



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

Διπλωματική εργασία

Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για
την ταυτοποίηση της βοτανικής
προέλευσης μελιού

Σερλεμές Μάρκος

Επιβλέπων Καθηγητής
Τσόπελας Φώτιος

Αθήνα 2023

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Η υλοποίηση των πειραμάτων έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας που ανήκει στο Τομέα Ι Χημικών Επιστημών της σχολής. Ως σκοπό είχε την ανάπτυξη μιας ηλεκτροχημικής μεθόδου και συγκεκριμένα βολταμετρικής τεχνικής, για την ταυτοποίηση και ανίχνευση της νοθείας ενός επιλεγμένου τρόφιμου. Η ανάλυση έγινε στο μέλι, για τον διαχωρισμό και ταυτοποίηση τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών του, μελετώντας την δυνατότητα εύρεσης ενός μοναδικού προφίλ ταυτοποίησης για την κάθε μία και πραγματοποιώντας πολλαπλές διαφορετικές μεθοδολογίες και προκατεργασίες των δειγμάτων. Η ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα διπλωματική αυτή εργασία, ανετέθη και επιβλέφτηκε από τον κ. Τσόπελα Φώτιο, επίκουρο καθηγητή της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου του Τομέα Χημικών Επιστημών.

Η συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί την ολοκλήρωση των προπτυχιακών σπουδών μου και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους ανθρώπους που με υποστήριξαν στον μεγάλο δρόμο για την υλοποίηση και εκπόνηση της. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Τσόπελα Φώτιο για την συνεχή και ουσιαστική υποστήριξη του αλλά και τη γενικότερη συμβολή του στην διεύρυνση των γνώσεων μου, καθώς και την Δρ. Χημικό Μηχανικό του ΕΜΠ Τσακανίκα Λαμπρινή-Αρετή για την ουσιαστική υποστήριξη και συνεισφορά της στο εργαστήριο που έλαβαν χώρα τα πειράματα. Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στα κοντινά μου άτομα και στην οικογένεια μου, που ήταν το στήριγμα μου σε όλα αυτά τα χρόνια καθώς και μεγάλη κινητήρια δύναμη για την εκπλήρωση των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	1
Ευρετήριο Εικόνων	6
Ευρετήριο Πινάκων	10
Περίληψη	11
Abstract	13
Graphical Abstract	13
Κεφάλαιο 1 - «Το Μέλι»	
1.1 Το Μέλι	177
1.1.1 Το «νέκταρ των θεών»	17
1.1.2 Η Ιστορία και εξέλιξη του μελιού	18
1.1.3 Παραγωγή	19
1.1.4 Παγκόσμια αγορά και κατανάλωση	20
1.1.5 Η μελισσοκομία στην Ελλάδα	22
1.2 Δημιουργία και σύσταση μελιού	23
1.2.1 Πως δημιουργείται το μέλι	24
1.2.2 Σύσταση Μελιού	24
1.2.3 Υπόλοιπα παράγωγα κυψέλης	26
1.3 Κατηγορίες και είδη μελιού	28
1.3.1 Κατηγορίες	28
1.3.2 Βοτανικά είδη και ονομασίες μελιών	29
1.4 Ιδιότητες μελιού	32
1.4.1 Ευεργετικές και βιολογικές ιδιότητες	32
1.4.2 Φαρμακευτικές ιδιότητες	33
1.4.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες	34
Κεφάλαιο 2 - «Νοθεία»	
2.1 Νοθεία	36
2.1.1 Λόγοι νοθείας	36
2.1.2 Νοθεία σε διεθνή επίπεδο	37
2.1.3 Κίνδυνοι και επιπτώσεις	38
2.2 Τύποι νοθείας	40
2.2.1 Άμεση νόθευση	40

