλιση υγρού-υγρού και η χρήση προσροφητικών ρητίνων είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως (Pyrzyska & Biesaga, 2009). Για αυτό το λόγο, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη κατάλληλου πρωτοκόλλου για την απομάκρυνση των σακχάρων και την παραγωγή εμπλουτισμένου εκχυλίσματος σε δευτερογενείς μεταβολίτες, χρησιμοποιώντας τις τεχνικές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ως δείγμα-οδηγός επιλέχθηκε ένα μέλι φυτών (multifloral honey) από το νησί της Λέσβου (HON28).

A.1) Κατεργασία με ρητίνες προσρόφησης

Ένας αποτελεσματικός τρόπος για την απομάκρυνση των σακχάρων από ένα οποιοδήποτε εκχύλισμα ή διάλυμα είναι η χρήση ρητινών προσρόφησης. Οι ρητίνες Amberlite® XAD είναι πολυμερές που διαθέτουν την ικανότητα να προσροφούν επιλεκτικά συγκεκριμένες κατηγορίες ουσιών. Υπάρχουν διαφορετικά είδη ρητίνης, για τα συγκεκριμένα όμως πειράματα επιλέχθηκε η χρήση της Amberlite® XAD7. Το είδος ρητίνης XAD7 χαρακτηρίζεται από ενδιάμεση πολικότητα και δύναται να προσροφήσει συγκεκριμένα συστατικά, υδροφοβικά μόρια από υδατικά συστήματα, καθώς και υδρόφιλα μόρια από μη υδατικά συστήματα (Daignault, Noot, Williams, & Huck, 1988; Moore & Karasek, 1984). Συγκεκριμένα,

- 40 g μελιού διαλύθηκαν σε 100 ml ύδατος, και εν συνεχεία προστέθηκαν 25 g ρητίνης XAD7. Το δείγμα αναδεύτηκε για 1.5 ώρα. Στη συνέχεια, το μείγμα ρητίνης/δείγματος διηθήθηκε και εκπλύθηκε τρεις φορές με 200 ml νερού. Στη συνέχεια, το υπόλειμμα (ρητίνη/φαινολικές ενώσεις) μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 200 ml μεθανόλης. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με

χρήση υπερήχων για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, διηθήθηκε με φίλτρο και η ρητίνη πλύθηκε με 100 ml μεθανόλης. Το τελευταίο βήμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν. Τελικά οι μεθανολικές φάσεις αναμείχθηκαν και συμπηκνώθηκαν μέχρι ξηρού όπως και η υδατική φάση. Συνολικά παραλήφθηκαν 362.6 mg (**0.90%**) εκχυλίσματος.

- Πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με τη διαφορά ότι το μείγμα ρητίνης/δείγματος πριν από την εκχύλιση με μεθανόλη αφέθηκε όλη τη νύχτα. Συνολικά παραλήφθηκαν 0.4059 mg (**1.01%**) εκχυλίσματος.

Με βάση τον ποιοτικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), οι δύο μέθοδοι εκχύλισης απορρίφθηκαν επειδή δεν είναι δυνατόν να ληφθεί ένα πλούσιο φαινολικό κλάσμα χωρίς σάκχαρα σε ένα μόνο στάδιο.

A.2) Εκχύλιση υγρού-υγρού

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη βιβλιογραφία για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών του μελιού και στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή φαινολικών συστατικών και σακχάρων σε ένα διφασικό σύστημα διαλυτών νερού και οργανικού διαλύτη. Μερικά από τα πιο κοινά συστήματα περιλαμβάνουν ως οργανικό διαλύτη το οξικό εθυλεστέρα (Ciulu, Spano, Pilo, & Sanna, 2016; Zhu et al., 2019), διχλωρομεθάνιο, διαιθυλαιθέρα, πεντάνιο (Jerković, Kuš, Tuberoso, & Šarolić, 2014; Kuš & Jerković, 2018; Zacharis, Rotsias, Zachariadis, & Zotos, 2012) και χλωροφόρμιο (Schievano et al., 2010). Προκείμενου να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση εκχύλισης, μερικοί από αυτούς τους διαλύτες δοκιμάστηκαν ως σύστημα.

- Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και διχλωρομεθάνιο (DCM)

50 g μελιού διαλύθηκαν σε 80 ml νερού, και έπειτα προστέθηκαν 80 ml του συστήματος EtOAc/DCM (80:20 v/v) ως οργανική φάση. Το δείγμα εκχυλίστηκε τρεις φορές. Τα δύο κλάσματα που προέκυψαν εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση (rota vapor).

Έπειτα από έλεγχο με TLC και προσδιορισμό της απόδοσης σε φαινολικά, η μέθοδος δεν κρίθηκε ικανοποιητική κυρίως εξαιτίας της πολύ μικρής ποσότητας οργανικής στιβάδας λόγω γαλακτώματος και πολύ αργής εξισορρόπησης των δύο φάσεων. Συνολικά παραλήφθηκαν 17.8 mg (**0.03%**) εκχυλίσματος που βάσει TLC ένα μεγάλο ποσοστό αποτελούνταν από σάκχαρα γεγονός που υποδηλώνει την ατελή απομάκρυνσή τους.

- Εκχύλιση με μεθανόλη (MeOH) και χλωροφόρμιο (CHCl₃)

Πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αλλά με αναλογία συστήματος H₂O:MeOH:CHCl₃ (2:1:2 v/v). Έτσι, παραλήφθηκαν δύο εκχυλίσματα, αυτό της οργανικής (**HON28_LOP**) και αυτό της υδατικής φάσης (**HON28_LAP**). Με βάση τα βάρη (Πίνακας 4), η απόδοση της εκχύλισης σε φαινολικές ενώσεις ήταν ιδιαίτερα μικρή, αλλά ελαφρώς βελτιωμένη σε σχέση με την προηγούμενη δοκιμασία. Πραγματοποιήθηκε επανάληψη του πειράματος με μεγαλύτερη αρχική ποσότητα δείγματος. Έτσι, 500 g μελιού διαλύθηκαν σε 600 ml νερού, και προστέθηκαν 300 ml MeOH και 600 ml CHCl₃.

Πίνακας 4. Βάρη των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από υγρή-υγρή εκχύλιση με H₂O/MeOH/CHCl₃

Εκχυλίσματα	Βάρη (g) -Απόδοση %
Αρχική ποσότητα 50g	
HON28_LAP	40.008 -80.0%
HON28_LOP	7.9764 -15.9%
Αρχική ποσότητα 500 g	
HON28_Aq	320.25 -64.05%
HON28_OPh1	179.46 -35.9%
HON28_Aq2	313.98 -62.8%
HON28_OPh2	1.6519 -0,3%
HON28_Oph1_XAD7_MeOH	5.72 -1.1%
HON28_OPh2_XAD7_MeOH	0.0664 -4.9%

Έπειτα από ποιοτικό έλεγχο και των δύο εκχυλισμάτων με TLC ήταν καθαρή η ύπαρξη φαινολικών συστατικών στο εκχύλισμα της οργανικής φάσης. Με σκοπό την αύξηση της απόδοσης ακολούθησε εκ νέου εκχύλιση της υδατικής φάσης HON28_Aq με EtOAc (600 ml x3). Τα δύο εκχυλίσματα που προέκυψαν (υδατική φάση, **HON28_Aq2**) και (οργανική φάση, **HON28_OPh2**) εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και τα βάρη παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων, όπου διαπιστώθηκε ότι στα τελικά οργανικά εκχυλίσματα (HON28_OPh1 και HON28_OPh2) υπήρχαν ακόμα σάκχαρα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι, αν και ικανοποιητική η διαδικασία αυτή, δεν είναι αρκετή για την πλήρης απομάκρυνση των σακχάρων.

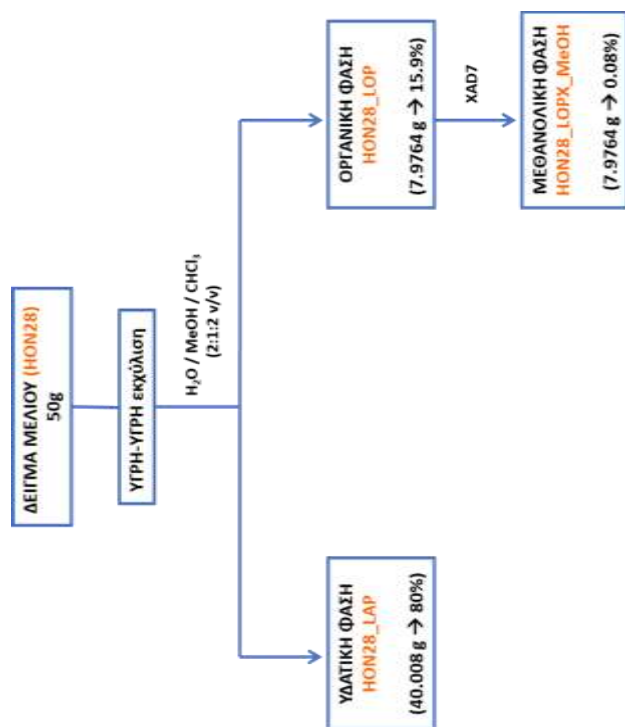
A.3) Συνδιαστική χρήση εκχύλισης υγρού-υγρού και προσροφητικής ρητίνης

Η τρίτη σειρά δοκιμών που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε τη συνδιαστική χρήση της υγρής-υγρής εκχύλισης και των ρητινών προσρόφησης. Έτσι, τα εκχυλίσματα **HON28_LOP** (50 g

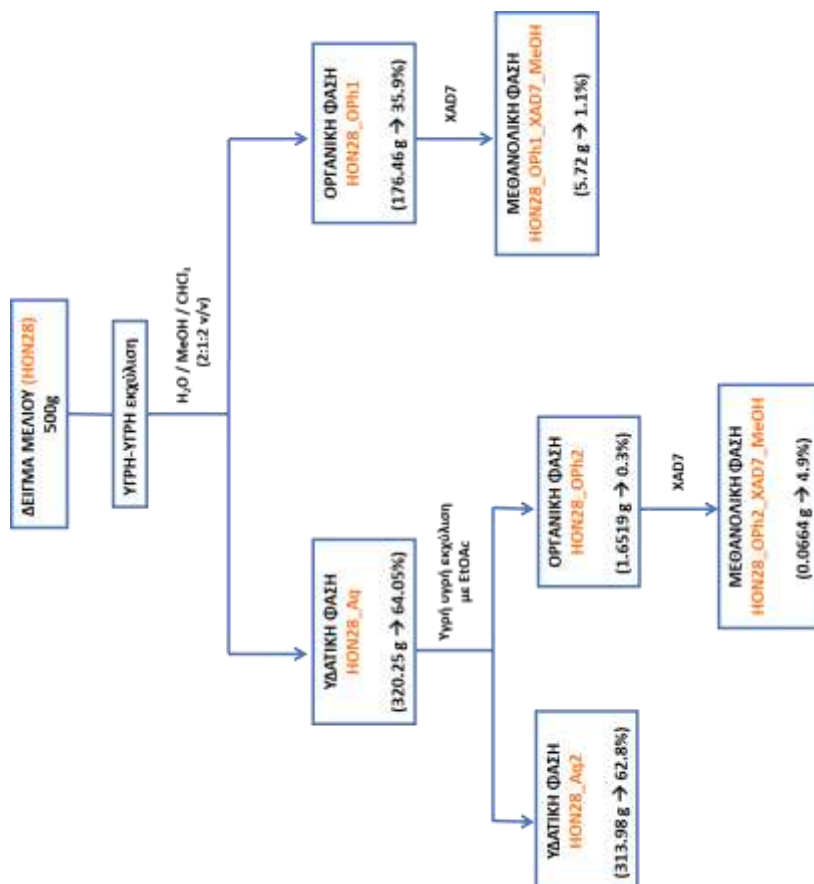
μελιού / εκχύλιση με $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (2:1:2 v/v) /οργανική φάση), **HON28_OPh1** (500 g μελιού / εκχύλιση με $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (2:1:2 v/v) /οργανική φάση) και **HON28_OPh2** (500 g μελιού / εκχύλιση με $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ (2:1:2 v/v) + EtOAc /οργανική φάση) υποβλήθηκαν σε κατεργασία με XAD7.

- **HON28_LOP:** 7.9764 g διαλύθηκαν σε 150 ml απιονισμένου νερού και έπειτα προστέθηκαν 20 g XAD7. Το μίγμα παρέμεινε όλη νύχτα υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το δείγμα διηθήθηκε υπό κενό με ειδικό φίλτρο (por 3). Στη συνέχεια προστέθηκαν στη ρητίνη 150 ml μεθανόλης με σκοπό την αποδέσμευση των φαινολικών συστατικών. Το δείγμα, υποβλήθηκε σε εκχύλιση με υπερήχους για 20 λεπτά και φιλτράρισμα (por 4) για την απομάκρυνση της ρητίνης και παραλαβής του μεθανολικού εκχυλίσματος. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Ύστερα, από τη συλλογή των τριών μεθανολικών εκχυλισμάτων έγινε εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση αποδίδοντας το εμπλουτισμένο εκχύλισμα **HON28_LOPX_MeOH** με βάρος 0.0405 g (**0.5%, συνολική απόδοση 0.08%**).
- **HON28_OPh1:** 176.46 g του εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε 900 ml νερού και έπειτα προστέθηκαν 260 g XAD7. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Από αυτή τη διαδικασία προέκυψε το εκχύλισμα **HON28_Oph1_XAD7_MeOH** με βάρος 5.72 g (**3.2%, συνολική απόδοση 1.1%**) (Πίνακας 4).
- **HON28_OPh2:** Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και σε αυτό το εκχύλισμα, όπου 1.3482 g διαλύθηκαν σε 30 ml απιονισμένου νερού και έπειτα προστέθηκαν 5.3928 g XAD7. Από αυτή τη διαδικασία προέκυψε το εκχύλισμα **HON28_OPh2_XAD7_MeOH** με βάρος 0.0664 g (**4.9%, συνολική απόδοση 0.01%**)(Πίνακας 4). Η διαδικασία που εκτελείται σε κάθε δείγμα / εκχύλισμα συνοψίζεται παρακάτω (Εικόνα 12 και 13)

Από τον έλεγχο των αποδόσεων φαίνεται ότι η συνδιαστική χρήση υγρής-υγρής εκχύλισης και ρητινών προσρόφησης έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα αν και σε κάθε περίπτωση οι συνολικές αποδόσεις παραμένουν εντυπωσιακά μικρές όπως αναμενόταν. Ωστόσο, εκτός από την απόδοση σε φαινολικά πολύ σημαντικό είναι να ελεγχθούν τα παραγώμενα εκχυλίσματα και εμπλουτισμένα κλάσματα ως προς την παρουσία σακχάρων ώστε να επιλεγθεί η πιο κατάλληλη μέθοδος. Οπότε αποφασιστικής σημασίας ήταν το στάδιο του ποιοτικού ελέγχου με διάφορες αναλυτικές τεχνικές.



Εικόνα 12. Workflow του δείγματος HON28 με 5g ως αρχική ποσότητα



Εικόνα 13. Workflow του δείγματος HON28 με 500g ως αρχική ποσότητα

Ταυτόχρονα με τον έλεγχο της ύπαρξης ή μη σακχάρων, αυτό το στάδιο βοήθησε και για το χαρακτηρισμό των περιεχόμενων χημικών ομάδων αλλά και μεταβολιτών τουλάχιστον στο δείγμα μελιού που επιλέχθηκε για την ανάπτυξη των μεθοδολογιών. Επιπλέον, ο ποιοτικός αυτός έλεγχος οδήγησε στην άντληση διαφορετικών πληροφοριών ανάλογα κάθε φορά με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική. Η συνδυαστική χρήση πολλών αναλυτικών τεχνικών και η συμπληρωματική πληροφορία που προκύπτει σχετικά με το χημικό περιεχόμενο, εξ όσων γνωρίζουμε δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν και πόσο μάλλον σε ένα Ελληνικό μέλι.

B) Ποιοτικός έλεγχος εκχυλισμάτων

Για τον ποιοτικό έλεγχο του **HON28** χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αναλυτικές τεχνικές που παρουσιάζονται συνοπτικά στη συνέχεια.

- **Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC).** Πλάκες αλουμινίου κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης πυριτίου με πάχος στιβάδας 0,1 mm (Silica gel 60 F254-Merck/ Silica gel 60 RP-18 F254S). Τα χρωματογραφήματα ελέγχθηκαν με λαμπτήρες υπεριώδους ακτινοβολίας, σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm και ακολούθησε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση.

- **Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD).** Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan που αποτελείται από: Αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία. Απαερωτή SpectraSystem 1000. Αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000. Ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000. Ανιχνευτής πολλαπλής διόδου (PDA) SpectraSystem UV6000LP. Στήλη: Supelco RP18, UniverSilHS C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm). Λογισμικό ChromQuestTM 4.1.

- **Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης συνδεδεμένη με υβριδικό φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMS/MS):** Thermo Finnigan Accela High Speed: αντλία Accela, αυτόματος δειγματολήπτης Acquity. MS: Υβριδικός φασματογράφος μάζας που περιλαμβάνει συνδυασμό γραμμικής παγίδας ιόντων (Ion trap - LTQ XL) και τροχιακή παγίδα ιόντων (Orbital trap – Orbitrap) LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Scientific - Brehmen, Germany) εφοδιασμένο με πηγή ιοντισμού τύπου ηλεκροψεκασμού (Electrospray - ESI) Τα

δείγματα προετοιμάστηκαν με μεθανόλη/νερό (1:1 v/v) αναλυτικής καθαρότητας σε τελική συγκέντρωση 0.3 mg/ml για ολικά εκχυλίσματα

- **Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).** Για τη λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιήθηκαν ο φασματογράφος Advance III Bruker BioSpin με 5 mm BBI probe στα 600 MHz. Οι διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε στην λήψη φασμάτων ήταν δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο DMSO (2.55 ppm/¹H-NMR).

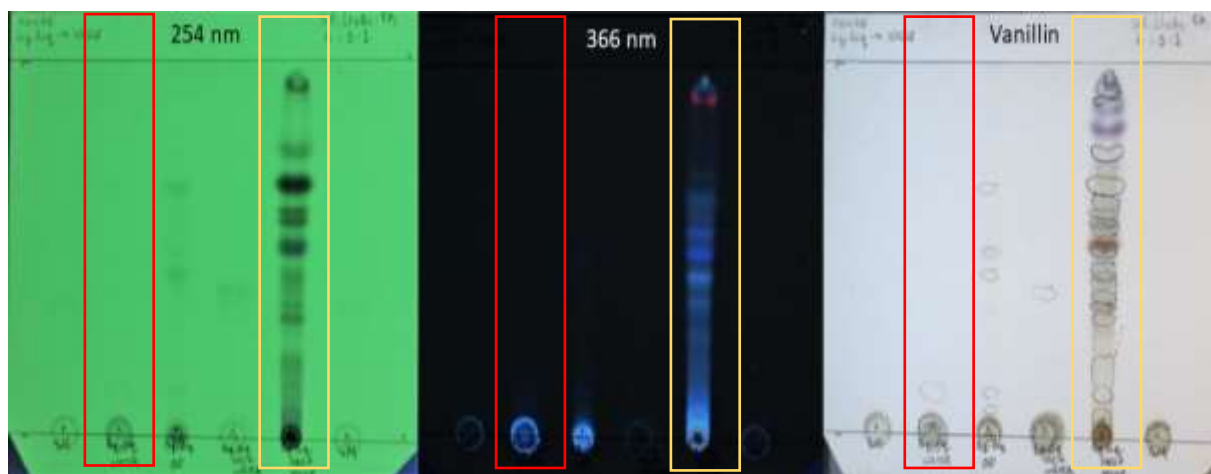
Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης J σε Hertz (Hz). Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων εκφράζεται ως s (single):απλή, brs (broad singlet): ευρεία απλή, d (double):διπλή, t (triple):τριπλή, q (quintuplet):τετραπλή, dd (double of doublets):διπλή διπλής m (multiple): πολλαπλή. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης ¹H-NMR και ¹³C-NMR ,καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων, COSY (Correlation spectroscopy), HSQC(Heteronuclear single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), NOESY (Nuclear Overhauser effect Spectroscopy).

B.1) Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων. Κάποια από τα πλεονεκτήματα της TLC σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, περιλαμβάνουν απλότητα, ελάχιστη απαιτούμενη προετοιμασία δείγματος, λιγότερη κατανάλωση διαλύτη και δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων παράλληλα σε λιγότερο χρόνο (Sherma & Rabel, 2018). Όπως αναφέρθηκε στα πειράματα που περιγράφηκαν, η χρήση της TLC αξιοποιήθηκε για τον γρήγορο έλεγχο των εκχυλισμάτων σε σχέση με την απομάκρυνση των σακχάρων. Διαφορετικά συστήματα που βρίσκονται στη βιβλιογραφία για την ανάλυση δειγμάτων μελιού (Aquosa, 2003; Stanek, Kafarski, & Jasicka-Misiak, 2019; Tuberoso et al., 2009) δοκιμάστηκαν μέχρι να εξακριβωθεί ποιο σύστημα οδηγεί στην καλύτερη παρατήρηση των συστατικών.

- **HON28 OPh1 και HON28 Oph1 XAD7 MeOH**

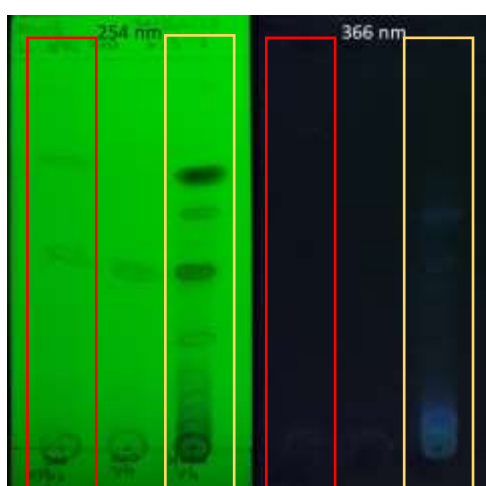
Τα προφίλ των κλασμάτων από τις εκχυλίσσεις υγρού-υγρού με κωδικούς HON28_OPh1 και HON28_OPh1_XAD7_MeOH παρουσιάζονται στην *Εικόνα 14*.



Εικόνα 14. Ποιοτικός έλεγχος TLC κανονικής φάσης των ολικών εκχυλισμάτων HON28_OPh1 (κόκκινη μπάρα) και HON28_Oph1_XAD7_MeOH (Κίτρινη μπάρα). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα ανάπτυξης Tol/EtoAc/FA (6:5:1 v/v)

Η ύπαρξη σακχάρων είναι έντονη στο εκχύλισμα HON28_OPh1 (κόκκινη μπάρα) με τα σάκχαρα να συγκεντρώνονται στη γραμμή βάση, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά δεν αποκαλύπτονται επαρκώς. Η χρήση της ρητίνης (κίτρινη μπάρα) οδήγησε στη λήψη ενός εμπλουτισμένου οργανικού εκχυλίσματος. Διακρίνονται ενώσεις που ανήκουν σε κατηγορίες όπως οι πολυφαινόλες, τα φαινολικά οξέα και άπολα συστατικά, όπως τα τερπένια. Η πλειοψηφία των ουσιών φαίνεται να απορροφά κυρίως στα 254 nm, ενώ στα 366 nm φαίνεται ότι απορροφούν λιγότερα συστατικά.

- **HON28_OPh2 και HON28_Oph2_XAD7_MeOH**



Εικόνα 15. Ποιοτικός έλεγχος TLC κανονικής φάσης των ολικών εκχυλισμάτων HON28_OPh2 (κόκκινο) και HON28_Oph2_XAD7_MeOH (κίτρινο). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα ανάπτυξης Tol/EtoAc/FA (6:5:1 v/v)

Τα προφίλ των εκχυλισμάτων **HON28_OPh2** και **HON28_OPh2_XAD7_MeOH** παρουσιάζονται στην *εικόνα 15*, όπου φαίνεται ότι υπάρχουν συστατικά ενδιαφέροντος στην οργανική φάση της εκχύλισης υγρού-υγρού με EtOAc (**HON28_OPh2**) (κόκκινη μπάρα), όμως ο μεγάλος αριθμός σακχάρων που ακόμη ανιχνεύεται στο εκχύλισμα παρεμποδίζει την καλύτερη παρατήρησή τους. Μετά την απομάκρυνση των περισσότερων σακχάρων με τη χρήση ρητίνης στο εκχύλισμα **HON28_OPh2_XAD7_MeOH** (κίτρινη μπάρα), η εικόνα του προφίλ βελτιώνεται αισθητά και παρατηρούνται πολλαπλές ζώνες που αντιστοιχούν σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Στα 254nm παρατηρείται ότι απορροφούν τα περισσότερα συστατικά του δείγματος, ενώ στα 366nm δεν απορροφούν τόσα.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την TLC, δείχνουν ότι η εκχύλιση υγρού-υγρού δεν αρκεί για ικανοποιητική αποβολή των σακχάρων. Για αυτό το λόγο, κρίθηκε αναγκαία και η χρήση ρητινών προσρόφησης ώστε να ληφθεί ένα εμπλουτισμένο εκχύλισμα χωρίς σάκχαρα που θα διευκολύνει τόσο τον χαρακτηρισμό όσο και την απομόνωση των επιμέρους συστατικών.

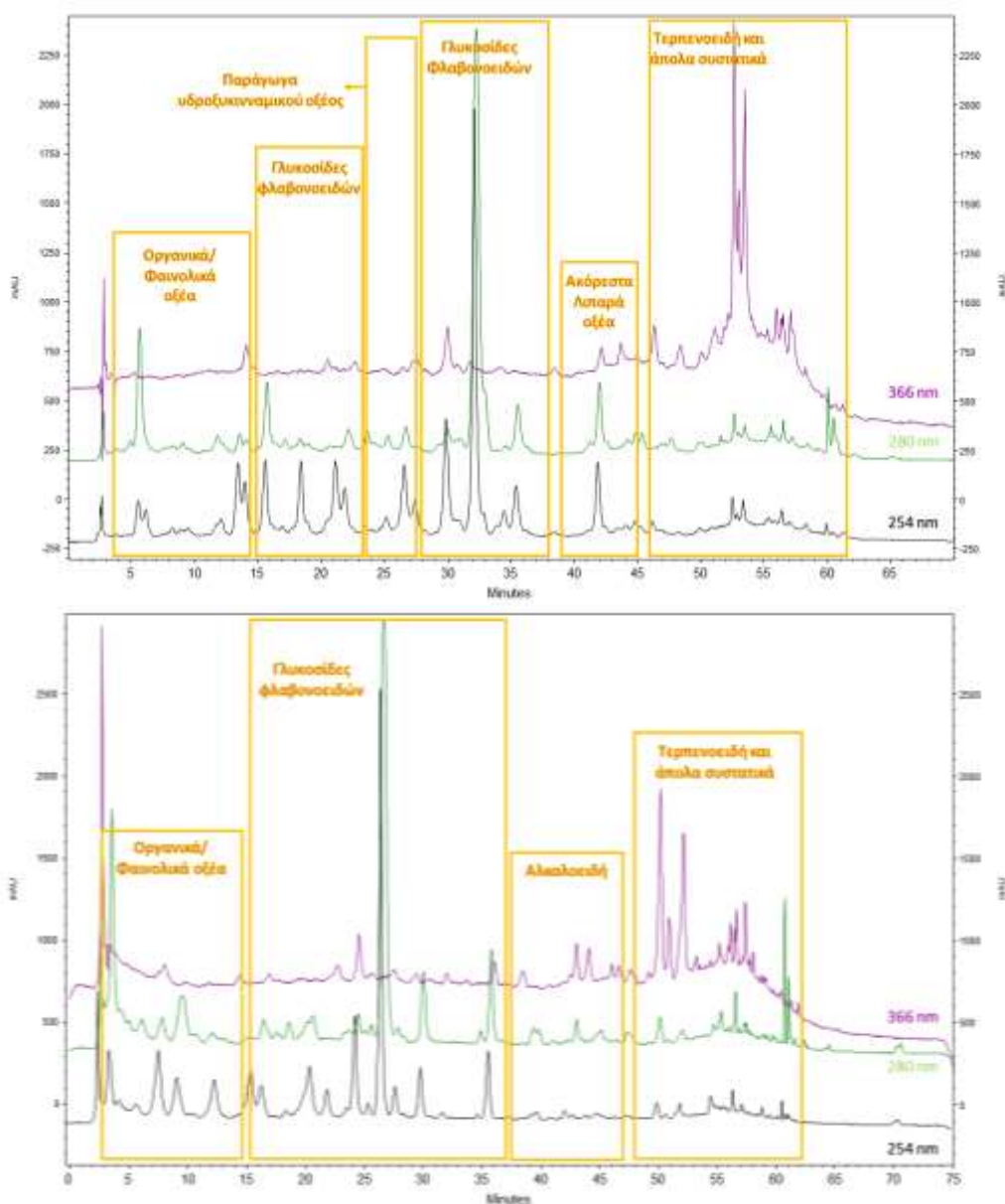
B.2) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD)

Η τεχνική HPLC έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για τον ποιοτικό έλεγχο, τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό/ταυτοποίηση διαφορετικών ενώσεων δειγμάτων μελιού (Adams et al., 2008; Federico Ferreres, Tomás-Barberán, Gil, & Tomás-Lorente, 1991; Koltsakidou, Zacharis, & Fytianos, 2015; Petrus et al., 2011). Δοκιμάστηκαν διαφορετικές μέθοδοι με διαφορετικούς διαλύτες και αναλογίες (*Παράρτημα ΠΠ2-ΠΠ5, ΕΠ1-ΕΠ4*) και βρέθηκε ότι η καλύτερες συνθήκες είναι οι ακόλουθες.

Τα διαλύματα εκχυλισμάτων για το **HON28_OPh1_XAD7_MeOH** και **HON28_OPh2_XAD7_MeOH** παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 10 mg/ml, χρησιμοποιώντας H₂O και MeOH (1:1 v/v). Η κινητή φάση Α αποτελείται από 2% οξικό οξύ, και η κινητή φάση Β MeOH. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20μL. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη μέθοδο (*Πίνακας 5*). Τα χρωματογραφήματα που λήφθησαν από τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζονται στην *εικόνα 16*.

Πίνακας 5. Συνθήκες της μεθόδου HPLC

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (%)	Κινητή φάση B (%)	Ροή (ml/min)
0	85	15	1
15	70	30	1
30	60	40	1
35	60	40	1
40	50	50	1
45	50	50	1
55	10	90	1
70	10	90	1
73	85	15	1
75	85	15	1



Εικόνα 16. HPLC-DAD (254, 280, 366 nm) χρωματογράφημα των εκχυλισμάτων **HON28_OPh1_XAD7_MeOH** (πάνω) και **HON28_OPh2_XAD7_MeOH** (κάτω).

Από τη μελέτη των χρωματογραφημάτων είναι εμφανές το πλούσιο μεταβολικό προφίλ και δύο των εκχυλισμάτων. Παράλληλα, γίνεται αμέσως αντιληπτό ότι πολλές φαινολικές ενώσεις λόγω της παρουσίας γαλακτώματος, στην πρώτη υγρή-υγρή εκχύλιση (H₂O/MeOH/CHCl₃) παραμένουν στην υδατική φάση και παραλαμβάνονται σε επόμενα στάδια (2ρη εκχύλιση με EtOAc + XAD). Αυτό σημαίνει συνεπώς ότι τα επόμενα στάδια εμπλουτισμού είναι απαραίτητα για την παραλαβή των φαινολικών και την αύξηση της απόδοσης.

Ποιοτικά, εμφανίζουν πολλές ομοιότητες αλλά και διαφορές. Όπως φαίνεται, και στα δύο υπάρχουν πολλές κατηγορίες ενώσεων με κυρίαρχες τα απλά φαινολικά οξέα και τους γλυκοσίδες φλαβονοειδών. Επίσης, παρατηρείται η παρουσία λιπαρών οξέων στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος HON28_OPh1_XAD7_MeOH λογικά εξαιτίας της χρήσης CHCl₃, στο πρώτο στάδιο ενώ αντίθετα κάποια αλκαλοειδή ανιχνεύονται κυρίως στο HON28_OPh2_XAD7_MeOH κάτι επίσης λογικό αφού μεσολαβεί επανεκχύλιση υδατικής φάσης.

Τέλος, μία σημαντική παρατήρηση από τις αναλύσεις με HPLC είναι η αυξημένη γραμμή βάσης και στις δύο περιπτώσεις που υποδηλώνει την ύπαρξη σακχάρων στα δείγματα. Αυτό σημαίνει ότι παρά τα διαφορετικά στάδια κατεργασίας τα σάκχαρα δεν απομακρύνονται τελείως.

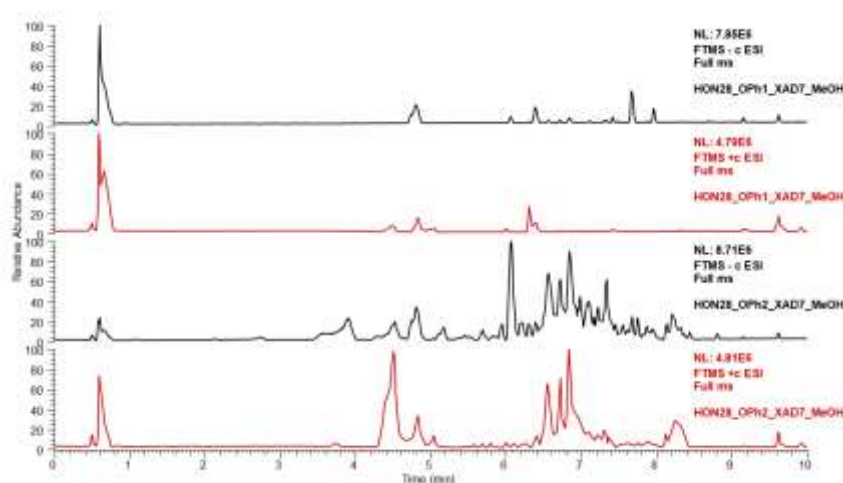
B.3) Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Απόδοσης συνδεδεμένη με υβριδικό φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMS & MS/MS).

Για την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ποιοτικός έλεγχος με τη χρήση LC-HRMS & MS/MS, με την χρήση πηγής ηλεκτροψεκασμού ESI, τόσο σε θετικό όσο και σε αρνητικό ιοντισμό (±). Το σύστημα έκλουσης ήταν A: 0.1 % φορμικό οξύ και B: Ακετονιτρίλιο (ACN). Ο όγκος του ενέσιμου δείγματος ορίστηκε σε 10 μL. Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε η στήλη ACQUITY UPLC BEH C18 1.7μM particle size, (Thermo Scientific). Η μέθοδος παρουσιάζεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 6.

Πίνακας 6. Συνθήκες της μεθόδου UHPLC-HRMS/MS.

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (%)	Κινητή φάση B (%)	Ροή (ml/min)
0.0	98.0	2.0	0.4
2.0	98.0	2.0	0.4
18.0	0.0	100.0	0.4
20.0	0.0	100.0	0.4
21.0	98.0	2.0	0.4
25.0	98.0	2.0	0.4

Για το μεταβολικό προφίλ των εκχυλισμάτων αναπτύχθηκε μία μέθοδος που αποτελείται από μία πλήρη σάρωση (Full scan) και μια επιλεκτική θραυσματοποίηση (λήψη φασμάτων MS/MS) των 3 ιόντων με την μεγαλύτερη ένταση σε κάθε σάρωση (Data Dependent Method). Η θερμοκρασία στο τριχοειδές (capillary temperature) ήταν 300°C, το δυναμικό τριχοειδούς (capillary voltage) ήταν 30 V, το δυναμικό ψεκασμού (spray voltage) ήταν 3.5 kV, η ροή αέριου αζώτου στο τριχοειδές (sheath gas) ήταν 30 arb και του βοηθητικού αέριου αζώτου (auxiliary gas) ήταν 10 arb. Για όλες τις μετρήσεις, ως όριο ακρίβειας της μέτρησης (mass tolerance) ορίστηκαν τα 5 ppm.



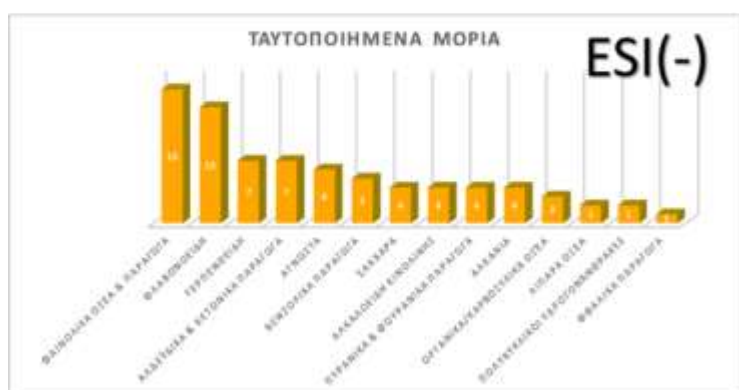
Εικόνα 17. Χρωματογραφήματα αρνητικού και θετικού ιοντισμού των εκχυλισμάτων HON28_Oph1_XAD7_MeOH και HON28_Oph2_XAD7_MeOH

Αντίθετα με την περίπτωση της ανάλυσης με HPLC, στην περίπτωση της ανάλυσης με LC-MS (Εικόνα 17) τα δύο δείγματα φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά, με το HON28_Oph2_XAD7_MeOH να εμφανίζεται πιο πλούσιο και στις δύο μεθόδους ιονισμού. Με καλύτερη ωστόσο εξέταση των χρωματογραφημάτων φαίνεται ότι οι διαφορές είναι κατά κύριο λόγο ποσοτικές. Επίσης, φαίνεται ότι ο αρνητικός ιονισμός είναι πιο κατάλληλος σε σχέση με το θετικό ιονισμό αν και αυτό εξαρτάται σημαντικά από τα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων. Τέλος, επιβεβαιώνεται η παρουσία σακχάρων τα οποία επεμβαίνουν τόσο στον ιονισμό των φαινολικών συστατικών όσο και στο διαχωρισμό τους με αποτέλεσμα μειωμένης ποιότητας χρωματογραφήματα.

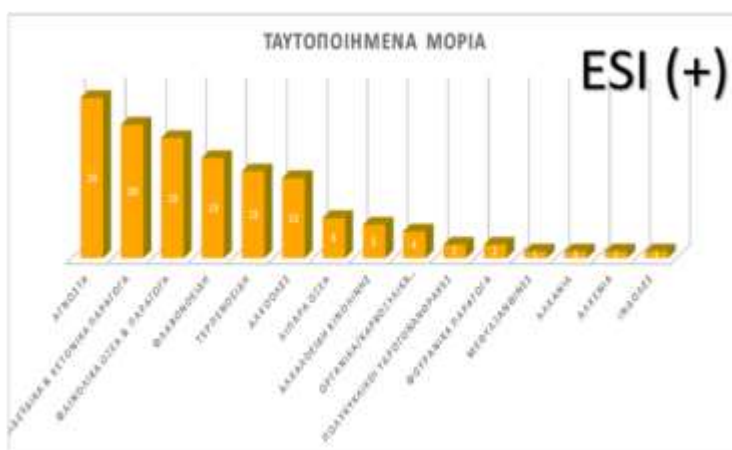
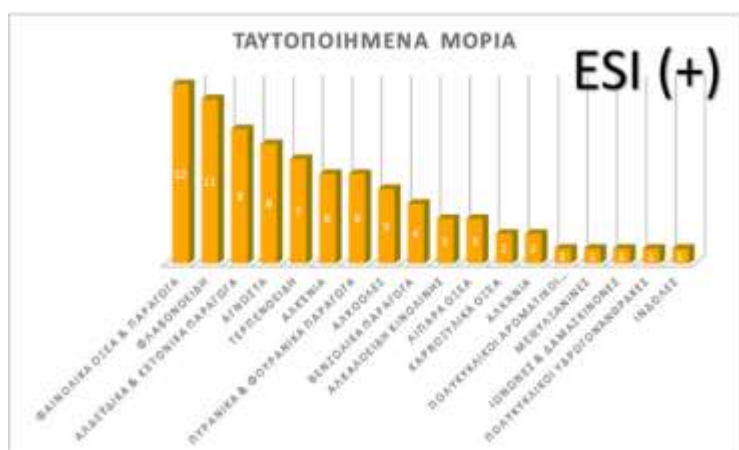
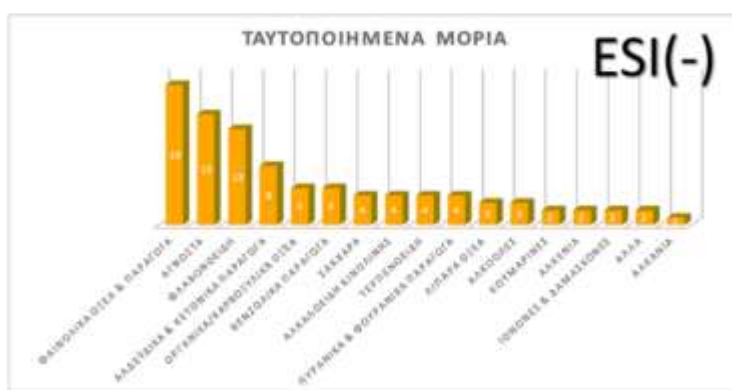
Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης των μεταβολιτών χρησιμοποιώντας χρωματογραφικά και φασματομετρικά εργαλεία καθώς και πληροφορίες από τη βιβλιογραφία και από βάσεις δεδομένων. Συγκεκριμένα, για την ταυτοποίηση των γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών (dereplication), μελετήθηκαν οι προτεινόμενοι μοριακοί τύποι (EC), ο χρόνος συγκράτησης (Rt) και ο βαθμός ακορεστότητας (RDBeq.) για τις κύριες κορυφές κάθε εκχυλίσματος,

χρησιμοποιώντας τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης (Full scan), ενώ σε ένα δεύτερο στάδιο μελετήθηκαν τα φάσματα δίδυμης φασματομετρίας HRMS/MS και το μοτίβο θραυσματοποίησης (fragmentation pattern). Το εύρος μάζας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν από m/z 115 έως 1000, και το όριο ακρίβειας (απόκλιση θεωρητικής και πειραματικής τιμής) τέθηκε σε $\Delta m = 5$ ppm. Τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους πίνακες ΠΠ6,7,8 & 9 στο παράρτημα.

HON28_OPh1_XAD



HON28_OPh2_XAD



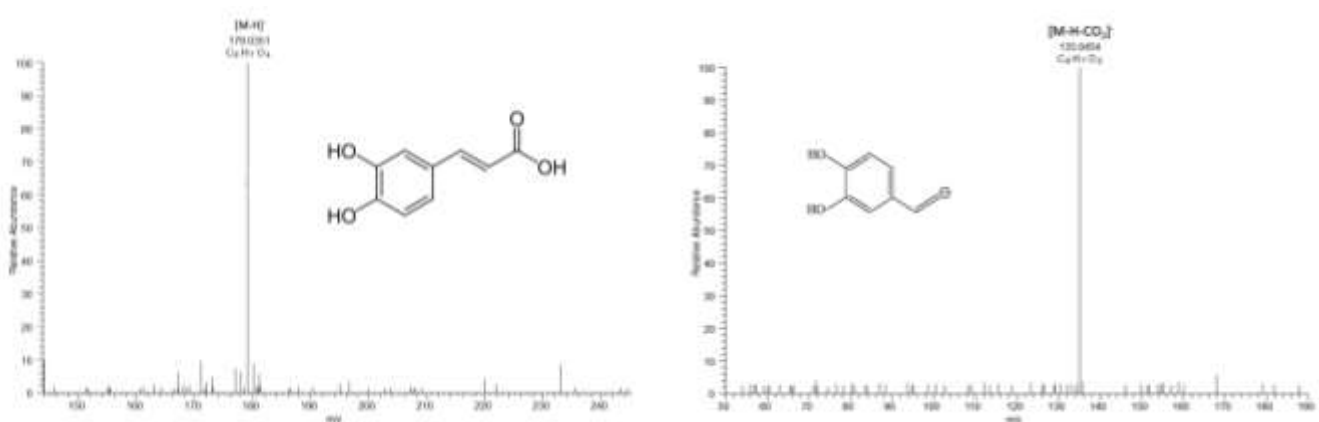
Εικόνα 18. Οπτικοποίηση των ταυτοποιημένων μορίων των εκχυλισμάτων HON28_OPh1_XAD και HON28_OPh2_XAD, από το dereplication.

Αναλυτικότερα, από το εκχύλισμα HON28_OPh1_XAD ταυτοποιήθηκαν 71 μόρια σε αρνητικό ιοντισμό, και 70 σε θετικό ιοντισμό, ενώ στο εκχύλισμα HON28_OPh2_XAD ταυτοποιήθηκαν 82 και 99 ουσίες, αντίστοιχα (Εικόνα 18). Στους πίνακες που προέκυψαν, παρουσιάζονται οι κατηγορίες ουσίων καθώς και συγκεκριμένες ουσίες που ταυτοποιήθηκαν. Στα φάσματα του αρνητικού ιοντισμού των δυο κλασμάτων ανιχνεύτηκαν ορισμένα σάκχαρα, τα οποία δεν ανιχνεύτηκαν στα φάσματα θετικού ιοντισμού τους. Οι κυριότερες κατηγορίες ουσίων που αναγνωρίστηκαν και είναι

παρούσες και στα δύο εκχυλίσματα είναι οι πολυφαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή και παράγωγά τους, τα λιπαρά οξέα και παράγωγά τους, τα καρβοξυλικά οξέα και τα τερπενοειδή. Κατά τη φασματομετρία μάζας αρνητικού ιοντισμού οι ουσίες με το μικρότερο Rt (Retention Time) είναι τα σάκχαρα, ενώ ακολουθούν τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα φλαβονοειδή με τα παράγωγά τους. Αντίθετα, σε θετικό ιοντισμό τα πρώτα μόρια που εμφανίζονται είναι τα καρβοξυλικά οξέα και, έπειτα, ακολουθούν οι ενώσεις του βενζοϊκού οξέος και τα φλαβονοειδή. Στους πίνακες υπάρχουν και άγνωστα συστατικά τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν μέσω βιβλιογραφίας.

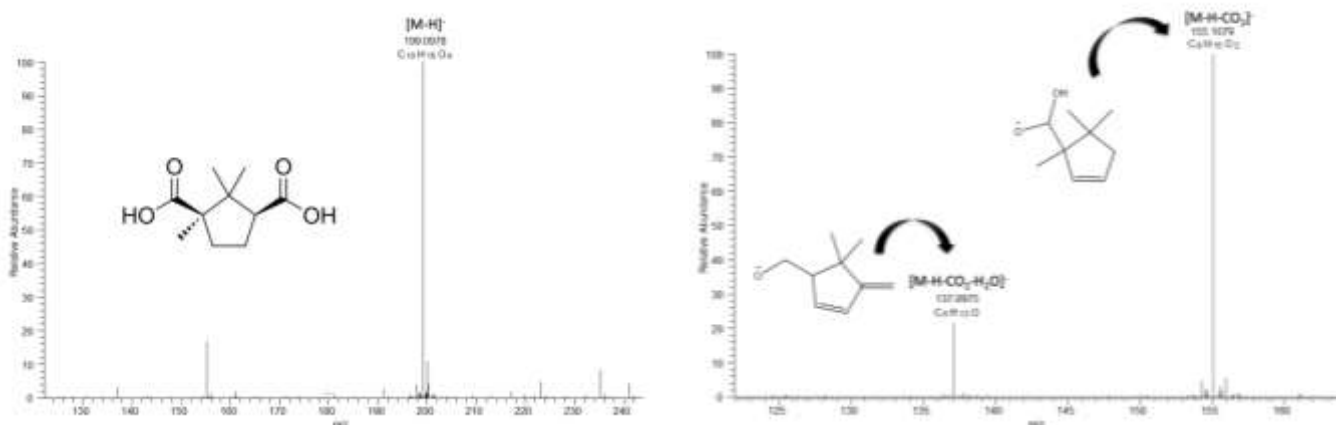
Όλες αυτές οι κατηγορίες ουσιών εντοπίζονται στο μέλι και ορισμένες από αυτές χαρακτηρίζουν τόσο την βοτανική όσο και τη γεωγραφική προέλευσή του. Για παράδειγμα, το κυνourενικό οξύ αποτελεί βιοδείκτη του μελιού καστανιάς (Truchado et al., 2009), η εσπεριτίνη αποτελεί πιθανό βιοδείκτη του μελιού εσπεριδοειδών (Federico Ferreres et al., 1993), το π-μεθοξυ-κινναμικό οξύ, η κονιφεραλδεΐδη και το p-κουμαρικό οξύ, που επίσης ανιχνεύτηκαν έχουν προταθεί ως βιοδείκτες του μελιού από βαμβάκι (Alissandrakis et al., 2005). Στην συνέχεια, παρουσιάζεται η μελέτη των φασμάτων μάζας πλήρους σάρωσης και δίδυμης φασματομετρίας μάζας κάποιων χαρακτηριστικών ενώσεων από ορισμένες χημικές κατηγορίες που εντοπίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δυο εκχυλίσματα.

Στην κατηγορία των πολυφαινολικών ενώσεων, σε Rt = 5.16 min ταυτοποιήθηκε το καφεϊκό οξύ. Αυτό το οξύ είναι παράγωγο του υδροξυκινναμικού οξέος και παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση (Chen & Ho, 1997). Το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^-$ εντοπίστηκε σε m/z 179.0350 (Εικόνα 19), με βαθμό ακορεστότητας 6.5, σε αρνητικό ιονισμό. Το φάσμα HRMS/MS οδήγησε στην ταυτοποίηση δίνοντας το χαρακτηριστικό θραύσμα m/z 135.0454 (100%), το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν $[M+H-CO_2]^-$.



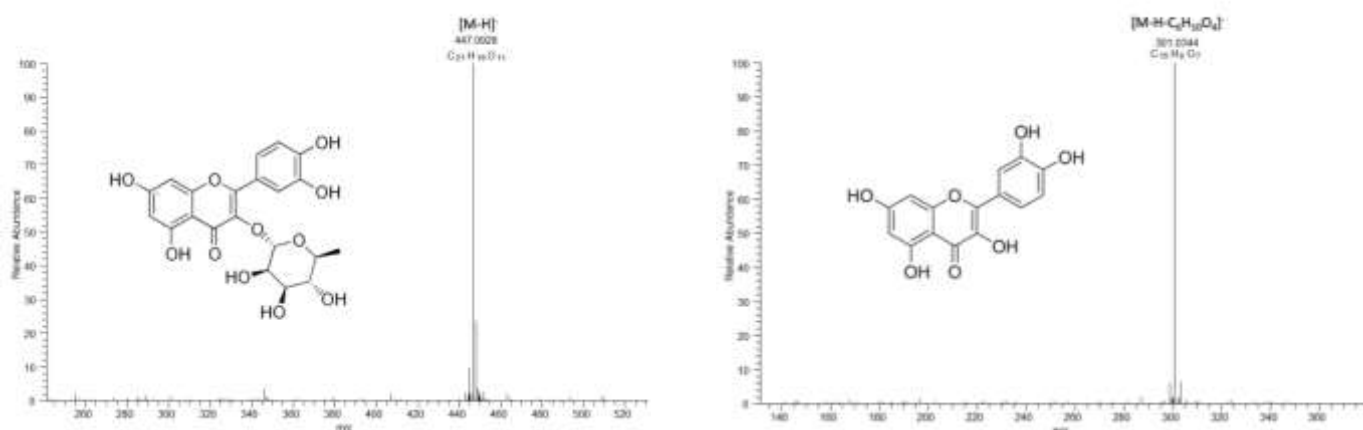
Εικόνα 19. Φάσμα μάζας του καφεϊκού οξέος (Αριστερά) και χαρακτηριστικό θραύσμα (δεξιά)

Στην κατηγορία των καρβοξυλικών οξέων, σε $R_t = 6.56$ min ταυτοποιήθηκε το καμφορικό οξύ, το οποίο λαμβάνεται από την οξείδωση της καμφοράς. Παρουσιάζει αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική και αντικαρκινική δράση (Ma et al., 2014). Το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$ εντοπίστηκε σε m/z 199.0978 και με βαθμό ακορεστότητας 3.5, σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού. Το φάσμα HRMS/MS οδήγησε στην ταυτοποίηση δίνοντας τα θραύσματα σε m/z 155.1079 (100%) και 137.0975 (21.46%), τα οποία αντιστοιχούν στα ιόντα $[M+H-CO_2]^-$ και $[M+H-CO_2-H_2O]^-$ (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Φάσμα μάζας του καμφορικού οξέος (Αριστερά) και χαρακτηριστικό θραύσμα (δεξιά)

Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, σε $R_t = 7.34$ min ταυτοποιήθηκε η κερκιτρίνη (Quercitrin). Η κερκιτρίνη είναι η γλυκοσυλιωμένη μορφή της κερκετίνης. Παρουσιάζει αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιβακτηριακή δράση (Yin et al., 2013). Το ψευδομοριακό ιόν εντοπίστηκε σε m/z 447.0928 $[M+H]^+$, με βαθμό ακορεστότητας 12.5, σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού. Το φάσμα HRMS/MS οδήγησε στην ταυτοποίηση δίνοντας το χαρακτηριστικό θραύσμα σε m/z 301.0344 (100%) $[M+H-Rha]^+$, το οποίο αντιστοιχεί στην απομάκρυνση ενός μορίου ραμνόζης (Εικόνα 21).

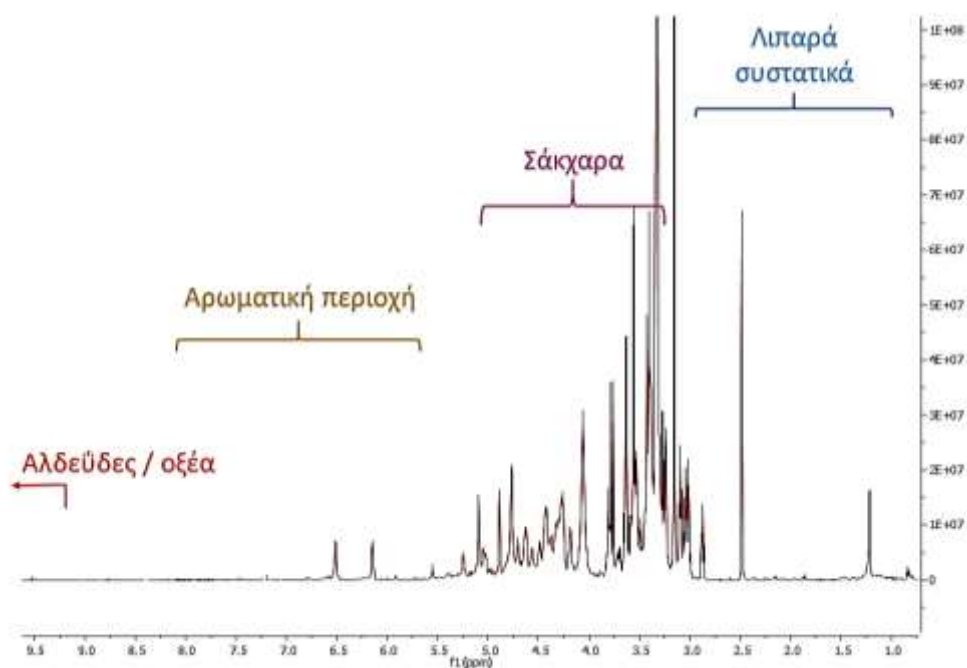


Εικόνα 21. Φάσμα μάζας της κερκιτρίνης (Αριστερά) και χαρακτηριστικό θραύσμα (δεξιά)

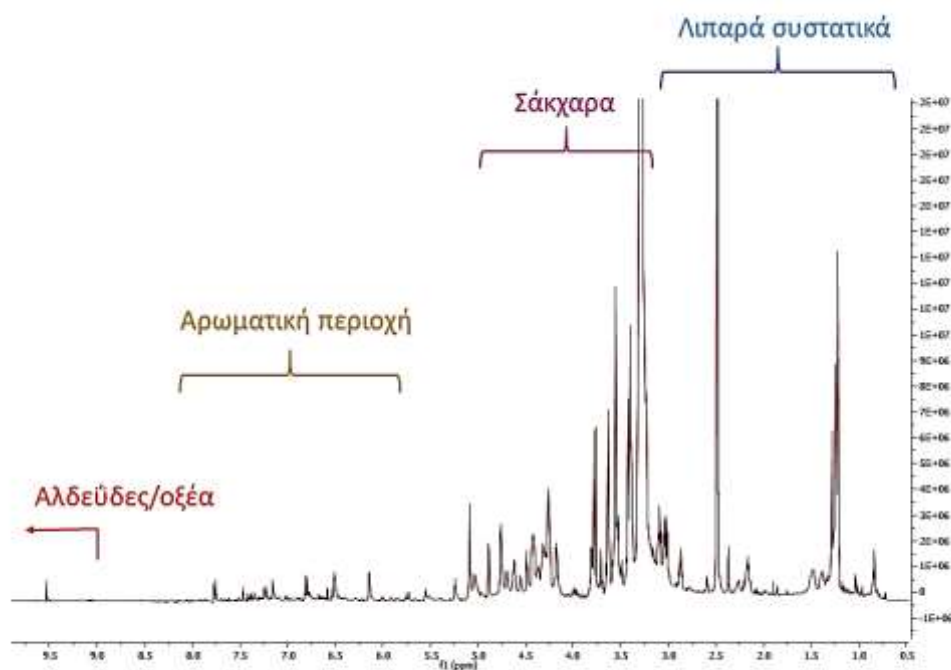
Με τη χρήση της LC-HRMS και HRMS/MS και την προσέγγιση dereplication ήταν δυνατή η ανίχνευση και η ταυτοποίηση πάνω από 90 δευτερογενών μεταβολιτών στο δείγμα μελιού. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν τόσο εκτεταμένος και αναλυτικός χαρακτηρισμός των δευτερογενών μεταβολιτών σε άλλο Ελληνικό μέλι, αλλά και γενικότερα σε άλλα μέλια. Επίσης, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο μέλι φυτών (polyfloral) της Λέσβου διακρίνεται από την παρουσία μεγάλου πλήθους μορίων με βιολογικές ιδιότητες και κυρίως απλά καρβοξυλικά οξέα, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και παράγωγά τους.

B.4) Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Στις παρακάτω εικόνες 22 και 23 φαίνονται αναλυτικά τα φάσματα ^1H NMR που στα δύο ίδια εκχυλίσματα (HON28OPh1_XAD7_MeOH και HON28_OPh2_XAD7_MeOH), σε διαλύτη δευτεριωμένο DMSO.



Εικόνα 22. Φάσμα ^1H NMR του εκχυλίσματος HON28_OPh1_XAD7_MeOH



Εικόνα 23. Φάσμα ^1H NMR του εκχυλίσματος HON28_OPh2_XAD7_MeOH

Από τα φάσματα παρατηρείται ότι βασικές κατηγορίες ενώσεων υπάρχουν και στα δύο εκχυλίσματα, όπως λιπαρά οξέα, αρωματικές ενώσεις, αλδεΐδες και οξέα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σήματα των σακχάρων εξακολουθούν να εμφανίζονται το οποίο αναμενόταν με βάση τις προηγούμενες αναλύσεις. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι το εκχύλισμα HON28_OPh2_XAD7_MeOH (Εικόνα 23) φαίνεται πλουσιότερο σε σύγκριση με το κλάσμα HON28_OPh1_XAD7_MeOH (Εικόνα 22) και μάλιστα σε αρωματικές και ενώσεις με αλδευδομάδες. Αυτό επιβεβαιώνει ξεκάθαρα την αναγκαιότητα τόσο της δεύτερης εκχύλισης της υδατικής φάσης όσο και τη χρήση της ρητίνης. Η παράληψη αυτού του σταδίου θα οδηγούσε στην απώλεια σημαντικών κατηγοριών φαινολικών ενώσεων. Σε γενικές ωστόσο γραμμές και τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ.

B.5) Συμπεράσματα αναλυτικών τεχνικών

Στην παρούσα εργασία, αξιοποιήθηκαν διαφορετικές αναλυτικές μέθοδοι με σκοπό αφ' ενός της αξιολόγησης της όλης διαδικασίας παραλαβής των φαινολικών συστατικών του μελιού με την ταυτόχρονη απομάκρυνση των σακχάρων ει δυνατόν ποσοτικά και αφετέρου τον χαρακτηρισμό τους. Ο συνδιασμός των πληροφοριών ανά τεχνική οδήγησε σε σημαντικά παρατηρήσεις και συμπεράσματα.

Αρχικά, γίνεται σαφές ότι είναι αρκετά δύσκολη και επίπονη διαδικασία η απομάκρυνση των σακχάρων από τα δείγματα του μελιού ώστε να γίνει η παραλαβή των περιεχομένων δευτερογενών μεταβολιτών. Σημαντικός παράγοντας είναι φυσικά η πολύ μικρή περιεκτικότητά τους που επιβάλλει επαναλαμβανόμενα βήματα για την παρεμπόδιση οποιασδήποτε απώλειας. Έγινε επίσης σαφές πολύ σύντομα ότι η δημιουργία γαλακτώματος είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες απώλειας των φαινολικών επιβάλλοντας τη χρήση διαδοχικών εκχυλίσεων με διαφορετικούς διαλύτες και φυσικά την περαιτέρω εκχύλιση της υδατικής φάσης. Τέλος, πολύ σημαντική τόσο για την αύξηση της απόδοσης όσο και για την παραλαβή των φαινολικών συστατικών ήταν η χρήση ρητινών προσρόφησης συνδιαστικά με την υγρή-υγρή εκχύλιση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι χρήσιμες πληροφορίες για τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων προέκυπταν χρησιμοποιώντας TLC. Πολύ γρήγορα και εύκολα γίνεται η ανίχνευση των σακχάρων καθώς παραμένουν στη γραμμή βάσης. Η παρατήρηση κάτω από διαφορετικά μήκη κύματος και η χρήση αντιδραστηρίων ψεκασμού οδηγούν στην ανίχνευση διαφορετικών κατηγοριών ενώσεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Από την άλλη πλευρά, με HPLC, ήταν δυνατό να ληφθεί ένα πιο ακριβές προφίλ κάθε εκχυλίσματος, όπου η παρουσία σακχάρων ήταν προφανής, καθώς αποτελούσαν εμπόδιο στην ανάλυση. Ωστόσο, οδηγεί στην πιθανή αναγνώριση ορισμένων κατηγοριών ενώσεων, που επικυρώνουν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με TLC. Επίσης, η τεχνική LC-ESI(±)-HRMS & HRMS/MS δίνει αποτελέσματα συνδιάζοντας το διαχωρισμό των συστατικών και τη δομική πληροφόρία. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός σε μεγάλο βαθμό των εκχυλισμάτων με αρκετά μεγάλη ασφάλεια φτάνοντας στην ταυτοποίηση 71 και 70 δευτερογενών μεταβολιτών, σε αρνητικό και θετικό ιονισμό, για το εκχύλισμα HON28_OPh1_XAD7_MeOH καθώς και 82 και 99 δευτερογενών μεταβολιτών, αντίστοιχα, για το εκχύλισμα HON28_OPh2_XAD7_MeOH, κάτι που πρώτη φορά λαμβάνει χώρα τόσο διεξοδικά σε ένα Ελληνικό μέλι. Τέλος, η τεχνική NMR παρείχε σημαντικές πληροφορίες που επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν με τις άλλες αναλύσεις, ενώ δίνει πολύ γρήγορα και εύκολα τα σχετικά επίπεδα συγκέντρωσης των περιεχομένων μεταβολιτών κάτι που δεν μπορεί να γίνει με καμία άλλη από τις προηγούμενες τεχνικές.

Γ) Κλασμάτωση και απομόνωση συστατικών

Το επόμενο βήμα της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών των εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων που προέκυψαν. Για την απομόνωση έγινε χρήση τεχνικών όπως η χρωματογραφία στήλης και η παρασκευαστική TLC.

C.1) Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography) του εκχυλίσματος HON28_OPh1_XAD7_MeOH

Σε γυάλινη χρωματογραφική στήλη πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση 3.180 g του εκχυλίσματος HON28_Oph1_XAD7_MeOH με χρήση γέλης πυριτίου (90 g, silica 40-60 μm) ως στατική φάση. Αρχικά, έγινε προκατεργασία του δείγματος όπου 3.180 g του εκχυλίσματος διαλύθηκαν σε MeOH και αναμίχθηκαν με 7 g silica 0.060-0.200 mm. Έπειτα από εξάτμιση του διαλύτη, το ξηρό δείγμα προστέθηκε στη στήλη και ακολούθησε προσθήκη διαλυτών αυξανόμενης πολυκότητας με στόχο τη σταδιακή παραλαβή των συστατικών. Οι αναλογίες και οι όγκοι των συστημάτων παρουσιάζονται στο παράρτημα (ΠΠ10). Συνολικά, προέκυψαν 824 κλάσματα που κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με TLC και έγιναν οι απαραίτητες συνενώσεις. Τα βάρη των κλασμάτων παρουσιάζονται στο παράρτημα (ΠΠ11).

C.2) Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Prep-TLC)

Πραγματοποιήθηκε η τεχνική Prep-TLC, για την απομόνωση ουσιών στα κλάσματα της στήλης. Χρησιμοποιήθηκαν υάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη πυριτίου με πάχος στιβάδας 1mm (Silica gel 60 F254-Merck).

- Παρασκευαστική TLC των κλασμάτων του εκχυλίσματος [HON28_OPh1_XAD7_MeOH](#)

Από τα κλάσματα του εκχυλίσματος HON28_Oph1_XAD7_MeOH, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα κλάσματα για prep-TLC. Λόγω ανάκτησής τους από τη στήλη με διαφορετικό σύστημα διαλυτών, επιλέχθηκαν διαφορετικές αναλογίες και διαλύτες για την χρωματογραφική ανάπτυξη των πλακών. Συγκεκριμένα:

- ♦ Τα κλάσματα **F7** και **F13** αναπτύχθηκαν σε σύστημα Tol:EtOAc:FA (6:5:1 v/v),
- ♦ Τα κλάσματα **F22** και **F25** σε σύστημα EtOAc:MeOH:H₂O:FA (50:10:7:1 v/v)
- ♦ Τα κλάσματα **F31**, **F32** και **F33** σε σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH:H₂O:FA (50:11:7:1 v/v).

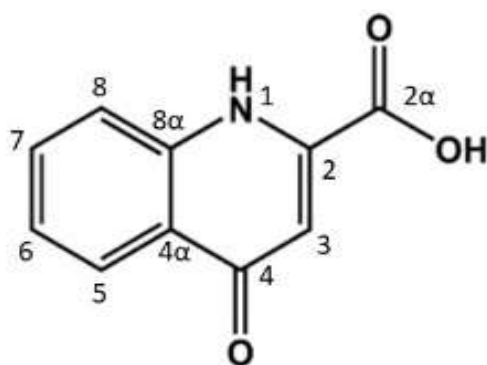
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποδέσμευση της κάθε ουσίας από τη στατική φάση με εκχύλιση με σύστημα διαλυτών MeOH/ EtOAc και υπερήχους. Ακολούθησε φιλτράρισμα (por 4),

εξάτμιση των διαλυτών και στο τέλος μετρήθηκαν τα βάρη. Κάθε ζώνη αναλύθηκε με ^1H NMR. Από όλες τις ζώνες που παραλήφθηκαν από τις παραπάνω prep-TLCs μόνο η ζώνη Α του κλάσματος F32 οδήγησε συστατικό σε καθαρή μορφή (**Μεταβολίτης 1**).

- Παρασκευαστική TLC του εκχυλίσματος [HON28 OPh2 XAD7 MeOH](#)

Στο εκχύλισμα **HON28_Oph2_XAD7_MeOH**, πραγματοποιήθηκε μόνο prep-TLC δεδομένης της χαμηλής απόδοσης (66.4 mg). 30 mg του εκχυλίσματος τοποθετήθηκαν σε γυάλινη πλάκα και η ανάπτυξη έγινε με το σύστημα Tol:EtOAc:FA (6:5:1 v/v). Ορίστηκαν οι ζώνες Α-Μ και έπειτα από παρόμοια διαδικασία όπως παραπάνω τα δείγματα αναλύθηκαν με ^1H NMR. Όπως έδειξε η ανάλυση μόνο ηζώνη Κ οδήγησε συστατικό σε καθαρή μορφή (**Μεταβολίτης 2**).

C.3) Μεταβολίτης 1 – Κυνουρενικό οξύ



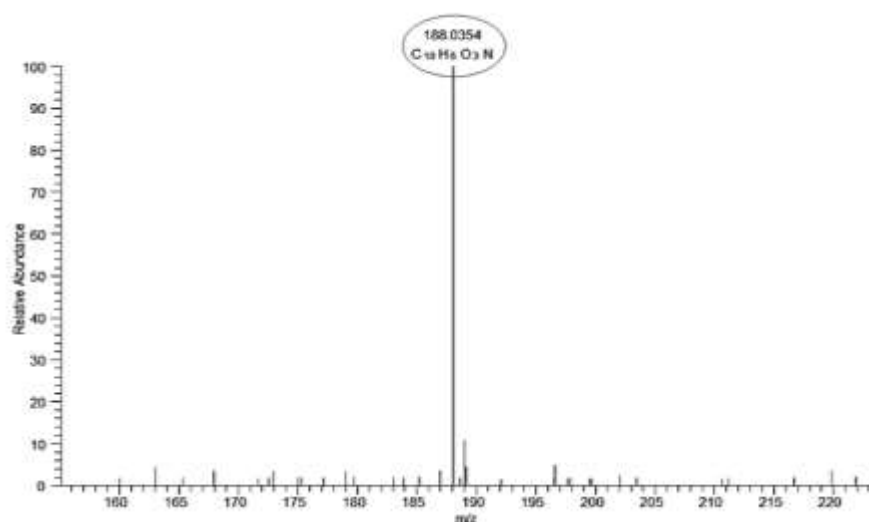
Εικόνα 24. Δομή του κυνουρενικού οξέος (KYNA)

Το κυνουρενικό οξύ (KYNA – Εικόνα 24), είναι ένας ενδογενής ανταγωνιστής γλουταμινικών υποδοχέων και είναι ένα τελικό προϊόν που παράγεται από την τριπτοφάνη μέσω του μονοπατιού τριπτοφάνη-κυνουρενίνη. Αυτό το μονοπάτι αποτελεί την κύρια οδό αποδόμησης τριπτοφάνης, η οποία δημιουργεί την παραγωγή αρκετών νευροδραστικών ενώσεων. Προτείνεται ότι το κυνουρενικό οξύ συμμετέχει στην παθοφυσιολογία των ψυχιατρικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της σχιζοφρένειας (Erhardt, Olsson, & Engberg, 2009). Έχει βρεθεί ότι το κυνουρενικό οξύ σε υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζει αντι-σπασμωδικές, νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις (Beretta, Caneva, & Facino, 2007; Lugo-Huitrón et al., 2011).

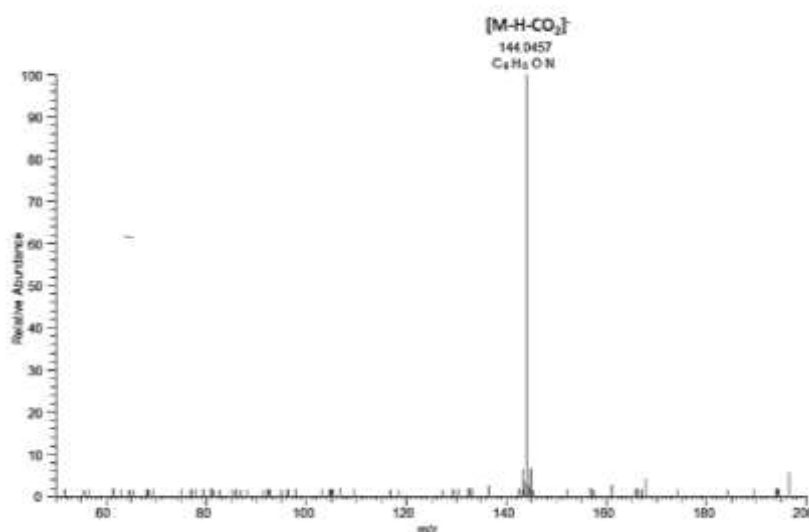
Μεγάλη σημασία κατέχει η παρουσία της ουσίας αυτής σε δείγματα μελιού και σε άλλα προϊόντα μελισσών. Το κυνουρενικό οξύ παράγεται και σε φυτικούς οργανισμούς και έχει προταθεί

ότι μπορεί να αποτελεί μια μορφή άμυνας του φυτού από παθογόνους μύκητες και παράσιτα. Η ύπαρξή του στο μέλι είναι πιθανό να αιτιολογεί τη δράση του μελιού ως αναλγητικό (Beretta et al., 2007). Επίσης, έχει απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε μέλι καστανιάς (chestnut honey) και έχει προταθεί ως βιοδείκτης του συγκεκριμένου μελιού (Cho et al., 2015).

Το φάσμα μάζας του μορίου ελήφθησε με HRMS με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε αρνητικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB =188.0354 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_{10}H_6NO_3$ (RDBeq=9.5) (Εικόνα 25). Το φάσμα HRMS/MS παρουσιάζει το θραύσμα σε m/z 144.0457 (100%), το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν $[M-H-CO_2]^-$ (Εικόνα 26).

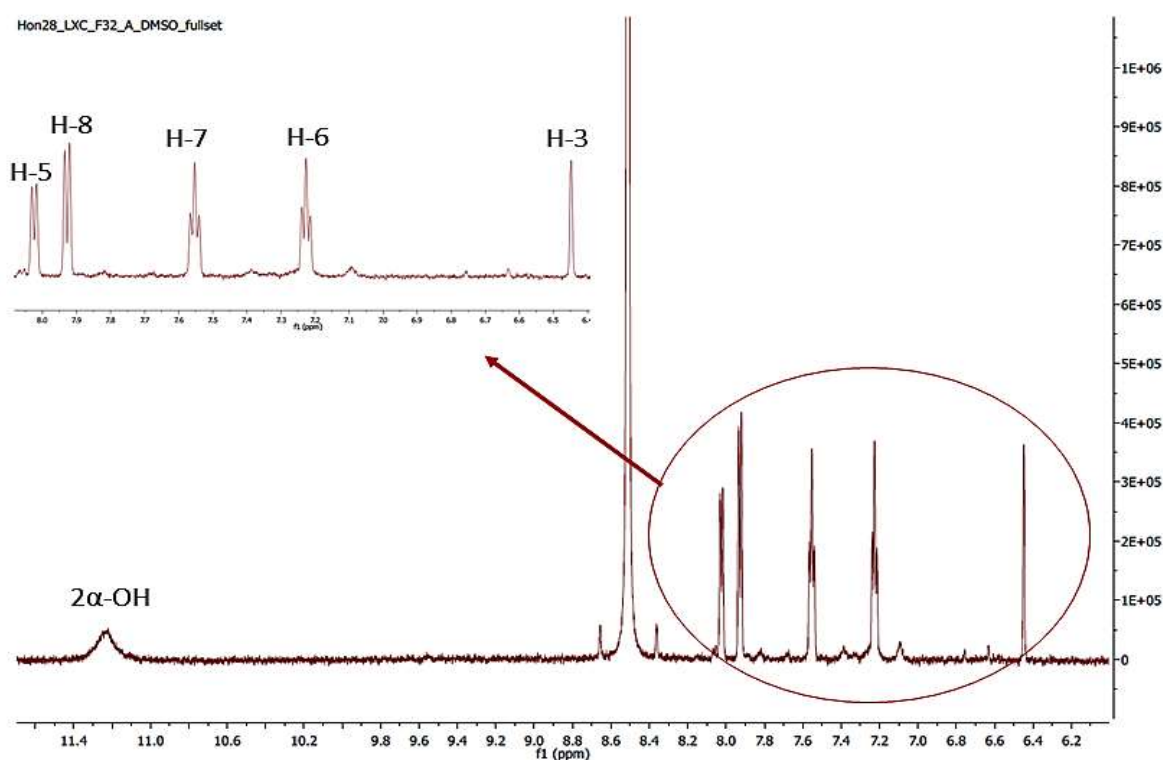


Εικόνα 25. Φάσμα μάζας Κυνουρενικού οξέος



Εικόνα 26. Φάσμα μάζας χαρακτηριστικού θραύσματος του κυνουρενικού οξέος

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα NMR μίας και δύο διαστάσεων και συγκεκριμένα COSY, HSQC και HMBC (Παράρτημα ΠΠ12) βάσει των οποίων προσδιορίστηκε η δομή του κυνoureνικού οξέος. Το φάσμα ^1H NMR λήφθηκε με χρήση $\text{DMSO}-d_6$ ως διαλύτη και παρουσιάζεται στη συνέχεια.

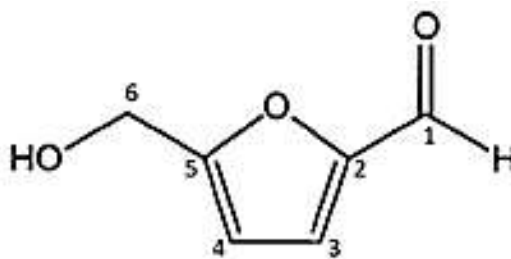


Εικόνα 27. Φάσμα ^1H NMR του Κυνουρενικού Οξέος

Τα φάσματα ^1H (Εικόνα 27) και ^{13}C -NMR επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση του κυνoureνικού οξέος, καθώς συμφωνούν με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας (Cho et al., 2015). Εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές (δ 7.93 και 8.02) με σταθερά σύζευξης $J = 8.19$ Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα H-5 και H-8 του αρωματικού δακτυλίου. Ακόμη, εντοπίζονται δύο τριπλές κορυφές στην αρωματική περιοχή, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-7 και H-6 του βενζολικού δακτυλίου (δ 7.23 και 7.55). Τέλος, παρατηρείται μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-3 (δ 6.45) του διπλού δεσμού. Τέλος, αποθωρακισμένο ως μια ευρεία απλή κορυφή εμφανίζεται το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας του μορίου και συγκεκριμένα στα 11.14 ppm. Όλες οι κορυφές ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο ενώ η πολλαπλότητα συμβαδίζει με το είδος των πρωτονίων. Από το φάσμα COSY NMR παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων H-8 με H-7, H-7 με H-6 και H-6 με H-5. Επίσης, βάσει των φασμάτων HSQC και HMBC βρέθηκαν οι τιμές των ανθράκων των πρωτονίων καθώς και μακρύτερες συσχετίσεις

μεταξύ των πρωτονίων αυτών και ανθράκων σε απόσταση δύο και τριών δεσμών (C-H, 2J – 3J long range correlations), αντίστοιχα. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα (ΠΠ12 και ΕΠ5-8).

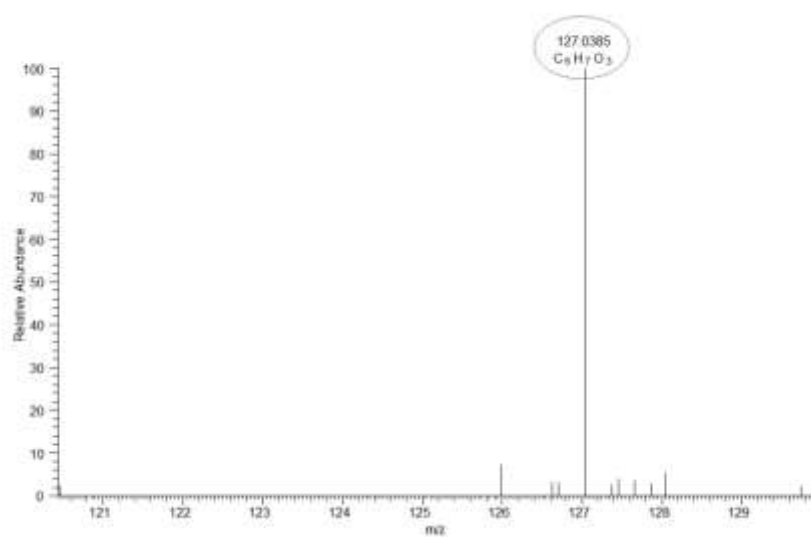
C.4) Μεταβολίτης 2 – 5-Υδροξυμεθυλφουρφουράλη



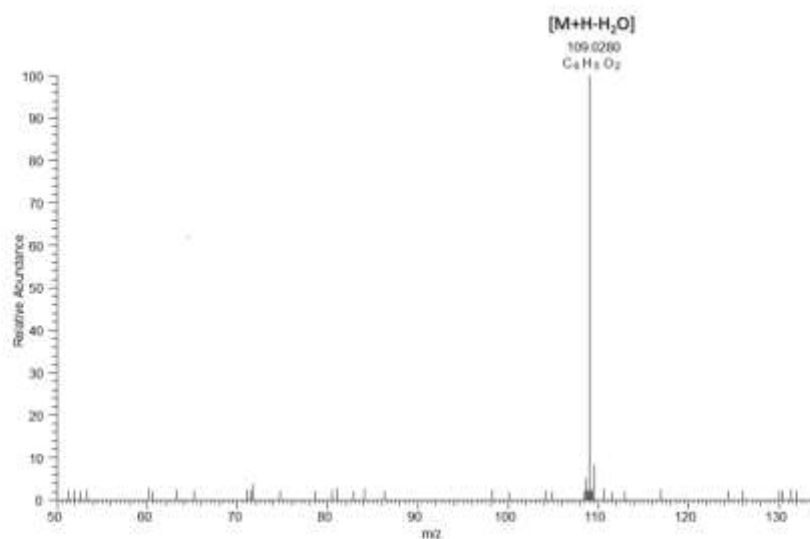
Εικόνα 28. Δομή της 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλης (5-HMF)

Όπως έχει αναφερθεί, η HMF (Εικόνα 28) είναι ένα από τα πιο κοινά ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης Maillard. Είναι ένας πρώιμος δείκτης αυτής της αντίδρασης, καθώς σχηματίζεται κατά τα αρχικά της στάδια, και εμφανίζεται σε πολλές τροφές με υδατάνθρακες. Επιπλέον, αυτή η κυκλική αλδεΐδη παράγεται επίσης κατά την αφυδάτωση εξοζών υπό όξινες συνθήκες, ακολουθούμενη από υδρόλυση γλυκοζαμίνης και εμφανίζεται φυσικά σε προϊόντα στα οποία το νερό συνυπάρχει με μονοσακχαρίτες σε όξινο μέσο. Επιπλέον, είναι μια αναγνωρισμένη παράμετρος της φρεσκάδας και της ποιότητας των τροφίμων. Ο αναλυτικός έλεγχος της HMF έχει χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση τροφίμων για την αξιολόγηση τόσο της ποιότητας της επεξεργασίας όσο και ορισμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος. Έτσι, η παρουσία της HMF έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ακατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης ή θερμοκρασίας σε διάφορα τρόφιμα, όπως μαρμελάδα και παιδικές τροφές (Teixidó, Moyano, Santos, & Galceran, 2008).

Το φάσμα HRMS του μορίου ελήφθη με με την μέθοδο του ηλεκροψεκασμού (ESI), σε θετικό ιονισμό. Έτσι καθορίστηκε το μοριακό βάρος της ουσίας MB=127.0385 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_6H_7O_3$ (RDBeq=3.5) (Εικόνα 29). Το φάσμα HRMS/MS παρουσιάζει χαρακτηριστικό θραύσμα σε m/z 109.0280 (100%), το οποίο αντιστοιχεί στο ιόν $[M+H-H_2O]^+$ (Εικόνα 30).

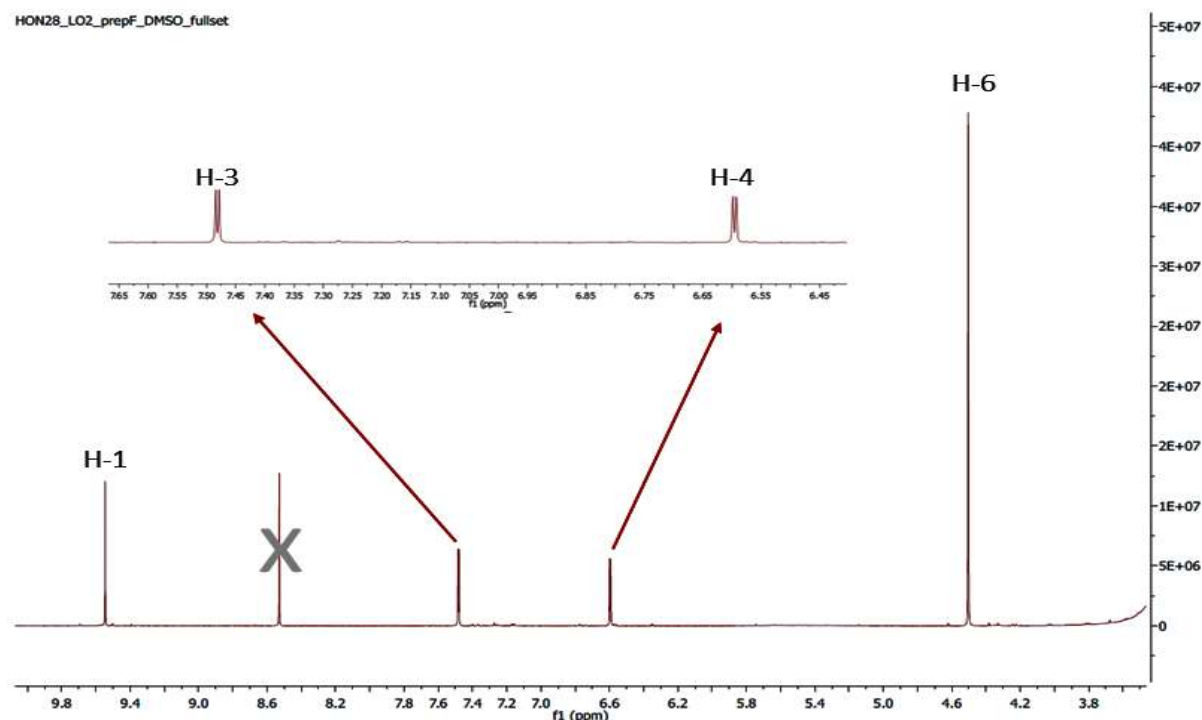


Εικόνα 29. Φάσμα μάζας της 5-HMF



Εικόνα 30. Φάσμα μάζας χαρακτηριστικού θραύσματος της HMF

Τα φάσματα μίας (¹H NMR) και δύο διαστάσεων NMR (COSY, HSQC και HMBC) (Παράρτημα ΠΠ13) ελήφθησαν με στόχο την ταυτοποίηση του μορίου.



Εικόνα 31. Φάσμα ^1H NMR της 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλης (5HMF)

Τα φάσματα NMR επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση της HMF, καθώς συμφωνούν με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας (Tong et al., 2011; Vigier, Benguerba, Barrault, & Jéréôme, 2012). Το φάσμα πρωτονίου (Εικόνα 31) χαρακτηρίζεται από πολύ λίγες κορυφές οι οποίες όλες εμφανίζονται σε χαμηλά πεδία. Εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές σε δ 7.48 και 6.60, με σταθερά σύζευξης $J = 3.55$ Hz, οι οποίες αντιστοιχούν στα H-3 και H-4 του φουρανίου. Μία απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-1 (δ 9.55) της αλδεϋδομάδας και μια επιπλέον απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-6 (δ 4.50) και είναι η μόνη που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια. Όλες οι άλλες κορυφές ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο. Από το φάσμα COSY NMR είναι ορατή μόνο η σύζευξη του H-3 με το H-4. Επίσης, με βάση τα φάσματα HSQC και HMBC βρέθηκαν οι τιμές των ανθράκων των πρωτονίων καθώς και μακρύτερες συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων αυτών και ανθράκων σε απόσταση δύο και τριών δεσμών, αντίστοιχα. Τα πλήρη φασματοσκοπικά δεδομένα του μορίου παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα (ΠΠ 163 και ΕΠ9 -12).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Ν°2

3.1) ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Πρώτο στόχο της μελέτης αποτέλεσε η συλλογή δειγμάτων μελιού. Η συλλογή επικεντρώθηκε στα νησιά του Α. Αιγαίου για τα οποία δεν υπάρχει προηγούμενη μελέτη. Θα πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι τα μετα-δεδομένα (metadata) δηλαδή οι πληροφορίες που συνοδεύουν τα δείγματα και η λεπτομερής καταγραφή τους είναι αποφασιστικής σημασίας σε μια μεταβολομική μελέτη και θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο πλήρη και σαφή.



Εικόνα 32. Χάρτης της Ελλάδας που δείχνει τα νησιά όπου έγινε η συλλογή δειγμάτων.

Για την παρούσα εργασία συλλέχθηκαν 76 δείγματα μελιού με διαφορετική βοτανική και γεωγραφική προέλευση. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε μεταξύ 2016 και 2017, από τα ακόλουθα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου: Άγιος Ευστράτιος, Ικαρία, Λέσβος, Σάμος, Λήμνος, Φούρνοι Κορσεών, Χίος και Ψαρά (Εικόνα 32). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) παρουσιάζονται πιο αναλυτικά ο αριθμός των δειγμάτων, ο τόπος προέλευσης καθώς και ο τύπος του μελιού. Τα μεταδεδομένα του κάθε δείγματος παρουσιάζονται στο παράρτημα (ΠΠ14).

Πίνακας 7. Βοτανική και γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων

Γεωγραφική Προέλευση	Βοτανική προέλευση	Δείγματα
Άγιος Ευστράτιος	Μέλι φυτών	1
Ικαρία	Ανοιξιάτικο μέλι / Αναματόμελο	6
Λέσβος	Μέλι καστανιάς/ Ανθόμελο / Μέλι φυτών	21
Λήμνος	Θυμαρίσιο μέλι	5
Σάμος	Μέλι φυτών	17
Φούρνοι Κορσεών	Θυμαρίσιο μέλι	8
Χίος	Μέλι φυτών	15
Ψαρά	Θυμαρίσιο μέλι	3

3.2) ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕΛΙΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μη στοχευμένη ανάλυση μεταβολομικής. Για αυτό το λόγο, στα δείγματα μελιού δοκιμάστηκαν διαφορετικοί μέθοδοι κατεργασίας, ώστε να παραληφθούν δύο κύρια κλάσματα: κλάσματα σακχάρων και φαινολικών ουσιών, όπου τα φαινολικά κλάσματα επιλέχθηκαν ως το κλάσμα μελέτης για τη συνέχεια.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η φιλοσοφία προκατεργασίας του δείγματος για τη μεταβολομική μελέτη είναι παρόμοια εκείνης για την απομόνωση των συστατικών. Ωστόσο, εξαιτίας του πολύ μεγάλου αριθμού των δειγμάτων και της απαιτούμενης επαναληψιμότητας της συγκεκριμένης προσέγγισης προς αποφυγήν ανεπιθύμητης μεταβλητότητας, η όλη διαδικασία θα έπρεπε να επιταχυνθεί σημαντικά αλλά και να περιλαμβάνει όσο το δυνατόν λιγότερα βήματα. Επίσης, θα έπρεπε να εξασφαλίζεται ικανή ποσότητα εκχυλίσματος ώστε να ικανοποιεί τις απαιτήσεις ευαισθησίας της τεχνικής NMR. Στην περίπτωση αυτή, ο ποιοτικός έλεγχος πραγματοποιούνταν σε όλα τα στάδια με TLC, HPLC και ^1H NMR.

A) Εφαρμογή ρητινών

- Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης (XAD4)

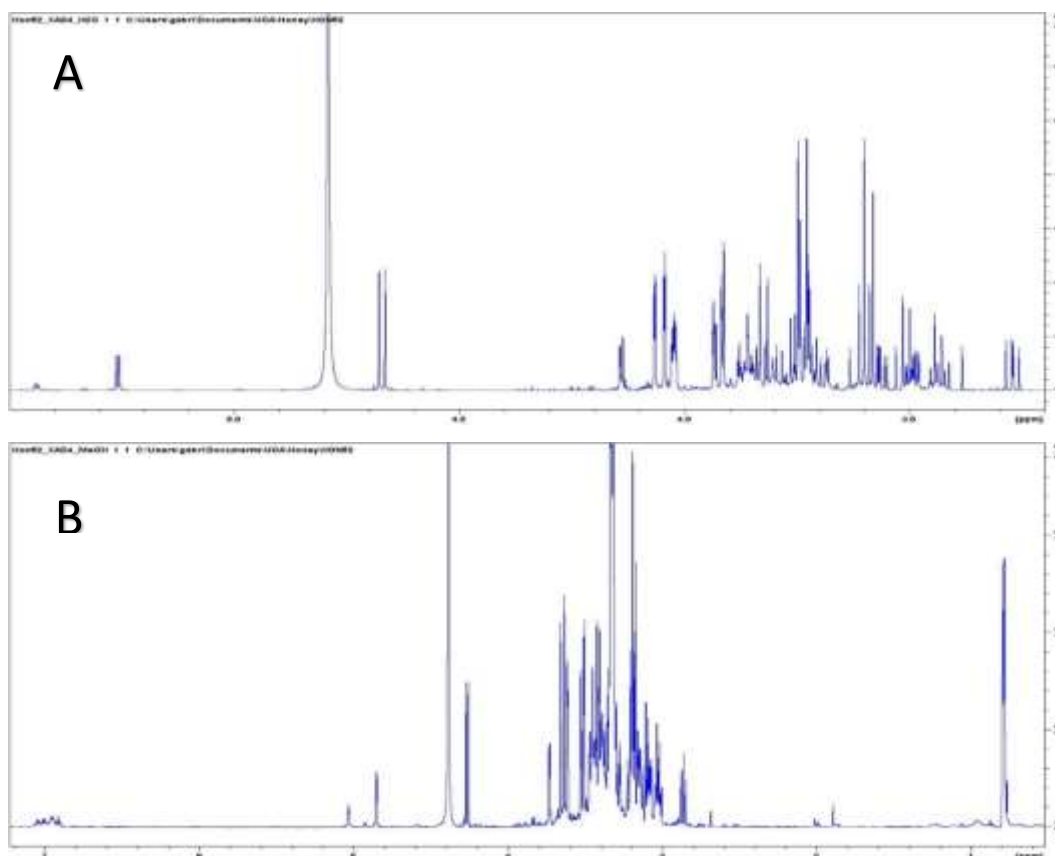
Όπως και στην περίπτωση της απομόνωσης έτσι και για την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου της μεταβολομικής αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι ρητίνες προσρόφησης. Συγκεκριμένα, 10 g μελιού διαλύθηκαν σε 100 ml ύδατος, και εν συνεχεία προστέθηκαν 20 g της ρητίνης **XAD4**. Το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά για 3 ώρες στα 150 rpm. Στη συνέχεια, το μίγμα ρητίνης/δείγματος

φιλτραρίστηκε, η ρητίνη διηθήθηκε και πλύθηκε τρεις φορές με 200 ml H₂O. Στη συνέχεια, η ρητίνη μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 100 ml MeOH. Το διάλυμα εκχυλίστηκε με χρήση υπερήχων για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, διηθήθηκε με φίλτρο και η ρητίνη πλύθηκε με 100 ml MeOH. Το τελευταίο βήμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν. Τελικά οι μεθανολικές φάσεις αναμείχθηκαν και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού όπως και η υδατική φάση. Τα βάρη παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g) -Απόδοση %
1	HON52_xad4_H ₂ O	9.3492 – 93.5%
2	HON52_xad4_MeOH	0.1170 -1.1%

Για την ανάλυση ¹H-NMR (Εικόνα 33), η μεθανολική φάση και η υδατική φάση διαλύθηκαν σε 0.6 ml MeOD και D₂O αντίστοιχα. Από τα φάσματα παρατηρείται ένας μη επιτυχής διαχωρισμός των σακχάρων και των φαινολών ενώ η μεθανολική φάση δίνει ένα φτωχό σε μεταβολίτες προφίλ, και αυτός είναι ο λόγος που απορρίφθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος.



Εικόνα 33. Φάσματα ¹H NMR της Α) υδατικής και Β) μεθανολικής φάσης

- **Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης (XAD4) και οξινισμένο νερό**

Η διαδικασία επαναλήφθηκε με τη διαφοροποίηση ότι το μέλι διαλύθηκε σε οξινισμένο νερό (συμπυκνωμένο HCl, pH = 2). Η υπόλοιπη διαδικασία παραμένει ίδια με το άνωθεν πρωτόκολλο. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο αυτών πρωτοκόλλων.

- **Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης (XAD4) και υγρή-υγρή εκχύλιση**

6 g μελιού διαλύθηκαν σε 30 ml οξινισμένου ύδατος (pH = 2) και αναδεύτηκαν για μία ώρα. Προστέθηκαν 9 g ρητίνης και συνεχίστηκε η ανάδευση για άλλη μια ώρα. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλήφθηκε όπως προηγουμένως. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μια υγρή-υγρή εκχύλιση (EtOAc 3x5ml) στο μεθανολικό κλάσμα που λαμβάνεται από την εφαρμογή ρητίνης. Τα βάρη παρουσιάζονται στο παράρτημα (ΠΠ15). Πραγματοποιήθηκε παράλληλα ανάλυση HPLC για το μεθανολικό και το κλάσματα EtOAc (παράρτημα ΠΠ16, ΕΠ13). Με βάση τα χρωματογραφήματα, φαίνεται ότι η επεξεργασία με ρητίνη δίνει έναν επιτυχή διαχωρισμό των ενώσεων, ενώ η υγρή-υγρή εκχύλιση εμπλουτίζει επιλεκτικά το φαινολικό κλάσμα. Δυστυχώς, η κατεργασία με ρητίνη δεν ήταν αρκετή για την εξάλειψη όλων των σακχάρων και αυτό οδήγησε στο σχηματισμό του γαλακτώματος κατά τη διάρκεια της υγρής-υγρής εκχύλισης.

- **Κατεργασία με ρητίνη προσρόφησης (XAD7) και υγρή-υγρή εκχύλιση**

Στην περίπτωση αυτή η ρητίνη XAD4 αντικαταστάθηκε από την XAD7 και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Τα βάρη παρουσιάζονται και τα χρωματογραφήματα HPLC δίνονται στο παράρτημα (Παράρτημα ΠΠ17, ΕΠ14). Από τα χρωματογραφήματα είναι σαφές ότι η κατεργασία με ρητίνη XAD7 είναι καταλληλότερη, αφού παρουσιάζει ένα πλουσιότερο προφίλ σε σύγκριση με την XAD4. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει, επειδή το Amberlite XAD4 είναι ένα συμπολυμερές στυρενίου και διβινυλοβενζολίου, και λειτουργεί ως μη πολικό προσροφητικό, ενώ το Amberlite XAD7 είναι ένα πολυμερές ακρυλικού εστέρα, το οποίο είναι πιο πολικό και έχει περισσότερο υδρόφιλη δομή (Daignault et al., 1988). Παρόλα αυτά, παρατηρείται επίσης μη επιτυχή απομάκρυνση των σακχάρων ενώ η μεθανολική φάση δίνει ένα σχετικά φτωχό σε μεταβολίτες προφίλ, οπότε και αυτή η μέθοδος απορρίφθηκε. *Όλες οι προηγούμενες μέθοδοι που δοκιμάστηκαν απορρίφθηκαν διότι είναι χρονοβόρες, επιλεκτικές και επίπονες ενώ παρουσίαζαν μειωμένη επαναληψιμότητα.*

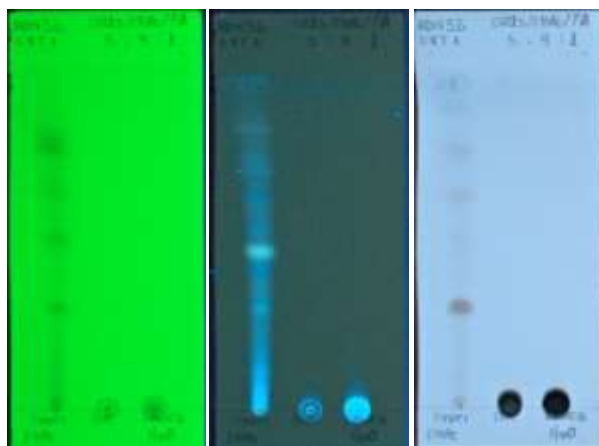
B) Υγρή-υγρή εκχύλιση

- **Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)**

6 g μελιού διαλύθηκαν σε 15 ml νερού και εκχυλίστηκαν με EtOAc (3x15 ml). Οι οργανικές φάσεις αναμείχθηκαν και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού ενώ αναλύθηκαν ποιοτικά μέσω χρωματογραφίας TLC στο σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{FA}$ (5:4:1 v/v) με ψεκασμό με αντιδραστήριο γενικής εμφάνισης. Με βάση τα βάρη (Πίνακας 9), παρατηρείται πως ένα μεγάλο μέρος του δείγματος χάνεται λόγω του σχηματισμού γαλακτώματος ανάμεσα στις φάσεις, που δεν μπορεί να εξαλειφθεί με φυγοκέντρηση.

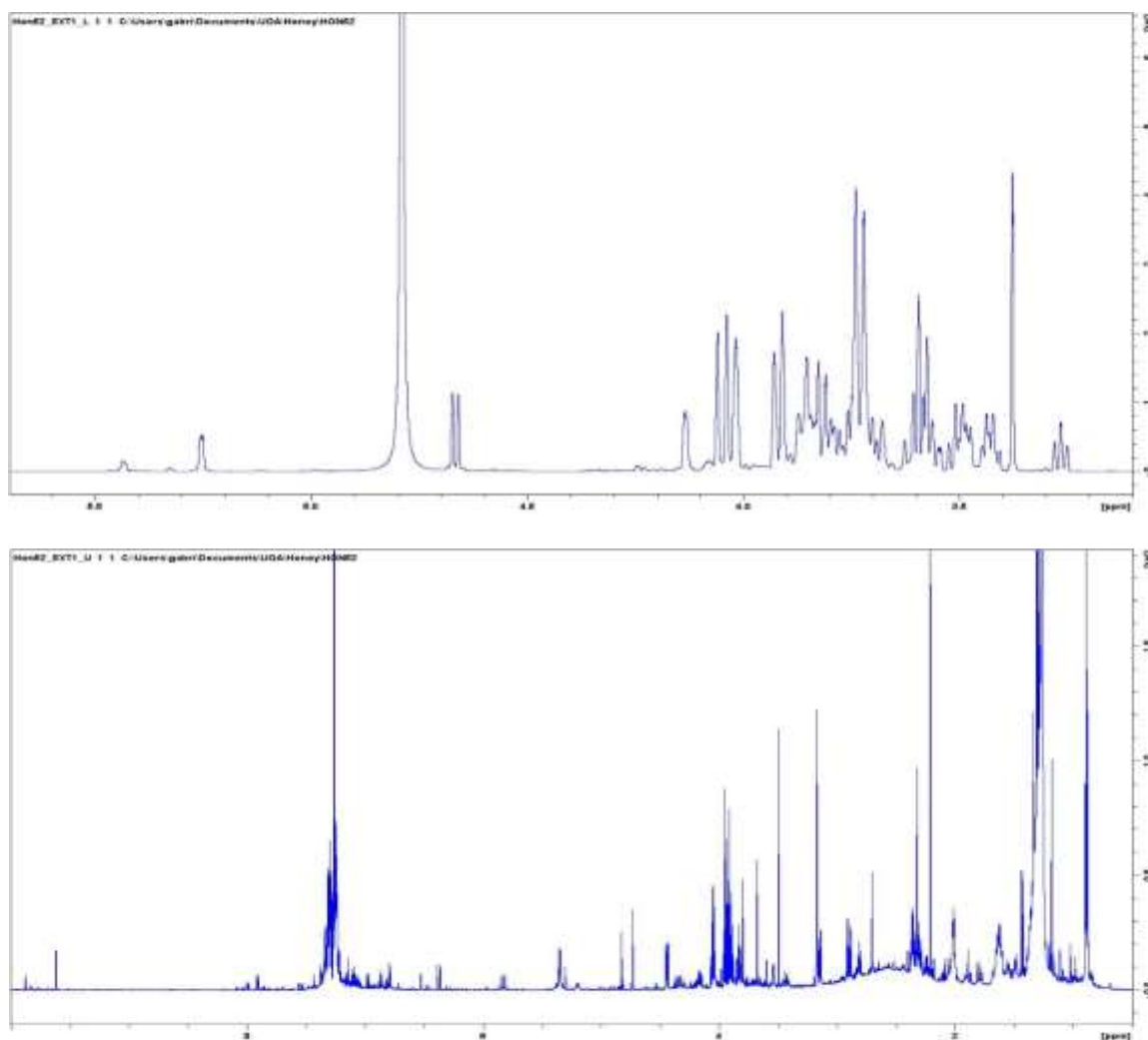
Πίνακας 9. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g) -Απόδοση %
1	HON52_Ext1_EtOAc	0.0038 -0.06%
2	HON52_Ext1_H ₂ O	4.8951 -81.58%



Εικόνα 34. Εικόνες TLC που αποκτήθηκαν στα 254nm, 360 nm, και μετά από ψεκασμό.

Από την TLC (Εικόνα 34), φαίνεται η παρουσία σακχάρων ενώ με τη μελέτη των φασμάτων ^1H NMR (η οργανική και η υδατική φάση διαλύθηκαν σε 0.6 ml CDCl_3 και D_2O αντίστοιχα) (Εικόνα 35), φαίνεται ότι είναι δυνατόν να διαχωριστούν αποτελεσματικά τα σάκχαρα και τα φαινολικά συστατικά. Παρ' όλο που ο διαχωρισμός είναι ικανοποιητικός, αυτός ο τρόπος εκχύλισης απορρίφθηκε λόγω του σχηματισμού του γαλακτώματος, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πρόκειται για ένα μίγμα πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών (Camprone et al., 2014; Zacharis et al., 2012). Το γαλάκτωμα αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια μεγάλου μέρους των φαινολικών συστατικών και επίσης δυσχεραίνει το διαχωρισμό των φάσεων, που μπορεί να οδηγήσει τελικά σε σφάλμα στην ανάλυση.



Εικόνα 35. Φάσματα ^1H NMR της υδατικής (πάνω) και οργανικής φάσης (κάτω).

- **Οξικός αιθυλεστέρα (EtOAc) - βουτανόλη (BuOH)**

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το προηγούμενο πρωτόκολλο, αρχικά με βουτανόλη και στη συνέχεια με οξικό αιθυλεστέρα. Το πρόβλημα της δημιουργίας γαλακτώματος παραμένει ενώ η όλη διαδικασία δυσχαιρένεται επιπλέον εξαιτίας της δυσκολίας εξάτμισης της βουτανόλης.