2.2.2 Έμμεση νόθευση	41
2.2.3 Νόθευση με ανάμειξη	41
2.3 Αναγνώριση νοθευμένου μελιού	42
2.4 Έλεγχοι	43
2.4.1 Έλεγχος νοθείας σε Διεθνή επίπεδο	43
2.4.2 Έλεγχοι της ΕΕ.....	45
2.4.3 Εθνικοί έλεγχοι	46
Κεφάλαιο 3 - «Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας»	
3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας.....	47
3.2 Κλασσικές μέθοδοι.....	48
3.2.1 Μελισσοπαλυνολογική μέθοδος	48
3.2.2 Εκτίμηση φυσικοχημικών παραμέτρων	49
3.3 Συνήθεις αναλυτικές τεχνικές	49
3.3.1 Χρωματογραφικές τεχνικές.....	49
3.3.1.1 Αέρια χρωματογραφία (GC)	50
3.3.1.2 Υγρή χρωματογραφία (LC).....	50
3.3.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδα (TLC).....	51
3.3.1.4 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής υψηλής απόδοσης συζευγμένης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (HPAEC-PAD)	52
3.3.2 Φασματομετρικές τεχνικές.....	52
3.3.2.1 Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	53
3.3.2.2 Φασματομετρία Raman	53
3.3.2.3 Φασματομετρία υπερύθρου (IR).....	54
3.3.2.4 Φασματομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)	55
3.3.3 Τεχνικές φασματομετρίας μαζών.....	55
3.3.3.1 Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)	55
3.3.3.2 Φασματομετρία μαζών αναλογίας ισοτόπων άνθρακα (IR-MS).....	56
3.4 Άλλες μέθοδοι	56
3.5 Σύνθετες – συνδυαστικές τεχνικές.....	59
Κεφάλαιο 4 - «Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές και χημειομετρικές αναλύσεις»	
4.1 Ηλεκτροανάλυση.....	62
4.2 «Ηλεκτρονική γλώσσα»	63

4.2.1 Αρχή λειτουργίας	63
4.2.2 Διάταξη μεθόδου	64
4.2.3 Κύριες ηλεκτροχημικές τεχνικές.....	65
4.2.3.1 Ποτενσιομετρική ηλεκτρονική γλώσσα (PE tongue).....	66
4.2.3.2 Βολταμμετρική ηλεκτρονική γλώσσα (VE tongue)	67
4.2.4 Προβλήματα και δυσκολίες των ηλεκτροχημικών μεθόδων / θετικά και αρνητικά ηλεκτροχημικών μεθόδων.....	70
4.3 Χημειομετρία	72
4.3.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis PCA).....	75
4.3.2 Ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression PLSR).....	77
4.3.3 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial least squares-discriminant analysis PLS-DA).....	82
4.3.4 Μοντελοποίηση κλάσης (Class modeling).....	86
Κεφάλαιο 5 - «Πειραματική διαδικασία»	
5.1 Σκοπός.....	90
5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός και δείγματα μελιού.....	90
5.3 Πειραματικές μέθοδοι.....	97
5.3.1 Μεθοδολογία Α – απλή διαλυτοποίηση/εκχύλιση	97
5.3.2 Μεθοδολογία Β – εκχύλιση στερεάς φάση (SPE)	99
5.3.3 Μεθοδολογία Γ – Διπλή εκχύλιση/διαλυτοποίηση με ξήρανση	102
Κεφάλαιο 6 - «Αποτελέσματα»	
6.1 Ανάλυση δεδομένων με χημειομετρικές τεχνικές και αποτελέσματα	105
6.1.1 Ηλεκτρόδιο Χρυσού, κυκλική βολταμμετρία	105
6.1.1.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA.....	111
6.1.1.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA	112
6.1.1.3 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class).....	116
6.1.2 Ηλεκτρόδιο Χρυσού, Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία.....	118
6.1.2.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA.....	122
6.1.2.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA	124
6.1.2.3 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class).....	125
6.1.3 Ηλεκτρόδιο Λευκόχρυσου, Κυκλική Βολταμμετρία	127
6.1.3.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA.....	131
6.1.3.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA	133

6.1.3.3	Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class).....	137
6.1.4	Ηλεκτρόδιο Λευκόχρυσου, Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία.....	138
6.1.4.1	Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA.....	142
6.1.4.2	Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA.....	143
6.1.4.3	Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class).....	144
Κεφάλαιο 7 - «Συμπεράσματα και σχολιασμός»		
7.1	Συμπεράσματα.....	146
Βιβλιογραφία		151