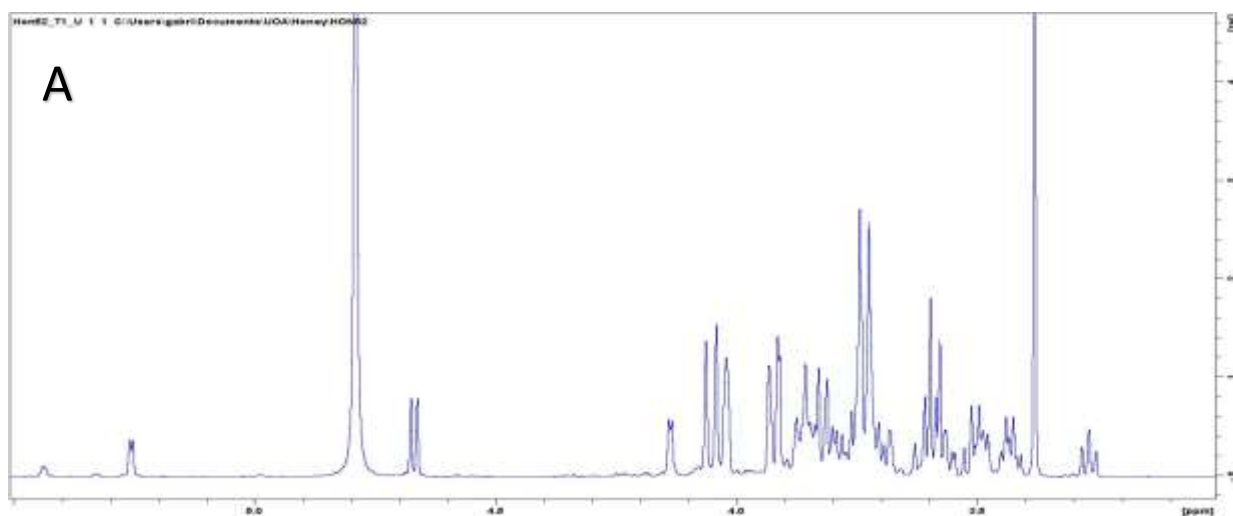
- **Χλωροφόρμιο (CHCl_3)**

6 g μελιού διαλύθηκαν σε 15 ml αποσταγμένου νερού σε σωλίνια Falcon tubes-50ml και προστέθηκαν 15 ml CHCl_3 . Στη συνέχεια, το μίγμα αναδεύτηκε μηχανικά χρησιμοποιώντας αναδευτήρα περιδίνησης για 10 λεπτά για κάθε σωλήνα. Μετά την ανάδευση, οι σωλίνες φυγοκεντρήθηκαν στα 4000 rpm για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρηση, οι δύο φάσεις (U=υδατική, L=οργανική) συλλέχθηκαν και εξατμίστηκαν. Η διαδικασία έγινε εις

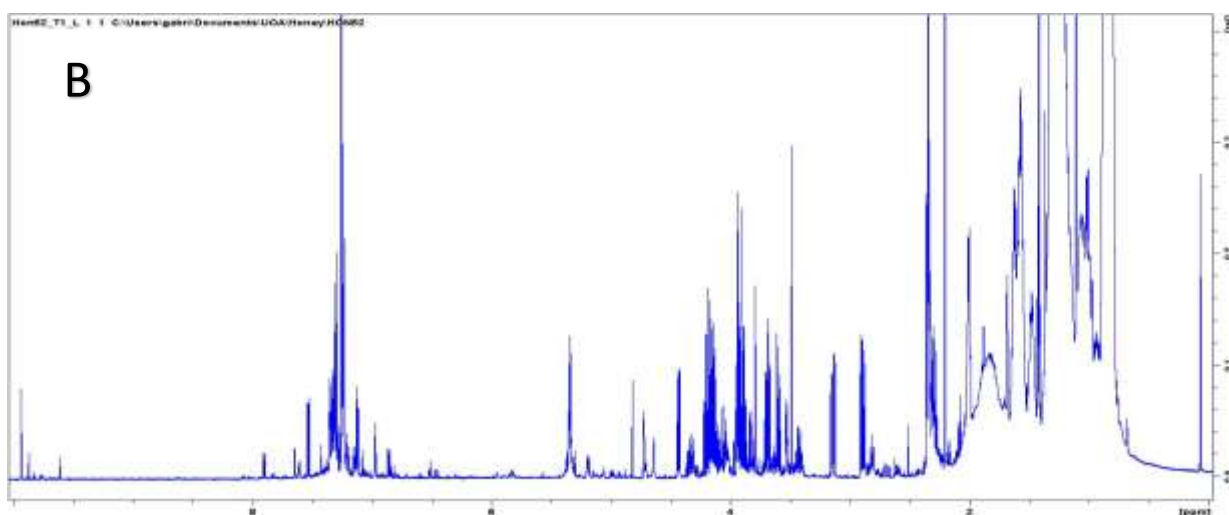
διπλούν (Trial 1- T1 / Trial 2 – T2). Δυστυχώς, μια σημαντική ποσότητα δείγματος χάθηκε (Πίνακας 10), λόγω του σχηματισμού του γαλακτώματος μεταξύ των φάσεων.

Πίνακας 10. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g) – Απόδοση %
1	HON52_T1_U	4.9987 – 83.31%
2	HON52_T1_L	0.0052 – 0.86%
3	HON52_T2_U	4.2156 – 70.26%
4	HON52_T2_L	0.0058 -0.10%



Εικόνα 36. Φάσματα ^1H NMR του κλάσματος HON52_T1_U



Εικόνα 37. Φάσματα ^1H NMR του κλάσματος HON52_T1_L

Για την ανάλυση ^1H -NMR τα κλάσματα HON52_T1_L και HON52_T1_U διαλύθηκαν σε 0.6 ml CDCl_3 και D_2O αντίστοιχα. Παρατηρώντας τα φάσματα (Εικόνες 36 και 37), είναι σαφές ότι ο διαχωρισμός μεταξύ σακχάρων και φαινολικών ενώσεων ήταν επιτυχής. Το οργανικό κλάσμα παρουσιάζει πλούσιο προφίλ, ενώ το υδατικό αποτελείται κυρίως από σάκχαρα. Το φάσμα του οργανικού κλάσματος (HON52_T1_L), θα χρησιμοποιηθεί ως προφίλ αναφοράς.

Βάσει των παραπάνω δοκιμών επιλέχθηκε το τελευταίο πρωτόκολλο να χρησιμοποιηθεί για τη μεταβολομική μελέτη καθώς εκτός από τον επιτυχή διαχωρισμό των ενώσεων, είναι μια γρήγορη διαδικασία και επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό των δειγμάτων. Στη συνέχεια ακολούθησαν διάφορες άλλες δοκιμές για την ολοκλήρωση άλλων παραμέτρων του πρωτοκόλλου.

○ Επαναληψιμότητα προκατεργασίας:

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας του πρωτοκόλλου παραλαβής των φαινολικών συστατικών του μελιού, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά μέλια, και εφαρμόστηκε πιστά το επιλεγμένο πρωτόκολλο. Η διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας τα δείγματα μελιού HON01 και HON52. Αξίζει να σημειωθεί η παρουσία γαλακτώματος ενώ τα βάρη των κλασμάτων δίνονται στα παραρτήματα (Παράρτημα ΠΠ18). Για ανάλυση ^1H NMR, οι υδατικές και οι οργανικές φάσεις διαλύθηκαν σε 0.6 ml D_2O και CDCl_3 , αντίστοιχα. Είναι σαφές ότι τα φάσματα (Παράρτημα ΕΠ15,16) που λαμβάνονται από τις υδατικές φάσεις έχουν παρόμοιο προφίλ, αν και είναι μέλια με διαφορετική βοτανική προέλευση. Από την άλλη πλευρά, συγκρίνοντας τα φάσματα των οργανικών φάσεων, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν ορισμένες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων, ειδικά στην αρωματική και αλειφατική περιοχή.

○ Προσδιορισμός της αρχικής ποσότητας:

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τα αποτελέσματα μιας μεταβολομικής μελέτης είναι το πλήθος των μορίων που ανιχνεύονται κάτι που σχετίζεται άμεσα με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική. Ειδικά στις μελέτες με NMR που διακρίνεται από χαμηλή ευαισθησία είναι απαραίτητο να καθοριστεί η κατάλληλη αρχική ποσότητα μελιού που να εξασφαλίζει τη βέλτιστη ποιότητα φασμάτων και παράλληλα να είναι δυνατή η ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολίτων του δείγματος. Έτσι, επαναλήφθηκε η διαδικασία εκχύλισης χρησιμοποιώντας 0.5 και 0.2g μελιού ως αρχική ποσότητα (Παράρτημα ΠΠ19). Τα φάσματα ^1H NMR που λαμβάνονται παρουσιάζουν το ίδιο προφίλ μεταξύ τους, γεγονός που επιτρέπει μικρότερη αρχική ποσότητα μελιού.

Όμως, σε σύγκριση με το φάσμα αναφοράς, μπορούν να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές (Παράρτημα ΕΠ17). Για να προσδιοριστεί εάν το πρόβλημα ήταν η χρησιμοποιούμενη ποσότητα της πρώτης ύλης (Παράρτημα ΠΠ20), επαναλήφθηκε η εκχύλιση με αυξημένες ποσότητες. Όλα τα φάσματα (Παράρτημα ΕΠ18) που προέκυψαν από τις προσπάθειες δείχνουν πολύ παρόμοιο προφίλ μεταξύ τους, αλλά είναι πολύ φτωχά. Σε σύγκριση με το προφίλ αναφοράς, τα φάσματα παρουσιάζουν τις ίδιες σημαντικές διαφορές όπως προηγουμένως οπότε συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για διαφορές λόγω διαφορετικής βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης και όχι λόγω μικρής ποσότητας δείγματος. .

ο Προσδιορισμός του όγκου διαλυτών:

Για να γίνει διερευνηθεί επίσης η επίδραση της αναλογίας των διαλυτών στην απόδοση της εκχύλισης-προκατεργασίας πραγματοποιήθηκαν νέες δοκιμές με διαφορετικό όγκο συστήματος (4ml κα 1.6 ml του συστήματος $D_2O/CDCl_3$) (Παράρτημα ΠΠ21). Όλα τα φάσματα 1H NMR που λαμβάνονται δείχνουν διαφορετικά προφίλ σε σύγκριση με το φάσμα αναφοράς. Ποιο συγκεκριμένα, σήματα στα 9.5-10 ppm και αυτά στην αρωματική περιοχή εξαφανίστηκαν, και σημαντικές αλλαγές είναι ορατές στην περιοχή 2.5 - 6 ppm. Επίσης, παρέχουν πολύ φτωχό προφίλ σε σχέση με το φάσμα αναφοράς, γεγονός που οδηγεί σε απώλεια πολύτιμων πληροφοριών (Παράρτημα ΕΠ19). Επειδή οι φαινολικές ενώσεις είναι παρούσες στο μέλι σε χαμηλό ποσοστό σε σύγκριση με τα σάκχαρα, και επειδή το NMR είναι μια τεχνική χαμηλής ευαισθησίας, μικρές ποσότητες εκχυλισμάτων δεν αρκούν για να ανιχνεύσουν όλες τις ενώσεις που περιέχονται. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο αποφασίστηκε η τυποποίηση 6 g μελιού ως αρχική ποσότητα και 30 ml ως όγκος συστήματος.

ο Διαχείριση γαλακτώματος :

Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά είναι η μη προβλέψιμη ποιοτικά και ποσοτικά δημιουργία γαλακτώματος που διαφέρει σε κάθε δείγμα και επιφέρει προβλήματα επαναληψιμότητας. Οπότε έγινε προσπάθεια να εξαλειφθεί ή να ανασταλεί ο σχηματισμός του γαλακτώματος μεταξύ των φάσεων. Προκειμένου να μειωθεί η ποσότητα του γαλακτώματος, η μέθοδος εκτελέστηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους:

Α) 6 g μελιού διαλύθηκαν σε 15 ml H_2O και στη συνέχεια προστέθηκαν 15 ml $CHCl_3$. Το διφασικό σύστημα αναδεύτηκε μηχανικά για 10 λεπτά. Μετά, οι σωλήνες αφέθηκαν να παραμείνουν για 20 ώρες. Μόλις παρέλθουν οι ώρες, οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν και έπειτα, οι φάσεις διαχωρίστηκαν και εξατμίστηκαν.

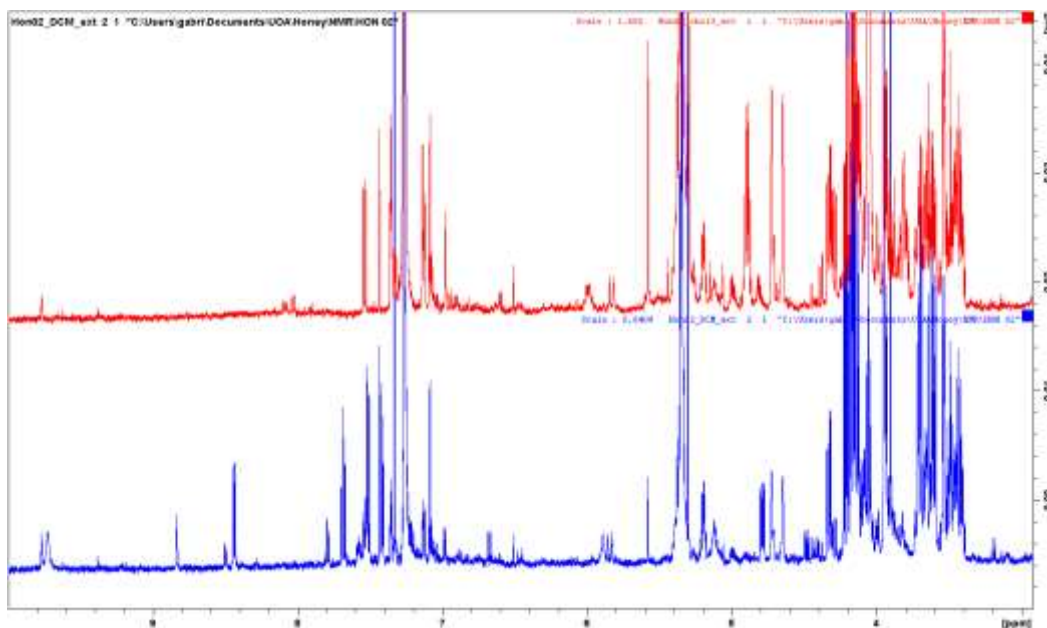
Β) Πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία, με την διαφορά στο ότι οι σωλήνες αφέθηκαν να παραμείνουν για 20 ώρες μετά την φυγοκέντρωση. Τα βάρη παρουσιάζονται στο παράρτημα (ΠΠ22,23)

Στις δύο περιπτώσεις, το γαλάκτωμα αποκτήθηκε μετά την ανάδευση. Μετά από 20 ώρες, δεν παρατηρήθηκε η αναστολή του. Στα φάσματα ^1H NMR. (Παράρτημα ΕΠ20) δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των προφίλ που προκύπτουν από τις μεθόδους. Από την άλλη πλευρά, σε σύγκριση με το προφίλ αναφοράς, είναι σαφές ότι κάποια σήματα χάνονται ή παρουσιάζουν διαφορετική πολλαπλότητα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην πιθανή αποσύνθεση των ενώσεων, καθώς τα εκχυλίσματα κρατήθηκαν στο διαλύτη για πολλές ώρες και χωρίς ψύξη.

Γ) Για να κατανοηθεί η συμπεριφορά του γαλακτώματος, διαφορετικά μέλια επιλέχθηκαν για εκχύλιση (HON02, HON08, HON38 και HON74), χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο (παράρτημα ΠΠ24). Όλα τα φάσματα ^1H NMR. που προέκυψαν (Παράρτημα ΕΠ21) παρουσιάζουν ομοιότητες μεταξύ των προφίλ τους, παρόλο που έχουν άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Το HON08 (Λέσβος) παρουσιάζει ένα πλουσιότερο προφίλ στην αρωματική περιοχή από τα άλλα, ενώ άλλα έχουν σήματα με πολύ χαμηλή ένταση περίπου στα 9.5-10 ppm. Παρόλο που το CHCl_3 λειτουργεί για το HON52, για αυτά τα δείγματα φαίνεται ότι δεν είναι ο κατάλληλος διαλύτης για την εκχύλιση, καθώς τα προφίλ φαίνονται φτωχά.

• Επιλογή οργανικού διαλύτη:

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω το πρωτόκολλο εκχύλισης, ο διαλύτης CHCl_3 αντικαταστάθηκε από διχλωρομεθάνιο (DCM) και η δοκιμή πραγματοποιήθηκε στο δείγμα HON02. Για ανάλυση ^1H -NMR οι οργανικές φάσεις διαλύθηκαν σε CDCl_3 . Το προφίλ που ελήφθη συγκρίθηκε με το φάσμα αναφοράς.



Εικόνα 38. Φάσματα ^1H NMR. από εκχύλιση με CHCl_3 (πάνω) και DCM (κάτω)

Το φάσμα ^1H NMR. που λαμβάνεται χρησιμοποιώντας DCM (Εικόνα 38), παρέχει ένα πλουσιότερο προφίλ από το CHCl_3 . Ανακαλύπτονται νέα σήματα στα 8-10ppm, τα οποία παρέχουν πληροφορίες για συγκεκριμένα είδη ενώσεων που δεν είναι ορατά στο εκχύλισμα CHCl_3 . Επίσης, η περιοχή 5-3.5 ppm φαίνεται πλουσιότερη. Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, διεξήχθησαν δοκιμές με διαφορετικά μέλια και διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους με την προηγούμενη εκχύλιση. Οι αποδόσεις που λαμβάνονται από τις εκχυλίσεις είναι (παράρτημα ΠΠ25) λόγω του ήδη γνωστού λόγου. Όμως, θα πρέπει να παρατηρηθεί ότι με EtOAc στο σύστημα, ο σχηματισμός γαλακτώματος μειώθηκε σημαντικά.

Για ανάλυση ^1H -NMR, οι οργανικές φάσεις διαλύθηκαν σε CDCl_3 . Τα προφίλ που λαμβάνονται παρουσιάζονται στο παράρτημα (παράρτημα ΕΠ22,23). Είναι σαφές ότι για το **HON02**, οι εκχυλίσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας EtOAc σε διαφορετικές αναλογίες, παρέχουν ένα πλούσιο προφίλ. Συγκεκριμένα, το σύστημα διαλυτών EtOAc/DCM (80:20 v/v) δίνει το καλύτερο προφίλ.

Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία αλλά χρησιμοποιώντας το σύστημα EtOAc/DCM (80:20) ως οργανική φάση, χρησιμοποιώντας μέλια με διαφορετική γεωγραφική και βοτανική προέλευση (Πίνακας 11). Για την ανάλυση ^1H NMR (παράρτημα ΕΠ24-26), οι οργανικές φάσεις διαλύθηκαν σε CDCl_3 .

Πίνακας 11. Δοκιμές δειγμάτων με διαφορετική και γεωγραφική προέλευση

Δείγμα	Τύπος	Νησί	Βάρη (g)
HON31	Θυμαρίσιο μέλι	Λύμνος	0.0054
HON54	Θυμαρίσιο μέλι	Φούρνοι Κόρσεων	0.0048
HON20	Μέλι φυτά	Λέσβος	0.0042
HON34	Μέλι φυτά	Σάμος	0.0051
HON18	Ανθόμελο μέλι	Λέσβος (Μυτιλήνη)	0.0032
HON13	Ανθόμελο μέλι	Λέσβος (Ερεσός / Σίγρη)	0.0038

Όλα τα δείγματα παρουσίασαν πλούσιο προφίλ και επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του γαλακτώματος.

Γ) Τελικό πρωτόκολλο και εκχύλιση δειγμάτων

Μετά τη δημιουργία του τελικού πρωτοκόλλου όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια, όλα τα δείγματα μελιού (76) εκχυλίστηκαν παράλληλα καταλήγοντας σε συνολικά 152 εκχυλίσματα. Τα βάρη παρουσιάζονται στο παράρτημα (ΠΠ26). Όλα τα παραγόμενα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους +4°C μέχρι την ανάλυση.

- ο 6 g μελιού διαλύονται σε 15 mL αποσταγμένου νερού σε σωλήνα falcon
- ο προσθήκη 15 ml EtOAc/DCM (80:20 v/v)
- ο μηχανική ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 10 λεπτά
- ο φυγοκέντριση στα 4000 rpm για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- ο συλλογή δύο φάσεων ξεχωριστά και εξάτμιση μέχρι ξηρού
- ο η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα

3.3) ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Α) Προετοιμασία των δειγμάτων

Το επόμενο βήμα μετά την προκατεργασία των δειγμάτων είναι η προετοιμασία η προετοιμασία τους σε σωλήνες NMR για την ανάλυση. Αποτελεί ένα από τα βασικά βήματα που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της ανάλυσης, γι' αυτό το λόγο, όλα τα δείγματα πρέπει να προετοιμάζονται με την ίδια ακριβώς μέθοδο και παράλληλα από τον ίδιο αναλυτή. Η διαδικασία, περιλαμβάνει διάλυση σε 600 μ L δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (chloroform-

D, 99.8%), που έχει την ικανότητα να διαλύσει πλήρως τα ληφθέντα εκχυλίσματα. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε hexamethyldisiloxane – HMDSO με συγκέντρωση 0.02% v/v.

B) Ανάλυση με NMR

Το φασματόμετρο NMR που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Bruker. Ο μαγνήτης είναι υπεραγώγιμος τύπου Ultrashield με πεδίο 14.1 T (600 MHz). Το σύστημα ηλεκτρονικών (NMR console) που συνοδεύει το συγκεκριμένο μαγνήτη είναι της γενιάς Avance III, και το σύστημα των πηνίων ανίχνευσης (NMR probe) είναι τύπου BBI (Broadband Inverse – εσωτερικό πηνίο διέγερσης και ανίχνευσης πρωτονίων) με διάμετρο εισαγώμενου σωλήνα NMR 5 mm. Η συγκεκριμένη NMR probe είναι εφοδιασμένη με τη δυνατότητα βαθμίδωσης του πεδίου κατά τον z άξονα (z-gradients). Τέλος το συγκεκριμένο σύστημα είναι εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60).

B.1) Παράμετροι ανίχνευσης

Για τη μεταβολομική μελέτη των δειγμάτων μελιού, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι:

Πίνακας 12. Παράμετροι ανίχνευσης της ανάλυσης NMR

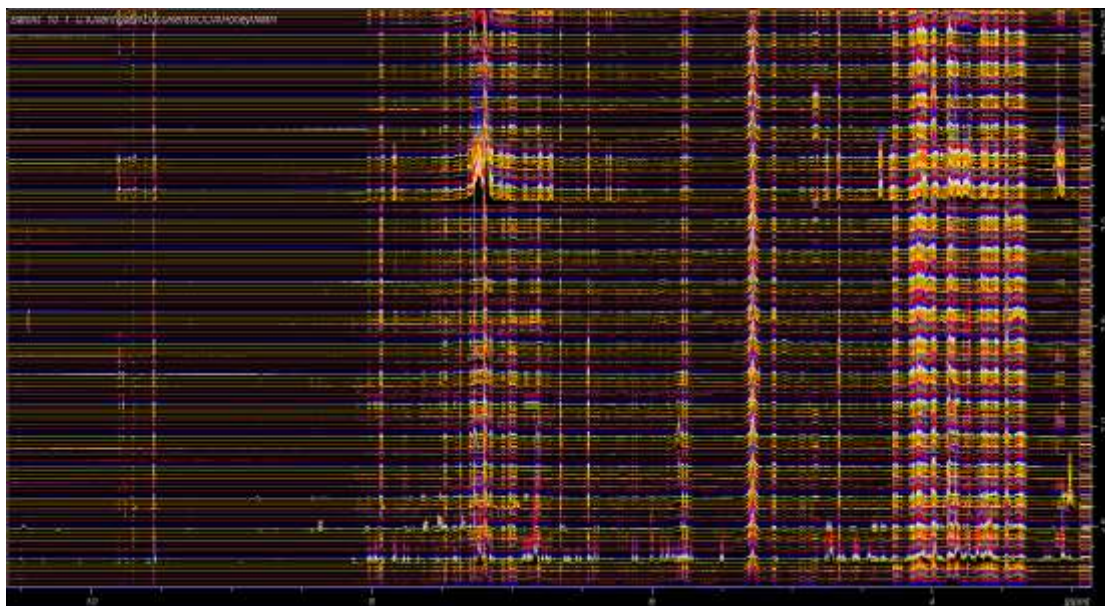
Πυρήνας διέγερσης και ανίχνευσης	^1H
Διάσταση φάσματος	1D
Αριθμός σαρώσεων	64
Αριθμός εικονικών σαρώσεων	4
Αριθμός σημείων πίνακα	65536
Χρονοκαθυστέρηση αποδιέγερσης	2 δευτερόλεπτα
Φασματικό εύρος	14 ppm
Χρόνος συλλογής δεδομένων	3,9 δευτερόλεπτα
Ενίσχυση σήματος	59
Μετατόπιση φέρουσας συχνότητας	6.5 ppm
Φέρουσα συχνότητα	600 MHz

Τα δείγματα εισήχθησαν στο φασματόμετρο NMR μέσω αυτόματου δειγματολήπτη, ελεγχόμενου από το πρόγραμμα αυτοματοποίησης ICON-NMR. Οι παράμετροι της αυτοματοποίησης

περιελάμβαναν αυτόματο συντονισμό και προσαρμογή της συνολικής εμπέδησης του συστήματος στα 50 Ω (automated tuning and matching), αυτόματη εύρεση της βέλτιστης ενίσχυσης σήματος (Receiver Gain Automated – rga) και νεκρό χρόνο 5 min πριν την έναρξη της ανάλυσης με σκοπό τη θερμική εξισορρόπηση του δείγματος στους 305 K. Τέλος, το σύστημα αυτοματοποίησης, με την εισαγωγή του εκάστοτε δείγματος παρακολουθεί τη διακύμανση/ολίσθιση της συχνότητας του δευτερίου ώστε να προσαρμόζεται αντιστοίχως και η συχνότητα συντονισμού του πρωτονίου μέσω του «κλειδώματος» στη συχνότητα του δευτερίου (deuterium lock). Συνολικά αποκτήθηκαν 152 φάσματα, όπου ο χρόνος ανάλυσης ανά δείγμα ήταν 6 λεπτά και 42 δευτερόλεπτα, και συνολικά, η ανάλυση όλων των δειγμάτων διήρκησε 17 ώρες.

Γ) Φασματοσκοπικά αποτελέσματα

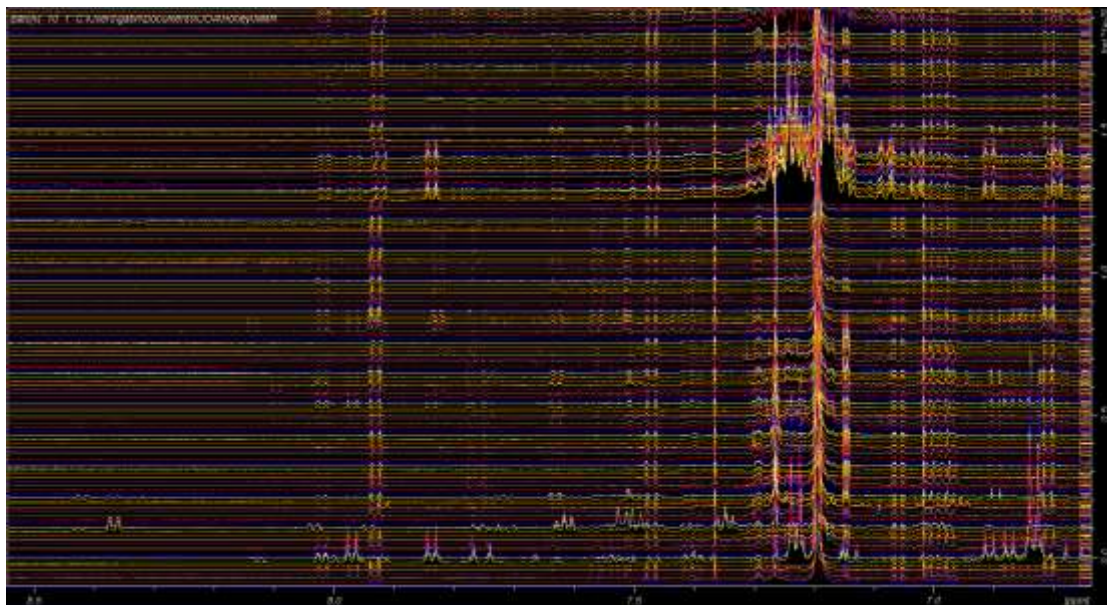
Στην εικόνα απεικονίζονται σε υπέρθεση τα 152 φασμάτων ^1H NMR (Εικόνα 39). Τα φάσματα φαίνονται αρκετά πλούσια σε δευτερογενείς μεταβολίτες ενώ φαίνονται πολύ εύκολα διαφοροποιήσεις και ομοιότητες σε διάφορες περιοχές χημικής μετατόπισης.



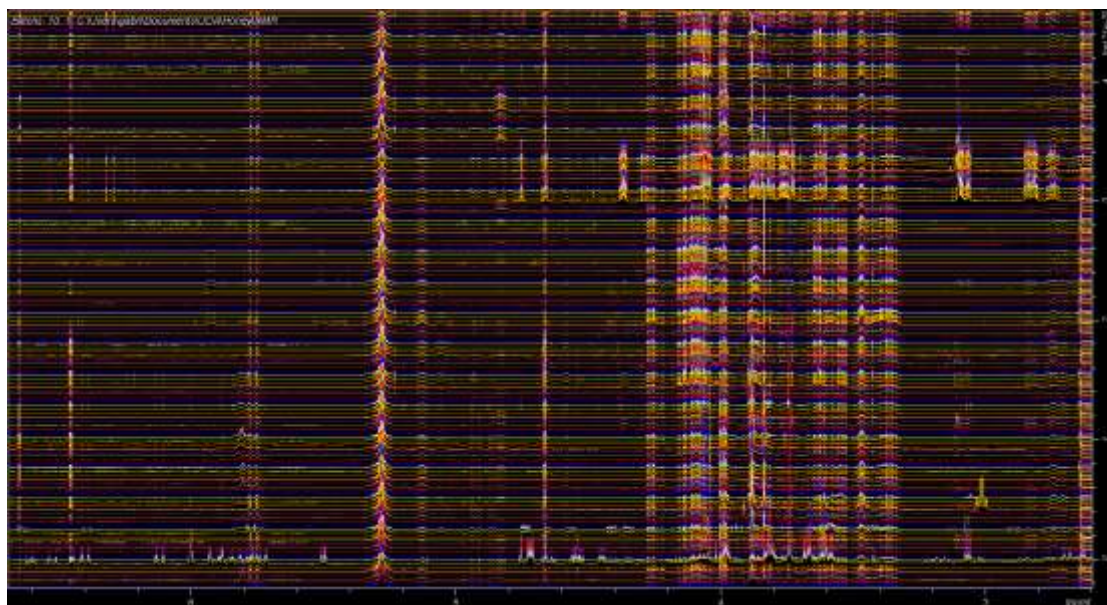
Εικόνα 39. Υπέρθεση φασμάτων ^1H NMR των αναλυθέντων δειγμάτων μελιού

Λόγω των σημαντικών διαφορών στα φάσματα των διαφορετικών μελιών, αυτά μπορούν να θεωρηθούν ως χημικά αποτυπώματα που χαρακτηρίζουν το κάθε δείγμα. Αν και η πληροφορία ολόκληρου του φάσματος είναι απαραίτητη για τη σωστή ταυτοποίηση του δείγματος, ορισμένες σαφείς διαφορές στη χημική σύνθεση των μεταβολιτών μεταξύ των διάφορων δειγμάτων είναι ήδη

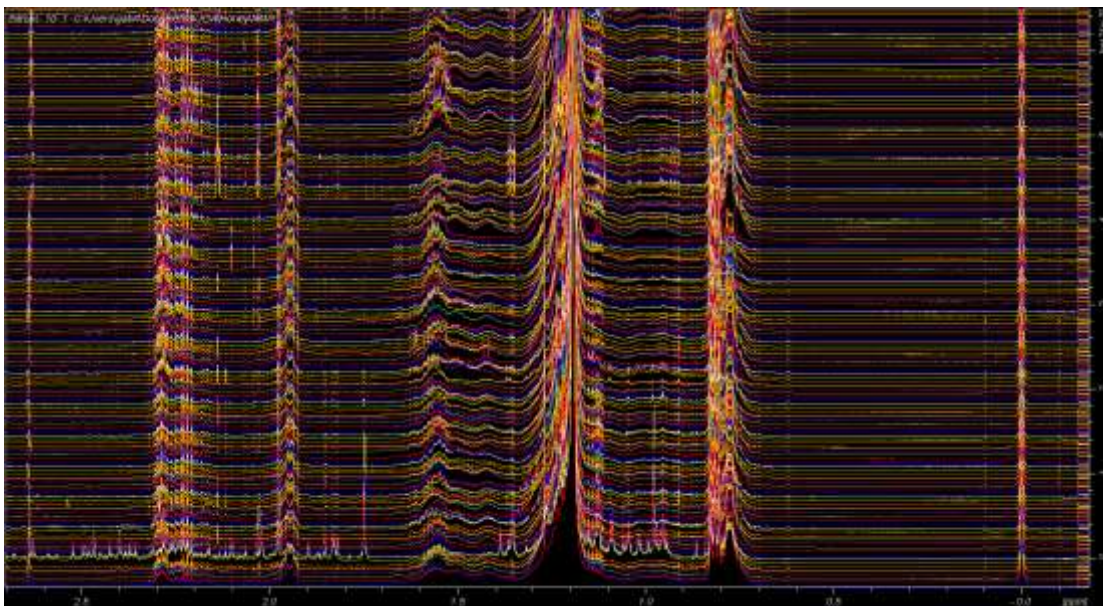
εμφανείς με στενή μελέτη συγκεκριμένων τμημάτων των φασμάτων. Στις εικόνες 40, 41 και 42, φαίνεται η αρωματική περιοχή, η περιοχή των ζακχάρων και η περιοχή των λιπιδίων, αντίστοιχα.



Εικόνα 40. Υπέρθεση φασμάτων ^1H NMR των αναλυθέντων δειγμάτων μελιού με zoom στην αρωματική περιοχή



Εικόνα 41. Υπέρθεση φασμάτων ^1H NMR των αναλυθέντων δειγμάτων μελιού με zoom στην περιοχή των σακχάρων



Εικόνα 42. Υπέρθεση φασμάτων ^1H NMR των αναλυθέντων δειγμάτων μελιού με zoom στην περιοχή των λιπιδίων

Η εξέταση των φασμάτων αποκάλυψε την επαναληψιμότητα του πρωτοκόλλου εκχύλισης, την προετοιμασία των δειγμάτων και τη λήψη των φασμάτων. Τα επαναλαμβανόμενα δείγματα δεν παρουσιάζουν ποιοτικές διαφορές ή στατιστικά σημαντικές ποσοτικές παραλλαγές, κάτι που είναι απαραίτητο για τη διεξαγωγή μιας μεταβολομικής μελέτης.

3.4) ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ-ΠΟΛΥΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Στο αρχικό στάδιο της παρούσας μελέτης αλλά και κάθε μεταβολομικής μελέτης προκύπτει το «μεταβολικό αποτύπωμα» (fingerprint) κάθε δείγματος και όπως έχει ήδη αναφερθεί αυτό είναι χρήσιμο για μια αρχική ανεύρεση ομοιοτήτων και διαφορών. Ωστόσο, ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων και η πληθώρα πληροφοριών κάνει αρκετά χρονοβόρα και σχεδόν αδύνατη την εξόρυξη της χρήσιμης πληροφορίας δηλαδή του σήματος εκείνου, του μεταβολίτη που είναι υπεύθυνος για την εκάστοτε παρατηρούμενη διαφοροποίηση. Σε αυτό το σημείο παρεμβαίνει η χημειομετρία και με τη χρήση στατιστικών μεθόδων και εργαλείων μπορεί να βοηθήσει σημαντικά τόσο στη διαχείριση όσο και στην οπτικοποίηση των δεδομένων αλλά και την ανεύρεση βιοδεικτών ανάλογα με την παράμετρο διαφοροποίησης που εξετάζεται, στη συγκεκριμένη περίπτωση η βοτανική ή/και η γεωγραφική προέλευση του μελιού. Επειδή πρόκειται για δεδομένα πολλών διαστάσεων συνήθως χρησιμοποιείται πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων (MVDA). Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία ήταν η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal

Components Analysis-PCA) και η μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτικής Ανάλυσης (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis-OPLS-DA)

A) Επεξεργασία και Μείωση δεδομένων (Data reduction)

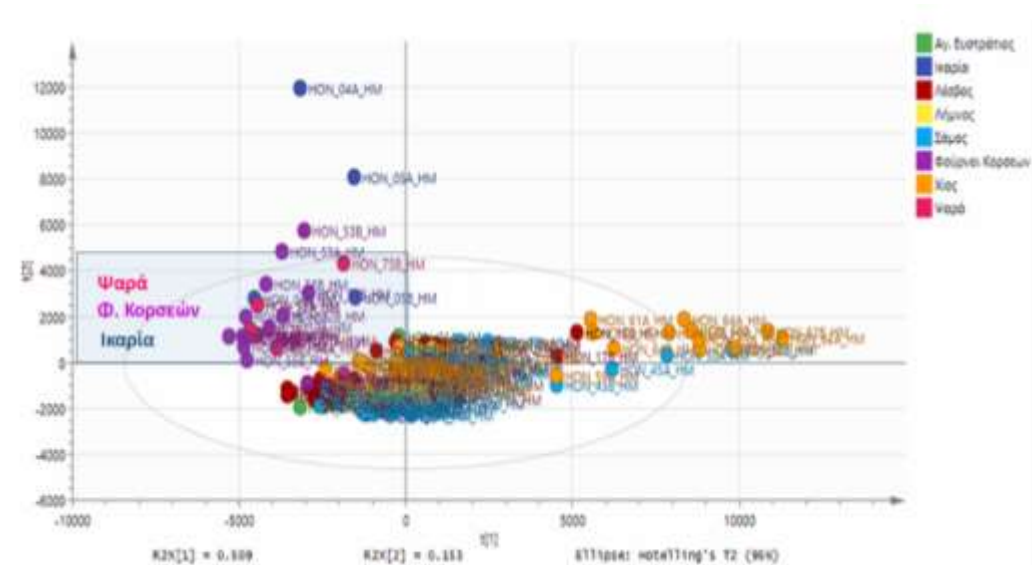
Για την πολυπαραμετρική μεταβολομική ανάλυση τα δεδομένα του NMR επεξεργάστηκαν περεταίρω ώστε να υποβληθούν σε στατική ανάλυση. Στα φάσματα έγινε αρχικά χειροκίνητα η διόρθωση της φάσης πρώτης και δευτέρας τάξεως (first and second order phase correction). Τα φάσματα βαθμονομήθηκαν ως προς την κλίμακα με βάση το εσωτερικό πρότυπο, το οποίο επιπροσθέτως χρησιμοποιήθηκε για μια εκτίμηση του ελάχιστου εύρους κορυφής του εκάστοτε δείγματος. Για την άνωθεν επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Bruker Topspin 3.6.1 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany).

Στη συνέχεια τα δεδομένα εισήχθησαν στο πρόγραμμα μαθηματικής μοντελοποίησης MATLAB 2015b όπου ακολούθησε η περεταίρω επεξεργασία τους. Ειδικότερα, έγινε επιλογή περιοχών που παρεμποδίζουν την ανάλυση, οι οποίες και αφαιρέθηκαν από το φάσμα. Παρεμποδίζουσες περιοχές θεωρούνται οι κορυφές των διαλυτών (παρ'όλο που οι διαλύτες είναι δευτεριωμένοι, εμφανίζουν κορυφές στο φάσμα πρωτονίου λόγω μη ιδανικής καθαρότητας), πιθανές επιμολύνσεις των δειγμάτων κατά τη διαδικασία της προ-κατεργασίας, καθώς και κορυφές οφειλόμενη σε υγρασία ή άλλη επίδραση. Στη συνέχεια, λόγω ύπαρξης χημικών μετατοπίσεων σε κάποιες κορυφές, πραγματοποιήθηκε η ευθυγράμμισή τους με το εργαλείο Icoshift (Version 3.0 beta). Έπειτα, συντελέστηκε ο τεμαχισμός (binning), όπου οι εναπομείνουσες περιοχές του φάσματος ολοκληρώνονται με $df = 0,04$ ppm ώστε να μειωθεί η ανάλυση του φάσματος και να μπορεί να γίνει πιο εύκολα η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών φασμάτων, αποφεύγοντας φαινόμενα διαφοροποίησης που οφείλονται σε ατελή ευθυγράμμιση των κορυφών. Οι αλλαγές στη χημική μετατόπιση που μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα στην ευθυγράμμιση των κορυφών περιλαμβάνουν μεταβολή στη θερμοκρασία, μεταβολή στο pH καθώς και αλλαγή στο ιονικό φορτίο του εκάστοτε δείγματος, δηλαδή παρεμπόδιση.

Β) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Β.1) Ανάλυση κύριων συνιστωσών - Principal Components Analysis (PCA)

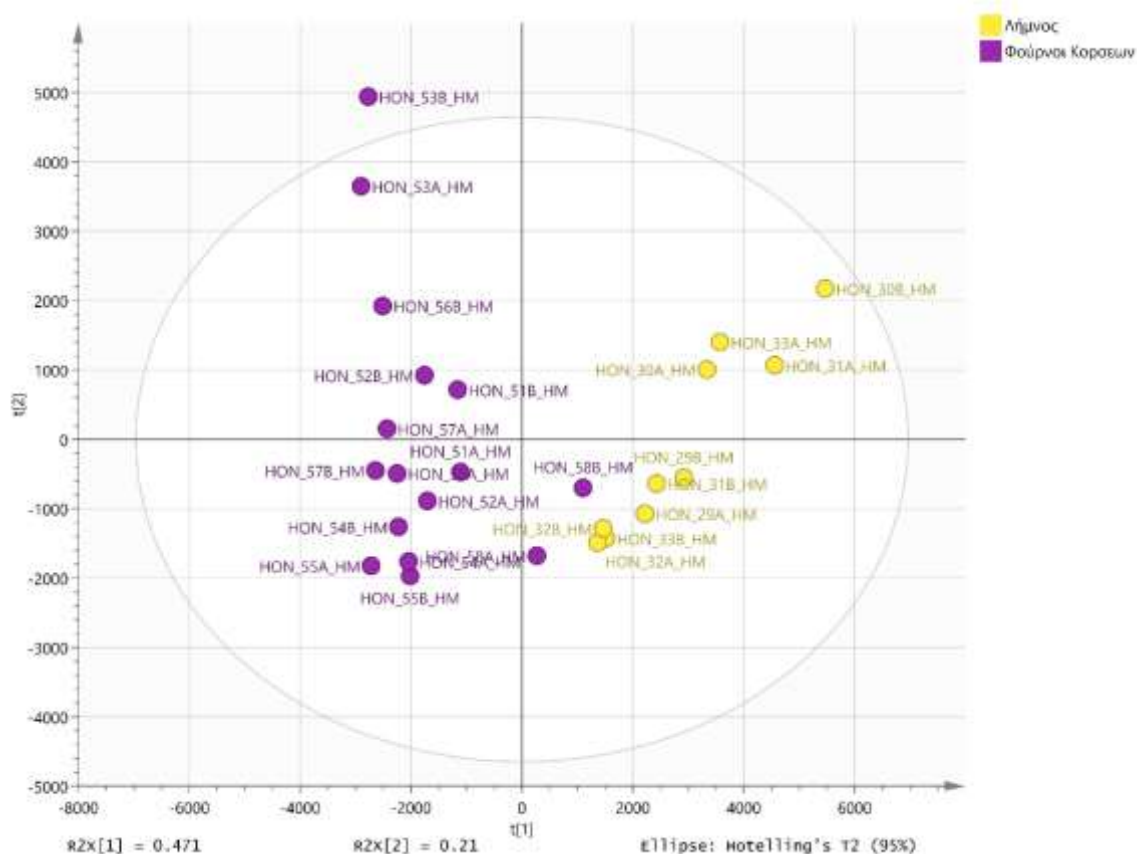
Το μοντέλο PCA των δειγμάτων με βάση τα φάσματα NMR δημιουργήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού Simca- v. 14.1. Ορίστηκαν ως κύριες μεταβλητές οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων και ως κύριες παρατηρήσεις τα δείγματα μελιού με δευτερεύουσα τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κλιμάκωσης Pareto. Από την ανάλυση PCA προέκυψαν τα παρακάτω διαγράμματα διασποράς συντεταγμένων (scores scatter plot).



Εικόνα 43. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - PCA ($N=2$, $R^2=0,661$, $Q^2=0,554$) όπου φαίνεται η εγγενής τάση διαχωρισμού ανά νησί.

Από το διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων όλων των δειγμάτων, παρατηρείται ότι η ομαδοποίηση μεταξύ τους δεν είναι εντελώς ξεκάθαρη (Εικόνα 43). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα από Ικαρία, Ψαρά και Φούρνους Κορσεών είναι ομαδοποιημένα και διαχωρίζονται στην πρώτη κυρία συνιστώσα. Αυτά τα νησιά, βρίσκονται γεωγραφικά κοντά μεταξύ τους. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρούνται ακραίες τιμές (outliers) που υποδηλώνουν πιθανά τη μεγάλη διαφοροποίηση των δειγμάτων

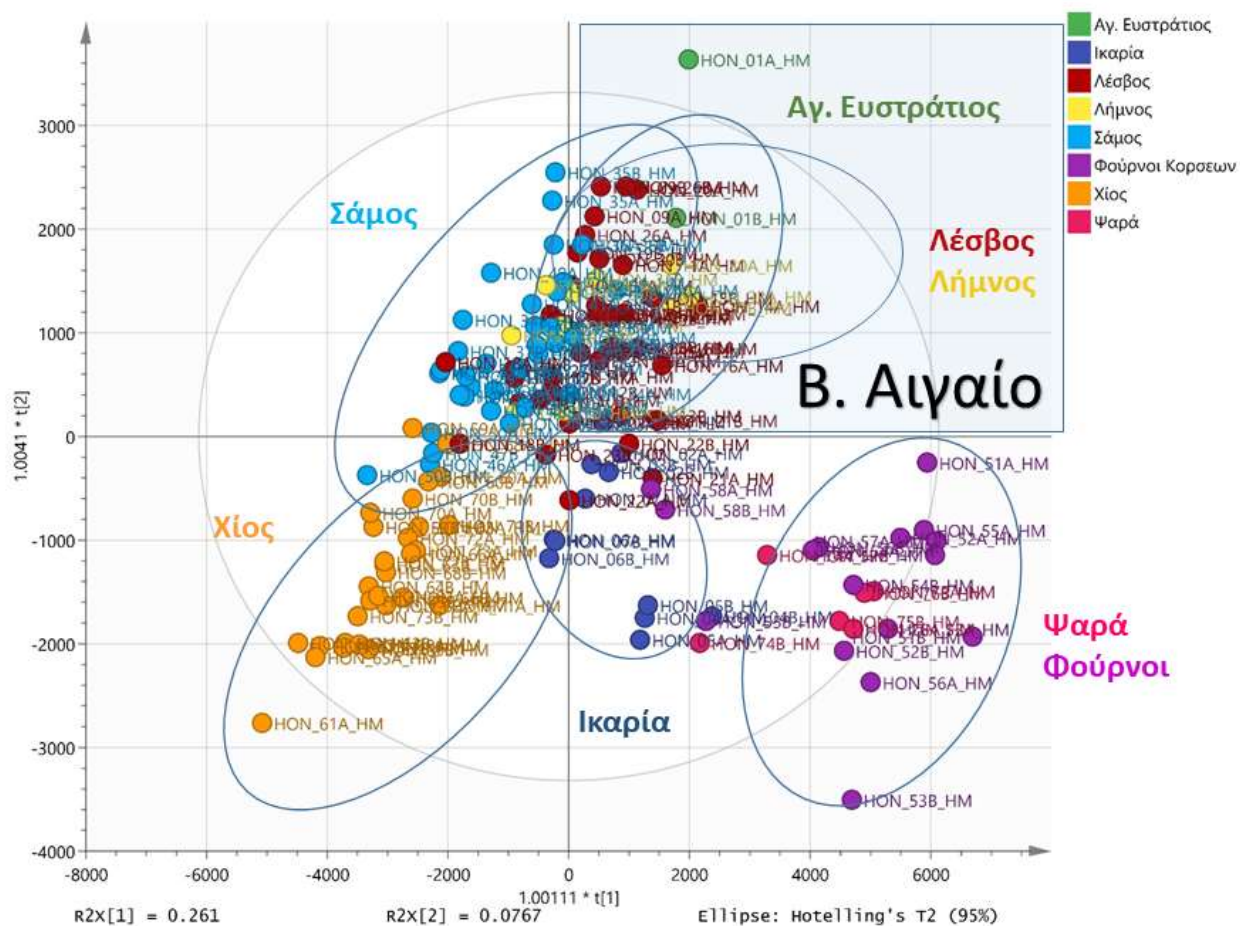
Άλλο scores scatter plot πραγματοποιήθηκε περιλαμβάνοντας ανά ζεύγη μόνο δύο νησιά (Λήμνος και Φούρνοι Κορσεών). Η ομαδοποίηση αυτών των δειγμάτων είναι προφανής με μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο. Τα δείγματα διαχωρίζονται στην πρώτη κύρια συνιστώσα (Εικόνα 44), καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό των δειγμάτων ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση.



Εικόνα 44. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - PCA: διάκριση μεταξύ της νήσου Λήμνου και των Φούρνων 26 δείγματα, $R^2 = 0.681$, $Q^2 = 0.500$

B.2) Μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτικής Ανάλυσης (Orthogonal partial least squares discriminant analysis / OPLS-DA)

Εκτός από την μη επιβλεπόμενη ανάλυση PCA, πραγματοποιήθηκε και η επιβλεπόμενη ανάλυση OPLS-DA. Δημιουργήθηκαν διαγράμματα διασποράς συντεταγμένων για την σύγκριση τόσο όλων των δειγμάτων, όσο και των δειγμάτων ανά ζεύγη.

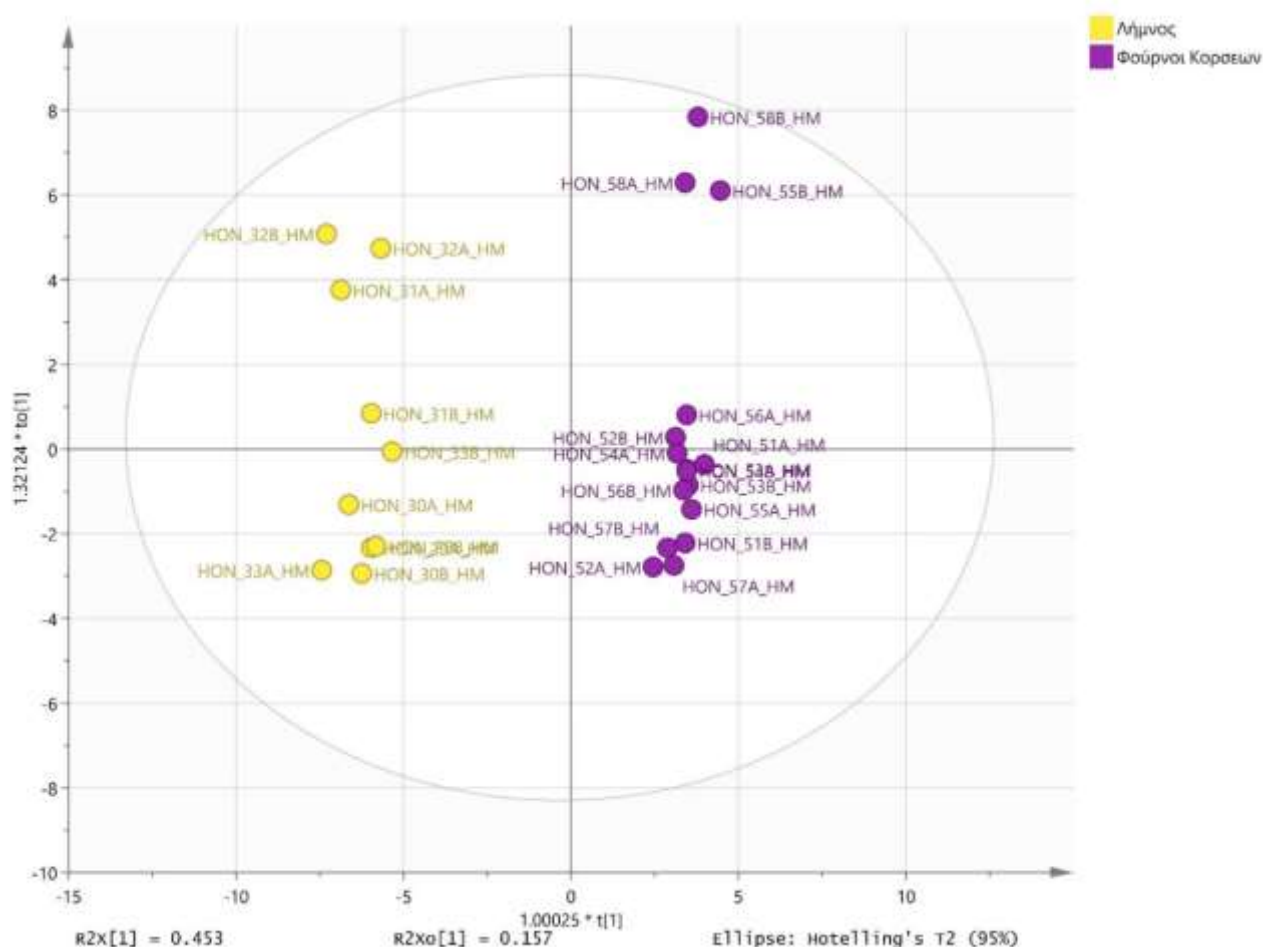


Εικόνα 45. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - O2PLS-DA: ομαδοποίηση βάσει γεωγραφικής προέλευσης. 152 δείγματα, $R^2X = 0,991$, $R^2Y = 0,632$, $Q^2 = 0,482$

Από το διάγραμμα (Εικόνα 45), παρατηρείται η ομαδοποίηση των νησιών του Β. Αιγαίου (Λέσβος, Λήμνος και Αγ. Ευστράτιος) χωριστά από την ομαδοποίηση των νησιών του Ν. Αιγαίου (Χίος, Σάμος, Ψαρά, Φύρνοι και Ικαρία). Αυτά τα δείγματα διαχωρίζονται με βάση την πρώτη κύρια συνιστώσα. Από την άλλη μεριά, τα μέλη από τη Χίο, Ψαρά και τους Φύρνους, βρέθηκαν να έχουν το καλύτερο διαχωρισμό, υποδεικνύοντας την υψηλότερη διαφοροποίηση μεταβολώματος.