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Οι 10 μεγαλύτερες χώρες παγκοσμίως με την μεγαλύτερη παραγωγή μελιού από το έτος 2006 μέχρι και το 2020 ^[5]	20
Εικόνα 2: Αντικειμενική αξία της αγοράς του μελιού στην Αμερική και προβλεπόμενη αυξητική πορεία από το 2020 μέχρι το 2030 ^[8]	21
Εικόνα 3: Διάγραμμα ροής των διαφορετικών τρόπων νόθευσης.....	40
Εικόνα 4: Διάταξη μεθόδων ηλεκτρονικής γλώσσας ^[3]	65
Εικόνα 5: Διάταξη ποτενσιομετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας ^[33]	67
Εικόνα 6: Διάταξη βολταμμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας ^[33]	70
Εικόνα 7: Αποτύπωση πολυμεταβλητού χώρου με 3 μεταβλητές και ένα παράθυρο (επίπεδο), που μας επιτρέπει να δούμε τις τάσεις, διαχωρισμένες ομάδες και έκτροπες τιμές ^[48]	74
Εικόνα 8: Χαρακτηριστικό διάγραμμα των συντεταγμένων (score plot).....	76
Εικόνα 9: Γεωμετρική απεικόνιση της τεχνικής PLSR ^[54]	80
Εικόνα 10: Σύγκριση αποτύπωσης διαγραμμάτων R ² και Q ² ^[52]	81
Εικόνα 11: Ένα γραμμικός διαχωριστής δύο τάξεων για δύο ομάδες που χαρακτηρίζονται από δύο μεταβλητές	84
Εικόνα 12: Γεωμετρικός χώρος του PLS-DA στην περίπτωση 3 κλάσεων ^[58]	85
Εικόνα 13: Απεικόνιση γεωμετρικού χώρου δειγμάτων σε τεχνική διακριτικής ανάλυσης και τεχνική μοντελοποίησης τάξεως. / Σετ 2 μεταβλητών: στοχευμένα δείγματα (μπλε κύκλοι), μη στοχευμένα δείγματα (κόκκινοι κύκλοι) / Μαύρες γραμμές: οριοθέτες (διακριτική προσέγγιση) / Ελλείψεις: χώρος κλάσης της στοχευμένης κατηγορίας κλάσης (μοντελοποίηση τάξεως) ^[59]	88
Εικόνα 14: Το σύστημα βολταμμετρικών αναλύσεων Computrace 797 VA.....	91
Εικόνα 15: Ηλεκτρόδια εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν	93
Εικόνα 16: Χάρτης τοποθεσιών των μελιού που συλλέχθηκαν ανά βοτανική προέλευση	96
Εικόνα 17: Φωτογραφία μελιών που συλλέχθηκαν.....	96
Εικόνα 18: Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας A – απλή διαλυτοποίηση/εκχύλιση.....	98
Εικόνα 19: Φωτογραφική απεικόνιση βημάτων μεθοδολογίας A	98
Εικόνα 20: Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας B – εκχύλιση στερεάς φάσης.....	100
Εικόνα 21: Φωτογραφική απεικόνιση βημάτων μεθοδολογίας B	101
Εικόνα 22: Φίλτρα εκχύλισης στερεάς φάσης.....	101

Εικόνα 23: Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας C – Διπλή εκχύλιση/διαλυτοποίηση με ξήρανση	103
Εικόνα 24: Φωτογραφική απεικόνιση βημάτων μεθοδολογίας C	104
Εικόνα 25: Κυκλικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	106
Εικόνα 26: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	107
Εικόνα 27: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	108
Εικόνα 28: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	109
Εικόνα 29: Κυκλικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού.....	110
Εικόνα 30: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και επισήμανση των έκτροπων τιμών	111
Εικόνα 31: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων.....	112
Εικόνα 32: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού.....	114
Εικόνα 33: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και διαχωρισμό των κλάσεων	115
Εικόνα 34: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων.....	115
Εικόνα 35: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου Class Modeling για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού.....	117
Εικόνα 36: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού.....	119
Εικόνα 37: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού.....	120