Ακολούθησε, εφαρμογή της μεθόδου O2PLS-DA περιλαμβάνοντας ανά ζεύγη τα νησιά και ως παράδειγμα δίνεται το ίδιο ζεύγος όπως και προηγούμενως, δηλαδή Λήμνος και Φύρνοι Κουρσεών (Εικόνα 46) που αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την PCA. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν αναμενόμενα. Η ομαδοποίηση αυτών των δειγμάτων είναι προφανής, και διαχωρίζονται στην πρώτη κύρια συνιστώσα, καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό των δειγμάτων ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση. Δεν εμφανίζονται ακραίες τιμές που σημαίνει ότι τα δείγματα δε διαφοροποιούνται

σημαντικά μεταξύ τους, και επίσης το μοντέλο που δημιουργήθηκε είναι κατάλληλο για όλα τα δείγματα που αναλύονται.



Εικόνα 46. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - O2PLS-DA: διάκριση μεταξύ της νήσου Λήμνου και των Φούρνων 26 δείγματα, $R^2X = 0,680$, $R^2Y = 0,9982$, $Q^2 = 0,955$

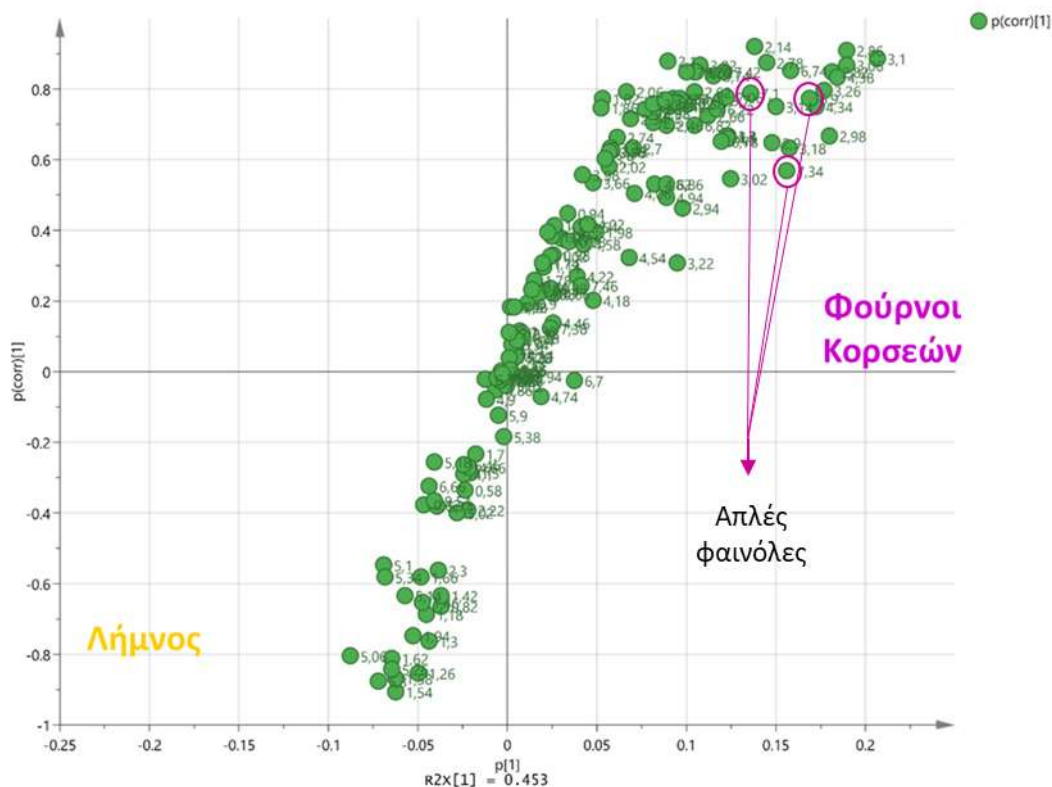
Είναι γνωστό ότι στα νησιά του Β. Αιγαίου σημειώνονται χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τα νησιά του Ν. Αιγαίου. Η Λήμνος είναι ένα νησί με σχετικά ήπιους βροχερούς χειμώνες και ηλιόλουστα καλοκαίρια, όπου πνέουν ισχυροί άνεμοι που συμβάλλουν στο ημίξηρο κλίμα του νησιού. Επίσης, είναι μία πεδινή περιοχή με χαμηλά υψόμετρα που χαρακτηρίζεται από την απουσία βράχων ασβεστόλιθου. Η μορφολογία και το κλίμα του νησιού ευνοεί την έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα, όπως γεωργία και κτηνοτροφία. Ταυτόχρονα, η ανθρώπινη δραστηριότητα και οι ισχυροί άνεμοι προκαλούν έλλειψη δασών, που σημαίνει μια λιγότερο ποικίλη χλωρίδα. Από την άλλη πλευρά, οι Φούρνοι, έχουν ξηρό κλίμα και υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Το χαρακτηριστικό του νησιού είναι η πολύ μεγάλη ακτογραμμή, όπου τα πετρώματά της είναι

σχιστολιθικά στα χαμηλότερα μέρη των λόφων και ασβεστολιθικά στα υψηλότερα. Η διαφορετική γεωμορφολογία παρέχει μια πλούσια χλωρίδα, η οποία αποτελείται κυρίως από πολλά είδη αρωματικών φυτών. Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να είναι ένας από τους λόγους της υψηλής διαφοροποίησης μεταβολώματος που παρατηρείται στο διάγραμμα όταν αναλύονται αυτά τα δυο νησιά χρησιμοποιώντας μια επιβλεπόμενη και μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο.

B.2.1) Διάγραμμα φορτίων (loadings S- plot)

Θεωρητικά, ένα διάγραμμα φορτίων δείχνει τη στατιστική σημαντικότητα κάθε μεταβλητής (variable) ως προς την παρατηρούμενη διαφοροποίηση μεταξύ των παρατηρήσεων/δειγμάτων (observations). Στο διάγραμμα φορτίων, κάθε σημείο απεικόνισης αντιστοιχεί στην πληροφορία, σε αυτή τη περίπτωση ppm, που χαρακτηρίζει την κάθε μεταβλητή, ενώ η σχετική θέση χαρακτηρίζει τη σημαντικότητα και τη βαρύτητα ως προς την τάση διαχωρισμού των δειγμάτων. Το διάγραμμα φορτίων με την χρήση κλιμάκωσης Pareto κατέστησε δυνατή την επισήμανση των κυριότερων φορτίων στα οποία αποδίδεται η διαφοροποίηση των δειγμάτων. Οι κατευθύνσεις των παρατηρήσεων σε ένα scores scatter plot όπως είναι λογικό, ανταποκρίνονται στις κατευθύνσεις των φορτίων στο αντίστοιχο loadings plot, που σε αυτή τη περίπτωση, αντιστοιχεί στην εικόνα 47.

Σύμφωνα με το διάγραμμα φαίνεται ότι τα περισσότερα φορτία που είναι υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση με βάση τη γεωγραφική προέλευση ανήκουν σε μεταβολίτες που τα πρωτόνια τους συντονίζονται σε υψηλά πεδία (δ 0.5 – δ 2.5), και αντιστοιχούν πιθανώς σε λιπαρά οξέα. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι τα φορτία που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που τα πρωτόνια τους συντονίζονται στην αρωματική περιοχή (6 – 7.5 ppm) είναι επίσης στατιστικά σημαντικά. Αυτό σημαίνει ότι ένα άλλο είδος ενώσεων, όπως οι απλές φαινόλες, παίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των δειγμάτων.



Εικόνα 47. Αντίστοιχο S-plot του μοντέλου O2PLS-DA που χωρίζει τη Λήμνο και τους Φούρνους. Ο διαχωρισμός οφείλεται κυρίως σε άφθονα λιπαρά οξέα, αλλά και άλλα απλά φαινολικά συστατικά

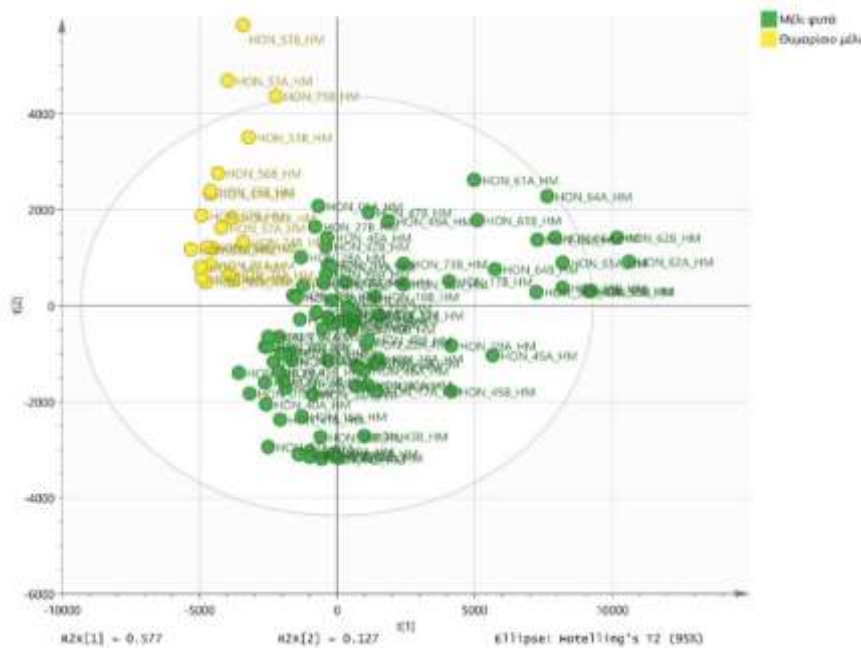
Γ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ

Γ.1) Ανάλυση κύριων συνιστωσών - Principal Components Analysis (PCA)

Το μοντέλο PCA των δειγμάτων με βάση τα φάσματα NMR δημιουργήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού Simca v. 14.1. Ορίστηκαν ως κύριες μεταβλητές οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων και ως κύριες παρατηρήσεις τα δείγματα μελιού με δευτερεύουσα τη βοτανική προέλευση των δειγμάτων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κλιμάκωσης Pareto. Από την ανάλυση PCA προέκυψαν τα παρακάτω διαγράμματα διασποράς συντεταγμένων (scores scatter plot).

Δημιουργήθηκε ένα διαγράμμα διασποράς συντεταγμένων, περιλαμβάνοντας ανά ζεύγη μόνο δύο είδη βοτανικής προέλευσης (θυμαρίσιο μέλι και μέλι φυτών) (Εικόνα 48). Η ομαδοποίηση αυτών των δειγμάτων είναι προφανής με μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο. Τα δείγματα διαχωρίζονται στην

πρώτη κύρια συνιστώσα, καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό ανάλογα με τη βοτανική τους προέλευση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα που αντιστοιχούν στα μέλια από φυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη διασπορά μεταξύ τους σε σχέση με τα αντίστοιχα της άλλης συστάδας. Αυτό συμβαίνει λόγω των διαφορών μεταξύ του μεταβολώματός τους, καθώς αυτά τα δείγματα αποτελούνται από μίγμα φυτών που δεν προσδιορίζεται.



Εικόνα 48. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - PCA: διάκριση μεταξύ θυμαριού και μέλι φυτών

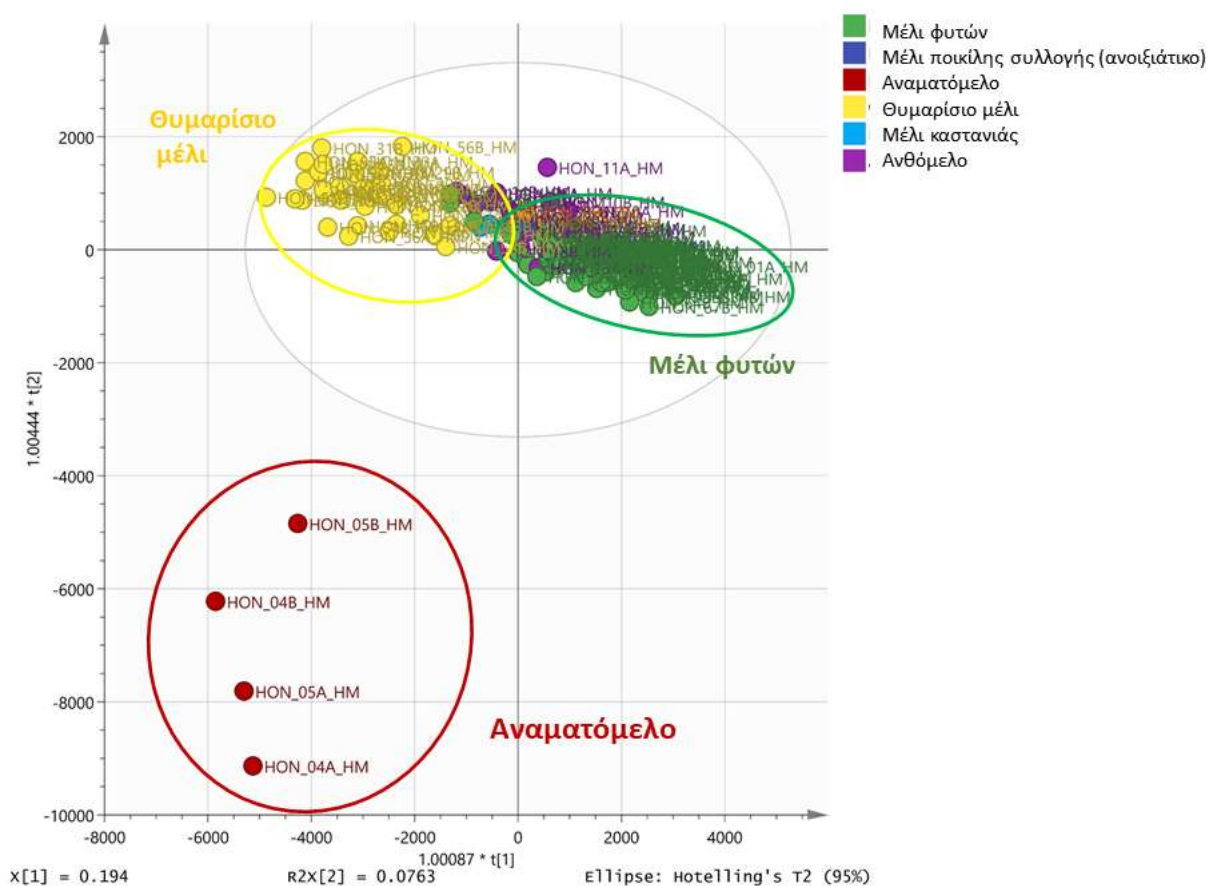
Γ.2) Μέθοδος Ορθογώνιων Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων – Διακριτικής Ανάλυσης

Ανάλυση ορθογωνίων μερικών ελάχιστων τετραγώνων – (Orthogonal partial least squares discriminant analysis (/ OPLS-DA)

Εκτός από την μη επιβλεπόμενη ανάλυση PCA, πραγματοποιήθηκε και η επιβλεπόμενη ανάλυση OPLS-DA. Δημιουργήθηκαν διαγράμματα διασποράς συντεταγμένων για την σύγκριση τόσο όλων των δειγμάτων (Εικόνα 49), όσο και των δειγμάτων ανά ζεύγη.

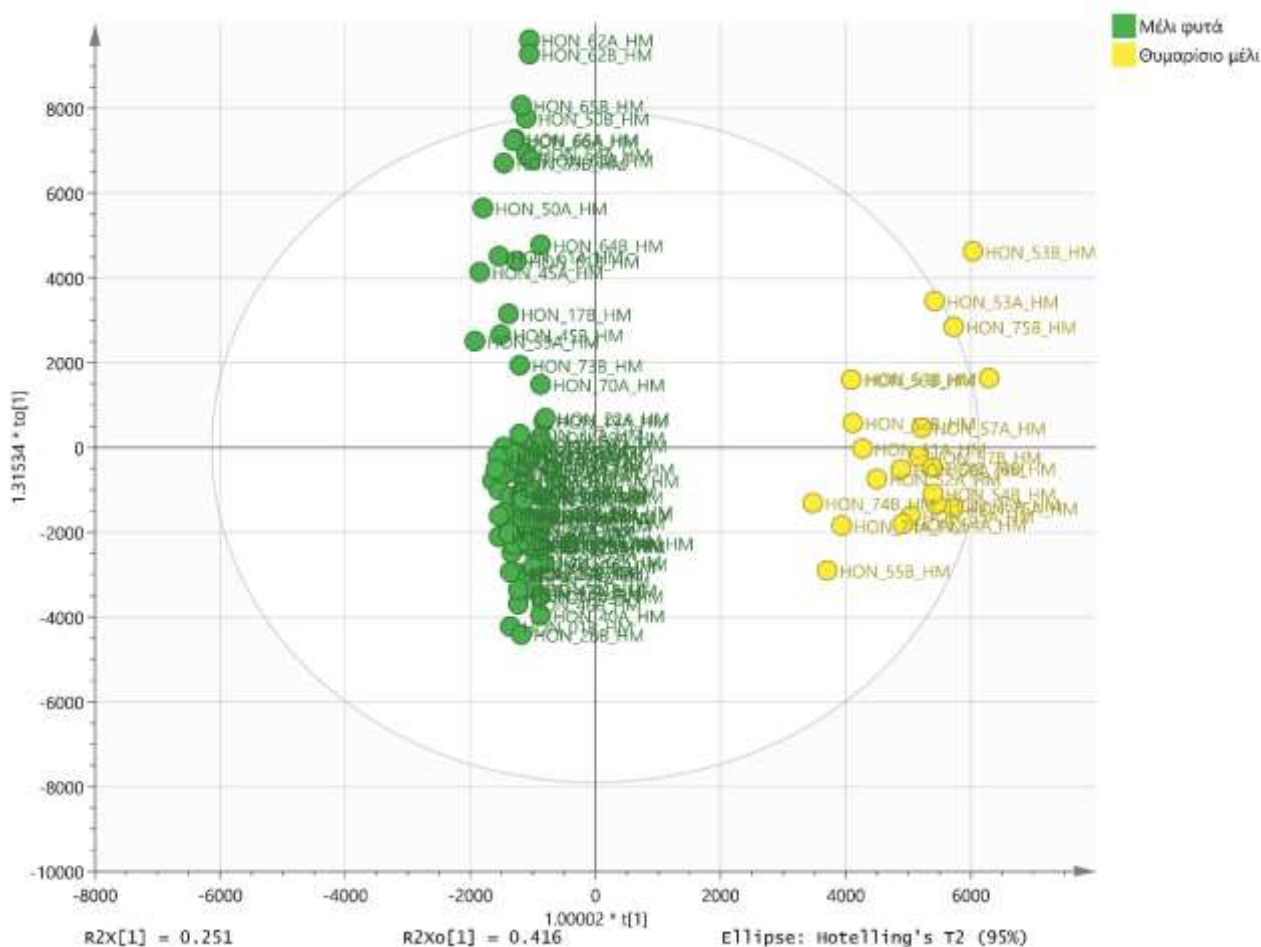
Παρομοίως με την προηγούμενη ανάλυση, η διάκριση των δειγμάτων που βασίζονται στην βοτανική προέλευση θα μπορούσε επίσης να επιτευχθεί μόνο με επιβλεπόμενες μεθόδους.. Τα αποτελέσματα δείχνουν ένα σαφές μοτίβο ομαδοποίησης που διαφοροποιεί το **αναματόμελο**, το

Θυμαρίσιο μέλι και το **μέλι φυτών**. Αυτά τα δείγματα βρέθηκαν να έχουν το καλύτερο διαχωρισμό, υποδεικνύοντας την υψηλότερη εναλλαγή μεταβολώματος. Το αναματόμελο διαφοροποιείται ξεκάθαρα από τα άλλα μέλια. Αυτό παρατηρείται αφού τα δείγματα εμφανίζονται ως outliers εκτός της έλλειψης Hotellings 95%.



Εικόνα 49. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - O2PLS-DA: ομαδοποίηση βάση βοτανικής προέλευσης

Άλλο score scatter plot δημιουργήθηκε περιλαμβάνοντας ανά ζεύγη τις βοτανικές προελεύσεις και ως παράδειγμα δίνεται το ίδιο ζεύγος όπως και προηγουμένως, δηλαδή **θυμαρίσιο** και **μέλι φυτών**, που αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας PCA (Εικόνα 50). Όπως στη μη επιβλεπόμενη μέθοδο, παρατηρείται η ομαδοποίηση αυτών των δειγμάτων, όπου τα δείγματα διαχωρίζονται στην πρώτη κύρια συνιστώσα, αλλά με την επιβλεπόμενη μέθοδο η ομαδοποίηση είναι εντελώς ξεκάθαρη, καθιστώντας δυνατό τον διαχωρισμό των δειγμάτων ανάλογα με τη βοτανική τους προέλευση. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρούνται ακραίες τιμές (outliers) που υποδηλώνουν πιθανά τη μεγάλη διαφοροποίηση των δειγμάτων.

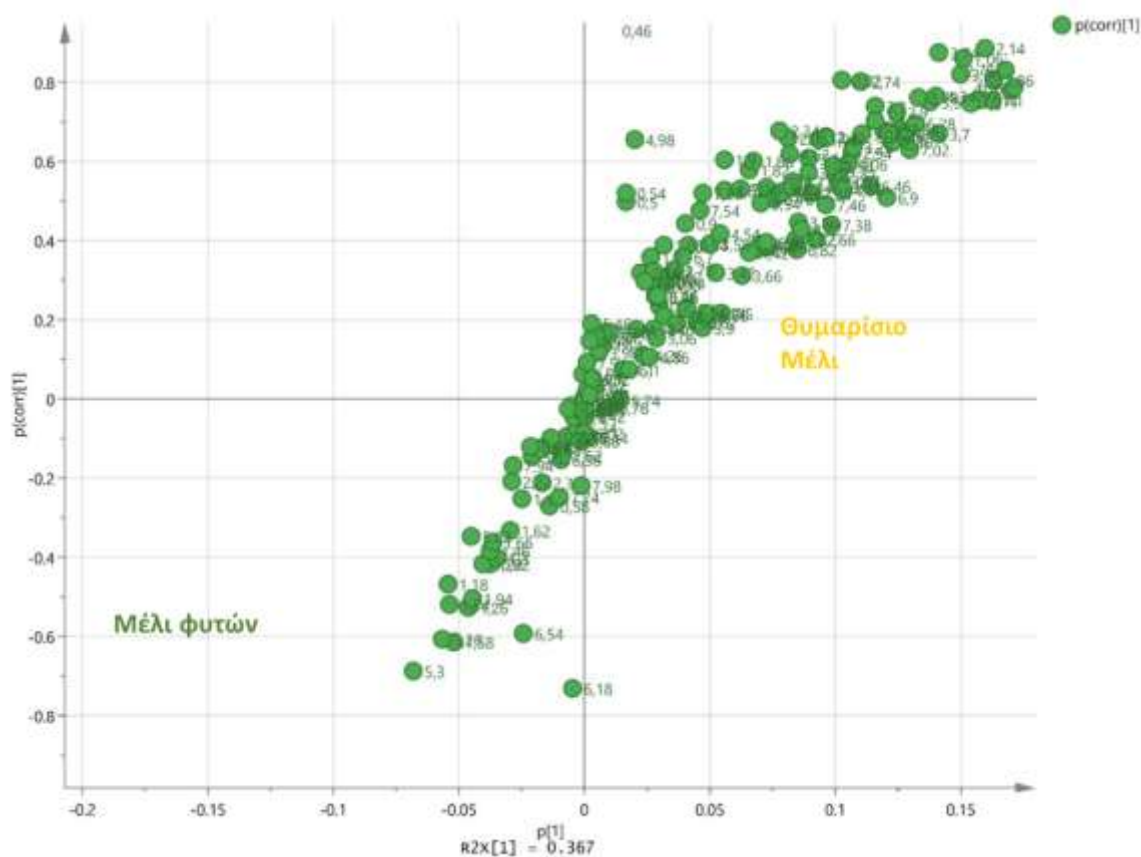


Εικόνα 50. Διάγραμμα διασποράς συντεταγμένων - O2PLS-DA: διάκριση μεταξύ θυμαριού και μέλι φυτού

Γ.2.1) Διάγραμμα φορτίων (loadings S- plot)

Όπως προηγουμένως, οι κατευθύνσεις των παρατηρήσεων σε ένα scores scatter plot, όπως είναι λογικό, ανταποκρίνονται στις κατευθύνσεις των φορτίων στο αντίστοιχο loadings plot, που σε αυτή τη περίπτωση, αντιστοιχεί στην εικόνα 51.

Σύμφωνα με το διάγραμμα φαίνεται ότι τα περισσότερα φορτία που είναι υπεύθυνα για τη διαφοροποίηση με βάση τη βοτανική προέλευση ανήκουν σε μεταβολίτες που τα πρωτόνια τους συντονίζονται σε υψηλά πεδία (δ 0.5 – δ 2.5), και αντιστοιχούν πιθανώς σε λιπαρά οξέα. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι τα φορτία που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που τα πρωτόνια τους συντονίζονται στην αρωματική περιοχή (δ 6 – δ 7.5) είναι επίσης στατιστικά σημαντικά.



Εικόνα 51. Αντίστοιχη γραφική παράσταση S του μοντέλου O2PLS-DA που χωρίζει το θυμάρι και το μέλι των φυτών. Η υδροξυμεθυλφουρφουράλη είναι επίσης σημαντικός βιοδείκτης

3.5) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

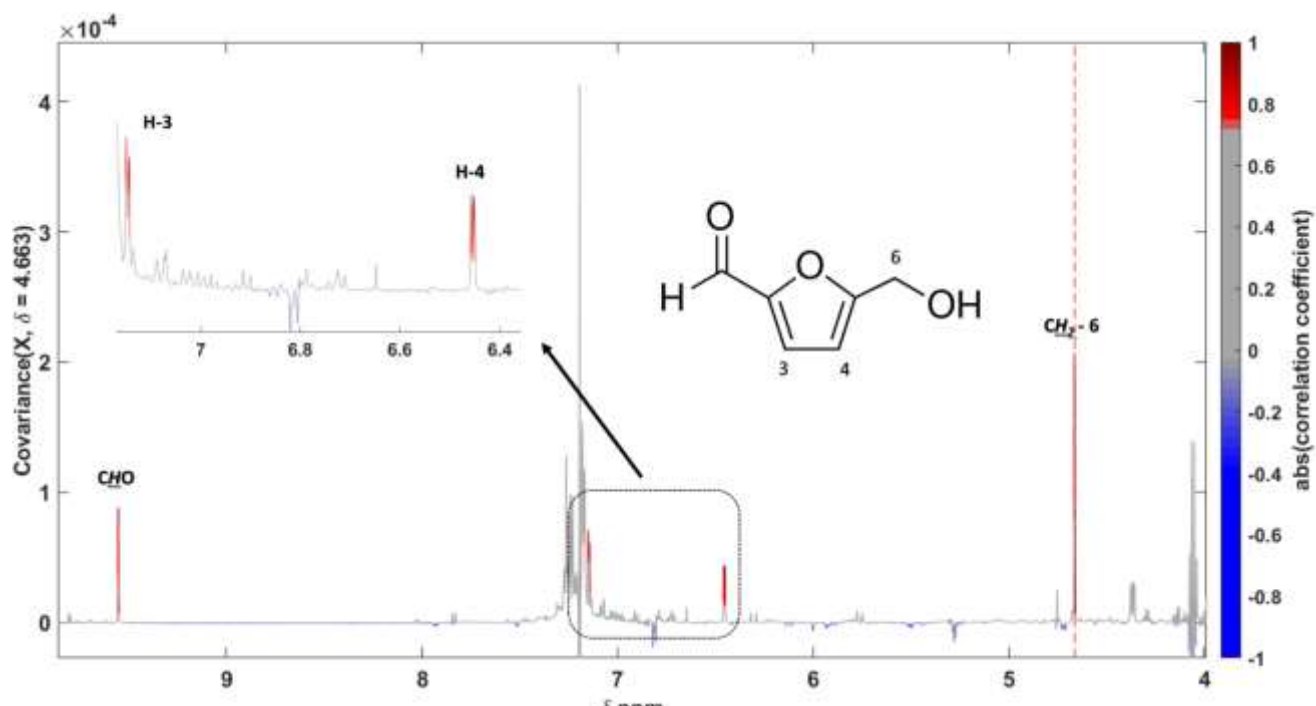
Ένα από τα σημαντικά βήματα της μεταβολομικής ανάλυσης που αφορούν τα τρόφιμα, σε αυτήν την περίπτωση το μέλι, είναι ο εντοπισμός πιθανών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να δώσουν πληροφορίες για την ποιότητα και την αυθεντικότητα του προϊόντος σχετικά με τη βοτανική και γεωγραφική του προέλευση. Δυστυχώς, λόγω της έλλειψης βάσεων δεδομένων και της πολυπλοκότητας και μεταβλητότητας των δειγμάτων, είναι δύσκολο να εκτελεστεί. Έτσι, έχουν προταθεί στατιστικές τεχνικές και εργαλεία για να βοηθήσουν με αυτό το ζήτημα. Μεταξύ αυτών, η φασματοσκοπία στατιστικής συνολικής συσχέτισης (STOCSY) έχει εφαρμοστεί κυρίως σε δείγματα ανθρώπων ή ζώων. Το STOCSY εκμεταλλεύεται τη γραμμική συσχέτιση της έντασης των μεταβλητών σε ένα σύνολο φασμάτων για να δημιουργήσει ένα ψευδοφάσμα NMR που εμφανίζει τη συσχέτιση μεταξύ των εντάσεων των διαφόρων κορυφών σε ολόκληρο το δείγμα. Οι συσχετίσεις STOCSY μεταξύ

ορισμένων κορυφών δείχνουν την πιθανότητα να ανήκουν στην ίδια ένωση ή σε ενώσεις της ίδιας οδού προέλευσης (Beteinakis et al., 2020; Cloarec et al., 2005).

Χρησιμοποιήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις από τις παραγόμενες λίστες VIP (VIP > 1) (ΠΠ27 και ΠΠ28) των μοντέλων OPLS-DA ως «Κορυφές οδηγοί» στα πειράματα STOCSY. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι χημικές μετατοπίσεις μπορεί να διαφέρουν ελαφρώς σε σχέση με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, καθώς όλα τα φάσματα που αναλύθηκαν σε αυτήν την μελέτη, βαθμονομήθηκαν με βάση το εσωτερικό πρότυπο, όχι με βάση το σήμα του διαλύτη.

A) 5-υδροξυμεθυλφουρφουράλη

Η κορυφή σε χημική μετατόπιση 4.66 ppm χρησιμοποιήθηκε ως κορυφή-οδηγός, και με τη χρήση του STOCSY αποκαλύφθηκαν συσχετίσεις με άλλες κορυφές έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ψευδοφάσματος που αντιστοιχεί στον βιοδείκτη 5-HMF (Εικόνα 52). Για την ταυτοποίηση της ένωσης αυτής, πραγματοποιήθηκε σύγκριση με την αντιστοίχη βιβλιογραφία (Tong et al., 2011; Vigier et al., 2012).



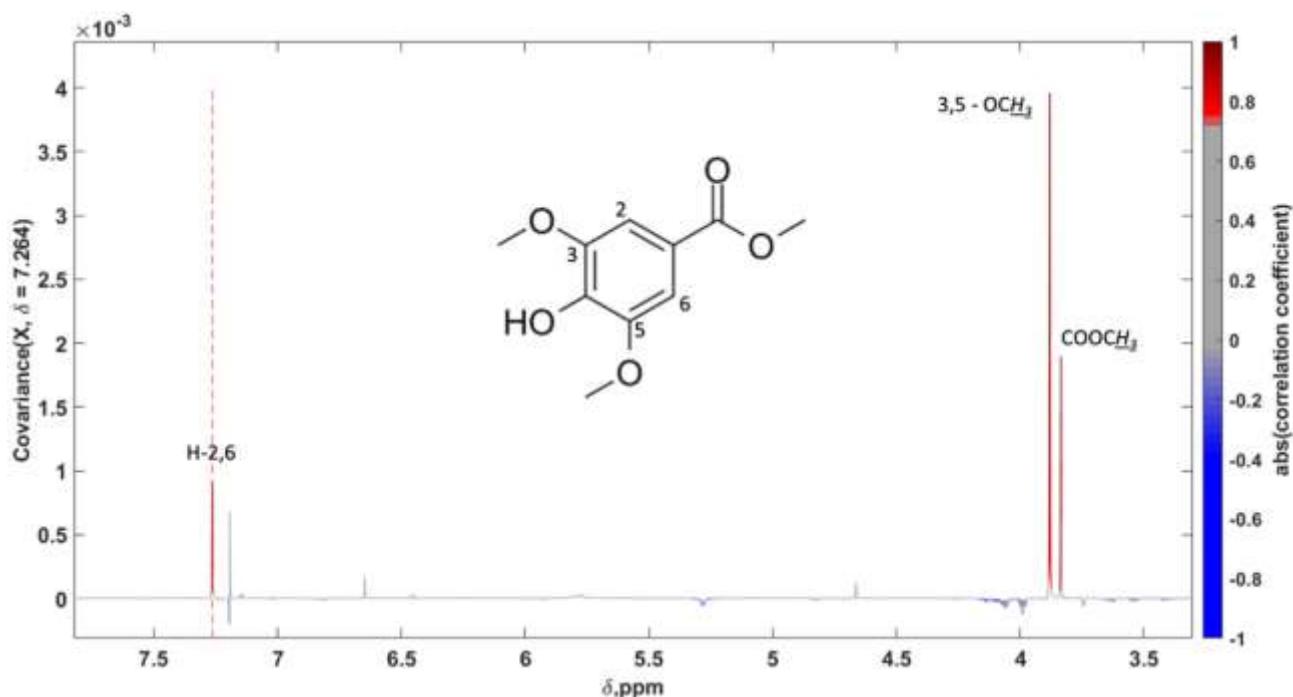
Εικόνα 52. Φάσμα συνολικής στατιστικής συσχέτισης (STOCSY) 1D pseudo-spectrum. Οι συντελεστές συσχέτισης με τα άλλα σήματα στο φάσμα κωδικοποιούνται με χρώμα. Η κορυφή οδηγός (driving peak) ήταν στα 4.66 ppm.

Όπως έχει αναφερθεί, η 5-HMF θεωρείται ένας από τους κύριους δείκτες ποιότητας διαφορετικών εμπορικών προϊόντων. Επομένως, ο Codex Alimentarius Standard έχει θέσει ένα όριο

για την HMF στο μέλι (Εικόνα 7) για να διασφαλίσει ότι το προϊόν δεν έχει υποστεί εκτεταμένη θέρμανση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και είναι ασφαλές για κατανάλωση, καθώς έχει βρεθεί ότι η HMF έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, όπως κυτταροτοξικότητα προς τους βλεννογόνους και το δέρμα, μεταλλαξιογένεση, χρωμοσωμικές εκτροπές; και καρκινογένεση σε ανθρώπους και ζώα (Shapla et al., 2018). Ωστόσο, σε πιο πρόσφατες εκτεταμένες μελέτες, η HMF έχει αποδειχθεί ότι έχει ένα ευρύ φάσμα θετικών αποτελεσμάτων, όπως αντιοξειδωτική (Zhao et al., 2013), αντι-αλλεργική (Yamada, Nemoto, Shigemori, Yokota, & Isoda, 2011) και αντιφλεγμονώδη δράση (Kitts, Chen, & Jing, 2012).

B) Methyl syringate (MS)

Η κορυφή σε χημική μετατόπιση 7.264 ppm χρησιμοποιήθηκε ως κορυφή οδήγός, και με τη χρήση του STOCSY αποκαλύφθηκαν συσχετίσεις με άλλες κορυφές έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ψευδοφάσματος που αντιστοιχεί στον βιοδείκτη Methyl syringate (Εικόνα 53). Για την ταυτοποίηση της ένωσης αυτής, πραγματοποιήθηκε σύγκριση με την αντιστοίχη βιβλιογραφία (Yun-Xia Xian, Hong-Lei Zhou, 2014).



Εικόνα 53. Φασματοσκοπία στατιστικής συνολικής συσχέτισης (STOCSY) 1D ψευδο-φάσματα. Οι συντελεστές συσχέτισης με τα άλλα σήματα στο φάσμα κωδικοποιούνται με χρώμα. Η κορυφή οδήγησης ήταν στα 7.264 ppm.

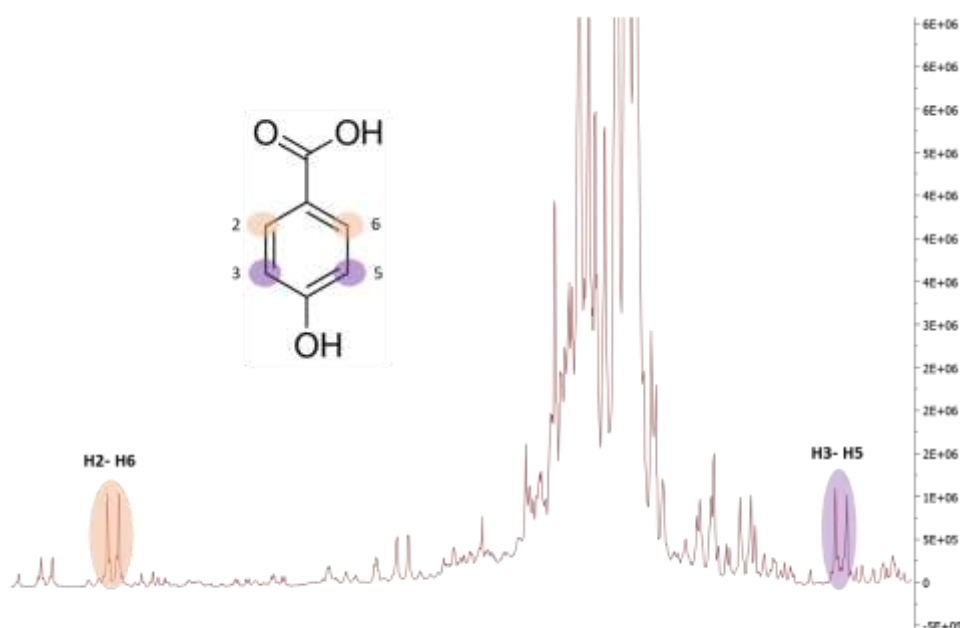
Το Methyl syringate είναι ένα παράγωγο του συριγγικού οξέος, που έχει μια μοναδική ανασταλτική δράση στην παραγωγή αφλατοξίνης. Αυτή η ένωση είναι ένας ειδικός και επιλεκτικός ενεργοποιητής του hTRPA1, που μπορεί να ρυθμίσει την πρόσληψη τροφής και την εκκένωση του γαστρικού συστήματος, και κατ'επέξταση, μπορεί να συμβάλει στην καταστολή του βάρους (*Jermnak, Yoshinari, Sugiyama, & Tsuyuki, 2012; Kim et al., 2013; Son et al., 2012*). Με βάση μια μελέτη που διεξήχθη από Tuberoso et al., 2009, Το methyl syringat έχει βρεθεί ότι είναι βιοδείκτης του μελιού Asphodel.

Παράλληλα, εκτός από την χρήση του εργαλείου STOCSY, μια στοχευμένη προσέγγιση (dereplication) βασισμένη στη βιβλιογραφία, οδήγησε στον εντοπισμό άλλων βιοδεικτών.

Γ) π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA)

Το π-υδροξυβενζοϊκό είναι κυρίως γνωστό ως βάση για την παρασκευή των εστέρων του, γνωστών ως parabens, τα οποία χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα καλλυντικά και σε ορισμένα οφθαλμικά διαλύματα (T. R. Aalto, M. C. Firman, 1953). Το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ αναφέρεται ότι έχει, μεταξύ άλλων, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, αντιακτική, και αντιφλεγμονώδη δράση (Chaudhary & Jain, 2018).

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (*Cimmino et al., 2017*), εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές σε χαμηλά πεδία με χημική μετατόπιση $\delta 7.8$ και $\delta 6.9$ με $J=8.7$ Hz (Εικόνα 54). Αυτό το μόριο έχει ανιχνευθεί σε θυμαρίσιο μέλι μόνο από τους Φούρνους, και όχι σε θυμαρίσιο μέλι από άλλα νησιά. Έχει όμως ανιχνευθεί και σε αναμatóμελο από την Ικαρία.

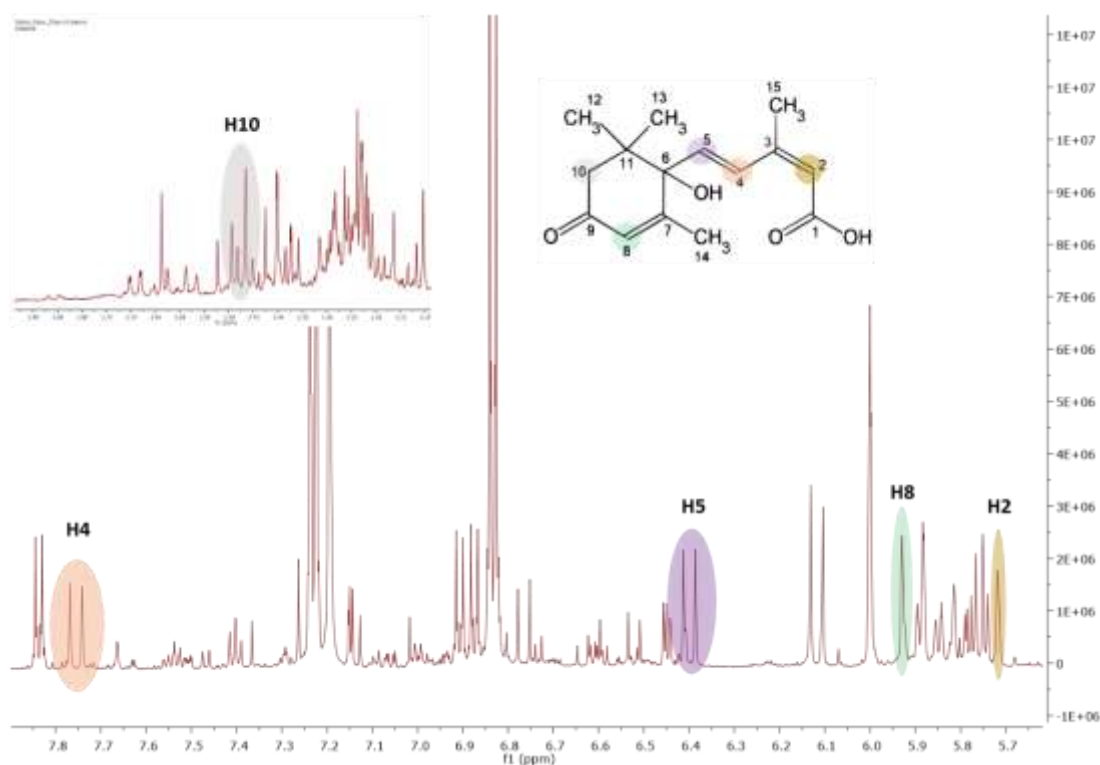


Εικόνα 54. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του δείγματος HON51 που δείχνει τις κορυφές του PHBA

Δ) 2-cis-4-trans-αμπισικό οξύ (Abscisic acid - ABA)

Το 2-cis-4-trans-αμπισικό οξύ είναι μια ορμόνη που υπάρχει στα φυτά και εμπλέκεται σε πολλές αναπτυξιακές διαδικασίες (Liu et al., 2007). Δεν υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με την βιολογική του δράση, αλλά μέχρι τώρα έχει βρεθεί ότι το ABA παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση και βελτιώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη (Bruzzone et al., 2007; Sánchez-sarasúa et al., 2016; Zocchi & Hontecillas, 2017).

Το ABA έχει ανιχνευθεί (Εικόνα 55) σε αναματόμελο από την Ικαρία, με τις ακόλουθες χαρακτηριστικές κορυφές: H4 δ7.75 (d, 15.95Hz), H5 δ6.11 (d, 15.95Hz), H8 δ5.92 (s), H2 δ5.71 (s), H10 δ2.54 (d, 17.15Hz). Οι χημικές μετατοπίσεις και η πολλαπλότητα συγκρίθηκαν με την βιβλιογραφία (Federico Ferreres, Andrade, & Toma, 1996). Αυτές οι κορυφές, δεν εντοπίζονται σε άλλα δείγματα εκτός από το αναματόμελο.

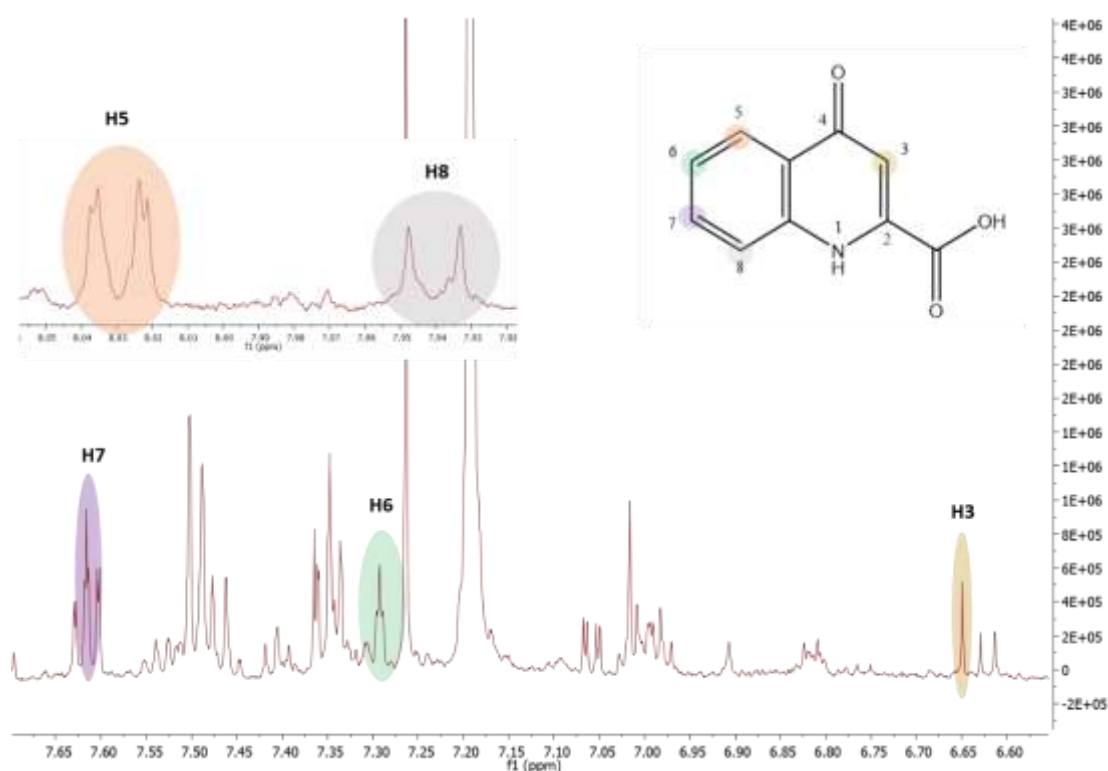


Εικόνα 55. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του δείγματος HON04 που δείχνει τις κορυφές του ABA

Ε) Κυνουρενικό οξύ (KYNA)

Το κυνουρενικό οξύ (KYNA) υπάρχει σε πολλά τρόφιμα, με τις υψηλότερες γνωστές συγκεντρώσεις στο μέλι καστανιάς, ενώ έχει εξεταστεί για θεραπευτική χρήση σε ορισμένες νευροβιολογικές διαταραχές (Hanival & Gonzalez-Nuñez, 2008). Έχει βρεθεί επίσης, ότι το KYNA μπορεί να έχει θετική επίδραση σε διαφορετικές παθολογίες του γαστρεντερικού σωλήνα, και συγκεκριμένα σε έλκος, απόφραξη του παχέος εντέρου ή κολίτιδα (Turski, Turska, Paluszkiwicz, Parada-turska, & Gregory, 2013)

Το KYNA στη συγκεκριμένη μελέτη έχει βρεθεί στο μέλι καστανιάς (Εικόνα 56) από τη Λέσβο, παρουσιάζοντας τις κορυφές H5 δ8.03 (dd, 1.13-8.16Hz), H8 δ7.94 (d), H7 δ7.62(m), H6 δ7.29 (t) και H3 δ6.65 (s). Οι χημικές μετατοπίσεις και η πολλαπλότητα συγκρίθηκαν με την βιβλιογραφία (Beretta et al., 2007). Η τριπλή και η πολλαπλή είναι χαρακτηριστικά σήματα μελιού καστανιάς που δεν μπορούν να ανιχνευθούν σε άλλα δείγματα.



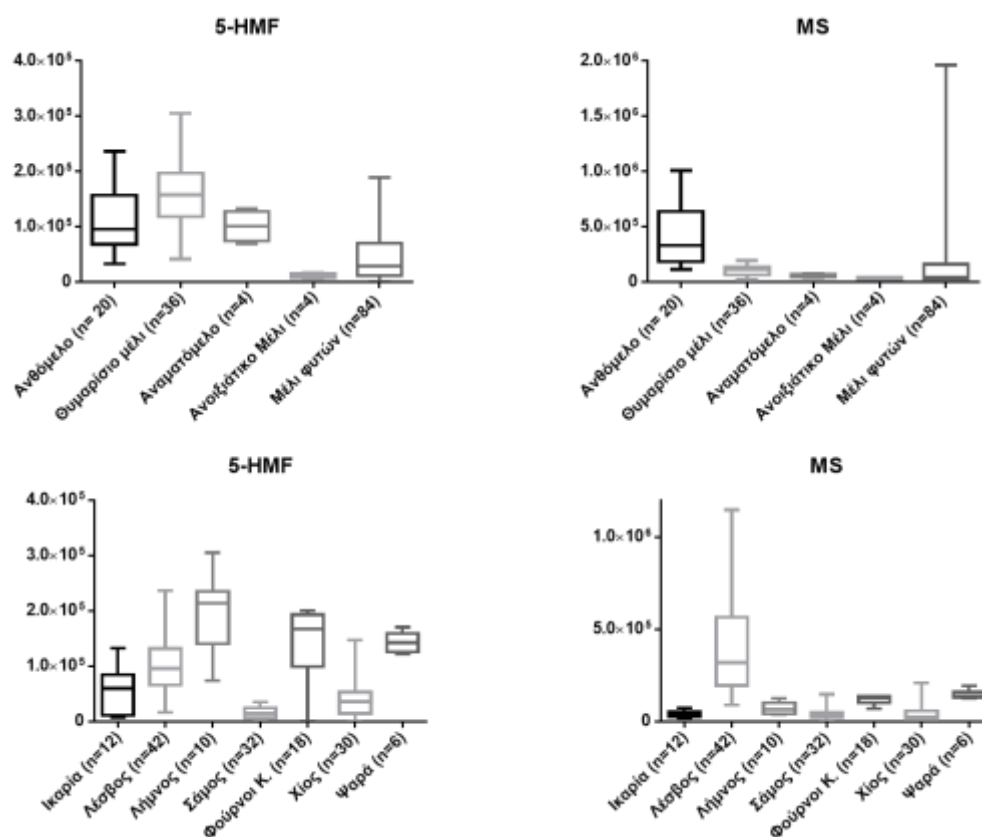
Εικόνα 56. Φάσμα ¹H-NMR του δείγματος HON08 που δείχνει τις κορυφές του KYNA

3.6) Αξιολόγηση της ποιότητας και της αυθεντικότητας

Το επόμενο βήμα ήταν να αξιολογηθούν τα μόρια-βιοδείκτες τα οποία προέκυψαν περαιτέρω.

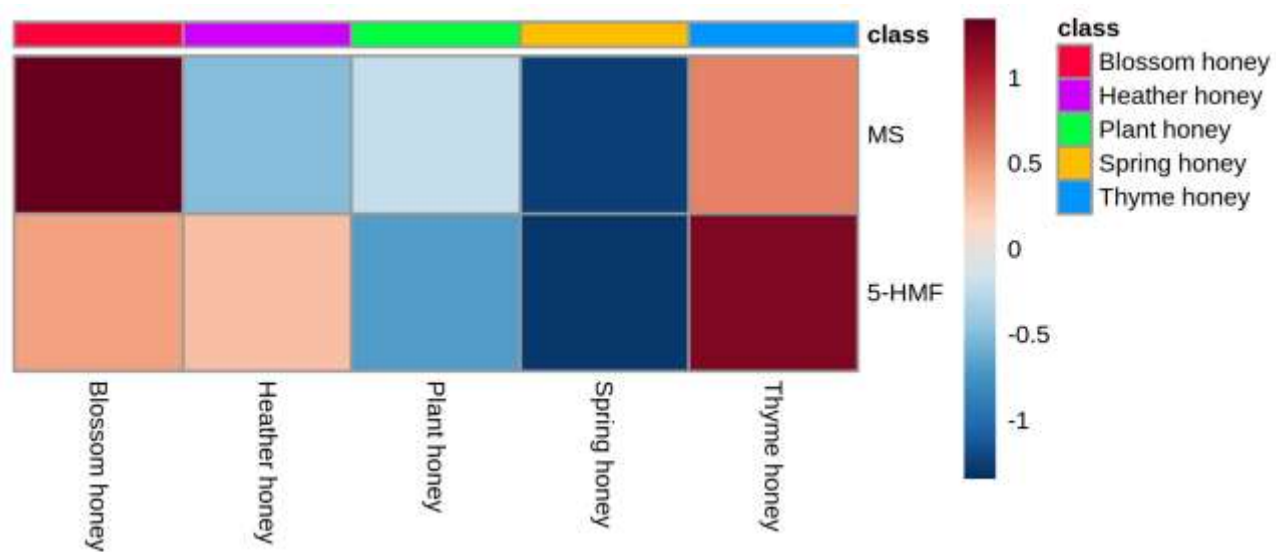
Για αυτό το σκοπό κατασκευάστηκαν θηκογράμματα (box plot) που συνοπτικά παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 57). Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι το HMF ήταν παρόν στην πλειονότητα των δειγμάτων. Ωστόσο, η μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκεται σε **μέλια θυμαριού**. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα μονοποικιλιακά μέλια περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση φρουκτόζης αντί για γλυκόζη, και συγκεκριμένα (Siddiqui, 1970, Tsiapara et al., 2009), το μέλι θυμαριού παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση φρουκτόζης σε σύγκριση με μέλια που έχουν διαφορετική βοτανική προέλευση. Όπως αναφέρθηκε πριν, η 5-HMF δημιουργείται από μονοσακχαρίτες, και κυρίως από την φρουκτόζη μέσω αντίδρασης Maillard. Από την άλλη πλευρά, τα μέλια που παρουσιάζουν μικρότερη συγκέντρωση 5-HMF αντιστοιχούν στα **μέλια φυτών** και τα **ανοιξιάτικα**. Έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία ότι το μελίτωμα περιέχει χαμηλή συγκέντρωση μονοσακχαριτών, και χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση ολιγοσακχαριτών (Siddiqui, 1970). Παρόλο που δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη βοτανική προέλευση αυτών των δειγμάτων, θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι τα περισσότερα από αυτά τα μέλια αντιστοιχούν σε μελίτωμα, και όχι σε μέλι από νέκταρ ανθέων. Όταν λαμβάνεται υπόψη η γεωγραφική προέλευση, τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τη σχετική συγκέντρωση με βάση τη βοτανική προέλευση, καθώς τα δείγματα που προέρχονται από τη Λήμνο, τους Φούρνους και την Ψαρά φέρουν την ένδειξη θυμαρίσιο μέλι. Ωστόσο, δεν μπορεί να αγνοηθεί και η περίπτωση ότι αυξημένο HMF σημαίνει και ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης ή αυξημένη παλαιότητα.

Κάτι παρόμοιο συμβαίνει στην περίπτωση του μεθυλεστέρα του συριγγικού οξέος. Σύμφωνα με το αντίστοιχο θηκόγραμμα, τα ανθόμελα παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση. Όπως αναφέρθηκε πριν, ο μεθυλεστέρας του συριγγικού οξέος χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης του μελιού από ασφόδελο, που καταναλώνεται ευραίως στην Ελλάδα. Όταν λαμβάνεται υπόψη η γεωγραφική προέλευση, τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τη σχετική συγκέντρωση με βάση τη βοτανική προέλευση, καθώς τα δείγματα που προέρχονται από τη Λέσβο φέρουν την ένδειξη ανθόμελο.



Εικόνα 57. Θηκογράμματα (Box plot) με τη διακύμανση των 5-HMF και μεθυλεστέρα του συριγγικού οξέος (MS) σύμφωνα με τη βοτανική και γεωγραφική προέλευσή τους.

Με στόχο μια καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και της συσχέτισης των συγκεντρώσεων των 5-HMF και MS στα υπό ανάλυση δείγματα, κατασκευάστηκε ένας χάρτης θερμότητας «heat map» (Εικόνα 58). Όπως φαίνεται το ανθόμελο παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση MS, ενώ για το ανοιξιάτικο μέλι, δείκτης θα μπορούσε να είναι η απουσία αυτής της ένωσης. Τα μέλια φυτών και ερείκης παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα επίσης, ενώ σχετικά αυξημένο εμφανίζεται στο θυμαρίσιο μέλι. Σχετικά με το 5-HMF, φαίνεται εμφανώς ότι το θυμαρίσιο μέλι παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ η απουσία του ή τα μειωμένα επίπεδά του είναι χαρακτηριστικό για το ανοιξιάτικο μέλι και το μέλι φυτών. Σύμφωνα με τη προηγούμενη συζήτηση, το μελίτωμα περιέχει χαμηλότερη συγκέντρωση της υδροξυμεθυλφουρφουράλης, επειδή χαρακτηρίζεται από την παρουσία ολιγοσακχαριτών, και όχι τόσο μονοσακχαριτών. Για αυτό το λόγο, το ανοιξιάτικο μέλι θα μπορούσε να προσδιοριστεί ως μελίτωμα.



Εικόνα 58. Χάρτης θερμότητας (heat map) των 5-HMF και MS.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας μεταβολομικής με τη χρήση NMR για τον έλεγχο βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης Ελληνικών μελιών του ΒΑ Αιγαίου. Επίσης, αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα ποσοτικής παραλαβής των φαινολικών συστατικών του μελιού ενώ απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν χαρακτηριστικές ενώσεις – βιοδείκτες.

Συγκεκριμένα, λόγω της μεγάλης δυσκολίας χειρισμού του μελιού (υψηλό ιξώδες, μεγάλη αναλογία σακχάρων) αρχικό βήμα ήταν η ανάπτυξη μεθοδολογιών για την πλήρη απομάκρυνση των σακχάρων και την ποσοτική παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών. Διάφοροι μέθοδοι με τη χρήση υγρής-υγρής εκχύλισης και την χρήση ρητίνης προσρόφησης Amberlite XAD7 ή συνδιασμό τους, δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκαν. Φάνηκε ότι ο συνδιαμός υγρής-υγρής εκχύλισης με το σύστημα $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, με EtOAc και ρητίνης ήταν η πιο αποτελεσματική τόσο ποσοτικά (απόδοση) όσο και ποιοτικά (χρήση TLC, HPLC, UHPLC-ESI(±)-HRMS/MS, NMR). Με την τεχνική UHPLC-ESI(±)-HRMS/MS, ταυτοποιήθηκαν πάνω από 100 μεταβολίτες ενώ αξίζει να σημειωθεί πως η παράλληλη χρήση αυτών των τεχνικών δεν έχει αναφερθεί στη τρέχουσα βιβλιογραφία, και επίσης δεν υπάρχει μια αντίστοιχη μελέτη που αναφέρει τη χρήση της προσέγγισης dereplication σε ελληνικό μέλι. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας ένα δείγμα μελιού ως οδηγό πραγματοποιήθηκε απομόνωση και ταυτοποίησης σε καθαρή μορφή των μορίων κυνourενικό οξύ (KA) και η υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF) τα οποία ποτελούν σημαντικούς δείκτες ποιότητας.

Παράλληλα, στα πλαίσια της εργασίας πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μεταβολομικού πρωτοκόλλου (προκατεργασία δειγμάτων, ανάλυση, επεξεργασία δεδομένων) με τη χρήση NMR για τη μελέτη του μελιού. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν 76 δείγματα από νησιά του Α. Αιγαίου (Λήμνος, Αγ. Ευστράτιος, Λέσβος, Ψαρά, Χίος, Ικαρία, Σάμος, Φουρνοι Κορσεών) και με διαφορετική βοτανική προέλευση (Μέλι φυτών, ανοιξιάτικο μέλι, αναματόμελο, μέλι καστανιάς, ανθόμελο και θυμαρίσιο μέλι) με στόχο την ανάπτυξη μοντέλων αποτύπωσης και πρόβλεψης της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης καθώς και την ανάδειξη μορίων-βιοδεικτών. Η προτεινόμενη μέθοδος απαιτεί πολύ μικρή προετοιμασία δείγματος, είναι γρήγορη, αναπαραγώγιμη, επιτρέπει να αποκτηθεί ταυτόχρονα το αποτύπωμα διαφορετικών κατηγοριών ενώσεων και παρέχει σύντομο χρόνο απόκτησης για την ανάλυση.

Βάσει των αποτελεσμάτων της στατιστικής επεξεργασίας με την χρήση επιβλεπόμενων και μη επιβλεπόμενων χημειομετρικών μεθόδων και των παραγώμενων μοντέλων κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός των δειγμάτων βάσει γεωγραφικής προέλευσης κυρίως μεταξύ των νησιών Χίος, Ψαρά και Φούρνοι τα οποία παρουσίασαν τη μεγαλύτερη εναλλαγή μεταβολώματος. Από την άλλη πλευρά είναι σαφής ο διαχωρισμός των μελιών με βάση τη βοτανική προέλευση, όπου βρέθηκε η προφανής ομαδοποίηση των μελιών από θυμάρι και των μελιών φυτών. Επίσης, το αναματόμελο βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη εναλλαγή μεταβολώματος. Διαπιστώθηκε ότι τα λιπαρά οξέα και ορισμένες απλές φαινόλες είναι οι κατηγορίες ενώσεων που είναι υπεύθυνες για την ομαδοποίηση/διαχωρισμό με βάση τη γεωγραφική προέλευση, ενώ για τη βοτανική προέλευση, τα λιπίδια και οι ενώσεις όπως η 5-HMF είναι υπεύθυνα για την ομαδοποίηση/διαχωρισμό τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την ταυτοποίηση των βιοδεικτών χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος STOCYSY με την οποία αναδείχτηκαν και ταυτοποιήθηκαν η υδροξυμεθυλφουρφουράλη (5-HMF) και ο μεθυλεστέρας του συριγγικού οξέος (MS), καθώς και με βάση βιβλιογραφίας βρέθηκαν το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA), το 2-cis-4-trans-αμπισικό οξύ (ABA) και το κυνourενικό οξύ (KYNA).

Τέλος, είναι δυνατόν να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την ταυτότητα του μελιού από διαφορετικές βοτανικές πηγές. Το 2-cis-4-trans-αμπισικό οξύ και το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ αποτελούν βιοδείκτες του αναματόμελου και το κυνourενικό οξύ, του μελιού καστανιάς. Από την άλλη πλευρά, τα μέλια με προέλευση από τους Φούρνους, χαρακτηρίζονται από την παρουσία του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος κάτι που δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν. Ο μεθυλεστέρας του συριγγικού οξέος βρέθηκε να είναι βιοδείκτης του ανθομέλου, όπου βρέθηκε σε μεγάλη συγκέντρωση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα. Επίσης, η απουσία της ένωσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για ανοιξιότικο μέλι. Η 5-HMF βρέθηκε να είναι σημαντικός βιοδείκτης του θυμαρίσιου μελιού.

Μελλοντικοί στόχοι αποτελούν η ταυτοποίηση κι άλλων δευτερογενών μεταβολιτών από τα μέλια που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη και η ανάδειξη περισσότερων μορίων βιοδεικτών και πιο εκτεταμένη χρήση της μεθόδου STOCYSY. Επίσης, στόχο αποτελεί η μεταβολομική μελέτη με την χρήση της τεχνικής LC-HRMS, και περαιτέρω σύγκριση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε αυτήν την εργασία. Τέλος, η ανάλυση και άλλων δειγμάτων μελιού διαφορετικής βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης για τον εμπλουτισμό της υπάρχουσας βάσης δεδομένων και την ισχυροποίηση των μοντέλων.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Naby Awad, O. G., & Hamad, A. M. H. (2018). Honey can help in herpes simplex gingivostomatitis in children: Prospective randomized double blind placebo controlled clinical trial. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 39(6), 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2018.09.007>
- Abdullah, I., Gary, S. R., & Marla, S. (2007). Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂. *Apidologie*, 38, 67–76. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N. C., Manley-Harris, M., & Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research*, 343(4), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.011>
- Adamski, J. (2020). *Introduction to metabolomics. Metabolomics for Biomedical Research*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812784-1.00001-3>
- Adebo, O. A., Njobeh, P. B., Adebisi, J. A., Gbashi, S., & Kayitesi, E. (2017). Food Metabolomics: A New Frontier in Food Analysis and its Application to Understanding Fermented Foods. *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*, (August). <https://doi.org/10.5772/intechopen.69171>
- Ahmed, S., & Othman, N. H. (2013). Honey as a Potential Natural Anticancer Agent : A Review of Its Mechanisms, 2013(c).
- 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 Chemistry*, 121(3), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.098>
- Alissandrakis, E., Kibaris, A. C., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Polissiou, M. (2005). Flavour compounds of Greek cotton honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(9), 1444–1452. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2124>
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Polissiou, M. (2007a). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100(1), 396–404.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.015>

- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Polissiou, M. (2007b). Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 8152–8157. <https://doi.org/10.1021/jf071442y>
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Pappas, C., Harizanis, P. C., & Polissiou, M. (2011). Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1042–1051. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.002>
- An, N., Cai, W., Zhu, Q., Wang, W., Hussain, D., Feng, Y., ... Y-q, F. (2020). Metabolic Profiling of organic acids in honey by stable isotope labeling assisted liquid chromatography-mass spectrometry. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103423>
- Andrade, P., Ferreres, F., Gil, M. I., & Tomás-Barberán, F. A. (1997). Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. *Food Chemistry*, 60(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00313-5)
- Aquosa, F. (2003). Isolamento e Identificação do Flavonóide Rutina em Mel Laranjeira de, 26(Ic), 2003–2004.
- Bargańska, Z., Lebioda, M., & Namieśnik, J. (2016). Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(3), 235–248. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1078220>
- Barker, M., & Rayens, W. (2003). Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, 17(3), 166–173. <https://doi.org/10.1002/cem.785>
- Bastías, J. M., Jambon, P., Muñoz, O., Manquían, N., Bahamonde, P., & Neira, M. (2013). Honey as a bioindicator of arsenic contamination due to volcanic and mining activities in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(2), 147–153. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392013000200010>
- Beretta, G., Caneva, E., & Facino, R. M. (2007). Kynurenic acid in honey from arboreal plants: MS and NMR evidence. *Planta Medica*, 73(15), 1592–1595. <https://doi.org/10.1055/s-2007-993740>
- Beretta, G., Caneva, E., Regazzoni, L., Bakhtyari, N. G., & Maffei Facino, R. (2008). A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Analytica Chimica Acta*, 620(1–2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.025>
- Bergmann-Verlag, @ J F, Kapoulas, V. M., Mastronicolis, S. K., & Galanos, D. S. (1977). Identification

- of the Lipid Components of Honey. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch*, 163, 96–99. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F01126025.pdf>
- Beteinakis, S., Papachristodoulou, A., Gogou, G., Katsikis, S., Mikros, E., & Halabalaki, M. (2020). NMR-based metabolic profiling of edible olives-determination of quality parameters. *Molecules*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153339>
- Blasco, C., Lino, C. M., Picó, Y., Pena, A., Font, G., & Silveira, M. I. N. (2004). Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *Journal of Chromatography A*, 1049(1–2), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.049>
- Bobis, O. (2007). FREE PHENOLIC ACIDS, FLAVONOIDS AND ABSCISIC ACID RELATED to HPLC SUGAR PROFILE IN ACACIA HONEY. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca - Animal Science and Biotechnologies*, 64(January 2007), 179–185. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:64:1-2:2230>
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Bouseta, A., Collin, S., & Dufour, J. P. (1992). Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system. *Journal of Apicultural Research*, 31(2), 96–109. <https://doi.org/10.1080/00218839.1992.11101268>
- Brereton, R. G. (2007). *Applied Chemometrics for Scientists. Applied Chemometrics for Scientists*. <https://doi.org/10.1002/9780470057780>
- Broom, S. J., Wilkins, A. L., Lu, Y., & Ede, R. M. (1994). Novel nor-Sesquiterpenoids in New Zealand Honeys. The Relative and Absolute Stereochemistry of the Kamahines: An Extension of the Mosher Method to Hemiacetals. *Journal of Organic Chemistry*, 59(21), 6425–6430. <https://doi.org/10.1021/jo00100a053>
- Bruzzone, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A., ... Zocchi, E. (2007). Absciscic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger, 104(14), 5759–5764.
- Cabras, P., Angioni, A., Tuberioso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C., ... Tossicologia, D. (1999). Homogentisic Acid : A Phenolic Acid as a Marker of Strawberry-Tree (*Arbutus unedo*) Honey, 000(group I), 4064–4067. <https://doi.org/10.1021/jf990141o>
- Cagliani, L. R., Culeddu, N., Chessa, M., & Consonni, R. (2015). NMR investigations for a quality

- assessment of Italian PDO saffron (*Crocus sativus* L.). *Food Control*, 50, 342–348.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.017>
- Campone, L., Piccinelli, A. L., Pagano, I., Carabetta, S., Di Sanzo, R., Russo, M., & Rastrelli, L. (2014). Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1334, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.081>
- Cao, R., Nonaka, A., Komura, F., & Matsui, T. (2015). Application of diffusion ordered-1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy to quantify sucrose in beverages. *Food Chemistry*, 171, 8–12.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.105>
- Capozzi, F., Ciampa, A., Picone, G., Placucci, G., & Savorani, F. (2011). Normalization is a Necessary Step in NMR Data Processing: Finding the Right Scaling Factors, (July 2014), 147–160.
<https://doi.org/10.1039/9781849732994-00147>
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103(2), 601–606.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.031>
- Castro-Vázquez, Lucia, Díaz-Maroto, M. C., & Pérez-Coello, M. S. (2006). Volatile Composition and contribution to the aroma of spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4809–4813.
<https://doi.org/10.1021/jf0604384>
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(11–12), 557–566. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.002>
- Chakir, A., Romane, A., Marcazzan, G. L., & Ferrazzi, P. (2016). Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S946–S954.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.10.013>
- Chaudhary, J., & Jain, A. (2018). A Comprehensive Review on Biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives, (October).
- Chen, J. H., & Ho, C. T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2374–2378.
<https://doi.org/10.1021/jf970055t>
- Cho, J. Y., Bae, S. H., Kim, H. K., Lee, M. L., Choi, Y. S., Jin, B. R., ... Moon, J. H. (2015). New Quinolinone Alkaloids from Chestnut (*Castanea crenata* Sieb) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01027>

- CiAnciosi, D., Yuliett, T., Afrin, S., GasparriNi, M., ReboRedo-rodriguez, P., Manna, P. P., ... Toyos, P. A. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits : A Review. *Molecules*, 23(2322), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Cimmino, A., Cinelli, T., Masi, M., Reveglia, P., Araujo, M., Mugnai, L., ... Evidente, A. (2017). Phytotoxic lipophylic metabolites produced by grapevine strains of Lasiodiplodia species in Brazil Phytotoxic lipophylic metabolites produced by grapevine strains of Lasiodiplodia species in Brazil. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04906>
- Ciulu, M., Spano, N., Pilo, M. I., & Sanna, G. (2016). Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys. *Molecules*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040451>
- Cloarec, O., Dumas, M. E., Craig, A., Barton, R. H., Trygg, J., Hudson, J., ... Nicholson, J. (2005). Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic 1H NMR data sets. *Analytical Chemistry*, 77(5), 1282–1289. <https://doi.org/10.1021/ac048630x>
- Communities, O. J. of the E. (1984). COUNCIL DIRECTIVE of 22 July 1974 on the harmonization of the laws of the Member States relating to honey. *Official Journal of the European Communities*, 21(6), 196. <https://doi.org/10.1039/AP9842100196>
- Consonni, R., Cagliani, L. R., & Cogliati, C. (2012). NMR characterization of saccharides in italian honeys of different floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4526–4534. <https://doi.org/10.1021/jf3008713>
- Crane, E. (1991). Honey from honeybees and other insects. *Ethology Ecology and Evolution*, 3(June), 100–105. <https://doi.org/10.1080/03949370.1991.10721919>
- Cuevas-Glory, L. F., Pino, J. A., Santiago, L. S., & Sauri-Duch, E. (2007). A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3), 1032–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.068>
- da Costa, A. C. V., Sousa, J. M. B., Bezerra, T. K. A., da Silva, F. L. H., Pastore, G. M., da Silva, M. A. A. P., & Madruga, M. S. (2018). Volatile profile of monofloral honeys produced in Brazilian semiarid region by stingless bees and key volatile compounds. *Lwt*, 94(August 2017), 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.043>
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Daignault, S. A., Noot, D. K., Williams, D. T., & Huck, P. M. (1988). A review of the use of XAD resins to

concentrate organic compounds in water. *Water Research*, 22(7), 803–813.

[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(88\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(88)90017-6)

Daniels, B. J., Prijic, G., Meidinger, S., Loomes, K. M., Stephens, J. M., Schlothauer, R. C., ... Brimble, M. A. (2016). Isolation, Structural Elucidation, and Synthesis of Lepteridine from Manuka (*Leptospermum scoparium*) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), 5079–5084. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01596>

Davies, A. M. C. (1975). Amino acid analysis of honeys from eleven countries. *Journal of Apicultural Research*, 14(1), 29–39. <https://doi.org/10.1080/00218839.1975.11099798>

De-melo, A. A. M., Almeida-muradian, L. B. De, Sancho, M. T., Pascual-maté, A., & Pascual-mate, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey : A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5–37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>

de la Fuente, E., Sanz, M. L., Martínez-Castro, I., Sanz, J., & Ruiz-Matute, A. I. (2007). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.039>

Donarski, J. A., Jones, S. A., Harrison, M., Driffield, M., & Charlton, A. J. (2010). Identification of botanical biomarkers found in Corsican honey. *Food Chemistry*, 118(4), 987–994. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.033>

Ede, R. M., Wilkins, A. L., Lu, Y., & Tan, S. T. (1993). Novel nor-sesquiterpenoids in New Zealand honeys II. Isolation and structural characterisation of meliracemoic acid. *Tetrahedron Letters*, 34(42), 6795–6798. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61704-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61704-5)

Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2007). Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. *Pharmacogenomics*, 8(9), 1243–1266. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.9.1243>

Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., ... Wishart, D. S. (2019). Nmr spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>

Emwas, A. H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., dos Santos, V. A. P. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018a). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, 14(3), 0. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>

Emwas, A. H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., dos Santos, V. A. P. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018b). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR

- data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, 14(3), 1–23.
<https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>
- Erhardt, S., Olsson, S. K., & Engberg, G. (2009). Pharmacological manipulation of kynurenic acid: Potential in the treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs*, 23(2), 91–101.
<https://doi.org/10.2165/00023210-200923020-00001>
- Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., & Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 142, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.033>
- Eteraf-Oskouei, T., & Najafi, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(6), 731–742.
<https://doi.org/10.22038/ijbms.2013.988>
- Fakhlaei, R., Selamat, J., Khatib, A., Razis, A. F. A., Sukor, R., Ahmad, S., & Babadi, A. A. (2020). The Toxic Impact of Honey Adulteration: A Review. *Foods*, 9(11), 1538.
<https://doi.org/10.3390/foods9111538>
- Fermo, P., Beretta, G., Facino, R. M., Gelmini, F., & Piazzalunga, A. (2013). Ionic profile of honey as a potential indicator of botanical origin and global environmental pollution. *Environmental Pollution*, 178, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.029>
- Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., Soler, C., García-Viguera, C., Ortiz, A., & Tomás-Lorente, F. (1994). A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*, 25(1), 21–30. <https://doi.org/10.1051/apido:19940103>
- Ferreres, Federico, Andrade, P., Gil, M. I., & Tomás-Barberán, F. A. (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *European Food Research and Technology*, 202(1), 40–44. <https://doi.org/10.1007/BF01229682>
- Ferreres, Federico, Andrade, P., & Toma, F. A. (1996). Natural Occurrence of Absciscic Acid in Heather Honey and Floral Nectar, 8561(95), 0–3. <https://doi.org/10.1021/jf9507553>
- Ferreres, Federico, García-Viguera, C., Tomás-Lorente, F., & Tomás-Barberán, F. A. (1993). Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61(1), 121–123. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740610119>
- Ferreres, Federico, Giner, J. M., & Tomás-Barberán, F. A. (1994). A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(3), 371–372. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740650316>
- Ferreres, Federico, Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., & Tomás-Lorente, F. (1991). An HPLC

technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56(1), 49–56. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740560106>

Fodor, P., & Molnar, E. (1993). Honey as an environmental indicator: Effect of sample preparation on trace element determination by ICP-AES. *Mikrochimica Acta*, 112(1–4), 113–118.

<https://doi.org/10.1007/BF01243327>

Gallego-Picó, A., Garcinuño-Martínez, R. M., & Fernández-Hernando, P. (2013). Chapter 20 - Honey authenticity and traceability in “Food Protected designation of origin: methodologies and applications.” *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59562-1.00020-7>

García, J. C. R., Rodríguez, R. I., Crecente, R. M. P., García, J. B., Martín, S. G., & Latorre, C. H. (2006). Preliminary chemometric study on the use of honey as an environmental marker in Galicia (northwestern Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7206–7212.

<https://doi.org/10.1021/jf060823t>

Gašić, U. M., Milojković-Opsenica, D. M., & Tešić, Ž. L. (2017). Polyphenols as possible markers of botanical origin of honey. *Journal of AOAC International*, 100(4), 852–861.

<https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0144>

Geană, E. I., Ciucure, C. T., Costinel, D., & Ionete, R. E. (2020). Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}\text{C}$ signature. *Food Control*, 109(September 2019).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106919>

Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). Targeted and nontargeted wine analysis by ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. differentiation of important parameters: Grape variety, geographical origin, year of vintage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619.

<https://doi.org/10.1021/jf400800d>

Guyot, C., Bouseta, A., Scheirman, V., & Collin, S. (1998). Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 625–633.

<https://doi.org/10.1021/jf970510l>

Guyot, C., Scheirman, V., & Collin, S. (1999). Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*, 64(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00122-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00122-8)

Hanival, S., & Gonzalez-Nuñez, X. (2008). Development and therapeutic potential of kynurenic acid

- and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Tips*, 21(April), 149–154.
- Hao, X. L., Chen, F., Zhao, Y. B., & Tian, H. Z. (2011). Determination of five flavonoids in honeys by HPLC-ESI-MS/MS. *Proceedings of 2011 International Conference on Electronic and Mechanical Engineering and Information Technology, EMEIT 2011*, 4, 1773–1776.
<https://doi.org/10.1109/EMEIT.2011.6023446>
- Hohmann, M., Koospal, V., Bauer-Christoph, C., Christoph, N., Wachter, H., Diehl, B., & Holzgrabe, U. (2015). Quantitative ¹H NMR analysis of egg yolk, alcohol, and total sugar content in egg liqueurs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4112–4119.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00940>
- Hsieh, Y. Z., & Kuo, K. L. (1997). Separation of retinoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 761(1–2), 307–313.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00820-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00820-5)
- Iglesias, M. T., De Lorenzo, C., Polo, M. D. C., Martín-Álvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Usefulness of Amino Acid Composition to Discriminate between Honeydew and Floral Honeys. Application to Honeys from a Small Geographic Area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 84–89.
<https://doi.org/10.1021/jf030454q>
- Islam, M. N., Khalil, M. I., Islam, M. A., & Gan, S. H. (2014). Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*, 34(7), 733–742. <https://doi.org/10.1002/jat.2952>
- Jandrić, Z., Frew, R. D., Fernandez-Cedi, L. N., & Cannavan, A. (2017). An investigative study on discrimination of honey of various floral and geographical origins using UPLC-QToF MS and multivariate data analysis. *Food Control*, 72, 189–197.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.010>
- Jasicka-Misiak, I., Makowicz, E., & Stanek, N. (2018). Chromatographic fingerprint, antioxidant activity, and colour characteristic of polish goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) honey and flower. *European Food Research and Technology*, 244(7), 1169–1184. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3034-3>
- Jerkovic, I., Hegic, G., Marijanovic, Z., & Bubalo, D. (2010). Organic extractives from mentha spp. Honey and the bee-stomach: Methyl syringate, vomifoliol, terpenediol i, hotrienol and other compounds. *Molecules*, 15(4), 2911–2924. <https://doi.org/10.3390/molecules15042911>
- Jerković, I., Kuś, P. M., Tuberoso, C. I. G., & Šarolić, M. (2014). Phytochemical and physical-chemical analysis of Polish willow (*Salix* spp.) honey: Identification of the marker compounds. *Food Chemistry*, 145, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.004>

- Jermnak, U., Yoshinari, T., Sugiyama, Y., & Tsuyuki, R. (2012). Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.023>
- Jones, K. C. (1987). Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water, Air, and Soil Pollution*, 33(1–2), 179–189. <https://doi.org/10.1007/BF00191386>
- Jones, O. A. H. (2018). Illuminating the dark metabolome to advance the molecular characterisation of biological systems. *Metabolomics*, 14(8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1396-y>
- Kacaniova, M., Knazovicka, V., Melich, M., Fikselova, M., Massanyi, P., Stawarz, R., ... Putala, A. (2009). Environmental concentration of selected elements and relation to physicochemical parameters in honey. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 44(4), 414–422. <https://doi.org/10.1080/10934520802659802>
- Karabagias, I. K. (2019). Seeking of reliable markers related to Greek nectar honey geographical and botanical origin identification based on sugar profile by HPLC-RI and electro-chemical parameters using multivariate statistics. *European Food Research and Technology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3216-z>
- Karabagias, I. K., Badeka, A. V., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M. G. (2014). Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. *Food Chemistry*, 165, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.033>
- Karabagias, I. K., Louppis, A. P., Kontakos, S., Papastephanou, C., & Kontominas, M. G. (2017). Characterization and geographical discrimination of Greek pine and thyme honeys based on their mineral content, using chemometrics. *European Food Research and Technology*, 243(1), 101–113. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2727-8>
- Karabagias, I. K., Nikolaou, C., & Karabagias, V. K. (2019). Volatile fingerprints of common and rare honeys produced in Greece : in search of PHVMs with implementation of the honey code. *European Food Research and Technology*, 245(1), 23–39. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3137-x>
- Karabagias, I. K., Vavoura, M. V., Badeka, A., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2014). Differentiation of Greek Thyme Honeys According to Geographical Origin Based on the Combination of Phenolic Compounds and Conventional Quality Parameters Using Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2113–2121. <https://doi.org/10.1007/s12161->

- Karabagias, I. K., Vavoura, M. V., Nikolaou, C., Badeka, A. V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2014). Floral authentication of Greek unifloral honeys based on the combination of phenolic compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Research International*, 62, 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.015>
- Karabagias, I. K., Vlasίου, M., Kontakos, S., Drouza, C., Kontominas, M. G., & Keramidas, A. D. (2018). Geographical discrimination of pine and fir honeys using multivariate analyses of major and minor honey components identified by ¹H NMR and HPLC along with physicochemical data. *European Food Research and Technology*, 244(7), 1249–1259. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3040-5>
- Karabournioti, S. E., Tsiripidis, I., Thrasyvoulou, A., & Eleftheriou, E. P. (2009). Melissopalynological attributes of some Greek thyme honeys. *Journal of Apicultural Research*, 48(2), 104–114. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.2.04>
- Karabournioti, S., Thrasyvoulou, A., & Eleftheriou, E. P. (2006). A model for predicting geographic origin of honey from the same floral source. *Journal of Apicultural Research*, 45(3), 117–124. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101329>
- Kaškonienė, V., & Venskutonis, P. R. (2010). Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620–634. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x>
- Kassi, E., Chinou, I., Spilioti, E., Tsiapara, A., Graikou, K., Karabournioti, S., ... Moutsatsou, P. (2014). A monoterpene, unique component of thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF-κB activity and IL-6 secretion. *Phytomedicine*, 21(11), 1483–1489. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.04.032>
- Katajamaa, M., & Orešič, M. (2007). Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 1158(1–2), 318–328. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.021>
- Kim, M. J., Son, H. J., Song, S. H., Jung, M., Kim, Y., & Rhyu, M. (2013). The TRPA1 Agonist , Methyl Syringate Suppresses Food Intake and Gastric Emptying, 8(8), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071603>
- Kitts, D. D., Chen, X. M., & Jing, H. (2012). Demonstration of antioxidant and anti-inflammatory bioactivities from sugar-amino acid maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6718–6727. <https://doi.org/10.1021/jf2044636>

- Koltsakidou, A., Zacharis, C. K., & Fytianos, K. (2015). A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid-liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent. *Journal of Chromatography A*, 1377, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.039>
- Kukurová, K., Karovičová, J., Greif, G., Kohajdová, Z., & Lehkoživová, J. (2006). Determination of 5-hydroxymethylfurfural after winkler and by the HPLC method for authentication of honey. *Chemical Papers*, 60(3), 186–191. <https://doi.org/10.2478/s11696-006-0034-8>
- Kuś, P. M., & Jerković, I. (2018). New sample preparation method for honey volatiles fingerprinting based on Dehydration Homogeneous Liquid–Liquid Extraction (DHLLE). *Molecules*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071769>
- Lever, J., Krzywinski, M., & Altman, N. (2017). Points of Significance: Principal component analysis. *Nature Methods*, 14(7), 641–642. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4346>
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W. H., & Ma, L. (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*, 315(5819), 1712–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1135882>
- Longobardi, F., Ventrella, A., Napoli, C., Humpfer, E., Schütz, B., Schäfer, H., ... Sacco, A. (2012). Classification of olive oils according to geographical origin by using ¹H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 130(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.045>
- Louppis, A. P., Karabagias, I. K., Kontakos, S., Kontominas, M. G., & Papastephanou, C. (2017). Botanical discrimination of Greek unifloral honeys based on mineral content in combination with physicochemical parameter analysis, using a validated chemometric approach. *Microchemical Journal*, 135, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.004>
- Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñoz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverri, J., Silva-Adaya, D., ... La Cruz, V. P. De. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(5), 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.07.002>
- Lušić, D., Koprivnjak, O., Ćurić, D., Sabatini, A. G., & Conte, L. S. (2007). Volatile profile of croatian lime tree (Tilia sp.), fir honeydew (Abies alba) and sage (Salvia officinalis) honey. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 156–165.
- Ma, X. L., Li, F. Y., Duan, W. G., Liao, J. N., Lin, Z. D., Lin, G. S., ... Lei, F. H. (2014). Synthesis and antifungal activity of camphoric acid-based acylhydrazone compounds. *Holzforschung*, 68(8),

889–895. <https://doi.org/10.1515/hf-2014-0002>

Maione, C., Barbosa, F., & Barbosa, R. M. (2019). Predicting the botanical and geographical origin of honey with multivariate data analysis and machine learning techniques: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*, 157(January), 436–446.

<https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.01.020>

Markowicz, a, Wegrzynek, D., Chinea-Cano, E., Bamford, S. a, Torres, D. H., & Alvarez, R. P. (2007). Honey characterization by total x-ray fluorescence: Evaluation of environmental quality and risk for the human health. *X-Ray Spectrometry*, 36(1), 27–34. <https://doi.org/10.1002/xrs>

Martos, I., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2000). Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1498–1502. <https://doi.org/10.1021/jf991166q>

Moore, R. A., & Karasek, F. W. (1984). Extraction of organic compounds from aqueous media by amberlite XAD resins. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 17(3–4), 187–202. <https://doi.org/10.1080/03067318408076972>

Naila, A., Flint, S. H., Sulaiman, A. Z., Ajit, A., & Weeds, Z. (2018). Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control*, 90, 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.027>

Nespeca, M. G., Vieira, A. L., Júnior, D. S., Neto, J. A. G., & Ferreira, E. C. (2020). Detection and quantification of adulterants in honey by LIBS. *Food Chemistry*, 311(August 2019), 125886. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125886>

Noviyanto, A., & Abdulla, W. H. (2020). Honey botanical origin classification using hyperspectral imaging and machine learning. *Journal of Food Engineering*, 265(January 2019), 109684. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109684>

Oroian, M., Paduret, S., & Ropciuc, S. (2018). Honey adulteration detection: voltammetric e-tongue versus official methods for physicochemical parameter determination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11), 4304–4311. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8956>

Oroian, M., Ropciuc, S., Paduret, S., & Todosi, E. (2018). Rheological analysis of honeydew honey adulterated with glucose, fructose, inverted sugar, hydrolysed inulin syrup and malt wort. *Lwt*, 95(February), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.064>

Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Gómez-Romero, M., Aboud, F., Giuseppe, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2017). Characterisation of phenolic compounds in Algerian honeys by RP-HPLC coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *LWT* -

- Food Science and Technology*, 85, 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.084>
- Ozcan-Sinir, G., Copur, O. U., & Barringer, S. A. (2020). Botanical and geographical origin of Turkish honeys by selected-ion flow-tube mass spectrometry and chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5), 2198–2207. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10244>
- Panseri, S., Catalano, A., Giorgi, A., Arioli, F., Procopio, A., Britti, D., & Chiesa, L. M. (2014). Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *Food Control*, 38(1), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.024>
- Pascual-Maté, A., Osés, S. M., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2018). Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures. *Separation and Purification Reviews*, 47(2), 142–158. <https://doi.org/10.1080/15422119.2017.1354025>
- Petrus, K., Schwartz, H., & Sontag, G. (2011). Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(8), 2555–2563. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4614-7>
- Pita-Calvo, C., & Vázquez, M. (2018). Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2523–2537. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05807>
- Pyrzynska, K., & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.015>
- Ramli, N. Z., Chin, K. Y., Zarkasi, K. A., & Ahmad, F. (2018). A review on the protective effects of honey against metabolic syndrome. *Nutrients*, 10(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/nu10081009>
- Rana, S., Mishra, M., Yadav, D., Subramani, S. K., Katare, C., & Prasad, G. (2018). Medicinal uses of honey: A review on its benefits to human health. *Progress in Nutrition*, 20(5), 5–14. <https://doi.org/10.23751/pn.v20i1-S.6394>
- Ren, J. L., Zhang, A. H., Kong, L., & Wang, X. J. (2018). Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Advances*, 8(40), 22335–22350. <https://doi.org/10.1039/c8ra01574k>
- Ruoff, K., Luginbühl, W., Bogdanov, S., Bosset, J. O., Estermann, B., Ziolk, T., & Amadò, R. (2006). Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6867–6872. <https://doi.org/10.1021/jf060770f>
- S. Bogdanov, P. M. (2002). Honey Authenticity : a Review. *The Standard Alimentarius, Codex*, 1–20.

- Sánchez-sarasúa, S., Moustafa, S., García-avilés, Á., López-climent, M. F., Gómez-cadenas, A., Oluchabordonau, F. E., & Sánchez-pérez, A. M. (2016). The effect of abscisic acid chronic treatment on neuroinflammatory markers and memory in a rat model of high-fat diet induced neuroinflammation. *Nutrition & Metabolism*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0137-3>
- Schievano, E., Peggion, E., & Mammi, S. (2010). ¹H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 57–65. <https://doi.org/10.1021/jf9022977>
- Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C., & Mammi, S. (2012). An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics*, 8(4), 679–690. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0362-8>
- Schrimpe-Rutledge, A. C., Codreanu, S. G., Sherrod, S. D., & McLean, J. A. (2016). Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27(12), 1897–1905. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1469-y>
- Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13065-018-0408-3>
- Sherma, J., & Rabel, F. (2018). A review of thin layer chromatography methods for determination of authenticity of foods and dietary supplements. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 41(10), 645–657. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1505637>
- Siddiqui, I. R. (1970). The sugars of honey. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 25(C), 285–309. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60430-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60430-8)
- Skiadas, P. K., & Lascaratos, J. G. (2001). Dietetics in ancient Greek philosophy: Plato's concepts of healthy diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(7), 532–537. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601179>
- Son, H. J., Kim, M. J., Park, J., Ishii, S., Misaka, T., & Rhyu, M. (2012). Methyl Syringate , a Low-molecular-weight Phenolic Ester , as an Activator of the Chemosensory Ion Channel TRPA1, 35(12), 2211–2218. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-1220-6>
- Sousa, S. A. A., Magalhães, A., & Ferreira, M. M. C. (2013). Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 122, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.01.006>
- Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., Chinou, I., ... Moutsatsou, P. (2014). Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from

- various regions in Greece. *PLoS ONE*, 9(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094860>
- Stanek, N., Kafarski, P., & Jasicka-Misiak, I. (2019). Development of a high performance thin layer chromatography method for the rapid qualification and quantification of phenolic compounds and abscisic acid in honeys. *Journal of Chromatography A*, 1598, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.052>
- Stanek, N., Teper, D., Kafarski, P., & Jasicka-Misiak, I. (2019). Authentication of phacelia honeys (*Phacelia tanacetifolia*) based on a combination of HPLC and HPTLC analyses as well as spectrophotometric measurements. *Lwt*, 107(March), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.009>
- T. R. Aalto, M. C. Firman, N. E. R. (1953). p-hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, 42(7), i. <https://doi.org/10.1002/jps.3030420701>
- Tan, S. Z., Begley, P., Mullard, G., Hollywood, K. A., & Bishop, P. N. (2016). Introduction to metabolomics and its applications in ophthalmology. *Eye (Basingstoke)*, 30(6), 773–783. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.37>
- Tananaki, C., Thrasyvoulou, A., Giraudel, J. L., & Montury, M. (2007). Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps. *Food Chemistry*, 101(4), 1687–1693. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.042>
- Teixidó, E., Moyano, E., Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2008). Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. *Journal of Chromatography A*, 1185(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.057>
- Tette, P. A. S., Guidi, L. R., Bastos, E. M. A. F., Fernandes, C., & Gloria, M. B. A. (2017). Synephrine – A potential biomarker for orange honey authenticity. *Food Chemistry*, 229, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.108>
- Tomaáds-Barberaádn, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., & Anklam, E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 485–496. <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>
- Tong, X., Li, M., Yan, N., Ma, Y., Dyson, P. J., & Li, Y. (2011). Defunctionalization of fructose and sucrose: Iron-catalyzed production of 5-hydroxymethylfurfural from fructose and sucrose. *Catalysis Today*, 175(1), 524–527. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2011.03.003>
- Tosi, E. A., Ré, E., Lucero, H., & Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time

- heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.005>
- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., & Ré, E. (2008). Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*, 106(3), 883–887. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.025>
- Truchado, P., Ferreres, F., Bortolotti, L., Sabatini, A. G., & Tomás-Barberán, F. A. (2008). Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8815–8824. <https://doi.org/10.1021/jf801625t>
- Truchado, P., Martos, I., Bortolotti, L., Sabatini, A. G., Ferreres, F., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Use of quinoline alkaloids as markers of the floral origin of chestnut honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5680–5686. <https://doi.org/10.1021/jf900766v>
- Tsiapara, A. V., Jaakkola, M., Chinou, I., Graikou, K., Tolonen, T., Virtanen, V., & Moutsatsou, P. (2009). Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chemistry*, 116(3), 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.024>
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Caboni, P., Cottiglia, F., Cabras, P., & Floris, I. (2010). Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 384–389. <https://doi.org/10.1021/jf9024147>
- Tuberoso, C. I. G., Bifulco, E., Jerkovic, I., Caboni, P., Cabras, P., & Floris, I. (2009). Methyl syringate: A chemical marker of asphodel (*asphodelus microcarpus* salzm. et viv.) monofloral honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3895–3900. <https://doi.org/10.1021/jf803991j>
- Turski, M. P., Turska, M., Paluszkiewicz, P., Parada-turska, J., & Gregory, F. (2013). Kynurenic Acid in the Digestive System — New Facts , New Challenges. *Internation Journal of Tryptophan Research*, 47–55. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S12536>
- U. Andjelković, M. Šrajer Gajdošik, D. Gašo-Sokač, T. M. and D. J. (2017). Foodomics and Food safety: Where We are. *Food. Technol. Biotechnol.*, 55(3), 290–307.
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C. J., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., Mustafa, N. R., & Kim, H. K. (2008). Metabolomics: Back to basics. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 525–537. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9091-7>
- Vigier, K. D. O., Benguerba, A., Barrault, J., & Jérôme, F. (2012). Conversion of fructose and inulin to 5-hydroxymethylfurfural in sustainable betaine hydrochloride-based media. *Green Chemistry*,

14(2), 285–289. <https://doi.org/10.1039/c1gc16236e>

Wang, J., Xue, X., Du, X., Cheng, N., Chen, L., Zhao, J., ... Cao, W. (2014). Identification of Acacia Honey Adulteration with Rape Honey Using Liquid Chromatography–Electrochemical Detection and Chemometrics. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2003–2012.

<https://doi.org/10.1007/s12161-014-9833-7>

Waykar, B., & Alqadhi, Y. A. (2016). Biological Properties and Uses of Honey : A Concise Scientific review, 4(3), 58–68.

WHO and FAO. (2019). STANDARD FOR HONEY CXS 12-1981. *Codex Alimentarius*, 1(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1–3), 37–52. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)

Yamada, P., Nemoto, M., Shigemori, H., Yokota, S., & Isoda, H. (2011). Isolation of 5-(hydroxymethyl)furfural from lycium chinense and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells. *Planta Medica*, 77(5), 434–440. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250402>

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian Eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86(2), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.013>

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., & Raymont, K. (2005). Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 38(6), 651–658.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.01.002>

Yin, Y., Li, W., Son, Y. O., Sun, L., Lu, J., Kim, D., ... Zhang, Z. (2013). Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 269(2), 89–99.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.03.015>

Yun-Xia Xian, Hong-Lei Zhou, X. W. (2014). Chemical Constituents of Gleditsia sinensis Thorns. *Asian Journal of Chemistry*, 26(18), 6097–6100.

Zacharis, C. K., Rotsias, I., Zachariadis, P. G., & Zotos, A. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 134(3), 1665–1672. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.073>

Zhao, L., Chen, J., Su, J., Li, L., Hu, S., Li, B., ... Chen, T. (2013). In vitro antioxidant and antiproliferative

activities of 5-hydroxymethylfurfural. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10604–10611. <https://doi.org/10.1021/jf403098y>

Zhu, Z., Zhang, Y., Wang, J., Li, X., Wang, W., & Huang, Z. (2019). Sugaring-out assisted liquid-liquid extraction coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detection for the determination of 17 phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, 1601, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.06.023>

Zocchi, E., & Hontecillas, R. (2017). Absciscic Acid : A Novel Nutraceutical for Glycemic Control ABA Is a Conserved Signaling Molecule among Species, 4(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00024>

Μπακανόρίτσος, Ν., Βαβουλίδου, Π. Π. Ε., & Τσιρογιάννης, Β. (2000). Μερικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μελιών βαμβακιάς και πορτοκαλιάς από περιοχές της Ελλάδας, 51(3), 200–204.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΠ 1. Μερικοί κλασικοί βιοδείκτες διαφορετικών μελιών

Honey	Technique	Biomarker	Bibliography
Acacia	LC-MS	• Kaempferol rhamnoside • Acacetin	(Bobis, 2007; Truchado et al., 2008)
	LC-ECD	• Chlorogenic acid	(Wang et al., 2014)
	HPLC-DAD	• Ellagic acid	(Tomaand's-Barberaand'n et al., 2001)
	NMR	• Chrysin • Pinocembrin	(Schievano et al., 2010)
Asphodel	HPLC-DAD	• Methyl syringate	(Tuberoso et al., 2009)
Avocado	NIR	• D-glycero-d-galacto-heptitol	(Kaškonienė & Venskutonis, 2010)
Chestnut	NMR	• Kynurenic acid • 4-quinolone-2-carboxylic acid • γ-LACT-3PKA	(Beretta et al., 2008; Cho et al., 2015; Schievano et al., 2012; Truchado et al., 2009)
	GC-MS	• Acetophenone • 2-aminoacetophenone • 1-phenylethanol • 2'-aminoacetophenone • Cis-cinnamyl alcohol • p-hydroxyacetophenone • Heptanoic acid • 2,3,4-trimethyl-pentane • 2,3,3-trimethyl-pentane • Hexanoic acid • Benzyl alcohol • Decanoic acid • 2'-aminobutyrophenone	(Alissandrakis et al., 2011; Guyot et al., 1999)
	LC-MS	• Spirodiquinolone • 3-(2'-piperidine)-kynurenic acid • 2,3-dihydropyrrolo[1,2-α]quinazolin-5(1H)-one	(Cho et al., 2015)
Citrus spp.	HPLC-DAD	• Hesperetin	(Federico Ferreres et al., 1993)
	GC	• Methyl anthranilate	(Federico Ferreres et al., 1994)
Cotton	GC-MS	• Cinnamaldehyde • Cinnamyl alcohol • Cinnamic acid • Neryl nitrile • Geranyl nitrile • Benzene propanol • Hmovanillyl alcohol • (E)/(Z)-p-methoxy-cinnamic acid • 2-methyl-p-phthalaldehyde • Coniferaldehyde • P-coumaric acid • Ferulic acid • Scopoletin • Scoparone	(Alissandrakis et al., 2005)
		•	

Eucaliptus	HPLC-DAD	• Myricetin • Tricetin • Quercetin • Luteolin • Kaempferol • Gallic acid • Coumaric acid • Chlorogenic acid	(Martos, Ferreres, & Tomás-Barberán, 2000; Yao et al., 2004)
	GC-MS	• 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone • 3-hydroxy-5-methyl-3-hexanone • Exo-2-hydroxycineole • Acetoin • Nonanal • Methylnonanoate • 4-hydroxyisophorone	(Alissandrakis et al., 2011)
	NMR	• Dehydrovomifoliol	(Schievano et al., 2012)
Fir	HPLC-DAD	• Protocatechuic acid	(Pita-Calvo & Vázquez, 2018)
	GC-MS	• 6-methyl-5-hepten-2-one • 2-hydroxy-3,5,5-trimethylcyclohex-2-en-one • 3,4,5-trimethylphenol • geranyl acetone • Hexanoic acid ethyl ester • Heptanoic acid ethyl ester • Octanoic acid ethyl ester • Nonanoic acid ethyl ester • Decanoic acid ethyl ester • Dodecanoic acid ethyl ester • Tetradecanoic acid ethyl ester	(Louppis et al., 2017; Pita-Calvo & Vázquez, 2018)
Heather	HPLC-DAD	• Ellagic acid • Quercitrin • Syringic acid	(Federico Ferreres, Andrade, Gil, et al., 1996; Kaškonienė & Venskutonis, 2010)
	GC-MS	• 2-cyclopenten-1,4-dione • Guaiacol • Propyl anisol • p-anisaldehyde • p-cresol	(Ozcan-Sinir, Copur, & Barringer, 2020)
	GC/FID	• Absciscic acid • Isophorone • Dehydrovomifoliol • P-anisaldehyde	(Guyot et al., 1999)
Holm oak	GC-MS	• 2-aminoacetophenone • Propylanisol	(Lucia Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, & Pérez-Coello, 2006)
Kanuka	UPLC-QToF MS	• 4-methoxyphenyllactic acid	(Jandrić et al., 2017)
Lavender	GC-MS	• Heptanal • Nerolidol oxide • Coumarin • Hotrienol • Hexanal • Hexanol	(L. Castro-Vázquez et al., 2007; Kaškonienė & Venskutonis, 2010)
	MECC	• Luteolin • Naringenin	(Hsieh & Kuo, 1997)

Leatherwood	UPLC-QToF MS	• Homovannilic acid • Phenyllactic acid • 4-methoxyphenyllactic acid • Syringic acid • Hydrocinnamic acid • Pinobanskin • Pinocembrin • 4-methoxycinnamic acid • Eugenig acid	(Jandrić et al., 2017)
Linden	NMR	• 1-O-β-gentiobiosyl ester • 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyclohexa-1,3-dienecarboxylic acid • 4-(1-methylethenyl)cyclohexa-1,3-dienecarboxylic acid	(Beretta et al., 2008; Schievano et al., 2010)
	GC/FID	• carvacrol • Estragole	(Guyot et al., 1998)
Manuka	HPLC/NMR	• Methylglyoxal • Lepterdine	(Adams et al., 2008; Daniels et al., 2016)
	NMR	• Kamahine A & B • Meliracemoic acid • O-Anisic acid • Eudesmic acid	(Broom et al., 1994; Ede et al., 1993; Gašić et al., 2017)
	UPLC-QToF MS	• Leptosperin • Phenyllactic acid • 4-methoxyphenyllactic acid • 2-Phenylethyl β-D-glucopyranoside • Gallic acid • Hydrocinnamic acid • Pinobanskin • Pinocembrin • Eugenig acid	(Jandrić et al., 2017)
Meadow	UPLC-QToF MS	• Homovannilic acid • Phenyllactic acid • 4-methoxyphenyllactic acid • Syringic acid • Hydrocinnamic acid • Pinobanskin • Pinocembrin • 4-methoxycinnamic acid	(Jandrić et al., 2017)
Mentha spp.	GC-MS	• Methyl syringate • Terpendiol I • Vomifoliol	(Jerkovic, Hegic, Marijanovic, & Bubalo, 2010)
Oak	GC-FID / NMR	• Quercitrol	(Pita-Calvo & Vázquez, 2018)
	GC-MS	• Trans-oak-lactone	(Pita-Calvo & Vázquez, 2018)
Orange	LC-MS	• Synephrine	(Tette et al., 2017)
	HPLC-CEAD	• Hesperetin	(Petrus et al., 2011)
	NMR	• 8-hydroxylinalool • Caffeine	(Schievano et al., 2012)
Pine	GC-MS	• 1-chloro-octane • Tridecane • 1-nonanal • β-thujone • Benzoic acid ethyl ester	(Karabagias et al., 2019; Louppis et al., 2017; Pita-Calvo & Vázquez, 2018)

		1-nonanol	
	HPLC-DAD	Protocatechuic acid	(Spilioti et al., 2014)
Rapeseed	LC-ECD	Ellagic acid	(Wang et al., 2014)
Rosemary	HPLC-DAD	8-methoxykaempferol - Kaempferol - Chrysin - Pinocembrin - Naringenin	(Escriche, Kadar, Juan-Borrás, & Domenech, 2014; F. Ferreres et al., 1994; Pyrzynska & Biesaga, 2009)
Sage	GC-MS	- Tetrahydro-2,2,5,5-tetramethylfuran - Lilac aldehyde 2-methylbenzene - Heptanoic acid - Benzeneacetic acid	(Lušić, Koprivnjak, Ćurić, Sabatini, & Conte, 2007)
Solidago	HPLC-DAD	Hotrienol	(Jasicka-Misiak, Makowicz, & Stanek, 2018)
	GC-MS	- Nerol oxide - Benzyl cinnamate	
Strawberry tree	GC-MS	Isophorone	(de la Fuente et al., 2007)
	LC-MS	Homogentisic Acid	(Cabras et al., 1999)
	HPLC-DAD-MS/MS	Unedone	(Tuberoso et al., 2010)
	NMR	α-isophorone 2,5-dihydroxyphenyl acetic acid	(Donarski et al., 2010)
Sunflower	HPLC-DAD	- Quercetin - Quercetin-3,3-dimethyl ether	(Yaoa, Jiang, Singanusong, Datta, & Raymont, 2005)
Thyme	HPLC-DAD	P-hydroxybenzoic acid	(Spilioti et al., 2014)
	CZE	Rosmarinic acid	(Andrade et al., 1997)
	GC-MS	1-(3-oxo-trans-1-butenyl)-2,6,6 trimethylcyclohexane-trans ,cis-1 ,2 ,4-triol 1,2,3,5-tetramethyl-benzene - Terpinen-4-ol - Formic acid - Hexadecanoic acid 1-phenyl-2,3-butanedione 3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone 3-hydroxy-1-phenyl-2-butanone - Phenylacetone nitrile - Carvacrol	(Alissandrakis, Tarantilis, Harizanis, & Polissiou, 2007b; Bouseta et al., 1992; Karabagias et al., 2019; Louppis et al., 2017)
	NMR	E-4-(1,2,4-trihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexyl)-but-3-en-2-one.	(Kassi et al., 2014)

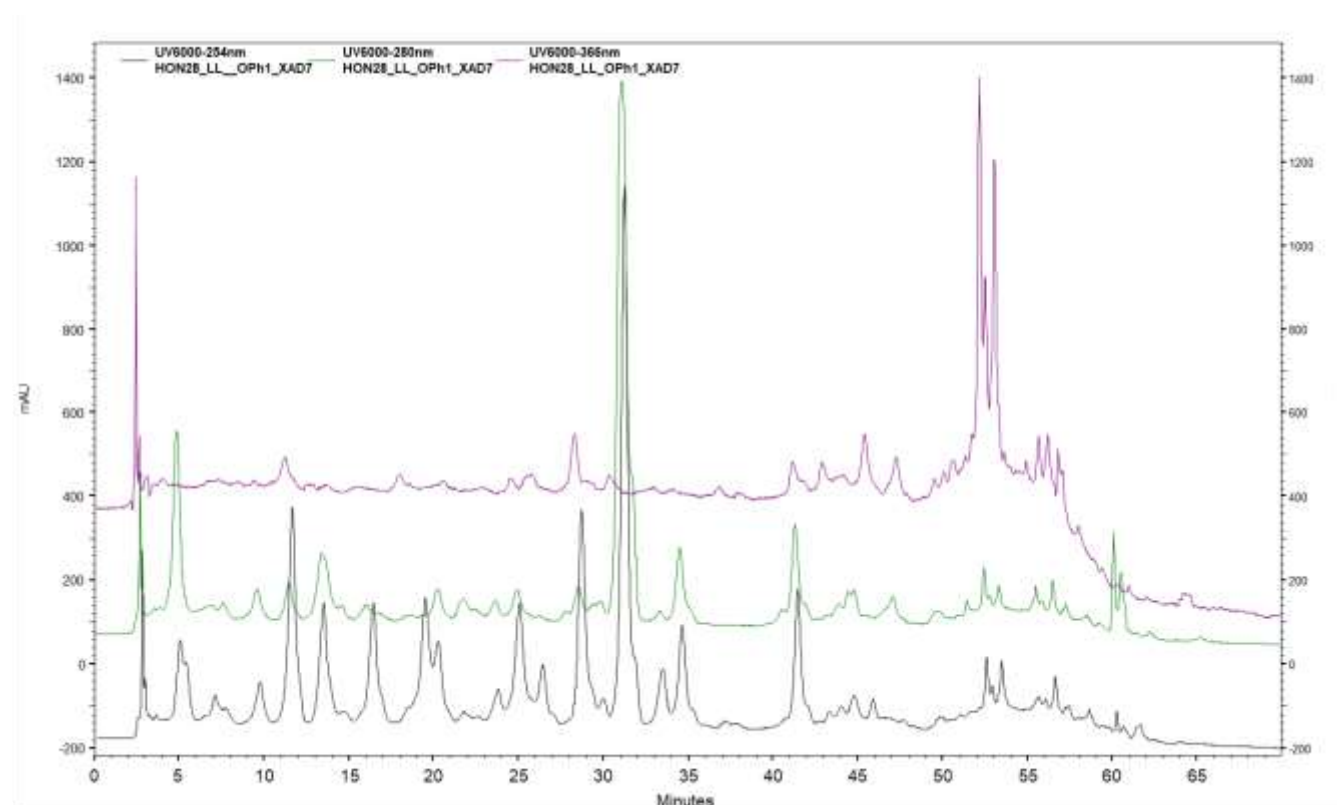
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Α) Ποιοτικός έλεγχος των εκχυλισμάτων

Α) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-DAD) – Χρωματογραφικά δεδομένα εκχυλισμάτων (Δοκιμές)

ΠΠ 2. Συνθήκες δοκιμής

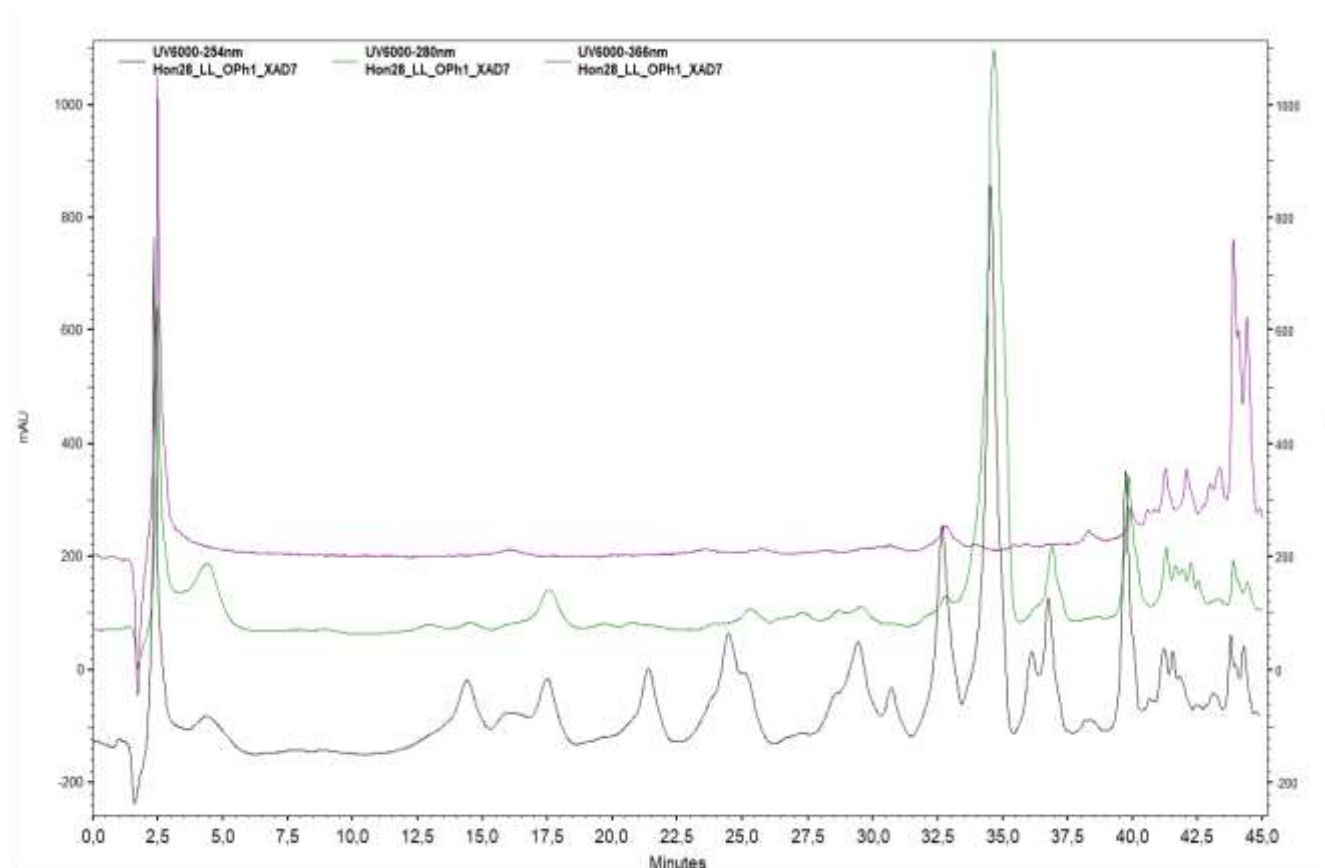
Χρόνος (min)	A(%)	B(%)	Ροή (ml/min)
0	85	15	1
15	70	30	1
30	60	40	1
35	60	40	1
40	50	50	1
45	50	50	1
55	10	90	1
70	10	90	1
73	85	15	1
75	85	15	1



ΕΠ 1. Χρωματογραφήματα HPLC, όπου η μοβ γραμμή αντιστοιχεί σε 360 nm, η πράσινη γραμμή στα 280 nm και η μαύρη γραμμή στα 254 nm.