Εικόνα 38: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	120
Εικόνα 39: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	121
Εικόνα 40: Διαφορικό παλμικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού.....	122
Εικόνα 41: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και επισήμανση των έκτροπων τιμών	123
Εικόνα 42: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων	124
Εικόνα 43: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	125
Εικόνα 44: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου Class Modeling για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού	126
Εικόνα 45: Κυκλικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	127
Εικόνα 46: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	128
Εικόνα 47: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	129
Εικόνα 48: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	130
Εικόνα 49: Κυκλικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	131
Εικόνα 50: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και επισήμανση των έκτροπων τιμών	132
Εικόνα 51: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων	133
Εικόνα 52: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και διαχωρισμό των κλάσεων	134

Εικόνα 53: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων	135
Εικόνα 54: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και διαχωρισμό των κλάσεων	136
Εικόνα 55: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων	136
Εικόνα 56: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου Class Modeling για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	137
Εικόνα 57: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	139
Εικόνα 58: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	140
Εικόνα 59: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	140
Εικόνα 60: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	141
Εικόνα 61: Διαφορικό παλμικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	141
Εικόνα 62: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και επισήμανση των έκτροπων τιμών.....	142
Εικόνα 63: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων	143
Εικόνα 64: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων	144
Εικόνα 65: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου Class Modeling για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου	145

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Τα είδη μελιών που συναντώνται στην Ελλάδα	30
Πίνακας 2: Όρια φυσικοχημικών ιδιοτήτων μελιού σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία	35
Πίνακας 3: Πίνακας μεθόδων για την βοτανική ταυτοποίηση του μελιού	59
Πίνακας 4: Η μορφή δεδομένων για μια διακριτική ανάλυση με <i>n</i> ομάδες με πιθανώς διαφορετικά μεγέθη και <i>p</i> μεταβλητές που μετρούνται σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση	83
Πίνακας 5: Τεχνικά χαρακτηριστικά του συστήματος βολταμμετρικών αναλύσεων Computrace 797 VA	92
Πίνακας 6: Μέλια θυμαριού που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν	94
Πίνακας 7: Μέλια ερείκης που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν.....	94
Πίνακας 8: Μέλια πορτοκαλιάς που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν	95
Πίνακας 9: Μέλια πεύκου που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν	95
Πίνακας 10: Συνοπτικός πίνακας με τις παραμέτρους που επέφεραν τα βέλτιστα αποτελέσματα.....	148

Περίληψη

Το μέλι είναι ένα θρεπτικό και ευεργετικό τρόφιμο, γνωστό από τα αρχαία χρόνια, που μπορεί να καταναλωθεί χωρίς καμία εκτεταμένη επεξεργασία και συναντάται μέχρι και σήμερα στα περισσότερα νοικοκυριά και όχι μόνο. Ακριβώς επειδή έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει μια πληθώρα ευεργετικών, διατροφικών αλλά και φαρμακευτικών ιδιοτήτων, είναι ένα προϊόν με μεγάλη ζήτηση και αξία στο εμπόριο, με αποτέλεσμα για αυτό το λόγο την όλο και μεγαλύτερη του στοχοποίηση για νοθεία. Οι τρόποι νόθευσης του μελιού ποικίλουν, με την πιο συνηθισμένη μορφή να συναντάται με την απλή προσθήκη σακχάρων. Επειδή το φαινόμενο αυτό συναντάται από τα παλιά χρόνια μέχρι και σήμερα, έχει καταστεί αναγκαία η ανάπτυξη ολοένα και περισσότερων αναλυτικών τεχνικών για τον εντοπισμό της νοθείας, ξεκινώντας πρωταρχικά με την μελισσοπαλυνολογική μέθοδο και εξελίσσοντας στις σημερινές σύγχρονες χρωματογραφικές τεχνικές. Τα τελευταία χρόνια, στο πλαίσιο της εξέλιξης και ανάπτυξης νέων και απλούστερων αναλυτικών τεχνικών, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στις περιβαλλοντικές φιλικές ηλεκτροχημικές μεθόδους και συγκεκριμένα στις ηλεκτρονικές γλώσσες.