ΠΠ 3. Συνθήκες δοκιμής

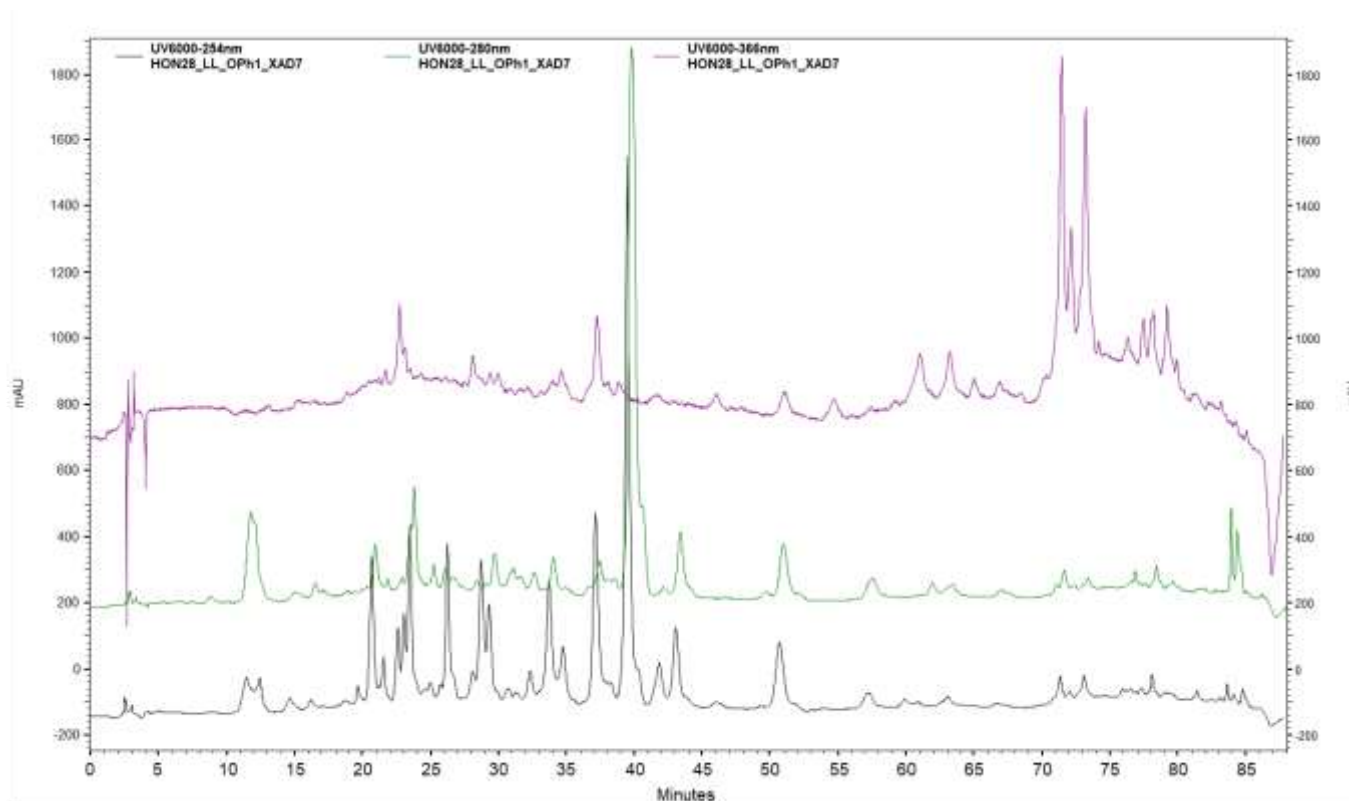
Χρόνος (min)	A(%)	B(%)	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
20	70	30	1
30	60	40	1
35	50	50	1
45	10	90	1



ΕΠ 2. Χρωματογραφήματα HPLC, όπου η μοβ γραμμή αντιστοιχεί σε 360 nm, η πράσινη γραμμή στα 280 nm και η μαύρη γραμμή στα 254 nm.

ΠΠ 4. Συνθήκες δοκιμής

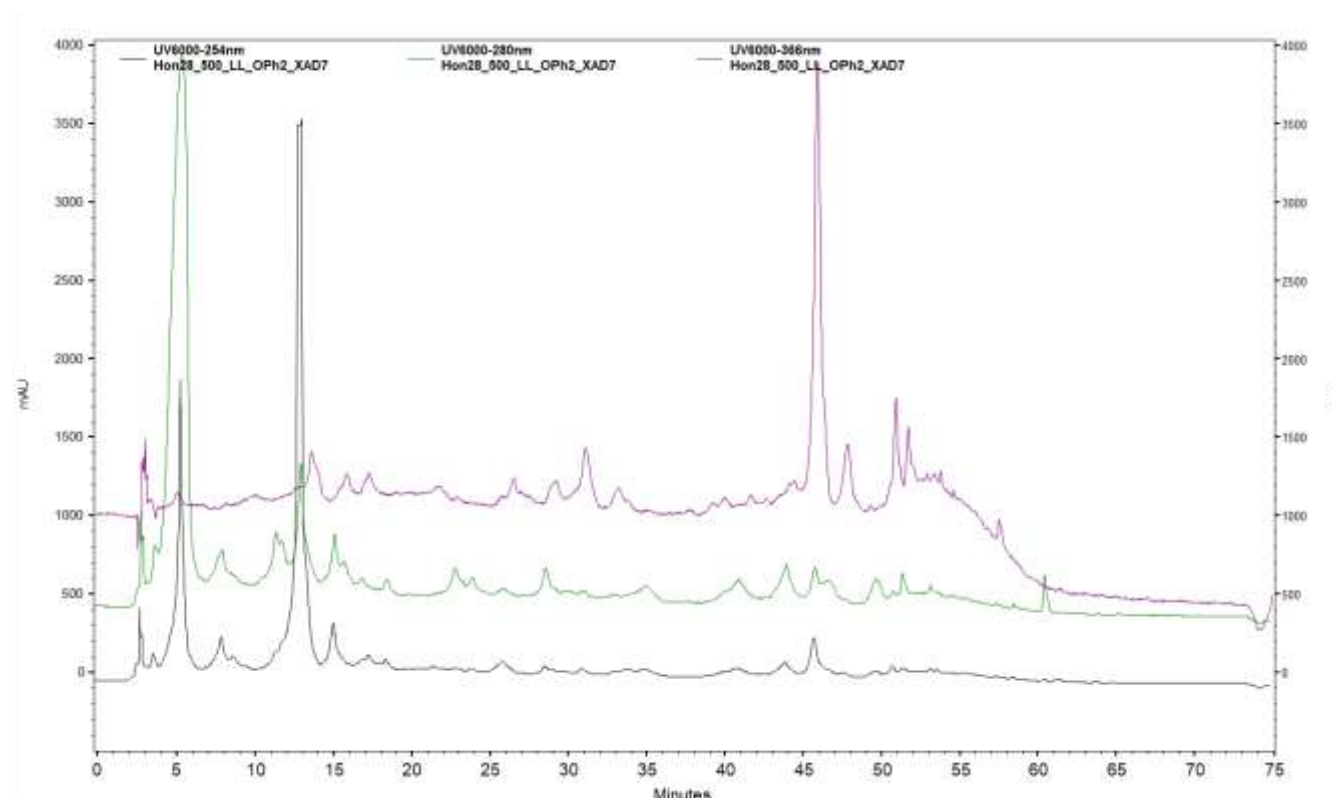
Χρόνος (min)	A(%)	B(%)	Ροή (ml/min)
0	98	2	1
5	98	2	1
20	70	30	1
40	60	40	1
50	60	40	1
60	50	50	1
65	50	50	1
80	10	90	1
83	10	90	1
85	98	2	1
88	98	2	1



ΕΠ 3. Χρωματογραφήματα HPLC, όπου η μοβ γραμμή αντιστοιχεί σε 360 nm, η πράσινη στα 280 nm και η μαύρη στα 254 nm.

ΠΠ 5. Συνθήκες δοκιμής

Χρόνος (min)	A(%)	B(%)	Ροή (ml/min)
0	80	20	0.8
15	70	30	0.8
30	60	40	0.8
35	60	40	0.8
40	50	50	0.8
45	50	50	0.8
55	10	90	0.8
70	10	90	0.8
73	80	20	0.8
75	80	20	0.8



ΕΠ 4. Χρωματογραφήματα HPLC, όπου η μοβ γραμμή αντιστοιχεί σε 360 nm, η πράσινη στα 280 nm και η μαύρη στα 254 nm.

Β) Υγρή χρωματογραφία Υπερυψηλής απόδοσης συνδεδεμένη με υβριδικό φασματογράφο μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (UHPLC-HRMS/MS)

Κορυφή	Rt (min)	Μοριακός Τύπος	Πειραματική τιμή [M-H] ⁻ m/z	Θεωρητική τιμή m/z	Δm (ppm)	RDB e	Θραύσμα α MSMS (σχετική ένταση %)	Ταυτοποίηση (μόριο ή χημική κατηγορία)
Σάκχαρα								
1	0.59	C ₆ H ₁₁ O ₇	195.0512	195.0510	0.7795	1.5	129(100)	Gluconic Acid
2	0.62	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	341.1087	341.1089	-0.6773	2.5	179(100), 196(71.97), 287(62.45), 161(54.93), 221(33.64), 113(29.22)	Sucrose or α-a-trehalose, maltulose, Nigerose, Turanose, Maltose, Kojibiose, Palatinose, Melibiose, Gentiobiose, Isomaltose or Cellobiose
3	0.63	C ₆ H ₁₁ O ₆	179.0564	179.0561	1.5073	1.5	n.d	Glucose or Fructose
4	0.67	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₆	503.1616	503.1618	-0.3326	3.5	141(100)	Raffinose, 1-ketose, Melezitose, Maltotriose or Isopanose
Οργανικά, καρβοξυλικά οξέα								
5	5.92	C ₆ H ₇ O ₇	191.0196	191.0197	-0.5392	3.5	n.d	Citric Acid
6	6.83	C ₁₀ H ₁₅ O ₄	199.0976	199.0976	-0.0115	3.5	155(100), 137(20.09)	Camphoric Acid
7	7.11	C ₉ H ₁₅ O ₄	187.0976	187.0976	-0.0123	2.5	n.d	Anchoic Acid
Φαινολικά οξέα και παράγωγα								
8	1.17	C ₉ H ₉ O	133.0662	133.0659	2.0579	5.5	n.d	(E)-Cinnamyl alcohol
9	2.27	C ₉ H ₁₀ NO ₂	164.0714	164.0717	-1.7722	5.5	n.d	Ethyl anthranilate
10	3.04	C ₉ H ₁₁ O ₃	167.0712	167.0714	-0.7437	4.5	n.d	Homovanillyl alcohol
11	3.86	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	211.0612	211.0612	0.1020	5.5	n.d	Methyl syringate / Eudesmic Acid / 4- methoxyphenyllactic Acid / Gallic acid propyl ester
12	4.27	C ₇ H ₅ O ₃	137.0246	137.0244	1.6464	5.5	n.d	p-hydroxybenzoic Acid
13	4.41	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0887	353.0878	2.6617	8.5	n.d	Chlorogenic Acid
14	5.15	C ₈ H ₇ O ₂	135.0456	135.0452	3.4875	5.5	n.d	Phenylacetic Acid / m- toluic acid, 2- hydroxyacetophenone
15	5.21	C ₇ H ₅ O ₂	121.0298	121.0295	2.1442	5.5	n.d	Benzoic Acid
16	5.60	C ₈ H ₇ O ₃	151.0396	151.0401	-3.2184	5.5	n.d	p-methoxybenzoic Acid / Vanillin / Methyl Salicylate / Methylparaben

17	6.04	C ₈ H ₇ O ₄	167.0352	167.0350	1.5912	5.5	n.d	Homogentisic acid / Vanillic Acid
18	6.04	C ₉ H ₇ O ₂	147.0455	147.0452	2.6840	6.5	n.d	(Z/E) cinnamic Acid
19	6.88	C ₇ H ₅ O ₅	169.0148	167.0142	3.3709	5.5	n.d	Gallic Acid
20	6.97	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0665	207.0663	1.2626	6.5	n.d	(Z/E)-3,4-dimethoxycinnamic acid
21	8.06	C ₇ H ₅ O ₄	153.0193	153.0193	-0.0936	5.5	n.d	Protocatechuic acid
22	8.49	C ₈ H ₈ NO ₂	150.0557	150.0561	-2.5842	5.5	n.d	Methyl anthranilate
Φλαβονοειδή								
23	4.47	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₅	609.1818	609.1825	-1.1995	12.5	n.d	Hesperidin
24	5.80	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289.0732	289.0718	4.8059	9.5	n.d	Catechin / Epicatechin
25	6.07	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1454	609.1461	-1.1855	13.5	n.d	Rutin
26	7.33	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0925	447.0933	-1.8258	12.5	n.d	Quercetin rhamnoside
27	7.88	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.0348	301.0354	-1.9461	11.5	n.d	Quercetin / Tricetin / Morin
28	7.96	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0973	431.0984	-2.5759	12.5	n.d	Vitexin
29	8.07	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁	461.1086	461.1089	-0.7657	12.5	n.d	Leptosin
30	8.51	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.0450	269.0455	-1.9820	11.5	n.d	Genistein or Apigenin or Galangin
31	8.63	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0399	285.0405	-1.8024	11.5	n.d	Kaempferol / Luteolin
32	8.70	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.0607	271.0612	-1.7219	10.5	n.d	Naringenin / Pinobanksin
33	8.86	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.0496	315.0510	-4.5544	11.5	n.d	Quercetin-3-methyl ether / 8-methoxykaempferol / Isorhamnetin / Rhamnetin
34	9.64	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0554	299.0561	-2.4140	11.5	n.d	Luteolin-7-methyl ether / Kaempferide
35	10.00	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.0666	329.0667	-0.1705	11.5	n.d	Quercetin-3,3'-dimethyl ether / Quercetin-3,7'-dimethyl ether
Βενζολικά παράγωγα								
36	5.15	C ₁₄ H ₂₁	189.1652	189.1649	1.6791	4.5	n.d	1,3-di-tert-butylbenzene
37	6.21	C ₇ H ₇ O ₂	123.0457	123.0452	4.1996	4.5	n.d	3,5-Dihydroxytoluene
38	6.49	C ₆ H ₆ Cl ₂	144.9620	144.9617	1.9090	4.5	n.d	1,4-dichlorobenzene
39	7.17	C ₁₀ H ₁₁ O	147.0818	147.0815	1.8989	5.5	n.d	Anethole
40	7.70	C ₉ H ₈ NO	146.0619	149.0611	4.2111	6.5	n.d	4-methoxyphenylacetonitrile
Αλκαλοειδή κινολίνης								
41	4.80	C ₉ H ₆ NO	144.0457	144.0455	1.5839	7.5	103(100), 116(76.12), 73(75.75)	2(1H)-quinolinone
42	6.32	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₂	239.0824	239.0826	-0.7234	10.5	n.d	3-pyrrolidinyl kynurenic Acid / γ-LACTA-3PKA
43	6.39	C ₁₀ H ₆ NO ₃	188.0354	188.0353	0.2033	8.5	n.d	Kynurenic Acid / 4-hydroxy quinaldinium cation
44	6.93	C ₁₇ H ₁₁ N ₂ O ₃	291.0771	291.0775	-1.3660	13.5	n.d	Spirodiquinolinone

Τερπένια								
45	0.50	C ₁₀ H ₁₃ O	149.0969	149.0972	-1.8768	4.5	n.d	Thymol
46	0.50	C ₁₀ H ₁₃ O	149.0969	149.0672	-1.8768	4.5	n.d	Carvacrol or Safranal
47	1.07	C ₁₅ H ₂₅ O	221.1920	221.1911	3.9188	3.5	n.d	Γ-eudesmol or Nerolidol
48	2.37	C ₁₀ H ₁₃	133.1017	133.1023	-4.1976	4.5	n.d	Thuja-2,4(10)-diene / p-cymene / (E,E)-2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene / 1,3,8-p-menthatriene
49	5.95	C ₁₀ H ₁₇ O	153.1291	153.1285	4.2227	2.5	n.d	Tetrahydro-2,2,6-trimethyl-6-vinyl-2H-pyran / Linalool / Fenchol / Terpinen-4-ol / α-terpineol / 2-decenal / Borneol o/ cis-rose oxide
50	6.83	C ₁₀ H ₁₇ O ₂	169.1231	169.1234	-1.6553	2.5	n.d	8-hydroxylinalool / Trans-furan linalool oxide / 2,2,6-Trimethyl-3-keto-6-viniltetrahydro-pyran, Epoxylinool
51	7.48	C ₁₅ H ₁₉ O ₄	263.1286	263.1289	-0.9531	6.5	n.d	Trans-abscisic Acid
Λιπαρά οξέα								
52	1.25	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.2341	255.2330	4.4334	1.5	n.d	Hexadecanoic Acid
53	3.66	C ₁₀ H ₁₉ O ₂	171.1388	171.1391	-1.5147	1.5	n.d	Decanoic Acid / Heptanoic Acid ethyl ester / Methyl nonanoate
Αλδευδικά και κετονικά παράγωγα								
54	3.72	C ₁₄ H ₁₉ O	203.1447	203.1441	2.6090	5.5	n.d	Lilial
55	4.50	C ₈ H ₇ O	119.0498	119.0502	-3.4493	5.5	n.d	Phenylacetaldehyde, or Acetophenone or p-tolualdehyde
56	6.07	C ₉ H ₉ O ₃	165.0559	165.0557	0.8782	5.5	n.d	2-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl) ethanone
57	7.15	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163.0765	163.0765	0.2250	5.5	n.d	3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone / 3-hydroxy-1-phenyl-2-butanone / Benzeneacetic Acid ethyl ester / Eugenol
58	7.26	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	195.0658	195.0663	-2.6491	5.5	n.d	3,4,5-trimethoxybenzaldehyde
59	7.66	C ₉ H ₁₃ O	137.0976	137.0972	2.8561	3.5	n.d	α-isophorone
60	7.88	C ₉ H ₁₁ O ₂	151.0768	151.0765	2.3817	4.5	n.d	5-ketoisophorone
Πυρανικά και φουρανικά παράγωγα								
61	0.59	C ₆ H ₇ O ₄	143.0354	143.0350	3.2450	3.5	n.d	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-one
62	0.63	C ₆ H ₅ O ₃	125.0249	125.0244	4.1233	4.5	n.d	5-HMF
63	0.75	C ₁₀ H ₁₅ O ₂	167.1078	167.1078	0.3010	3.5	n.d	Lilac aldehyde
64	8.22	C ₆ H ₈ O ₃	128.0479	128.0479	0.0383	3.0	n.d	2,5-dimethyl-2,4-dihydroxy-3(2H) furanone
Απλά αλκάνια								
65	3.32	C ₁₆ H ₃₃	225.2577	225.2588	-4.7444	0.5	n.d	Decahexane

66	4.75	C ₁₄ H ₂₉	197.2266	197.2275	-4.5456	0.5	n.d	Tetradecane
67	5.19	C ₁₀ H ₂₁	141.1644	141.1649	-3.4789	0.5	n.d	Decane / 4-methyl-nonane
68	7.07	C ₈ H ₁₆ Cl	147.0947	147.0946	0.6422	0.5	n.d	1-chlorooctane
Πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες								
69	3.17	C ₁₃ H ₁₅	171.1180	171.1179	0.5121	6.5	n.d	1,1,5-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene or 1.2-Dihydro-1.1.6-trimethyl-naphthalene
70	8.89	C ₁₀ H ₇	127.0551	127.0553	-1.4637	7.5	n.d	Napthalene
Φθαλικά παράγωγα								
71	3.20	C ₁₂ H ₁₃ O ₄	221.0823	221.0819	1.4833	6.5	101(100), 131(96.07) , 113(60.97) , 129(34.40)	Diethyl phthalate
Άγνωστα								
72	6.06	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209.0818	209.0819	-0.6939	5.5	n.d	-
73	6.71	C ₁₆ H ₂₅ O ₉	361.1496	361.1504	-2.2384	4.5	n.d	-
74	7.41	C ₂₅ H ₃₁ O ₁₃	539.1761	539.1765	-1.6074	10.5	196(100), 286(87.62) ,) 377(67.26) , 478(65.40) , 161(64.94)	-
75	7.66	C ₉ H ₁₅ O ₂	155.1080	155.1078	1.7999	2.5	n.d	-
76	7.96	C ₁₀ H ₁₇ O ₄	201.1132	201.1132	-0.2878	2.5	n.d	-
77	9.15	C ₁₄ H ₂₃ O ₆	287.1497	287.1500	-1.120	3.5	n.d	-

ΠΠ 7. Μεταβολίτες που εντοπίστηκαν από τον ποιοτικό έλεγχο μέσω LC-ESI(+)-HRMS/MS στο εκχύλισμα HON28_OP1_XAD7_MeOH

Κορυφή	Rt (min)	Μοριακός τύπος	Πειραματική τιμή [M-H] ⁻ m/z	Θεωρητική τιμή	Δm	RDB eq	Θραύσματα MSMS (σχετική ένταση %)	Ταυτοποίηση (μόριο ή χημική κατηγορία)
Καρβοξυλικά οξέα								
1	6.57	C ₁₀ H ₁₇ O ₄	201.1115	201.1121	-3.1041	2.5	n.d	Camphoric acid
2	8.24	C ₁₃ H ₁₉ O ₂	207.1374	207.1380	-2.8073	4.5	n.d	Cyclohexane-1,3-diene-1-carboxylic acid
Φαινολικά οξέα και παράγωγα								
3	0.58	C ₈ H ₉ O ₄	169.0490	169.0495	-2.9194	4.5	n.d	Homogentisic acid / Vanillic acid
4	0.58	C ₉ H ₁₁ O ₅	199.0603	199.0601	0.7888	4.5	n.d	Syringic acid
5	0.60	C ₉ H ₉ O ₃	165.0541	165.0546	-3.2005	5.5	n.d	p-coumaric acid
6	0.90	C ₈ H ₉ O ₂	137.0598	137.0597	0.3455	4.5	n.d	Phenylactic Acid / m-toluic acid, 2-hydroxyacetophenone
7	1.03	C ₇ H ₇ O ₂	123.0436	123.0441	-3.5039	4.5	n.d	Benzoic acid
8	2.25	C ₉ H ₁₂ O ₂ N	166.0858	166.0863	-2.5557	4.5	n.d	Ethyl anthranilate
9	7.40	C ₁₀ H ₁₃ O ₅	213.0753	213.0757	-1.877	4.5	n.d	Methyl syringate / Eudesmic Acid / 4-methoxyphenyllactic Acid / Gallic acid propyl ester
10	7.40	C ₉ H ₁₃ O ₃	169.0855	169.0859	-2.5182	3.5	n.d	Homovanillyl alcohol
11	7.42	C ₉ H ₉ O ₄	181.0492	181.0495	-2.0517	5.5	n.d	Caffeic acid
12	7.42	C ₁₀ H ₁₃ O ₅	213.0754	213.0757	-1.689	4.5	n.d	3,4,5-trimethoxybenzoic acid
13	7.42	C ₈ H ₉ O ₃	153.0542	153.0546	-2.5542	4.5	n.d	p-methoxybenzoic Acid / Vanillin / Methyl Salicylate / Methylparaben
14	7.56	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209.0804	209.0808	-2.2353	5.5	n.d	(Z/E)-3,4-dimethoxycinnamic acid
Φλαβονοειδή								
15	0.88	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.0554	287.0550	1.3059	10.5	n.d	Kaempferol / Luteolin
16	1.43	C ₁₆ H ₁₅ O ₅	287.0904	287.0901	-3.414	9.5	n.d	Pinobanksin methyl ether / Sakuranetin / Isosakuranetin
17	5.14	C ₁₅ H ₁₃ O ₅	273.0767	273.0771	3.552	9.5	n.d	Naringenin / Pinobanksin
18	5.26	C ₁₆ H ₁₃ O ₇	317.0652	317.0656	-1.322	10.5	n.d	Quercetin-3-methyl ether / 8-methoxykaempferol / Isorhamnetin / Rhamnetin
19	7.31	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.1069	449.1070	0.901	12.0	n.d	Quercetin rhamnoside
20	7.33	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.0496	303.0499	-1.119	10.5	n.d	Quercetin / Tricetin / Morin
21	7.61	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	255.0650	255.0652	-0.6572	10.5	n.d	Chrysin
22	7.94	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1137	433.1134	1.747	11.5	n.d	Vitexin

23	8.98	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301.0705	301.0705	-0.547	10.5	n.d	Kaempferid
24	9.64	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301.0706	301.0707	-0.248	10.5	n.d	Luteolin-7-methyl ether / Kaempferide
25	9.95	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331.0808	331.0812	-1.176	10.5	n.d	Quercetin 3,3'-dimethyl ether / Quercetin 3,7'-dimethyl ether
Βενζολικά παράγωγα								
26	0.15	C ₇ H ₉ O ₂	125.0599	125.0597	1.9037	3.5	n.d	3,5-Dihydroxytoluene
27	4.22	C ₈ H ₈ N	118.0647	118.0651	-3.6300	5.5	n.d	Phenyl acetonitrile
28	6.74	C ₁₀ H ₁₃ O ₂	165.0911	165.0910	0.4453	4.5	n.d	Eugenol
29	9.64	C ₁₀ H ₁₃	133.1008	133.1012	-3.0649	4.5	n.d	1-methyl-4-(1-methylethenyl)- benzene
Αλκαλοειδή κινολίνης								
30	4.48	C ₉ H ₈ ON	146.0596	146.0600	-2.8009	6.5	n.d	2(1H)-quinolinone
31	6.30	C ₁₄ H ₁₃ O ₂ N ₂	241.0969	241.0972	-1.0188	9.5	n.d	3-pyrrolidinyl kynurenic acid
32	6.39	C ₁₀ H ₈ O ₃ N	190.0495	190.0499	-2.1884	7.5	172(100)	Kynurenic Acid / 4-hydroxy quinaldinium cation
Τερπενοειδή								
33	3.72	C ₁₀ H ₁₇	137.1325	137.1325	0.1091	2.5	n.d	Limonene / α-pinene / β- pinene / β-myrcene / α- terpinene / γ-terpinene / δ-3- carene / Ocimene / α- Terpinolene
34	5.81	C ₁₀ H ₁₅ O	151.1123	151.1117	3.6250	3.5	n.d	Carvacrol / Safranal
35	5.96	C ₁₃ H ₁₉ O ₃	223.1325	223.1329	-1.4930	4.5	n.d	Dehydrovomifoliol
36	6.18	C ₉ H ₁₅	123.1163	123.1168	-4.3846	2.5	n.d	Santene
37	6.96	C ₁₀ H ₁₅	135.1163	135.1168	-3.8823	3.5	n.d	Thuja-2,4(10)-diene.13 / p- Cymene / 1,3,8-p- Menthatriene / / (E,E)-2,6- dimethyl-1,3,5,7-octatetraene
38	7.50	C ₁₅ H ₂₁ O ₄	265.1430	265.1434	-1.5076	5.5	n.d	Trans-abscisic acid
39	9.45	C ₁₀ H ₁₇ O	153.1269	153.1274	-3.1631	2.5	n.d	β-thujone or Nerol oxide or b- cyclocitral or Dill ether or α-4- Dimethyl-3-cyclohexene-1- acetaldehyde or Limonen-10- ol
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες								
40	1.92	C ₁₄ H ₁₁	179.9897	179.9901	-2.0457	3.0	n.d	Anthracene/ Penanthrene
Λιπαρά οξέα								
41	0.55	C ₁₇ H ₃₅ O ₂	271.2618	271.2618	-4.965	0.5	n.d	Methyl hexadecanoate / Isopropyl myristate / Margaric acid
42	3.91	C ₆ H ₁₃ O ₂	117.0904	117.0910	-4.8454	0.5	n.d	Butyl acetate / hexanoic acid
43	6.24	C ₂₂ H ₃₅ O ₁₃	507.2057	507.2059	-3.071	5.5	n.d	6-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D- glucopyranosylester 4-(1- hydroxy-1- methylethyl)cyclohexa-1,3- diene-1-carboxylate
Μεθυλξανθίνες								
44	0.14	C ₈ H ₁₁ O ₂ N ₄	195.0871	195.0877	-3.0011	5.5	n.d	Caffeine

Αλδεϋδικά και κετονικά παράγωγα								
45	1.69	C ₈ H ₉ O	121.0643	121.0648	-3.8031	4.5	n.d	Phenylacetaldehyde, or Acetophenone or p-tolualdehyde
46	3.91	C ₆ H ₁₃ O ₂	117.0904	117.0910	-4.8454	0.5	n.d	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone
47	5.96	C ₉ H ₁₃ O ₂	153.0905	153.0910	-3.0083	3.5	n.d	4-ketoisophorone
48	6.18	C ₉ H ₁₁ O ₂	151.0746	151.0740	-4.806	4.5	n.d	2-methoxyacetophenone
49	6.25	C ₁₃ H ₁₇ O	189.1272	189.1274	-0.7861	5.5	n.d	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal
50	6.74	C ₁₀ H ₁₃ O ₂	165.0911	165.0910	0.4453	4.5	n.d	3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone or 3-hydroxy-1-phenyl-2-butanone or 3-hydroxy-4-phenyl-3-buten-2-one or Benzeacetic acid ethyl ester
51	7.87	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163.0748	163.0754	-3.4190	5.5	n.d	1-phenyl-2,3-butanedione
52	8.24	C ₁₁ H ₁₅ O	163.1111	163.1117	-3.6578	4.5	n.d	2-methylbutyrophenone
53	9.73	C ₉ H ₁₅ O	139.1113	139.1117	-3.3017	2.5	n.d	a-isophorone
Ιονόνες και δαμασκινόνες								
54	7.01	C ₁₃ H ₁₉ O	191.1426	191.1430	-2.1862	4.5	n.d	β-damascenone
Αλκοόλες								
55	3.88	C ₇ H ₁₇ O	117.1268	117.1274	-4.9822	-0.5	n.d	2-Heptanol
56	5.81	C ₁₀ H ₁₅ O	151.1123	151.1117	3.6250	phen	n.d	(a,a) 4-trimethyl benzenemethanol
57	5.96	C ₁₀ H ₁₅ O ₂	167.1063	167.1067	-2.1754	3.5	n.d	1-phenyl-2,3-butanediol
58	6.01	C ₉ H ₁₃ O	137.0957	137.0961	-3.1674	3.5	n.d	Benzenepropanol
59	6.24	C ₈ H ₁₁ O	123.0800	123.0804	-3.6345	3.5	n.d	Phenyl ethyl alcohol
Αλκάνια								
60	6.74	C ₂₁ H ₄₅	297.3505	297.3516	-3.7467	-0.5	n.d	Heneicosane
61	16.39	C ₈ H ₁₉	115.1482	115.1481	0.2435	-0.5	n.d	2,3,3-trimethyl-pentane
Αλκένια								
62	6.96	C ₁₀ H ₁₅	135.1163	135.1168	-3.8823	3.5	n.d	(E,E)-2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene
Πολυκυκλικό υδρογονάνθρακες								
63	7.87	C ₁₃ H ₁₇	173.1320	173.1325	-2.6458	5.5	n.d	1,1,5-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) / 1.2-Dihydro-1.1.6-trimethylnaphthalene
Ινδόλες								
64	3.41	C ₈ H ₈ N	118.0647	118.0651	-3.6946	5.5	n.d	Indole
Πουρανικά και φουρανικά παράγωγα								
65	0.60	C ₆ H ₇ O ₃	127.0384	127.0390	-4.4415	3.5	n.d	5-HMF
66	0.72	C ₆ H ₉ O ₄	145.0490	145.0495	-3.7180	2.5	n.d	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-one

67	1.61	C ₁₀ H ₁₉ O ₂	171.1381	171.1380	0.9711	1.5	n.d	Trans-furan linalool oxide
68	1.69	C ₈ H ₉ O	121.0643	121.0648	-3.8031	4.5	n.d	2,3-Dihydro-benzofuran
69	2.34	C ₁₀ H ₁₉ O ₂	171.1382	171.1380	0.8819	1.5	n.d	2,2,6-Trimethyl-3-keto-6-viniltetrahydro-pyran, Epoxylinool
70	2.63	C ₆ H ₉ O ₃	129.0541	129.0546	-4.2116	2.5	n.d	2,5-dimethyl-2,4-hydroxy-3(2H)-furanone
Άγνωστα								
71	0.66	C ₂₄ H ₁₅ O ₃ N	365.1047	365.1047	0.0834	18.0	203(100),275(49.27),347(43.34),185(21.26),305(14.73)	
72	4.84	C ₉ H ₈ O ₂ N	162.0545	162.0550	-2.7808	6.5	n.d	
73	4.93	C ₁₃ H ₁₃ ON ₂	213.1019	213.1022	-1.6020	8.5	213(100),194(92.74),167(69.19),196(61.74),161(44.89),178(40.32),134(39.09),148(36.57),155(35.81),179(33.99),142(33.88),127(32.69)	
74	5.05	C ₁₃ H ₁₂ ON	198.0908	198.0913	-2.7033	8.5	n.d	
75	5.75	C ₁₂ H ₁₄ ON	198.1849	198.1852	-1.7669	1.5	196(100),179(89.65),167(63.00),161(52.52),176(47.42),108(46.00),194(45.38),169(44.16),172(43.24),138(42.57),189(41.24),140(40.49),103.1(40.22),103.0(40.09),124(39.39),176(38.78)	
76	6.83	C ₂₈ H ₁₉ ON	385.1463	385.1461	0.4024	20.0	n.d	
77	8.32	C ₃₂ H ₃₆ O ₅ N ₆	584.2744	584.2742	0.3138	18.0	438(100),420(87.13),287(27.87),196(19.92),287(15.25),167(13.17)	
78	8.68	C ₂₃ H ₂₇ N ₂	331.2164	331.2160	-1.435	11.5	n.d	

ΠΠ 8. Μεταβολίτες που εντοπίστηκαν από τον ποιοτικό έλεγχο μέσω LC-ESI(-)-HRMS/MS στο εκχύλισμα HON28_ΟΡh2_XAD7_MeOH.

Κορυφή	Rt (min)	Μοριακός τύπος	Πειραματική τιμή [M-H] ⁺ m/z	Θεωρητική τιμή m/z	Δm (ppm)	RDBeq	Θραύσματα MSMS (σχετική ένταση %)	Ταυτοποίηση (μόριο ή χημική κατηγορία)
Σάκχαρα								
1	0.59	C ₆ H ₁₁ O ₆	179.0563	179.0561	0.9108	1.5	n.d	Glucose or Fructose
2	0.59	C ₆ H ₁₁ O ₇	195.0511	195.0510	0.4666	1.5	n.d	Gluconic acid
3	0.60	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	341.1085	341.1089	-1.3930	2.5	196(100), 179(80.80), 167(68.41), 161(58.41)	Sucrose or α-a-trehalose, maltulose, Nigerose, Turanose, Maltose, Kojibiose, Palatinose, Melibiose, Gentiobiose, Isomaltose or Cellobiose
4	0.61	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₆	503.1616	503.1618	-0.2720	3.5	n.d	Raffinose, 1-ketose, Melezitose, Maltotriose or Isopanose
Οργανικά, καρβοξυλικά οξέα								
5	1.08	C ₄ H ₅ O ₄	117.0196	117.0193	2.4203	2.5	n.d	Succinic Acid
6	6.13	C ₉ H ₁₅ O ₄	187.0978	187.0976	0.9664	2.5	n.d	Anchoic Acid
7	6.56	C ₁₀ H ₁₅ O ₄	199.0978	199.0976	0.9082	3.5	155(100), 137(21.46)	Camphoric Acid
8	7.21	C ₂₂ H ₃₃ O ₁₃	505.1908	505.1927	-3.6982	6.5	n.d	6-O-(β-D-glucopyranosyl)-β- D-glucopyranosylester 4-(1- hydroxy-1- methylethyl)cyclohexa-1,3- diene-1-carboxylate
9	5.53	C ₆ H ₇ O ₇	191.0196	191.0197	-0.6191	3.5	n.d	Citric Acid
Φαινολικά οξέα και παράγωγα								
10	1.34	C ₇ H ₅ O ₅	169.0143	169.0142	0.0305	5.5	n.d	Gallic acid
11	2.08	C ₈ H ₇ O ₄	167.0351	167.0350	0.5864	5.5	n.d	Homogentisic acid / Vanillic Acid
12	2.72	C ₇ H ₅ O ₄	153.0195	153.0193	1.1030	5.5	n.d	Protocatechuic acid
13	3.91	C ₁₀ H ₁₁ O ₅	211.0611	211.0612	-0.4041	5.5	n.d	Methyl syringate / Eudesmic Acid / 4-methoxyphenyllactic Acid / Gallic acid propyl ester
14	3.95	C ₉ H ₉ O ₄	181.0500	181.0506	-3.5586	5.5	n.d	Veratric Acid
15	4.12	C ₉ H ₇ O ₃	163.0400	163.0401	-0.4546	6.5	n.d	p-coumaric Acid
16	4.39	C ₇ H ₅ O ₃	137.0247	137.0244	2.3145	5.5	n.d	p-hydroxybenzoic Acid / Salicylic Acid
17	5.02	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	353.0875	353.0878	-0.9684	8.5	n.d	Chlorogenic Acid
18	5.14	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	207.0666	207.0663	1.6311	6.5	n.d	(Z/E)-3,4-dimethoxycinnamic acid
19	5.16	C ₈ H ₇ O ₂	135.0455	135.0452	2.6966	5.5	103(100), 71(83.63), 56(76.36), 149(72.82)	Phenylacetic Acid / m-toluic acid, 2- hydroxyacetophenone
20	5.16	C ₉ H ₇ O ₄	179.0351	179.0350	0.6323	6.5	135(100)	Caffeic acid
21	5.21	C ₇ H ₅ O ₂	121.0300	121.0295	3.8463	5.5	n.d	Benzoic Acid

22	5.65	C ₉ H ₉ O	133.0662	133.0659	2.5166	5.5	n.d	(E)-Cinnamyl alcohol
23	5.69	C ₈ H ₇ O ₃	151.0400	151.0401	-0.6928	5.5	n.d	p-methoxybenzoic Acid / Vanillin / Methyl Salicylate / Methylparaben
24	6.02	C ₁₀ H ₉ O ₃	177.0557	177.0557	-0.2155	6.5	n.d	(Z/E)-p-methoxy-cinnamic acid / Coniferaldehyde
25	6.06	C ₉ H ₇ O ₂	147.0456	147.0452	3.2029	6.5	n.d	(Z/E) cinnamic Acid
26	6.35	C ₉ H ₁₀ NO ₂	164.0720	164.0717	1.6688	5.5	n.d	Ethyl anthranilate
27	7.03	C ₉ H ₉ O ₅	197.0457	197.0455	0.9334	5.5	n.d	Syringic Acid
28	7.03	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	359.0769	359.0772	-0.9367	11.5	n.d	Rosmarinic acid
Φλαβονοειδή								
29	2.55	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285.0776	285.0768	2.6639	10.5	n.d	Pinobanksin methyl ether
30	6.06	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609.1459	609.1461	-0.3839	13.5	196(100), 286(94.87), 167(75.30)	Rutin
31	6.09	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	283.0605	283.0612	-2.4036	11.5	n.d	Genkwanin
32	6.29	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	463.0878	463.0882	-0.9299	12.5	n.d	Hyperoside
33	6.36	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	593.1507	593.1512	-0.8387	13.5	n.d	Kaempferol Rutinoid
34	6.98	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301.0717	301.0718	-0.1497	10.5	n.d	Hesperetin
35	7.14	C ₁₅ H ₉ O ₇	301.0351	301.0354	-0.8309	11.5	151(100), 178(98.17), 167(43.14)	Quercetin / Tricetin / Morin
36	7.22	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0979	431.0984	-1.0185	12.5	285(100), 196(32.47), 167(25.66)	Vitexin
37	7.34	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0928	447.0933	-1.1432	12.5	301(100)	Quercetin rhamnoside
38	7.89	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0403	285.0405	-0.7318	11.5	n.d	Kaempferol / Luteolin
39	8.37	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.0454	269.0455	-0.5074	11.5	167(100), 173(50.47)	Genistein or Apigenin or Galangin
40	8.63	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.0511	315.0510	0.0952	11.5	n.d	Quercetin-3-methyl ether / 8-methoxykaempferol / Isorhamnetin / Rhamnetin
41	8.69	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.0606	271.0612	-2.0597	10.5	167(100), 161(54.88)	Naringenin / Pinobanksin
42	9.02	C ₁₇ H ₁₃ O ₇	329.0671	329.0667	1.2206	11.5	n.d	Quercetin-3,3'-dimethyl ether / Quercetin-3,7'- dimethyl ether
Βενζολικά παράγωγα								
43	2.13	C ₇ H ₇ O ₂	123.0455	123.0452	2.7115	4.5	n.d	3,5-Dihydroxytoluene
44	2.18	C ₆ H ₆ Cl ₂	144.9619	144.9617	0.8563	4.5	n.d	1,4-dichlorobenzene
45	6.50	C ₁₁ H ₁₅ O ₂	179.1078	179.1078	0.3660	4.5	n.d	Butylated hydroxyanisole
46	6.90	C ₉ H ₈ NO	146.0616	146.0611	3.2709	6.5	n.d	4-methoxyphenylacetonitrile
47	7.17	C ₁₀ H ₁₁ O	147.0820	147.0815	2.8326	5.5	n.d	Anethole
Αλκαλοειδή κινολίνης								
48	2.99	C ₉ H ₁₄ NO	152.1087	152.1081	3.9507	3.5	n.d	4(1H)-quinolinone
49	3.31	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₂	239.0820	239.0826	-2.4466	10.5	n.d	3-pyrrolidinyl kynurenic Acid / γ-LACTA-3PKA
50	4.80	C ₁₀ H ₆ NO ₃	188.0354	188.0353	0.2033	8.5	144(100)	Kynurenic Acid / 4-hydroxy quinolindinium cation

51	4.80	C ₉ H ₆ NO	144.0458	144.0455	2.0076	7.5	103(100), 99(96.13), 115(94.95), 127(92.05), 58(88.65)	2(1H)-quinolinone
Τερπενοειδή								
52	1.51	C ₁₀ H ₁₅ O	151.1125	151.1128	-2.1186	3.5	n.d	β-thujone or Nerol oxide or b-cyclocitral or Dill ether or α-4-Dimethyl-3-cyclohexene- 1-acetaldehyde or Limonen- 10-ol
53	4.97	C ₁₀ H ₁₃ O	149.0966	149.0972	-4.2306	4.5	n.d	Thymol
54	6.65	C ₁₃ H ₁₇ O ₃	221.1187	221.1183	1.7204	5.5	n.d	Dehydrovomifoliol
55	8.47	C ₁₀ H ₁₇ O ₂	169.1235	169.1234	0.6905	2.5	n.d	8-hydroxylinalool or Trans- furan linalool oxide or 2,2,6- Trimethyl-3-keto-6- viniltetrahydro-pyran, Epoxylinool
Λιπαρά οξέα								
56	3.80	C ₉ H ₁₇ O ₂	157.1237	157.1234	1.9086	1.5	n.d	Nonanoic Acid / Heptanoic Acid ethyl ester / Heptylacetate
57	5.24	C ₆ H ₁₁ O ₂	115.0770	115.0765	4.3201	1.5	n.d	4-hydroxy-4-methyl-2- pentanone/Hexanoic acid
58	6.22	C ₇ H ₁₄ O ₂	129.0925	129.0921	3.1841	1.5	n.d	Heptanoic Acid
Κουμαρίνες								
59	5.33	C ₁₁ H ₉ O ₄	205.0498	205.0506	-3.9606	7.5	n.d	Scoparone
60	5.36	C ₁₀ H ₇ O ₄	191.0351	191.0350	0.4328	7.5	n.d	Scopoletin
Αλδεϋδικά και κετόνικά παράγωγα								
61	3.31	C ₁₄ H ₁₉ O	203.1445	203.1441	2.0081	5.5	n.d	Lilial
62	3.95	C ₉ H ₉ O ₄	181.0500	181.0506	-3.5586	5.5	n.d	Syringaldehyde
63	5.07	C ₈ H ₈ NO	134.0615	134.0611	2.8807	5.5	n.d	1-(2-Aminophenyl)-ethanone
64	5.41	C ₉ H ₁₁ O ₂	151.0771	151.0765	3.9977	4.5	n.d	5-ketoisophorone
65	5.45	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	195.0662	195.0663	-0.5371	5.5	n.d	3,4,5- trimethoxybenzaldehyde
66	6.02	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163.0767	163.0765	1.2707	5.5	n.d	3-hydroxy-4-phenyl-2- butanone / 3-hydroxy-1- phenyl-2-butanone / Benzeneacetic Acid ethyl ester / Eugenol
67	6.06	C ₉ H ₉ O ₃	165.056	165.0557	2.1725	5.5	147(100)	2-hydroxy-1-(4- methoxyphenyl) ethanone
68	6.59	C ₉ H ₁₃ O	137.0977	137.0972	3.5239	3.5	n.d	a-isophorone
Πυρανικά και φουρανικά παράγωγα								
69	0.61	C ₆ H ₅ O ₄	141.0195	141.0193	0.9805	4.5	n.d	3,5-dihydroxy-2-methyl-4H- pyran-4-one
70	1.57	C ₆ H ₅ O ₃	125.0248	125.0244	2.8418	4.5	n.d	5-HMF
71	5.51	C ₈ H ₅ O ₂	133.0299	133.0295	3.0405	6.5	n.d	2,2'-bifuran
72	7.61	C ₆ H ₇ O ₄	143.0354	143.0350	3.1384	3.5	n.d	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6- methyl-4H-pyran-one
Αλκοόλες								

73	1.51	C ₁₀ H ₁₅ O	151.1125	151.1128	-2.1186	3.5	n.d	Hotrienol
74	2.79	C ₈ H ₉ O	121.0657	121.0659	-1.8973	4.5	n.d	Phenyl ethyl alcohol
75	4.87	C ₈ H ₁₇ O	129.1286	129.1285	0.9899	0.5	n.d	Octanol / 2-ethyl-1-hexanol
Απλά αλκάνια								
76	3.34	C ₁₆ H ₃₃	225.2585	225.2588	-1.0864	0.5	n.d	Hexadecane
Αλκένια								
77	4.44	C ₁₀ H ₁₉	139.1490	139.1492	-1.5947	1.5	n.d	5-methyl-4-nonene
78	8.68	C ₉ H ₁₇	125.1339	125.1336	2.6339	1.5	n.d	2,4-dimethyl-1-heptene
Ιονόνες και δαμασκόνες								
79	7.28	C ₁₃ H ₁₇ O	189.1283	189.1285	-1.2605	5.5	n.d	b-damascenone
80	7.57	C ₁₃ H ₁₇ O ₂	205.1242	205.1234	3.7680	5.5	n.d	3-oxo-a-ionone
Λοιπά στοιχεία								
81	7.31	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁	461.1089	461.1089	-0.1039	12.5	n.d	Leptosin
82	7.26	C ₁₃ H ₁₉ O ₃	223.1343	223.1340	1.3874	4.5	n.d	3,4-dihydro-3-oxoactinidol, 3-oxo-α-ionol / megastigm- 4-ene-3,9-dione / vomifoliol
Άγνωστα								
83	0.66	C ₁₄ H ₁₃ N ₆ O ₇	377.0852	377.0851	0.1447	11.5	179(100), 196(97.84), 286(77.38), 341(76.31), 161(68.33), 167(66.53)	
84	5.43	C ₈ H ₁₁ O ₄	171.0665	171.0663	1.0824	3.5	n.d	
85	5.69	C ₈ H ₁₃ O ₄	173.0821	173.0819	0.8368	2.5	111(100), 154(18.00)	
86	6.06	C ₁₁ H ₁₃ O ₄	209.0821	209.0819	0.8387	5.5	n.d	
87	6.20	C ₁₀ H ₁₇ O ₅	217.1082	217.1081	0.2449	2.5	157(100), 155(24.62), 167(18.44)	
88	6.29	C ₁₀ H ₁₉ O ₄	203.1290	203.1289	0.4180	1.5	167(100), 161(65.09)	
89	6.48	C ₁₆ H ₂₅ O ₉	361.1500	361.1504	-1.234	4.5	199(100), 301(16.02)	
90	7.08	C ₁₀ H ₁₇ O ₄	201.1134	201.1132	1.0021	2.5	139(100)	
91	7.34	C ₃₄ H ₁₁ N ₂	447.0298	447.0928	0.0038	30.5	301(100)	
92	7.55	C ₁₆ H ₂₇ O ₈	347.1701	347.1711	-1.328	3.5	185(100), 329(30.32), 161(29.14), 287(13.58), 196(11.26)	
93	7.68	C ₉ H ₁₅ O ₂	155.1081	155.1078	2.2918	2.5	167(100), 161(55.46), 103(46.83)	
94	7.75	C ₃₇ H ₁₅ N ₂ O ₂	519.1140	519.1139	0.0994	31.5	459(100), 315(59.17), 299(21.47), 196(15.67), 167(14.43), 314(10.21), 286(10.09)	
95	8.21	C ₃₄ H ₃₆ N ₃ O ₆	582.2606	582.2610	-0.685	18.5	462(100), 342(15.11)	
96	8.45	C ₁₆ H ₂₉ O ₈	349.1864	349.1868	-1.120	2.5	196(100), 167(59.57), 286(52.53), 161(49.03)	
97	8.81	C ₄₃ H ₁₇ N ₂ O ₂	593.1292	593.1292	-0.676	36.5	196(100), 285(81.53), 167(73.27), 307(52.50), 286(52.27)	

ΠΠ 9. Μεταβολίτες που εντοπίστηκαν από τον ποιοτικό έλεγχο μέσω LC-ESI(+)-HRMS/MS στο εκχύλισμα HON28_Oph2_XAD7_MeOH

Peak	Rt	MF	Experimental	Theoretical	Δm	RDBeq	Fragments MSMS	Category of compound
	(min)		[M-H] ⁻ m/z		(ppm)		(relative intensity %)	(Identification)
Οργανικά, καρβοξυλικά οξέα								
1	5.67	C ₁₃ H ₁₉ O ₂	207.1374	207.1380	-2.7336	4.5	n.d	Cyclohexane-1,3-diene-1-carboxylic acid
2	6.10	C ₉ H ₁₇ O ₄	189.1118	189.1121	-1.8488	1.5	n.d	Anchoic Acid
3	6.45	C ₁₀ H ₁₇ O ₄	201.1118	201.1121	-1.8902	2.5	n.d	Camphoric Acid
4	19.02	C ₄ H ₇ O ₄	119.0342	119.0339	2.9225	1.5	n.d	Succinic acid
Φαινολλά/ βενζοϊκά οξέα και παράγωγα								
5	0.47	C ₈ H ₈ N	118.0648	118.0651	-3.1777	5.5	n.d	Phenyl acetonitrile
6	1.85	C ₉ H ₉ O ₂	149.0598	149.0597	0.8295	5.5	n.d	(Z/E) cinnamic Acid
7	1.85	C ₇ H ₇ O ₂	123.0437	123.0441	-3.0078	4.5	n.d	Benzoic acid
8	2.61	C ₉ H ₉ O ₃	165.0542	165.0546	-2.3685	5.5	n.d	p-Coumaric acid
9	4.07	C ₉ H ₁₀ ON	148.0755	148.0757	-1.4893	5.5	n.d	4-methoxyphenylacetonitrile
10	4.34	C ₇ H ₇ O ₃	139.0385	139.0390	-3.1802	4.5	n.d	p-hydroxybenzoic Acid / Salicylic Acid
11	4.45	C ₈ H ₁₀ O ₂ N	152.0702	152.0706	-2.8272	4.5	n.d	Methoxy-phenyl-oxime
12	4.86	C ₈ H ₉ O ₂	137.0594	137.0597	-1.8811	4.5	119(100),91(51.72),103(40.35),71(38.41),96(37.30),104(35.49),80(33.88),96(33.65),88(33.07),89(32.46),109(31.57),53(31.41),71(31.35),76(31.26),60(30.90),78(30.87),86(30.62),74(30.04),61(29.81),100(29.67)	Phenylactic Acid / m-toluic acid, 2-hydroxyacetophenone / p-anisaldehyde
13	5.12	C ₇ H ₉ O ₂	125.0592	125.0597	-3.8308	3.5	n.d	3,5-Dihydroxytoluene
14	5.19	C ₈ H ₉ O ₄	169.0491	169.0495	-2.4681	4.5	n.d	Homogentisic acid / Vanillic acid / p-anisic acid
15	5.19	C ₉ H ₉ O ₄	181.0494	181.0495	-0.6189	5.5	n.d	Caffeic acid
16	5.66	C ₁₀ H ₁₃ O	149.0956	149.0961	-3.2195	4.5	n.d	Anethole
17	5.79	C ₈ H ₉ O ₃	153.0540	153.0546	-4.1493	4.5	n.d	p-methoxybenzoic Acid / Vanillin / Methyl Salicylate / Methylparaben
18	5.97	C ₁₀ H ₁₅ O ₂	167.1060	167.1067	-3.6364	3.5	n.d	Eugenol / 1-phenyl-2,3-butanediol
19	6.33	C ₉ H ₁₂ O ₂ N	166.0856	166.0863	-3.9338	4.5	n.d	Ethyl anthranilate
20	15.08	C ₁₀ H ₁₃ O ₅	213.0750	213.0744	-3.661	4.5	n.d	Methyl syringate / Eudesmic Acid / 4-methoxyphenyllactic Acid / Gallic acid propyl ester

21	16.07	C ₁₀ H ₁₁ O ₃	179.0701	179.0703	-0.8745	5.5	n.d	(Z/E)-p-methoxy-cinnamic acid / Coniferaldehyde
Φλαβονοειδή								
22	3.44	C ₁₆ H ₁₅ O ₅	287.0906	287.0901	-2.856	9.5	n.d	Sakuranetin / Isosakuranetin
23	5.70	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331.0816	331.0812	1.0397	10.5	n.d	Quercetin 3,3'-dimethyl ether / Quercetin 3,7'-dimethyl ether
24	5.94	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	303.0493	303.0499	-2.208	10.5	n.d	Quercetin / Tricetin / Morin
25	5.94	C ₁₅ H ₁₃ O ₄	257.0804	257.0808	-1.8773	9.5	n.d	Pinocembrin
26	6.02	C ₁₆ H ₁₃ O ₇	317.0654	317.0656	-0.660	10.5	n.d	Quercetin-3-methyl ether / 8-methoxykaempferol / Isorhamnetin / Rhamnetin
27	6.06	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	465.1013	465.1014	-3.144	11.5	n.d	Hyperoside
28	6.34	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.0547	287.0550	-1.2275	16.0	n.d	Kaempferol / Luteolin
29	6.34	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	595.1654	595.1652	-0.565	12.5	n.d	Kaempferol rutinoside
30	6.43	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.1069	449.1070	-2.021	11.5	n.d	Quercetin rhamnoside
31	6.41	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.1610	611.1612	0.571	12.5	n.d	Rutin / Quercetin rutinoside
32	6.61	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285.0753	285.0757	-1.508	10.5	n.d	Genkwanin
33	7.57	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	255.0650	255.0652	-0.8965	10.5	n.d	Chrysin
34	7.79	C ₁₅ H ₁₃ O ₅	273.0762	273.0757	1.5449	9.5	n.d	Naringenin / Pinobanksin
35	7.93	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.1121	433.1121	-1.855	11.5	n.d	Vitexin
36	8.55	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.0608	271.0601	2.4370	10.5	n.d	Genistein / Apigenin / Galangin
Αλκαλοειδή κινολίνης								
37	0.57	C ₁₀ H ₈ O ₃ N	190.0496	190.0499	-1.5461	7.5	172(100)	Kynurenic Acid / 4-hydroxy quinaldinium cation
38	4.83	C ₉ H ₈ ON	146.0596	146.0600	-3.3232	6.5	120(100),121(93.54),126(93.14),64(92.41),119(91.62),61(89.20),102(88.03),93(86.24),58(86.16),68(83.30),101(83.04),83(82.38),71(81.07),55(80.96),118(80.91),91(80.81),115(80.67),56(80.42),113.2(80.12),113.6(79.15)	2(1H)-quinolinone
39	6.00	C ₁₁ H ₁₁ O ₂ N	187.0863	187.0866	-1.5277	7.5	n.d	2,3-dihydropyrrolo[1,2-a]quinazolin-5(1H)-one
40	6.29	C ₁₄ H ₁₃ O ₂ N ₂	241.0967	241.0972	-1.8415	9.5	n.d	3-pyrrolidinyl kynurenic acid
41	15.57	C ₉ H ₁₆ ON	154.1225	154.1226	-0.9286	2.5	n.d	4(1H)-quinolinone
Μονοτερπενοειδή								
42	6.29	C ₁₀ H ₁₅ O	151.1112	151.1117	-3.3424	3.5	n.d	Thymol
43	3.28	C ₁₀ H ₁₇ O	153.1279	153.1274	3.1147	2.5	n.d	β-thujone or Nerol oxide or b-cyclocitral or Dill ether or α-4-Dimethyl-3-cyclohexene-1-acetaldehyde or Limonen-10-ol
44	5.67	C ₁₁ H ₁₇ O	165.1268	165.1274	-3.6725	3.5	n.d	a-Thujenal

45	6.16	C ₉ H ₁₅	123.1164	123.1168	-3.5790	2.5	n.d	Santene
46	6.69	C ₁₀ H ₁₅	135.1162	135.1168	-4.3340	3.5	n.d	Thuja-2,4(10)-diene.13 / p-Cymene / 1,3,8-p-Menthatriene / (E,E)-2,6-dimethyl-1,3,5,7-octatetraene
47	7.20	C ₁₀ H ₁₅ O ₂	171.1375	171.1380	-2.5954	1.5	n.d	8-hydroxylinalool / Trans-furan linalool oxide / 2,2,6-Trimethyl-3-keto-6-viniltetrahydro-pyran, Epoxylinool / Trans-furanoid linaloxide / Cis-furanoid linaloxide / Cis-rose oxide
48	9.08	C ₁₀ H ₁₇	137.1323	137.1325	-1.4487	2.5	n.d	Limonene/ α-pinene / β-pinene / β-myrcene / α-terpinene / γ-terpinene / δ-3-carene / Ocimene / a-Terpinolene
Σεσκιτερπενοειδή								
49	3.93	C ₁₅ H ₂₅	205.1956	205.1951	2.4845	3.5	n.d	Caryophyllene / Alloaromadendrene / Germacrene D / cis-Murola-4(14),5-diene / δ-Cadinene / epi-Bicyclosesquiphellandrene
50	5.64	C ₁₃ H ₂₁ O ₃	225.1482	225.1485	-1.3198	3.5	n.d	Vomifolol / 3,4-dihydro-3-oxoactinidol
51	5.96	C ₁₃ H ₁₉ O ₃	223.1324	223.1329	-1.9717	4.5	n.d	Dehydrovomifolol
52	6.49	C ₁₅ H ₂₁ O ₄	265.1429	265.1434	-1.8529	5.5	n.d	Trans-abscisic acid
53	14.57	C ₁₅ H ₂₇ O	223.2068	223.2056	4.9935	2.5	n.d	Nerolidol
Λιπαρά οξέα και παράγωγα								
54	0.83	C ₁₇ H ₃₅ O ₂	271.2638	271.2632	2.2361	0.5	n.d	Methyl hexadecanoate / Isopropyl myristate / Margaric acid
55	6.61	C ₂₂ H ₃₅ O ₁₃	507.2059	507.2059	-2.538	5.5	n.d	6-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosylester 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyclohexa-1,3-diene-1-carboxylate
56	13.17	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283.2630	283.2632	-0.4443	1.5	n.d	Oleic Acid
57	14.10	C ₂₀ H ₃₉ O ₂	311.2938	311.2945	-2.1338	1.5	n.d	Ethyl oleate
58	15.19	C ₁₆ H ₃₃ O ₂	257.2465	257.2462	1.1500	1.0	n.d	Hexadecanoic acid
59	19.86	C ₁₀ H ₂₁ O ₂	173.1530	173.1536	-3.6792	0.5	n.d	Octanoic acid ethyl ester / Methyl nonanoate
Μεθυλξανθίνες								
60	6.61	C ₈ H ₁₁ O ₂ N ₄	195.0868	195.0863	-4.470	5.5	n.d	Caffeine
Αλδεϋδικά και κετονικά παράγωγα								
61	0.59	C ₆ H ₇ O ₃	127.0385	127.0390	-3.6007	3.5	n.d	5-HMF
62	0.60	C ₆ H ₉ O ₄	145.0491	145.0495	-3.1921	2.5	n.d	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-one
63	0.85	C ₆ H ₉ O ₃	129.0540	129.0546	-4.4481	2.5	n.d	2,5-dimethyl-2,4-hydroxy-3(2H)-furanone
64	1.85	C ₉ H ₉ O ₂	149.0598	149.0597	0.8295	5.5	n.d	2-methyl-p-phthalaldehyde

65	4.76	C ₉ H ₁₁ O ₃	167.0703	167.0703	0.1587	4.5	n.d	2-hydroxy-1-(4-methoxy-phenyl) ethanone
66	5.05	C ₈ H ₉ O	121.0643	121.0648	-3.6770	4.5	n.d	Phenylacetaldehyde, or Acetophenone or p-tolualdehyde
67	5.67	C ₉ H ₁₃ O ₂	153.0905	153.0910	-3.1079	3.5	n.d	4-ketoisophorone
68	5.67	C ₁₃ H ₁₉ O ₂	207.1374	207.1380	-2.7336	4.5	n.d	3-oxo- α -ionone
69	5.67	C ₉ H ₁₁ O ₂	151.0749	151.0754	-3.1855	3.5	n.d	2-methoxyacetophenone
70	5.68	C ₉ H ₉ O	133.0647	133.0648	-0.7080	5.5	n.d	2-phenylpropenal / (E)-Cinnamaldehyde
71	5.68	C ₁₃ H ₁₇ O	189.1266	189.1260	-4.028	5.5	n.d	5-methyl-2-phenyl-2-hexenal
72	5.81	C ₁₀ H ₁₇ O ₂	169.1218	169.1223	-3.1223	2.5	n.d	Lilac aldehyde
73	6.06	C ₁₀ H ₁₃ O ₂	165.0905	165.0910	-2.9744	4.5	n.d	3-hydroxy-4-phenyl-2-butanone or 3-hydroxy-1-phenyl-2-butanone or 3-hydroxy-4-phenyl-3-buten-2-one or Benzeacetic acid ethyl ester
74	6.65	C ₁₃ H ₁₉ O	191.1429	191.1430	-0.7492	4.5	n.d	β -damascenone
75	5.94	C ₁₀ H ₁₀ ON	136.0753	136.0757	-3.0784	4.5	n.d	1-(2-Aminophenyl)-ethanone
76	6.33	C ₉ H ₁₅ O	139.1112	139.1117	-3.6307	2.5	n.d	α -isophorone
77	7.45	C ₁₁ H ₁₅ O	163.1114	163.1117	-2.2546	4.5	n.d	2-methylbutyrophenone
78	9.02	C ₁₅ H ₂₁ O	217.1585	217.1587	-0.7749	5.5	n.d	(E/Z)-2-Hexyl-cinnamaldehyde
79	9.48	C ₁₁ H ₁₇ O ₂	181.1219	181.1223	-2.1454	3.5	n.d	Butylated hydroxyanisole
80	22.23	C ₉ H ₁₅ O	115.1120	115.1117	2.5715	0.5	n.d	2-Heptanone
Αλκοόλες								
81	3.28	C ₁₀ H ₁₇ O	153.1279	153.1274	3.1147	2.5	n.d	Hotrienol
82	5.64	C ₈ H ₁₁ O	123.0800	123.0804	-3.3865	3.5	n.d	Phenyl ethyl alcohol
83	5.67	C ₉ H ₁₃ O ₂	153.0905	153.0910	-3.1079	3.5	n.d	4-methoxyphenethyl alcohol
84	6.16	C ₉ H ₁₃ O	137.0956	137.0961	-3.5013	3.5	n.d	Benzenepropanol
85	6.29	C ₁₀ H ₁₅ O	151.1112	151.1117	-3.3424	3.5	n.d	(α,α) 4-trimethyl benzenemethanol / Safranal
86	6.54	C ₉ H ₁₁ O	135.0801	135.0804	-2.6903	4.5	n.d	(E)-Cinnamyl aldehyde
87	7.89	C ₉ H ₁₃ O ₃	169.0853	169.0859	-3.5109	3.5	n.d	Homovanillyl alcohol
88	10.70	C ₁₃ H ₂₁ O ₂	209.1536	209.1536	-1.4409	3.5	n.d	3-oxo- α -ionol / megastigm-4-ene-3,9-dione
89	13.38	C ₁₀ H ₂₃ O	159.1745	159.1743	1.0861	-0.5	n.d	Decanol
90	13.42	C ₁₄ H ₂₃ O	207.1742	207.1743	-0.7859	3.5	n.d	2,6- Di-tert-butyl phenol
91	21.73	C ₈ H ₁₉ O	131.1425	131.1430	-4.4663	-0.5	n.d	Octanol
92	24.93	C ₇ H ₁₇ O	117.1278	117.1274	3.4857	-0.5	n.d	2-Heptanol
Αλκάνια								

93	24.38	C ₁₉ H ₂₁	129.1640	129.1638	1.3816	-0.5	n.d	Nonane
Αλκένια								
94	6.29	C ₁₀ H ₁₃	133.1006	133.1012	-4.0967	4.5	n.d	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-benzene
Πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες								
95	3.93	C ₁₅ H ₂₅	205.1956	205.1951	2.4845	3.5	n.d	1a. 2. 3. 5. 6. 7. 7a. Tetra-1H-cyclopropa[a]naphthalene
96	14.71	C ₁₀ H ₉	129.0693	129.0699	-4.6639	6.5	n.d	Napthalene
Φουρανικά παράγωγα								
97	0.23	C ₈ H ₉ O	121.0644	121.0648	-2.9838	4.5	n.d	2,3-Dihydro-benzofuran
98	9.85	C ₈ H ₇ O ₂	135.0436	135.0441	-3.5315	5.5	n.d	2,2'-Bifuran
Ινδόλες								
99	5.46	C ₈ H ₈ N	118.0647	118.0651	-3.9531	5.5	53(100),103(93.61),94(92.64),96(90.42),125(87.89),93(87.29),83(86.97),81(85.96),120(85.44),104(84.84),101(84.83),58(84.58),124(84.30),98(84.24),95(83.83),80(82.08),95(81.94),116(80.90),104(80.61),50(80.21)	Indole
Άγνωστα								
100	0.59	C ₂₄ H ₁₅ O ₃ N	365.1052	365.1052	1.411	18.0	203(100),347(52.44),275(51.78),185(21.61),305(14.67)	
101	3.73	C ₉ H ₉ O ₂ N	162.0545	162.0550	-2.6867	6.5	161(100),103(94.16),160(65.68),103(63.68),135(62.94),111(62.51),66(62.30),147(62.28),140(62.21),65(60.81),160(60.66),106(59.98),82(59.74),150(59.07),99(58.83),115(58.64),50(58.33),109(57.90),82(57.87),156(57.55)	
102	4.50	C ₉ H ₈ ON	146.0596	146.0600	-2.8009	6.5	n.d	
103	4.96	C ₁₃ H ₁₃ ON ₂	213.1019	213.1022	-1.3872	8.5	71(100),54(81.38),64(73.13),107(70.14),104(68.39),111(67.72),110(65.94),69(65.41),61(65.30),71(65.30),109(64.87),51(63.42),119(62.11),78(61.03),75(59.96),80(59.19),128(59.04),126(58.37),78(57.76),111(57.49)	
104	5.03	C ₁₃ H ₁₂ ON	198.0910	198.0913	-1.7790	8.5	n.d	
105	5.40	C ₁₂ H ₈ N ₈	264.0863	264.0866	-1.4035	13.00	71(100),60(97.01),61(91.60),64(89.78),96(86.04),70(85.78),77(81.66),76(80.75),82(80.39),94(79.79),97(79.65),107(79.61),69(78.83),85(78.79),107(78.61),65(78.56),63(78.55),63(76.63),68(76.23),77(74.43)	
106	5.41	C ₂₆ H ₁₅ ON	357.1151	357.1153	0.740	20.0	119(100),106(91.70),108(89.47),123(88.32),100(87.85),86(86.80),121(86.02),129(85.93),112(85.27),112(85.14),96(84.46),114(83.95),113(83.48),123(83.21),85(83.08),129(82.73),86(81.89),93(81.85),128(81.80),118(80.43)	

107	5.51	C ₁₉ H ₁₃ N ₉	367.1285	367.1288	-0.9083	18.0	122(100),99(93.46),123(91.87),98(91.78)90(91.48),100(89.78),97(89.32),90(89.04),108(83.42),113(80.82),116(80.12),118(80.02),111(75.16)	
108	5.55	C ₁₁ H ₉ N ₂	169.0756	169.0760	-2.4697	8.5	124(100),92(99.65),119(93.11),65(91.22),87(90.76),53(89.78),78(89.19),62(88.60),105(88.43),74(88.10),51(87.15),71(85.25),101(85.26),59(84.74),66(84.29),54(84.20),78(82.63),67(82.55),64(82.29),78(82.02)	
109	5.64	C ₃₁ H ₂₃ ON	425.1775	425.1774	0.1031	21.0	106(100),109(96.34),120(95.15),122(92.54),126(91.82)	
110	5.67	C ₂₆ H ₁₇ ON	359.1306	359.1305	0.4164	19.0	92(100),104(90.76),94(89.62),116(88.92),129(86.42),96(83.59),112(82.04),115(80.71),96(79.28),92(75.91),91(72.10)	
111	5.96	C ₁₂ H ₂₄ ON	198.1848	198.1852	-2.0749	1.5	n.d	
112	6.10	C ₂₈ H ₂₁ ON	387.1620	387.1623	-0.5815	6.5	104(100),112(99.17),126(94.51),106(87.76),112(85.96),120(84.59),95(84.19),95(83.43),128(82.21),106(81.76),100(80.17),102(79.96),125(79.07),99(76.97),99(74.67),102(67.85)	
113	6.16	C ₂₆ H ₁₇ N	343.1362	343.1361	0.4114	6.5	103(100),103(98.30),87(90.83),118(90.29),90(89.72),111(88.91),100(85.85),105(83.47),116(82.66),112(81.19)103(79.61),117(79.41),124(78.18),124(77.60),113(77.37),109(77.05),115(75.09),100(75.09),81(71.42),93(69.75)	
114	6.25	C ₂₇ H ₁₉ ON	373.1464	373.1466	-0.5362	6.5	107(100),104(91.97),122(86.37),110(84.49),106(78.68),128(73.09)	
115	6.72	C ₂₈ H ₁₉ ON	385.1462	385.1461	0.2439	20.0	295(100),367(39.50),325(20.58),223(16.78),265(10.88)	
116	7.21	C ₃₂ H ₃₆ O ₈ N ₆	632.2591	632.2589	0.2859	18.0	n.d	
117	7.30	C ₂₈ H ₁₉ N	369.1513	369.1512	0.3671	20.0	207(100),309(79.82),351(64.43),286(46.52),196(34.22),279(20.23),167(17.56),173(13.14),196.5(13.02),196.6(12.57),118(12.10),96(11.80),145(11.76),156(10.98),119(10.88),296(10.83),184(10.67),301(10.63),101(10.58),112(10.52)	
118	7.44	C ₄₆ H ₃₄ ON	616.2642	616.2640	1.085	30.5	454(100),470(67.78),452(57.14)	
119	7.71	C ₄₇ H ₃₆ O ₂ N	646.2748	646.2751	1.213	30.5	484(100),452(39.46),470(29.38),466(11.60)	
120	7.89	C ₃₂ H ₃₆ O ₆ N ₆	600.2690	600.2691	-0.1705	18.0	454(100),436(91.10),438(46.25)	
121	8.00	C ₂₉ H ₂₁ ON	399.1618	399.1618	0.1726	20.0	309(100),381(37.53),339(15.70),237(15.55),279(11.49)	
122	8.24	C ₃₂ H ₃₆ O ₅ N ₆	584.2743	584.2742	0.2093	18.0	438(100),420(87.21)	
123	8.65	C ₂₈ H ₂₃ N	373.1828	373.1830	0.800	18.0	n.d	
124	8.70	C ₂₃ H ₂₇ N ₂	331.2164	331.2160	-1.345	11.5	316(100),301(67.22),196(40.37),286(38.49),167(30.48),161(24.8	

							7),317(24.82),196(17.66),174(17.00),194(14.08),194(13.44),182(13.18),180(12.69),323(12.61),255(12.59),257(12.09),318(11.40),222(11.40),290(10.51)	
--	--	--	--	--	--	--	---	--

B) Κλασμάτωση

B.1) Χρωματογραφία Στήλης

ΠΠ 10. Σύστημα διαλυτών της κλασμάτωσης

N°	c-Hex (%)	EtoAc (%)	MeOH (%)	Όγκος (ml)
1	100	-	-	400
2	95	5	-	800
3	90	10	-	800
4	80	20	-	800
5	70	30	-	800
6	60	40	-	800
7	50	50	-	800
8	-	100	-	800
9	-	98	2	800
10	-	95	5	800
11	-	90	10	800
12	-	85	15	800
13	-	80	20	800
14	-	75	25	800
15	-	70	30	800
16	-	60	40	600

ΠΠ 11. Βάρη και αποδόσεις κλασμάτων

Κλάσμα	Βάρος (mg)	Απόδοση (%) ^a
F1	1.8	0.057
F2	17.1	0.538
F3	4.7	0.148

F4	3.2	0.101
F5	1.4	0.044
F6	1.6	0.050
F7	8.7	0.274
F8	26.5	0.833
F9	5.6	0.176
F10	4.0	0.126
F11	2.3	0.072
F12	15.0	0.472
F13	8.8	0.277
F14	1.9	0.060
F15	13.0	0.409
F16	3.0	0.094
F17	1.5	0.047
F18	45.9	1.443
F19	4.4	0.138
F20	2.6	0.082
F21	6.9	0.217
F22	16.4	0.516
F23	15.0	0.472
F24	19.0	0.597
F25	30.0	0.943
F26	5.9	0.186
F27	65.3	2.053
F28	267.5	8.412
F29	957.4	30.10
F30	679.2	21.35
F31	77.3	2.431
F32	58.3	1.833
F33	63.3	1.991
F34	8.9	0.279

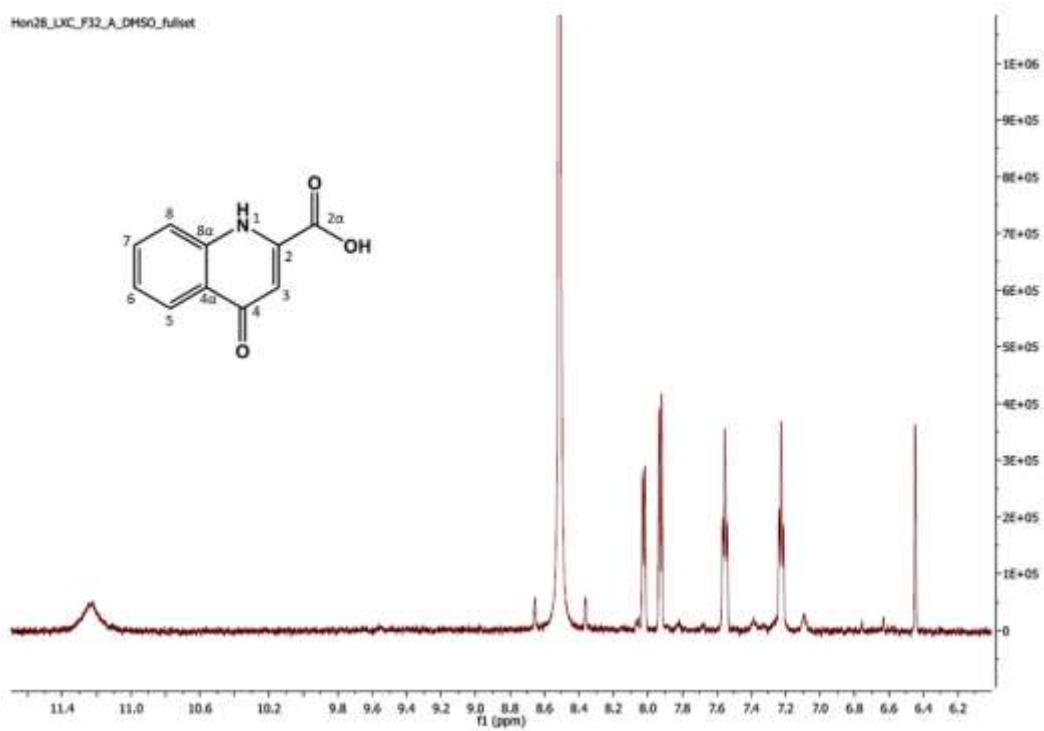
F35	5.6	0.176
F36	5.7	0.179
F37	26.0	0.817

Γ) Φασματοσκοπικά δεδομένα των απομονωμένων συστατικών

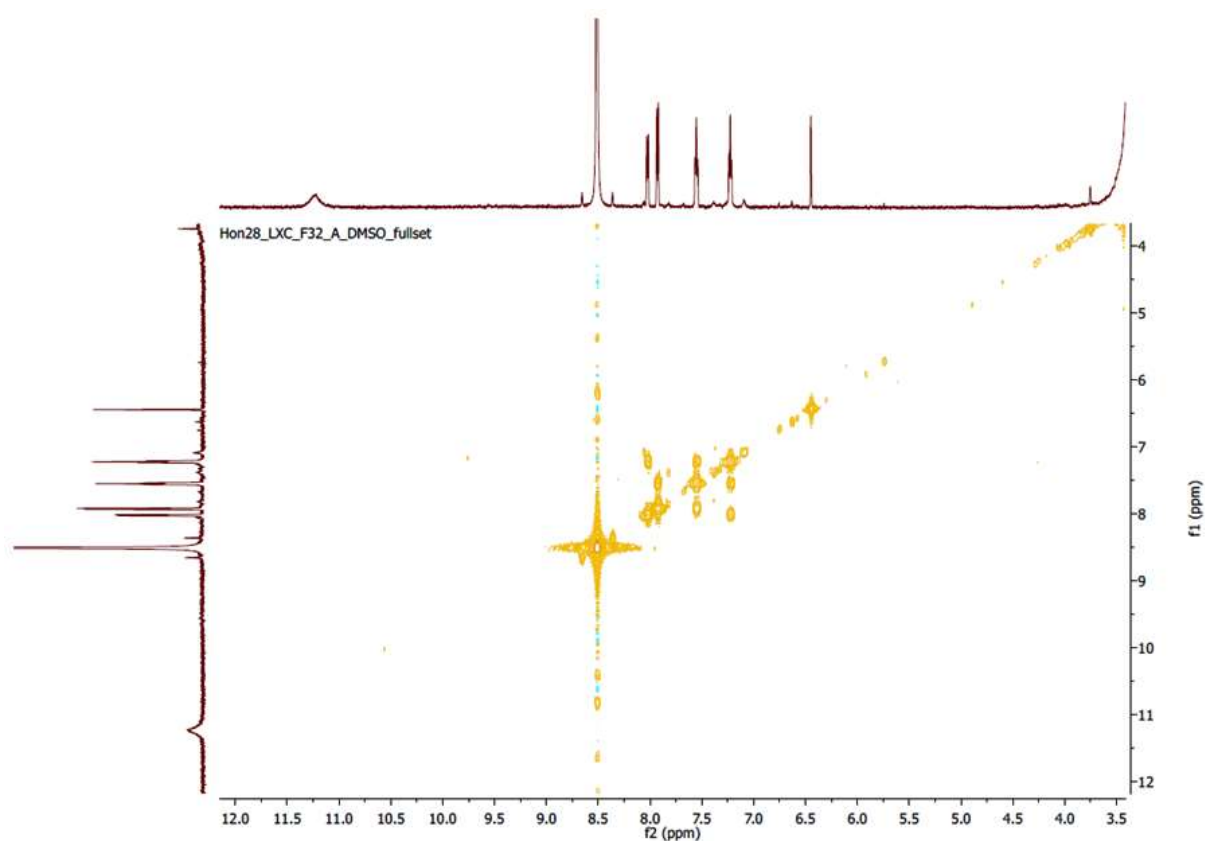
D.1) Μεταβολίτης 1 – Κυνουρενικό οξύ

ΠΠ 12. Φασματοσκοπικά στοιχεία του Κυνουρενικού οξέος

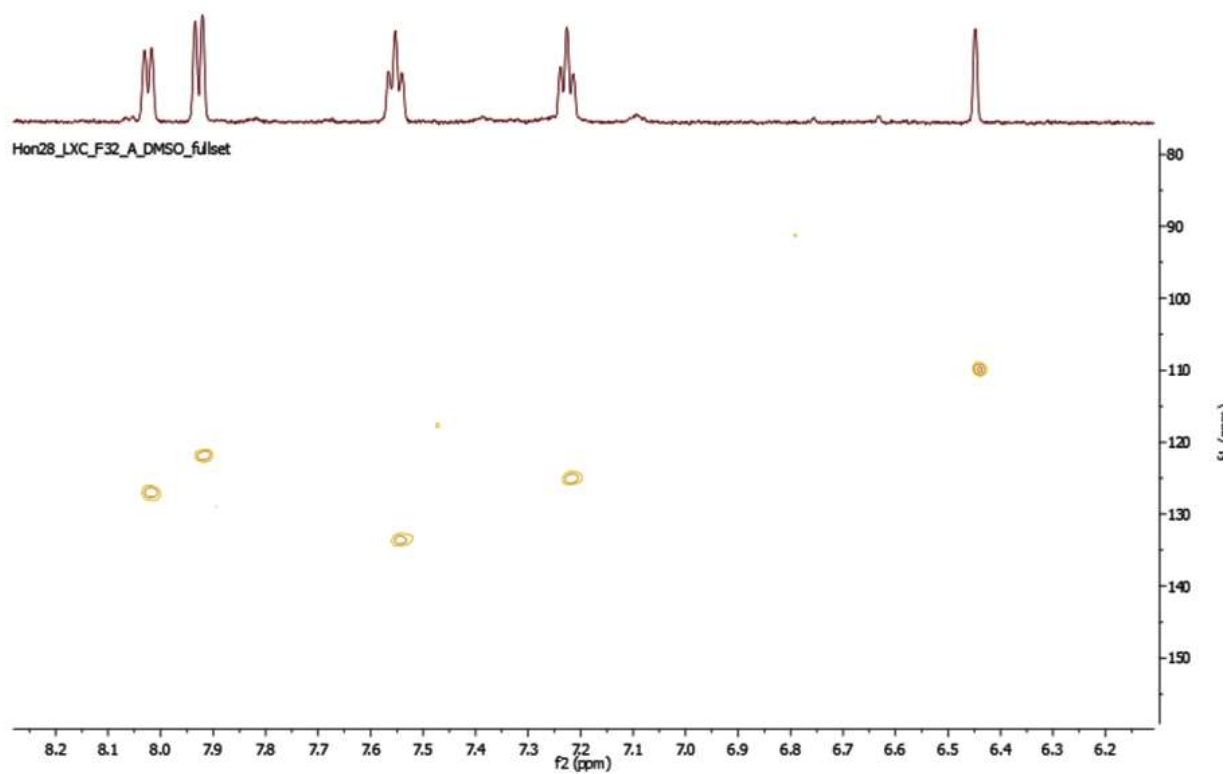
Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	Type	Integration	¹³ C (ppm)	HMBC correlations
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	140.0	-
2α-OH	11.14	s(br)	-	OH	1	163.6	-
3	6.45	s	-	CH	1	109.87	C-4α
4	-	-	-	-	-	177.7	-
4α	-	-	-	-	-	127.97	-
5	8.02	d	8.19	CH	1	126.98	C-7/C-8α
6	7.23	t	7.26	CH	1	125.09	C-8/C-4α
7	7.55	t	7.84	CH	1	133.61	C-5/C-8α
8	7.93	d	8.19	CH	1	121.86	C-6/C-4α
8α	-	-	-	-	-	142.13	-



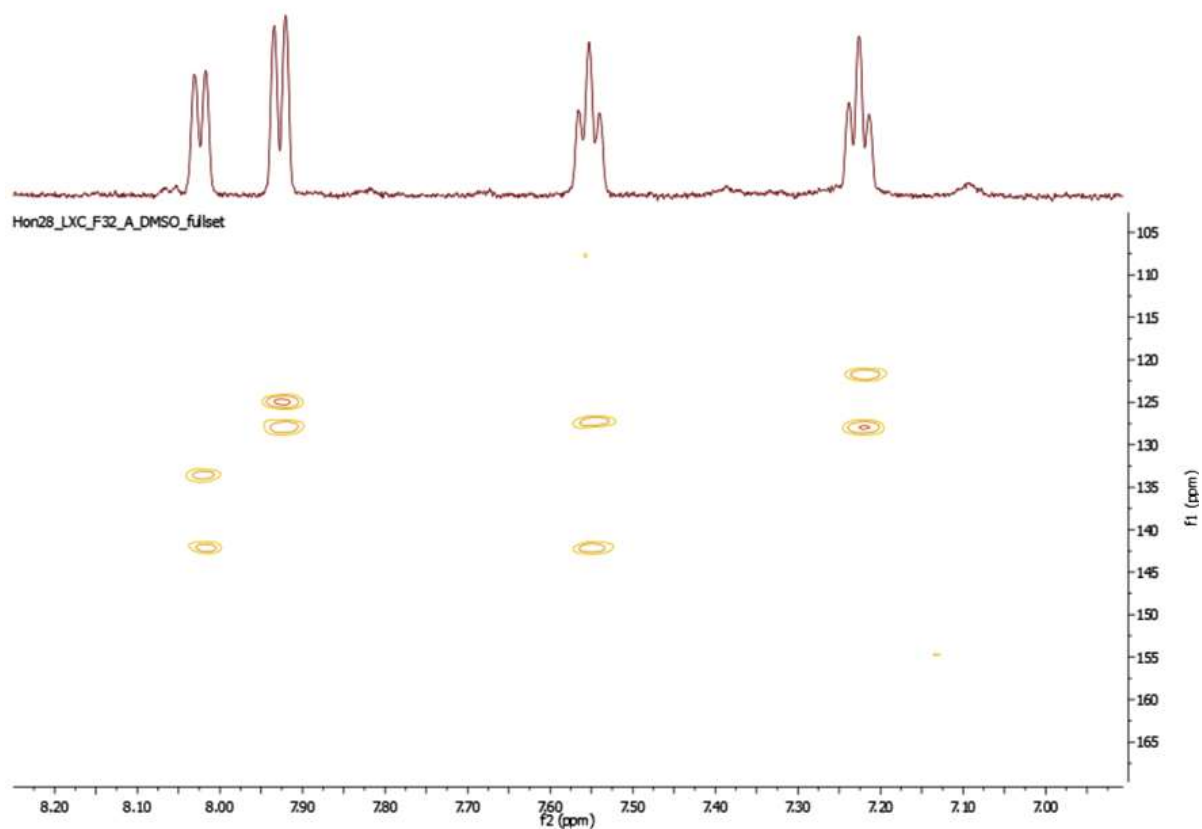
ΕΠ 5. Φάσμα πρωτονίου του ΚΥΝΑ



ΕΠ 6. Φάσμα COSY του ΚΥΝΑ



ΕΠ 7. Φάσμα HSQC του KYNA



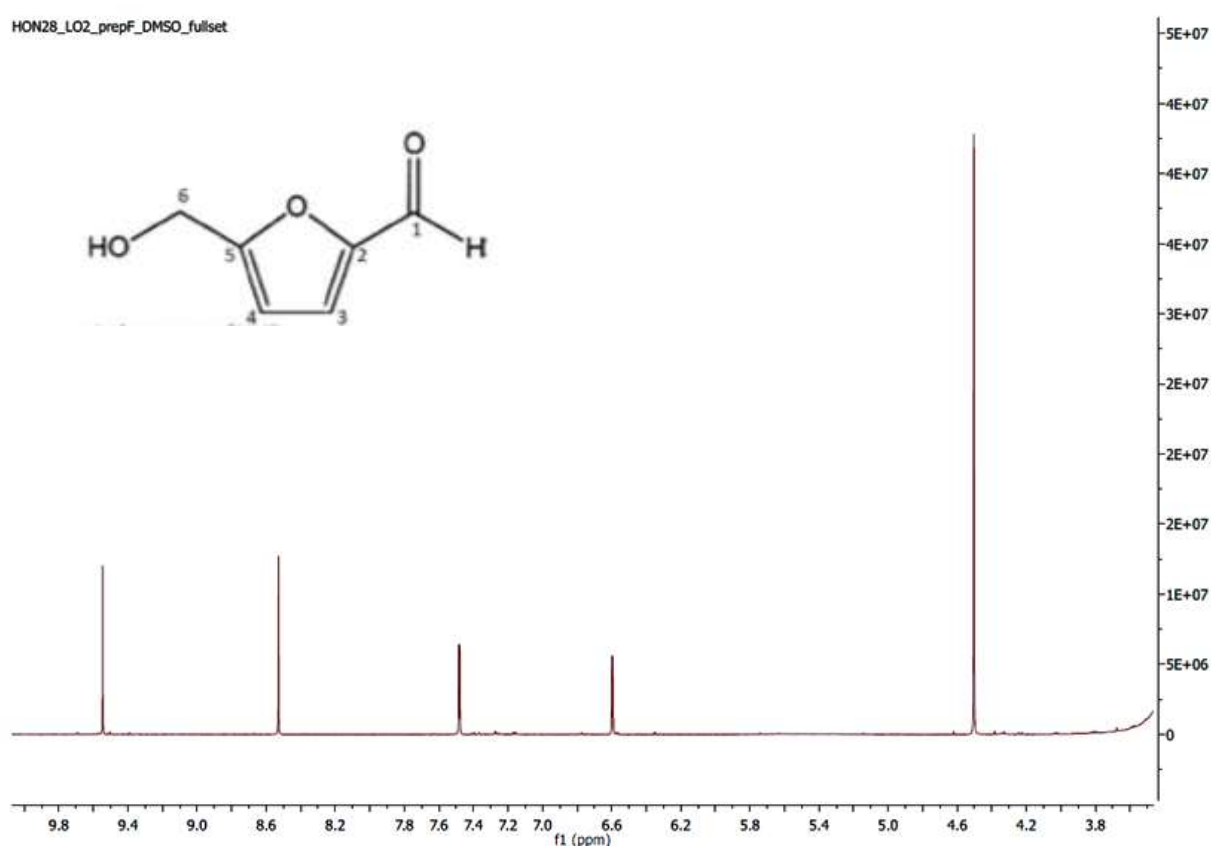
ΕΠ 8. Φάσμα HMBC του KYNA

D.2) Μεταβολίτης 2 – 5-HMF

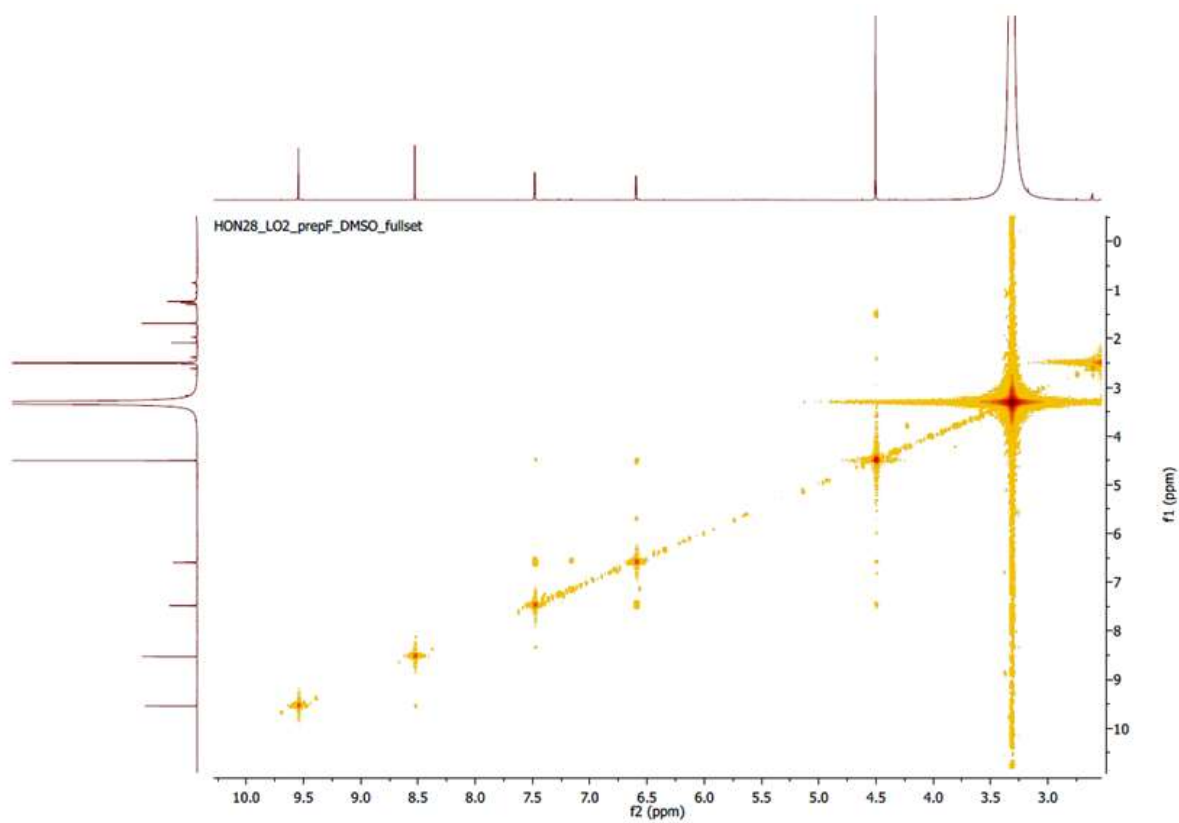
ΠΠ 13. Φασματοσκοπικά στοιχεία του Κινουρενικού οξέος

Atom	¹ H (ppm)	Mult/ty	J (Hz)	Type	Integration	¹³ C (ppm)	HMBC correlations
1-CHO	9.55	S	-	CH	1	178.40	-
2	-	-	-	-	-	152.23	-
3	7.48	d	3.55	CH	1	124.59	C-2/C-5
4	6.60	D	3.55	CH	1	109.90	-
5	-	-	-	-	-	162.64	-
6	4.50	S	-	CH ₂	2	56.26	C-4/C-5
6-OH	-	-	-	-	-	-	-

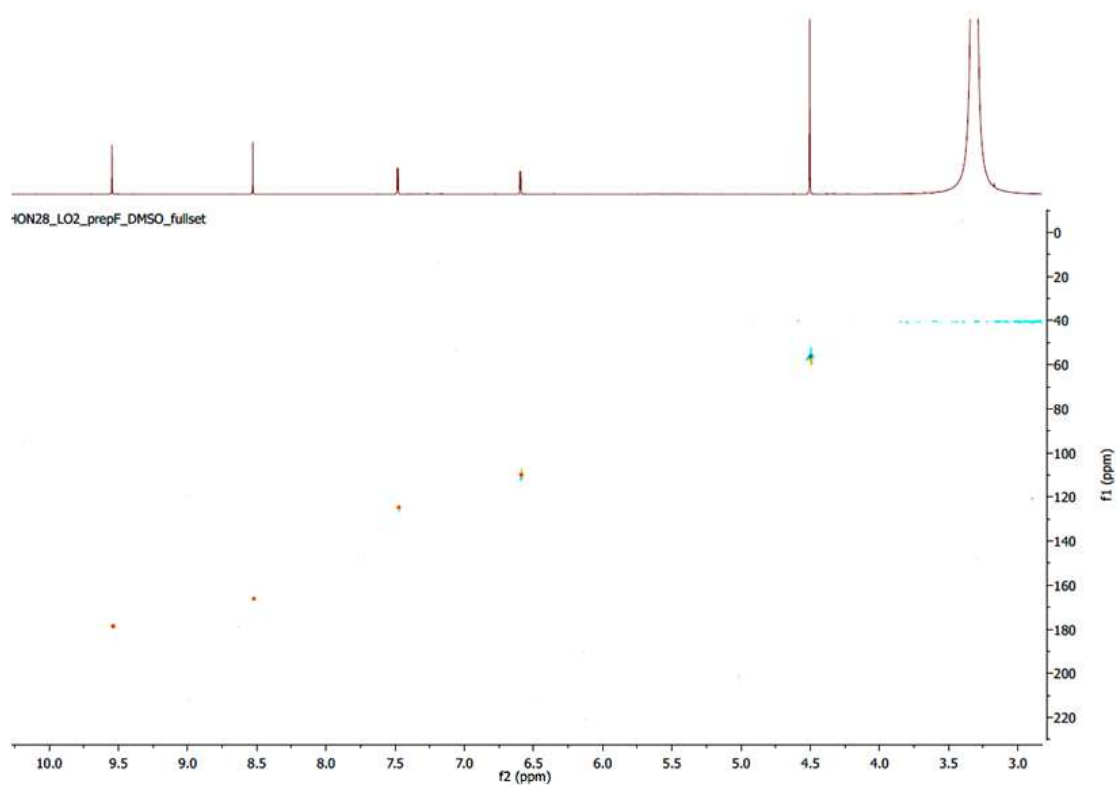
HON28_LO2_prepF_DMSO_fullset



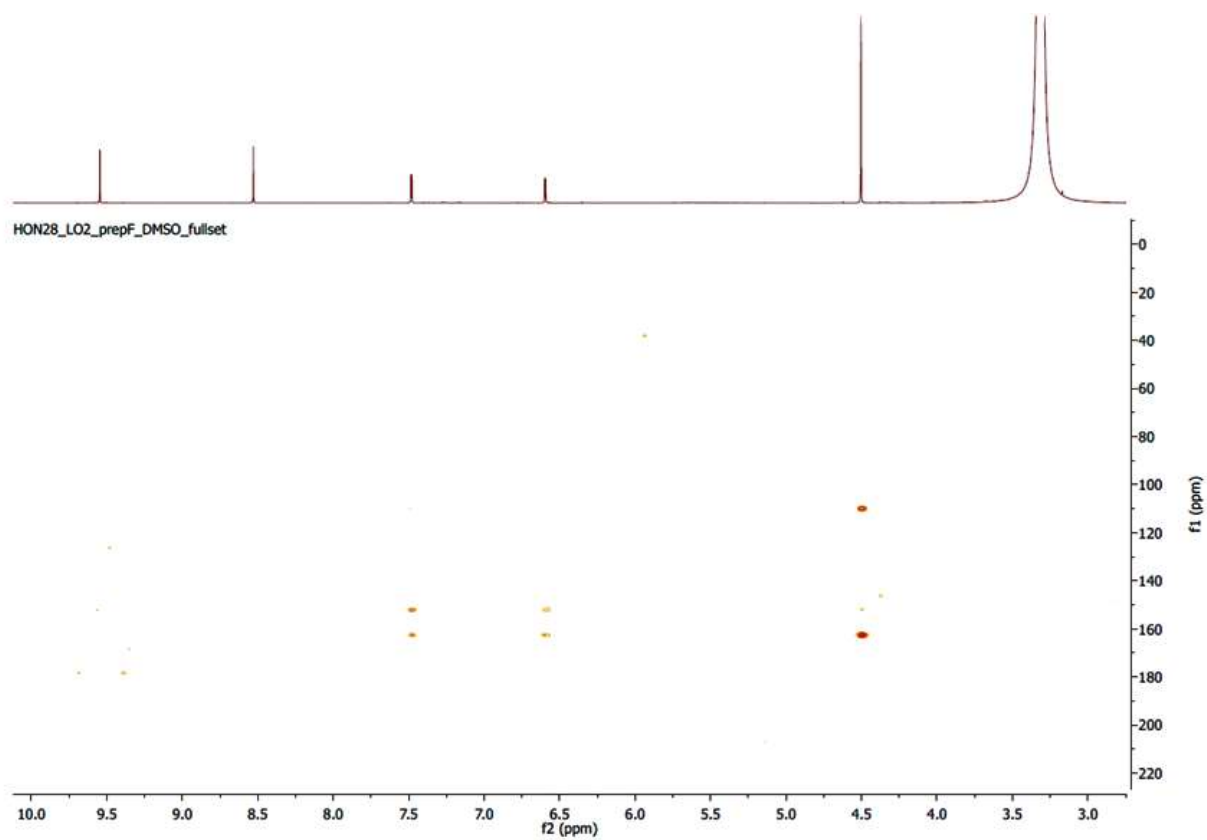
ΕΠ 9. Φάσμα πρωτονίου της HMF



ΕΠ 10. Φάσμα COSY της HMF



ΕΠ 11. Φάσμα HSQC της HMF



ΕΠ 12. Φάσμα HMBC της HMF

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Α) Μεταδεδομένα των δειγμάτων

ΠΠ 14. Μεταδεδομένα των δειγμάτων. Γεωγραφική και βοτανική προέλευση

Νησί	Περιοχή	Τύπος	Κωδικός
Άγιος Ευστράτιος	Άγιος Ευστράτιος	Μέλι φυτών	HON01
Ικαρία	Γιαλισκάρι	Ανοιξιάτικο μέλι	HON02
Ικαρία	Γιαλισκάρι	Ανοιξιάτικο μέλι	HON03
Ικαρία	Γιαλισκάρι	Αναματόμελο	HON04
Ικαρία	Γιαλισκάρι	Αναματόμελο	HON05
Ικαρία	Γιαλισκάρι	Θυμαρίσιο μέλι	HON06
Ικαρία	Γιαλισκάρι	Θυμαρίσιο μέλι	HON07
Λέσβος	Αγιάσος	Μέλι καστανιά	HON08
Λέσβος	Αγρα	Ανθόμελο	HON09
Λέσβος	Αεροδρόμιο	Ανθόμελο	HON10
Λέσβος	Βρίσα	Ανθόμελο	HON11
Λέσβος	Γέρα	Ανθόμελο	HON12
Λέσβος	Ερέσος/Σίγρι	Ανθόμελο	HON13
Λέσβος	Θερμή	Ανθόμελο	HON14
Λέσβος	Καλλόνη	Ανθόμελο	HON15
Λέσβος	Κάπη	Μέλι φυτών	HON16
Λέσβος	Κάπη	Μέλι φυτών	HON17
Λέσβος	Λουτρά/Μυτιλήνη	Ανθόμελο	HON18
Λέσβος	Μεσότοπος	Μέλι φυτών	HON19
Λέσβος	Μεσότοπος	Μέλι φυτών	HON20
Λέσβος	Πλαγιά Πλωμαρίου	Μέλι φυτών	HON21
Λέσβος	Πλαγιά Πλωμαρίου	Μέλι φυτών	HON22
Λέσβος	Πλωμάρι	Ανθόμελο	HON23
Λέσβος	Πλωμάρι	Μέλι φυτών	HON24
Λέσβος	Πλωμάρι	Μέλι φυτών	HON25
Λέσβος	Στύψη	Ανθόμελο	HON26
Λέσβος	Πλαγιά Πλωμαρίου	Μέλι φυτών	HON27
Λέσβος	Πλαγιά Πλωμαρίου	Μέλι φυτών	HON28
Λήμνος	Αγία Μαρίνα	Θυμαρίσιο μέλι	HON29
Λήμνος	Κάσπακας	Θυμαρίσιο μέλι	HON30
Λήμνος	Μανικάτι	Θυμαρίσιο μέλι	HON31
Λήμνος	Χαβούλι Μούδρο	Θυμαρίσιο μέλι	HON32
Λήμνος	Αγία Μαρίνα	Θυμαρίσιο μέλι	HON33
Σάμος	Άγ. Ιωάννης (ορ. Καρβούνης)	Μέλι φυτών	HON34
Σάμος	Δρακαίοι	Μέλι φυτών	HON35

Σάμος	Καλλιθέα	Μέλι φυτών	HON36
Σάμος	Κάμπος	Μέλι φυτών	HON37
Σάμος	Κουτακαϊκα	Μέλι φυτών	HON38
Σάμος	Μανωλάτες	Μέλι φυτών	HON39
Σάμος	Μυτιληνιοί	Μέλι φυτών	HON40
Σάμος	Παραδεϊκα	Μέλι φυτών	HON41
Σάμος	Παραδεϊκα	Μέλι φυτών	HON42
Σάμος	Πεταλούδα	Μέλι φυτών	HON43
Σάμος	Πλάτανος	Μέλι φυτών	HON44
Σάμος	Πλάτανος	Μέλι φυτών	HON45
Σάμος	Σακουλεϊκα	Μέλι φυτών	HON46
Σάμος	Σταυρινήδες	Μέλι φυτών	HON47
Σάμος	Σταυρινήδες	Μέλι φυτών	HON48
Σάμος	Υδρούσα	Μέλι φυτών	HON49
Σάμος	Χαρουπιές	Μέλι φυτών	HON50
Φ. Κορσεών	Φούρνοι Κορσεών	Θυμαρίσιο μέλι	HON51
Φ. Κορσεών	Φούρνοι Κορσεών	Θυμαρίσιο μέλι	HON52
Φ. Κορσεών	Καμάρι	Θυμαρίσιο μέλι	HON53
Φ. Κορσεών	Καμάρι	Θυμαρίσιο μέλι	HON54
Φ. Κορσεών	Μπάλι	Θυμαρίσιο μέλι	HON55
Φ. Κορσεών	Καμάρι	Θυμαρίσιο μέλι	HON56
Φ. Κορσεών	Μπάλι	Θυμαρίσιο μέλι	HON57
Φ. Κορσεών	Καμάρι	Θυμαρίσιο μέλι	HON58
Χίος	Χίος	Μέλι φυτών	HON59
Χίος	Χίος	Μέλι φυτών	HON60
Χίος	Αυγώνυμα	Μέλι φυτών	HON61
Χίος	Βέσσα	Μέλι φυτών	HON62
Χίος	Βίκι	Μέλι φυτών	HON63
Χίος	Βίκι	Μέλι φυτών	HON64
Χίος	Εγρηγύρος	Μέλι φυτών	HON65
Χίος	Θολοποτάμι	Μέλι φυτών	HON66
Χίος	Καμπί	Μέλι φυτών	HON67
Χίος	Καρδάμυλα	Μέλι φυτών	HON68
Χίος	Καρδάμυλα	Μέλι φυτών	HON69
Χίος	Κουρούνια	Μέλι φυτών	HON70
Χίος	Λεπτύποδα	Μέλι φυτών	HON71
Χίος	Σπαρτούντα	Μέλι φυτών	HON72
Χίος	Χαλανδρα	Μέλι φυτών	HON73
Ψαρά	Ψαρά	Θυμαρίσιο μέλι	HON74
Ψαρά	Ψαρά	Θυμαρίσιο μέλι	HON75
Ψαρά	Ψαρά	Θυμαρίσιο μέλι	HON76

B) Εφαρμογή ρητινών

- Εκχύλιση με ρητίνη Amberlite XAD4 και υγρή-υγρή εκχύλιση

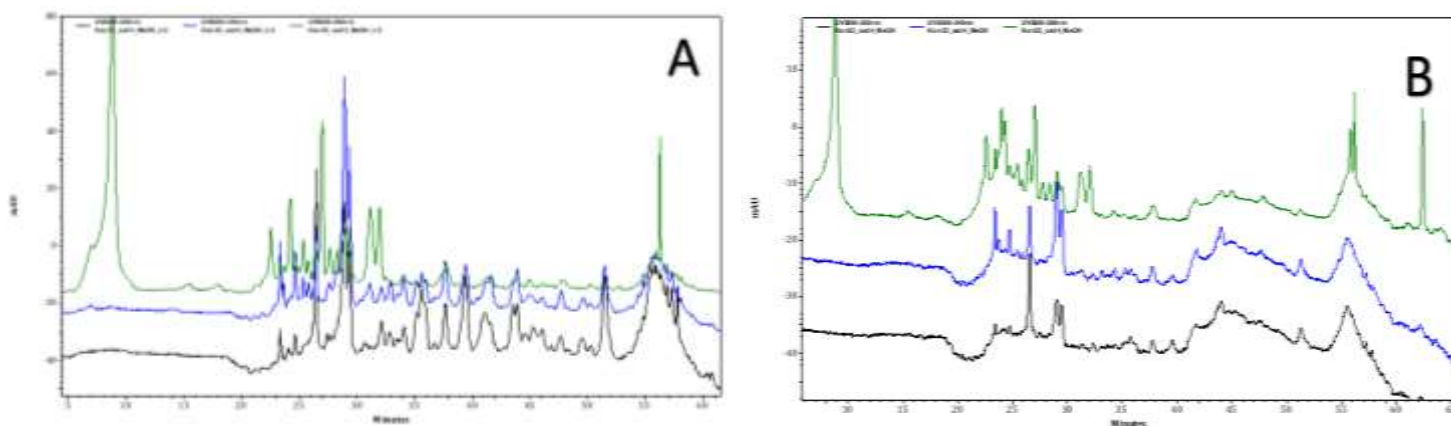
Για ανάλυση HPLC χρησιμοποιήθηκε μια αναλυτική στήλη Supelco C-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μm). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες A: H₂O + 2% MeOH + 0.25% FA και B: MeOH. Ο ανιχνευτής UV ρυθμίστηκε στα 290, 340 και 360 nm, και ο όγκος έγχυσης καθορίστηκε στα 20 μl. Τα δείγματα HON52_xad4b_MeOH και HON52 (πρώτη ύλη), παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση 5 mg/ml, ενώ το HON52_xad4b_MeOH_LU παρασκευάστηκε με συγκέντρωση 4.6 mg/ml.

ΠΠ 15. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g)
1	HON52_xad4b_H ₂ O	4.4321
2	HON52_xad4b_MeOH	0.0542
3	HON52_xad4b_MeOH_LL	0.0061
4	HON52_xad4b_MeOH_LU	0.0046

ΠΠ 16. Μέθοδος HPLC

Χρόνος (min)	A%	B%	Ροή (ml/min)
0	90	10	1
15	90	10	1
20	60	40	1
30	55	45	1
50	40	60	1
52	20	80	1
60	10	90	1
65	10	90	1
68	90	10	1
73	90	10	1

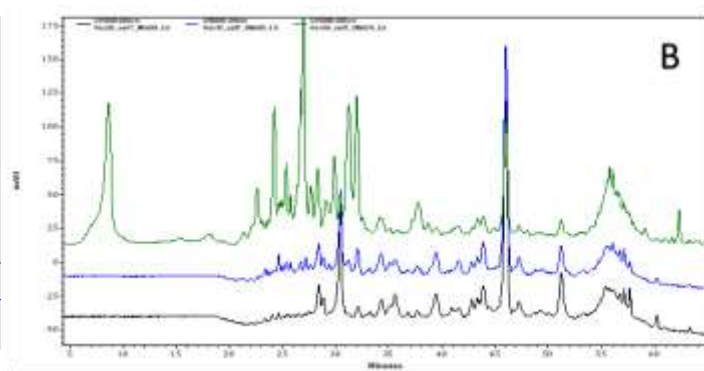
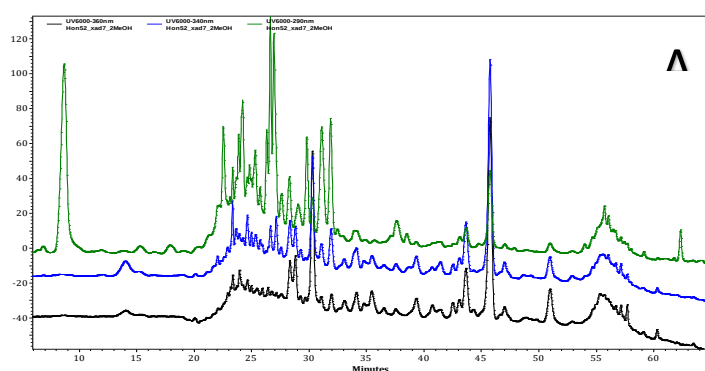


ΕΠ 13. Χρωματογραφήματα HPLC, όπου η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 360 nm, η κυανή στα 340 nm και η πράσινη στα 290 nm. Α) HON52_xad4_MeOH_LU και Β) HON52_xad4_MeOH.

- Εκχύλιση με ρητίνη Amberlite XAD7 και υγρή-υγρή εκχύλιση

ΠΠ 17. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g)
1	HON52_xad7_H ₂ O	5.9416
2	HON52_xad7_MeOH	0.0013
3	HON52_xad7_MeOH_LL	0.0050
4	HON52_xad7_MeOH_LU	0.0046



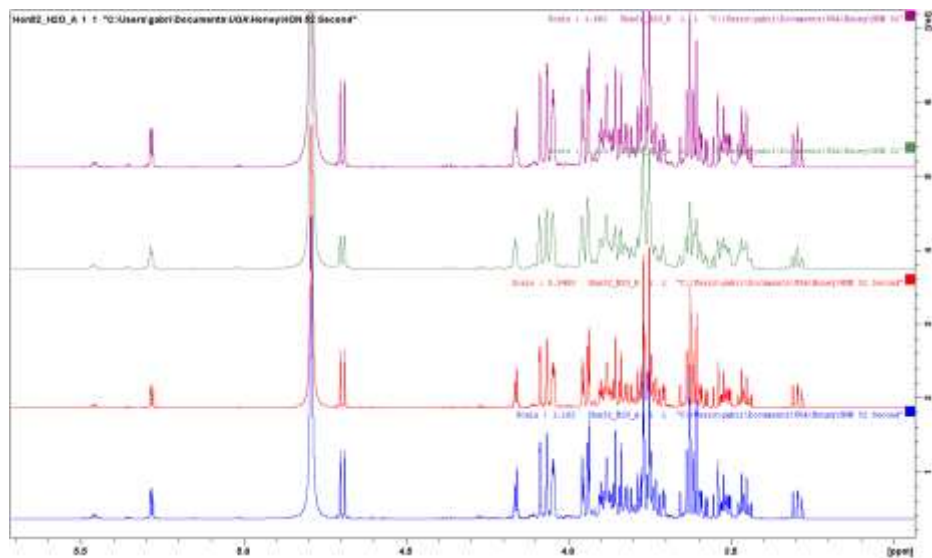
ΕΠ 14. Χρωματογραφήματα HPLC-DAD, όπου η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 360 nm, η κυανή στα 340 nm και η πράσινη στα 290 nm. Α) HON52_xad7 και Β) HON52_xad7_MeOH_LU.

Γ) Υγρή-υγρή εκχύλιση

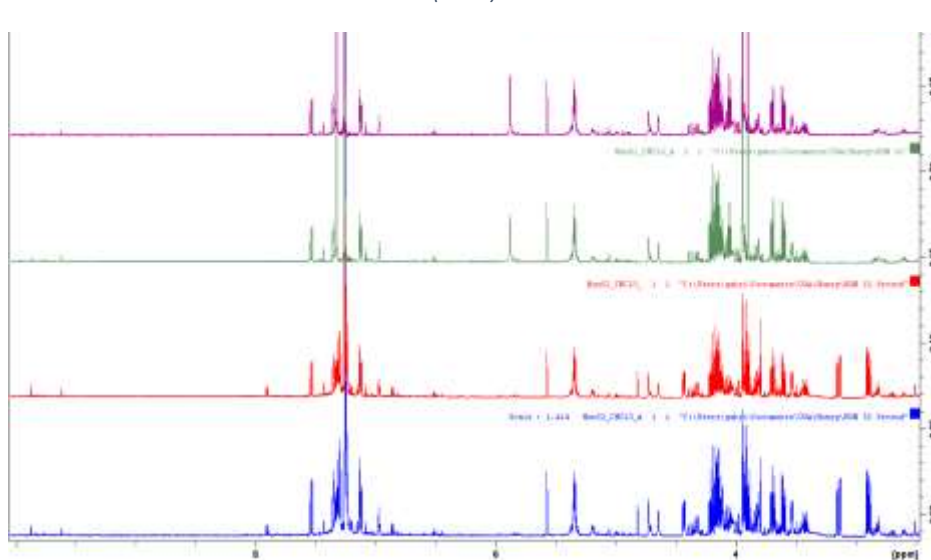
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃)
 - Σύγκριση των προφίλ

ΠΠ 18. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g)
1	HON01_H ₂ O_A	5.5886
2	HON01_H ₂ O_B	5.3204
3	HON01_CHCl ₃ _A	0.0092
4	HON01_CHCl ₃ _B	0.0051
5	HON52_H ₂ O_A	5.0200
6	HON52_H ₂ O_B	5.4960
7	HON52_CHCl ₃ _A	0.0080
8	HON52_CHCl ₃ _B	0.0071



ΕΠ 15. Φάσματα ^1H -NMR υδατικών φάσεων των δειγμάτων HON01 (πάνω) και HON52 (κάτω).

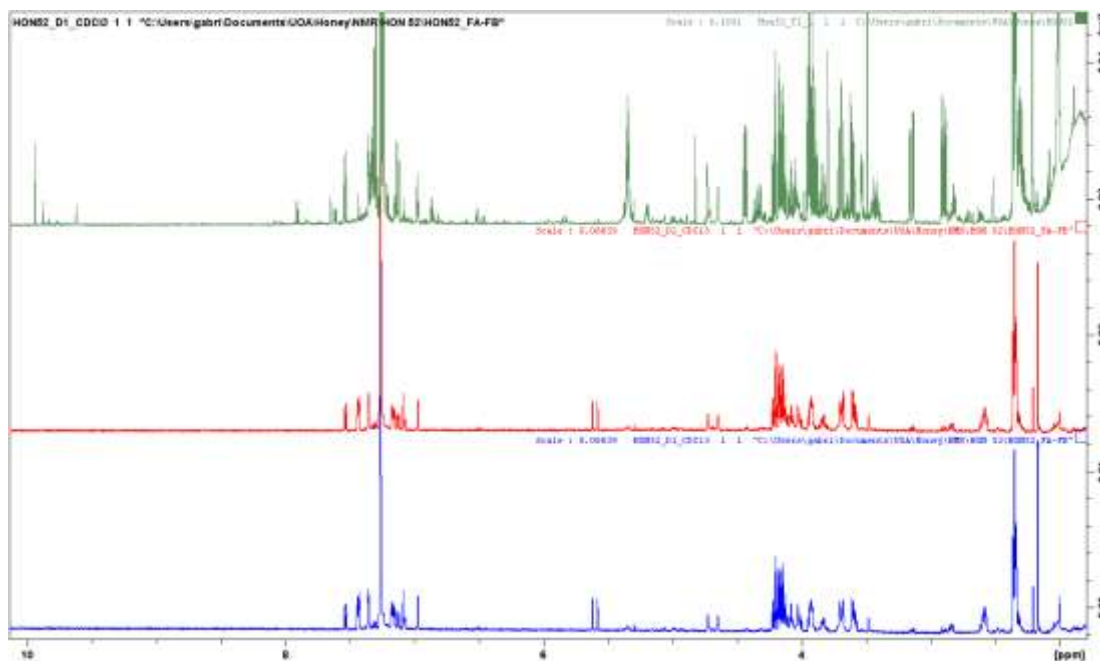


ΕΠ 16. Φάσματα ^1H -NMR οργανικών φάσεων των δειγμάτων HON01 (πάνω) και HON52 (κάτω).

- Προσδιορισμός της αρχικής ποσότητας:

ΠΠ 19. Δοκιμές

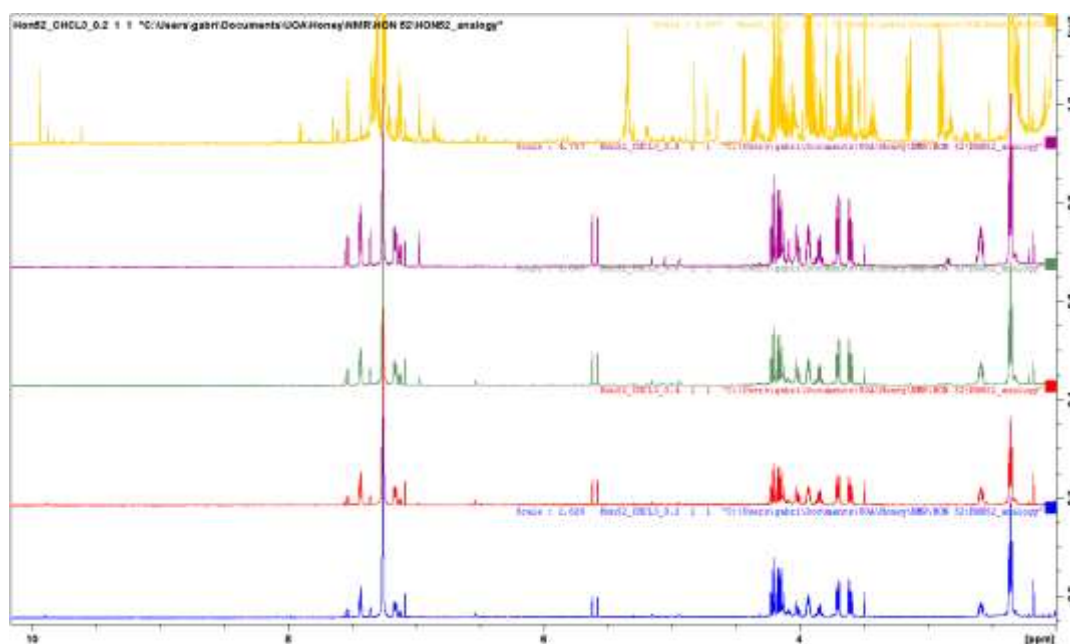
Κωδικός δείγματος	Αρχική ποσότητα (g)	H ₂ O/CHCl ₃ (ml)	Σημειώσεις
A1-A2	0.5	0.8 / 0.8	Μετά τη φυγοκέντρηση, η φάση CHCl ₃ είναι ένα gel, και δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός των φάσεων. Η δοκιμή απορρίφθηκε.
B1-B2	0.2	0.8 / 0.8	Μετά τη φυγοκέντρηση, μπορεί να παρατηρηθεί τεράστια ποσότητα γαλακτώματος. Η δοκιμή απορρίφθηκε.
C1-C2	0.2	0.8 / 0.8	Οι παράμετροι φυγοκέντρησης έχουν τροποποιηθεί σε 10000 rpm στους 4°C. Δεν παρατηρούνται διαφορές: Μπορεί να παρατηρηθεί τεράστια ποσότητα γαλακτώματος. Η δοκιμή απορρίφθηκε.
D1-D2	0.2	1 / 1	Χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένοι διαλύτες για την εκχύλιση (D ₂ O και CDCl ₃), έτσι μετά από φυγοκέντρηση αμέσως παρασκευάστηκαν για ανάλυση NMR, χωρίς να είναι απαραίτητο το στάδιο εξάτμισης. Δεν παρατηρείται γαλάκτωμα.



ΕΠ 17. Φάσματα της δοκιμής D

ΠΠ 20. Δοκιμές

Αριθ.	Κωδικός δείγματος	Αρχική ποσότητα (g)	D ₂ O/CDCl ₃ (ml)	Σημειώσεις
1	HON52_CHCl ₃ _0.2	0.2	0.5 / 0.5	Τα δείγματα παρασκευάστηκαν αμέσως για ¹ H-NMR.
2	HON52_CHCl ₃ _0.4	0.4	1 / 1	
3	HON52_CHCl ₃ _0.6	0.6	1.5 / 1.5	
4	HON52_CHCl ₃ _0.8	0.8	2 / 2	

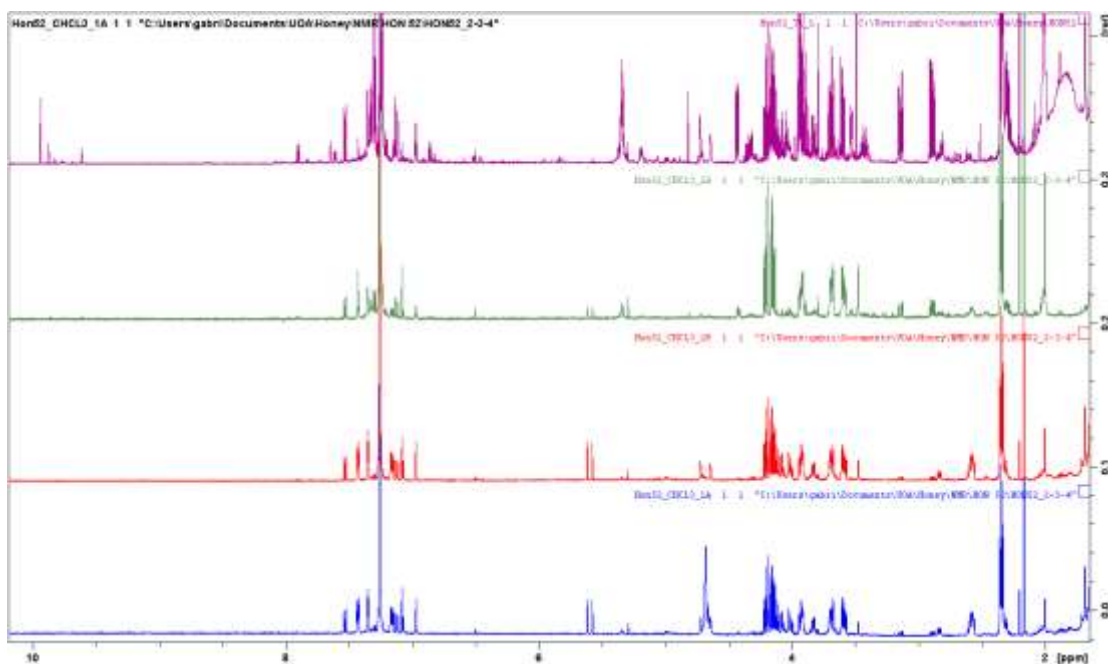


ΕΠ 18. Φάσματα πρωτονίου : Προφίλ αναφοράς (Πάνω) και των δοκιμών

- Προσδιορισμός του όγκου διαλυτών:

ΠΠ 21. Δοκιμές

Κωδικός δείγματος	Αρχική ποσότητα (g)	D ₂ O/CDCl ₃ (ml)	Σημειώσεις
1A-1B	0.2	2 / 2	Μετά τη φυγοκέντρηση, οι οργανικές φάσεις παρασκευάστηκαν αμέσως για ανάλυση NMR, χωρίς να απαιτείται το στάδιο εξάτμισης.
2A-2B	0.2	0.8 / 0.8	Μετά από φυγοκέντρηση, απορρίφθηκε η οργανική φάση του 2B, λόγω σχηματισμού γέλης. Η οργανική φάση του 2A παρασκευάστηκε αμέσως για ανάλυση NMR, χωρίς να απαιτείται το στάδιο εξάτμισης.



ΕΠ 19. Φάσματα ^1H -NMR φάσεων χλωροφορμίου. Από πάνω προς τα κάτω: Προφίλ αναφοράς, οργανικές φάσεις των δειγμάτων 2A, 1B, και 1A.

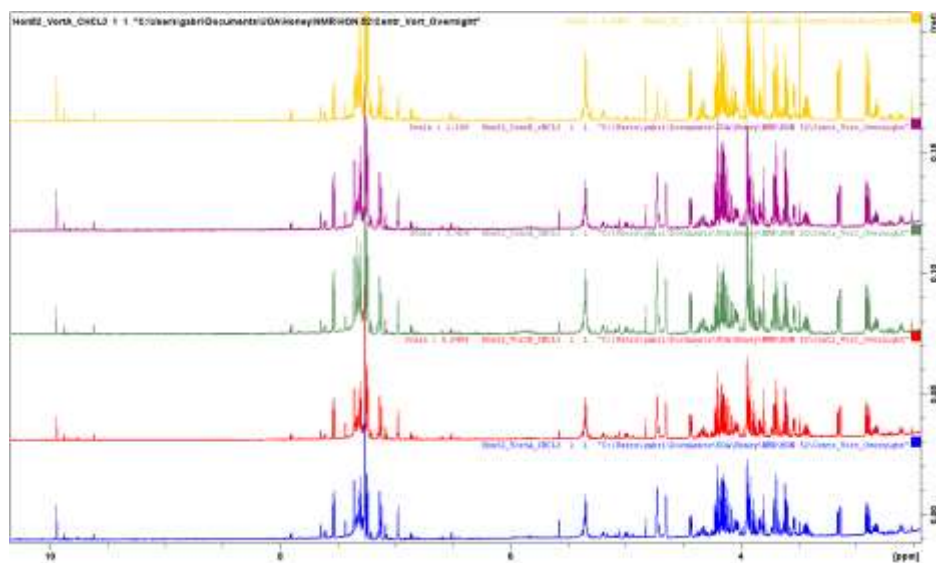
○ Αποβολή γαλακτώματος :

ΠΠ 22. Βάρη των κλασμάτων της δοκιμής A

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g)
1α	HON52_vortA_ H_2O	4.9679
2α	HON52_vortB_ H_2O	4.9409
1β	HON52_vortA_ CHCl_3	0.0102
2β	HON52_vortB_ CHCl_3	0.0099

ΠΠ 23. Βάρη των κλασμάτων της δοκιμής B

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g)
3α	HON52_centA_ H_2O	4.9856
4α	HON52_centB_ H_2O	4.9598
3β	HON52_centA_ CHCl_3	0.0093
4β	HON52_centB_ CHCl_3	0.0099

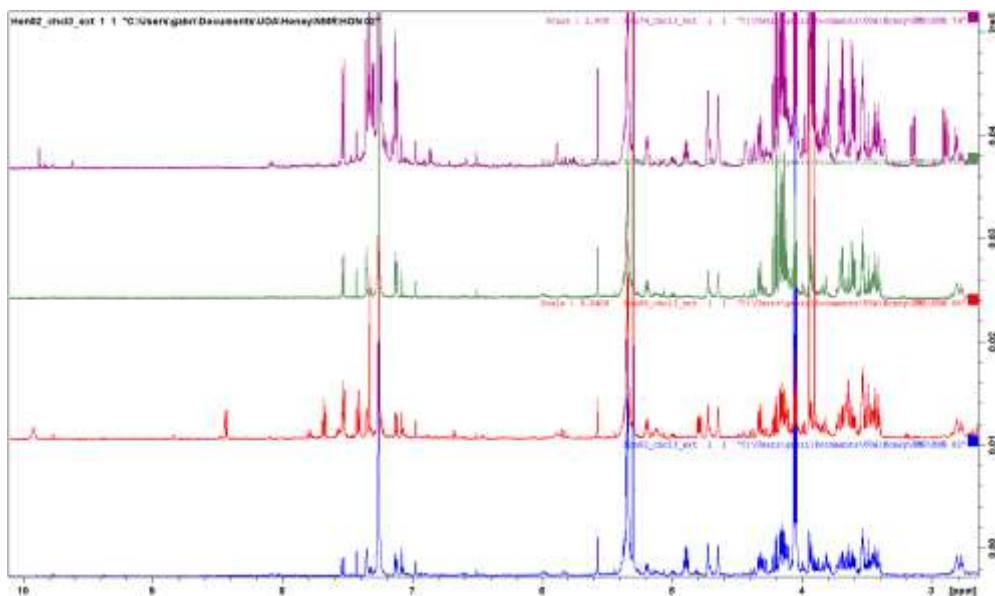


ΕΠ 20. Φάσματα ^1H -NMR. Από πάνω προς τα κάτω: Προφίλ αναφοράς, 4b, 3b, 2b και 1b

- Συμπεριφορά του γαλακτώματος

ΠΠ 24. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Εκχυλίσματα	Βάρη (g)
1	HON02_ CHCl_3	0.0044
2	HON08_ CHCl_3	0.0045
3	HON38_ CHCl_3	0.0073
4	HON74_ CHCl_3	0.0053



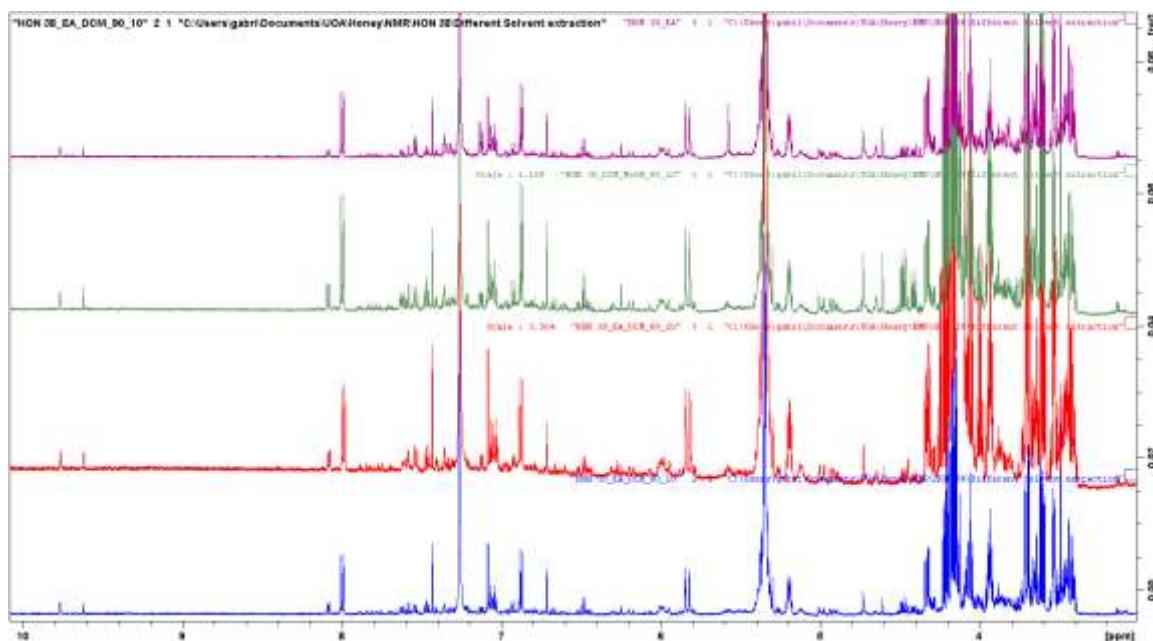
ΕΠ 21. Φάσματα πρωτονίου των οργανικών φάσεων

- Διχλωρομεθάνιο (DCM)

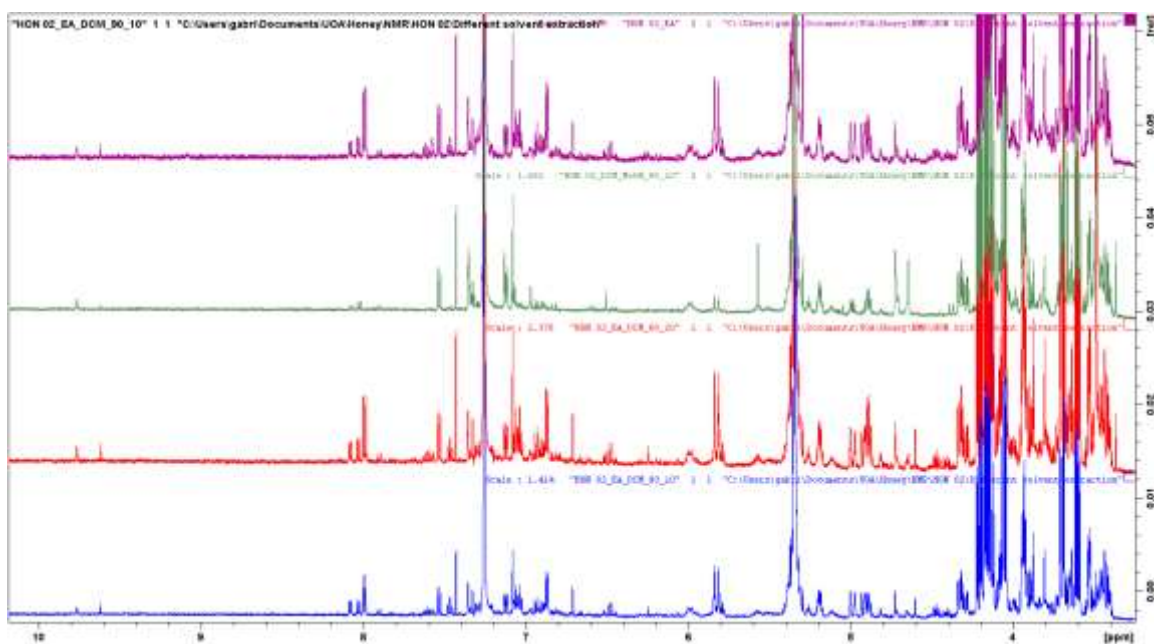
- Δοκιμές με διαφορετικά μέλια :

ΠΠ 25. Δοκιμές και βάρη

Κωδικός	Πρώτες ύλες	Αρχική Ποσότητα (g)	Οργανικοί διαλύτες	Αναλογία	Βάρη οργανικών κλασμάτων (g)
I	HON02	6	EtoAc / DCM	90 : 10	0.0033
II	HON02	6	EtoAc / DCM	80 : 20	0.0070
III	HON02	6	DCM/MeOH	90 : 10	0.0099
IV	HON02	6	EtoAc	100	0.0035
V	HON38	6	EtoAc / DCM	90 : 10	0.0022
VI	HON38	6	EtoAc / DCM	80 : 20	0.0058
VII	HON38	6	DCM/MeOH	90 : 10	0.0032
VIII	HON38	6	EtoAc	100	0.0029

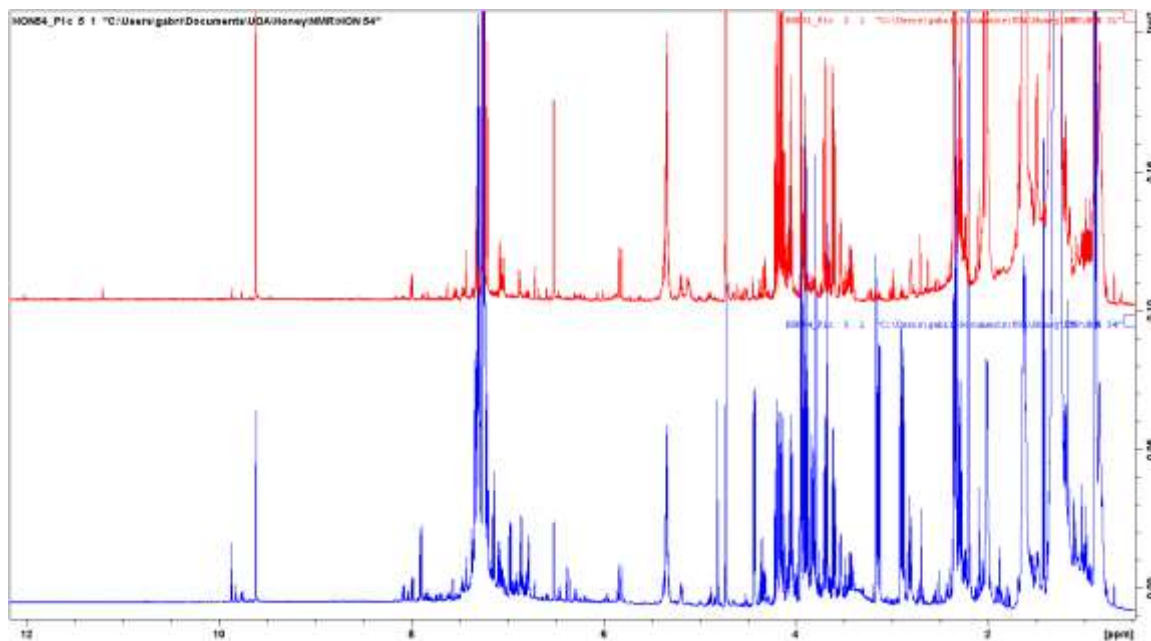


ΕΠ 22. Φάσματα πρωτονίου των οργανικών φάσεων των δειγμάτων (από πάνω προς τα κάτω) VI, III, II και I.

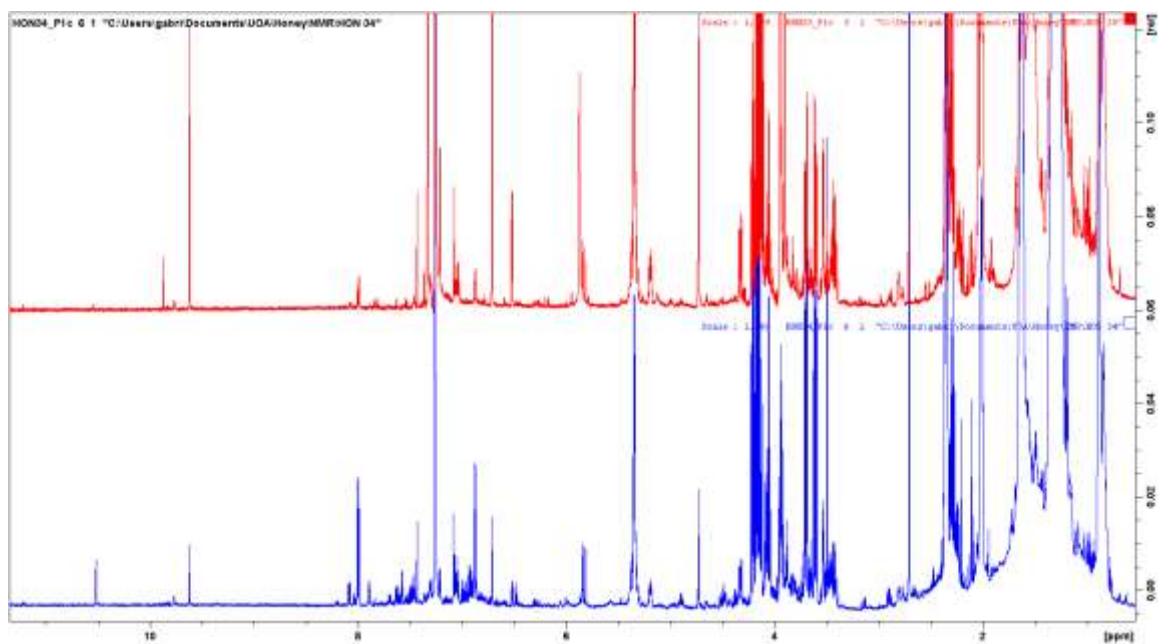


ΕΠ 23. Φάσματα πρωτονίου των οργανικών φάσεων των δειγμάτων (από πάνω προς τα κάτω) VIII, VII, VI και V.

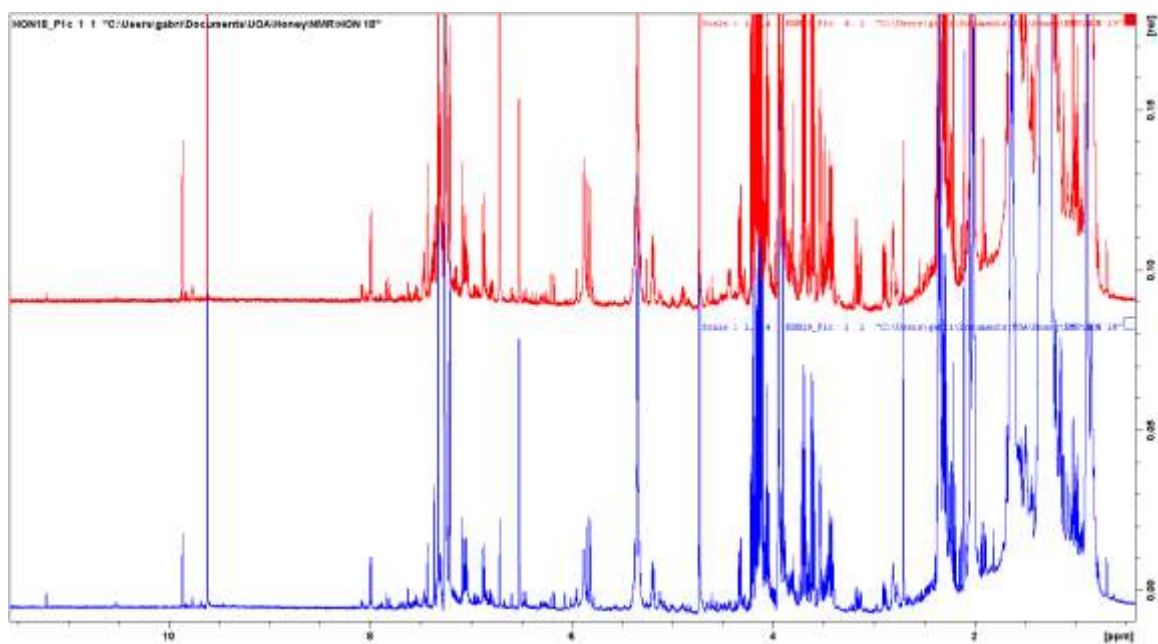
- Οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και διχλωρομεθάνιο (DCM)



ΕΠ 24. Φάσματα πρωτονίου των δειγμάτων από τη Λήμνο και τους Φούρνους.



ΕΠ 25. Φάσματα πρωτονίου των δειγμάτων από τη Λέσβο και Σάμο



ΕΠ 26. Φάσματα πρωτονίου των δειγμάτων από τη Λέσβο (Μυτιλήνη και Ερεσός/Σίγρη)

Δ) Τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης

ΠΠ 26. Βάρη των κλασμάτων

Αριθ.	Δείγμα	Κωδικός NMR	Βάρη (mg)
1	HON01_A	10	2.1
2	HON01_B	20	4.3
3	HON02_A	30	2.9
4	HON02_B	40	2.6
5	HON03_A	50	1.6
6	HON03_B	60	2.5
7	HON04_A	70	7.6
8	HON04_B	80	4.8
9	HON05_A	90	8.5
10	HON05_B	100	5.4
11	HON06_A	110	3.2
12	HON06_B	120	3.1
13	HON07_A	130	3.1
14	HON07_B	140	3.0
15	HON08_A	150	3.1
16	HON08_B	160	2.6
17	HON09_A	170	3.1
18	HON09_B	180	3.8
19	HON10_A	190	2.7
20	HON10_B	200	2.5
21	HON11_A	210	3.5
22	HON11_B	220	3.9
23	HON12_A	230	5.1
24	HON12_B	240	4.2
25	HON13_A	250	2.1
26	HON13_B	260	3.1
27	HON14_A	270	11.6
28	HON14_B	280	12.8
29	HON15_A	290	11.7
30	HON15_B	300	11.3
31	HON16_A	310	13.5
32	HON16_B	320	8.6
33	HON17_A	330	3.8
34	HON17_B	340	4.0
35	HON18_A	1250	4.4
36	HON18_B	1260	6.2
37	HON19_A	350	3.8
38	HON19_B	360	3.5
39	HON20_A	370	1.5
40	HON20_B	380	2.9
41	HON21_A	390	2.9

42	HON21_B	400	3.3
43	HON22_A	410	4.2
44	HON22_B	420	3.2
45	HON23_A	430	2.2
46	HON23_B	440	1.7
47	HON24_A	450	4.0
48	HON24_B	460	3.7
49	HON25_A	470	5.0
50	HON25_B	480	4.0
51	HON26_A	490	3.3
52	HON26_B	500	2.3
53	HON27_A	510	3.5
54	HON27_B	520	3.1
55	HON28_A	530	3.7
56	HON28_B	540	4.5
57	HON29_A	550	4.0
58	HON29_B	560	4.1
59	HON30_A	570	2.7
60	HON30_B	580	3.5
61	HON31_A	590	4.9
62	HON31_B	600	4.3
63	HON32_A	1270	3.3
64	HON32_B	1280	4.7
65	HON33_A	610	5.0
66	HON33_B	620	4.8
67	HON34_A	630	2.5
68	HON34_B	640	3.6
69	HON35_A	650	11.4
70	HON35_B	660	10.9
71	HON36_A	670	4.3
72	HON36_B	680	3.7
73	HON37_A	690	4.9
74	HON37_B	700	4.7
75	HON38_A	710	5.4
76	HON38_B	720	4.6
77	HON39_A	730	4.5
78	HON39_B	740	4.7
79	HON40_A	750	3.9
80	HON40_B	760	3.7
81	HON41_A	770	4.1
82	HON41_B	780	5.1
83	HON42_A	790	3.5
84	HON42_B	800	3.2
85	HON43_A	810	4.3
86	HON43_B	820	4.7
87	HON44_A	830	4.1

88	HON44_B	840	4.2
89	HON45_A	850	5.2
90	HON45_B	860	5.3
91	HON46_A	870	3.1
92	HON46_B	880	2.9
93	HON47_A	890	3.9
94	HON47_B	900	3.6
95	HON48_A	910	5.3
96	HON48_B	920	4.3
97	HON49_A	930	5.0
98	HON49_B	940	3.7
99	HON50_A	950	6.6
100	HON50_B	960	8.9
101	HON51_A	970	5.6
102	HON51_B	980	6.6
103	HON52_A	990	4.0
104	HON52_B	1000	3.5
105	HON53_A	1010	7.0
106	HON53_B	1020	7.0
107	HON54_A	1290	4.6
108	HON54_B	1300	5.2
109	HON55_A	1030	5.8
110	HON55_B	1040	4.6
111	HON56_A	1050	7.8
112	HON56_B	1060	7.9
113	HON57_A	1070	6.4
114	HON57_B	1080	5.9
115	HON58_A	1310	3.7
116	HON58_B	1320	8.5
117	HON59_A	1330	6.4
118	HON59_B	1340	9.0
119	HON60_A	1350	4.1
120	HON60_B	1360	5.2
121	HON61_A	1370	6.1
122	HON61_B	1380	6.5
123	HON62_A	1390	12.4
124	HON62_B	1400	11.5
125	HON63_A	1090	3.7
126	HON63_B	1100	4.1
127	HON64_A	1410	6.2
128	HON64_B	1420	5.9
129	HON65_A	1430	7.2
130	HON65_B	1440	10.1
131	HON66_A	1450	8.6
132	HON66_B	1460	10.1
133	HON67_A	1470	4.3

134	HON67_B	1480	4.6
135	HON68_A	1110	3.4
136	HON68_B	1120	4.5
137	HON69_A	1490	4.1
138	HON69_B	1500	4.6
139	HON70_A	1510	5.0
140	HON70_B	1520	6.3
141	HON71_A	1130	4.0
142	HON71_B	1140	4.0
143	HON72_A	1150	4.1
144	HON72_B	1160	4.2
145	HON73_A	1170	4.0
146	HON73_B	1180	4.7
147	HON74_A	1190	5.0
148	HON74_B	1200	5.6
149	HON75_A	1210	4.3
150	HON75_B	1220	4.9
151	HON76_A	1230	4.1
152	HON76_B	1240	4.5

Ε) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

ΠΠ 27. VIP λίστα που προέκυψε από το διάγραμμα συντεταγμένων - O2PLS-DA (διάκριση μεταξύ της νήσου Λήμνου και των Φούρνων). Μεταβλητές σε φθίνουσα σειρά σημασίας με τις αντίστοιχες ταυτοποιημένες ενώσεις.

No	Var ID	VIP value	Compound
1	3.1	3.07773	n.i.
2	3.06	2.83077	n.i.
3	4.38	2.75193	n.i.
4	2.82	2.72629	n.i.
5	6.9	2.49387	PHBA
6	6.74	2.38295	n.i.
7	3.14	2.2512	n.i.
8	2.9	2.24014	n.i.
9	2.14	2.05679	n.i.
10	6.78	1.93164	n.i.
11	7.06	1.9309	n.i.
12	4.3	1.93016	n.i.
13	3.7	1.86386	n.i.
14	2.66	1.78402	n.i.
15	3.74	1.76536	n.i.
16	2.94	1.74619	n.i.
17	6.22	1.72208	n.i.

18	6.82	1.66151	n.i.
19	2.62	1.64693	n.i.
20	3.82	1.62858	MS
21	3.78	1.60939	n.i.
22	3.5	1.51295	n.i.
23	7.5	1.47836	n.i.
24	7.02	1.47679	n.i.
25	5.06	1.40828	n.i.
26	4.94	1.39074	n.i.
27	6.86	1.38526	n.i.
28	7.14	1.36543	5-HMF
29	4.82	1.28101	n.i.
30	3.62	1.27376	n.i.
31	2.7	1.22817	n.i.
32	7.46	1.22057	n.i.
33	3.86	1.21912	MS
34	4.86	1.08412	n.i.
35	5.74	1.06946	n.i.
36	5.3	1.06588	n.i.
37	9.54	1.04628	5-HMF
38	2.74	1.02186	n.i.

ΠΠ 28. VIP λίστα που προέκυψε από το διάγραμμα συντεταγμένων - O2PLS-DA (διάκριση μεταξύ θυμαριού και μέλι φυτού). Μεταβλητές σε φθίνουσα σειρά σημασίας με τις αντίστοιχες ταυτοποιημένες ενώσεις.

No	Var ID	VIP value	Compound
1	2.82	2.94822	n.i.
2	3.1	2.58721	n.i.
3	4.38	2.57803	n.i.
4	7.3	2.39516	n.i.
5	7.14	2.38326	5-HMF
6	2.14	2.35767	n.i.
7	7.06	2.26625	n.i.
8	3.7	2.25596	n.i.
9	3.06	2.2401	n.i.
10	3.5	2.18319	n.i.
11	7.02	2.12295	n.i.
12	3.74	2.08134	n.i.
13	3.78	2.05797	n.i.
14	6.78	1.99097	n.i.
15	6.74	1.95264	n.i.
16	6.9	1.95021	n.i.
17	6.46	1.82564	5-HMF
18	4.66	1.79267	5-HMF
19	4.3	1.77666	n.i.

20	2.66	1.71474	n.i.
21	3.62	1.65982	n.i.
22	7.46	1.63423	n.i.
23	2.74	1.62619	n.i.
24	3.82	1.60411	MS
25	6.82	1.58705	PHBA
26	3.86	1.51561	MS
27	2.1	1.50244	n.i.
28	1.98	1.40016	n.i.
29	6.98	1.38669	n.i.
30	2.7	1.37042	n.i.
31	3.9	1.32308	n.i.
32	3.34	1.29021	n.i.
33	2.06	1.26698	n.i.
34	3.54	1.26531	n.i.
35	6.86	1.2468	n.i.
36	9.54	1.13971	5-HMF
37	4.14	1.11607	n.i.
38	3.42	1.071	n.i.
39	1.86	1.06431	n.i.
40	5.78	1.05615	n.i.
41	7.18	1.04145	n.i.
42	1.82	1.04067	n.i.
43	5.3	1.02979	n.i.