Η βολταμμετρία αποτελεί μία από αυτές, η οποία σε συνδυασμό με χημειομετρικές τεχνικές για την ανάλυση των δεδομένων, αποτελεί το θέμα της έρευνας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Συλλέχθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων μελιού από τέσσερις διαφορετικές βοτανικές κατηγορίες όπως μέλι από θυμάρι, ερείκη, πορτοκαλιά και πεύκο. Μέσω τεχνικών κυκλικής και διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας, μελετήθηκε η δυνατότητα εύρεσης ενός μοναδικού προφίλ ταυτοποίησης των βοτανικών κατηγοριών προκειμένου να τίθεται εφικτή η ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός μεταξύ τους. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές πειραματικές μεθοδολογίες, όπου στην κάθε μία ξεχωριστά δοκιμάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί αντιδραστηρίων και ηλεκτροδίων. Η μία από αυτές, η μέθοδος της διπλής εκχύλισης και διαλυτοποίησης με ζήρανση, με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού και λευκόχρυσου, ανέδειξε τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στα βολταμμογραφήματα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Εν συνεχεία, έγινε εξαγωγή των δεδομένων των βολταμμογραφημάτων για κάθε δείγμα, τα οποία υποβλήθηκαν σε χημειομετρική ανάλυση με χρήση της μεθόδου της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), της διακριτικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares – Discriminant

Analysis, PLS-DA) και της ανάλυσης μοντελοποίησης μιας κλάσης (Class Modeling), με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος SIMCA.

Τα αποτελέσματα παρουσίασαν ότι η βέλτιστη ταξινόμηση και ταυτοποίηση των βοτανικών κατηγοριών του μελιού επιτεύχθηκε με την εφαρμογή κυκλικής βολταμμετρίας χρησιμοποιώντας το ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου. Από τις χημειομετρικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων, η PCA και PLS-DA δεν κατάφεραν να επιτύχουν σαφή διαχωρισμό καθώς τα σημεία που αποτυπώθηκαν στο διάγραμμα συντεταγμένων (score plot) εμφάνισαν μεγάλη διασπορά καθιστώντας δύσκολο τον διαχωρισμό μεταξύ των δειγμάτων. Αντιθέτως, η ανάλυση μοντελοποίησης μιας κλάσεως (Class Modeling), επέφερε σε κάθε δοκιμασία κοινά θετικά αποτελέσματα, αποδεικνύοντας εφικτή την ταξινόμηση μόνο του θυμαρίσιου μελιού, παρέχοντας μια ευαισθησία >90% και ειδικότητα >93%.

Abstract

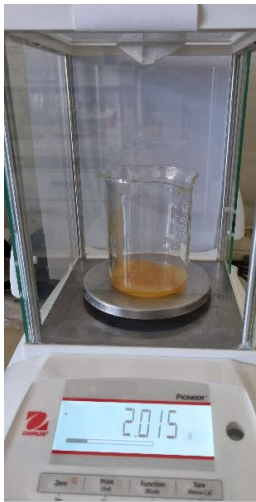
Honey is a nutritious and beneficial food known since the ancient times, which can be consumed without any extensive processing and is still found in most households nowadays. Because it has been proven to provide multiple beneficial, nutritional, and medicinal properties, it is a product of great demand and value in the market, but as a result is increasingly targeted for adulteration. There are a variety of ways in which honey can be adulterated, with the most common of them being the simple addition of sugars. Because this phenomenon has been encountered since ancient times till today, it has become a necessity to develop further analytical techniques to detect adulteration, starting primarily with the melissopalynology analysis and evolving in today's modern chromatographic techniques. In recent years, in the context of the evolution and development of new and simpler analytical techniques, special attention has been paid to the more environmental friendly electrochemical methods and specifically to electronic tongues.

One of them is voltammetry, which in combination with chemometric techniques for data analysis, is the subject of the research of this diploma thesis. A large number of honey samples were collected from four different botanical categories such as thyme, heather, orange and pine honey. Through cyclic and differential pulse voltammetry techniques, the possibility of finding a unique identification profile of the botanical categories was studied in order to make their identification and separation possible. The samples were subjected to three different experimental methodologies, where in each one different combinations of reagents and electrodes were tested. One of them, the method of double extraction and solubilization with drying, using gold and platinum electrodes, showed the greatest differences in the voltammograms compared to the rest of the methods applied. Subsequently, the data of the voltammograms were extracted for each sample, which after were subjected to chemometric analysis using the method of Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares – Discriminant Analysis (PLS-DA) and the Class Modeling, with the help of the SIMCA computer program.

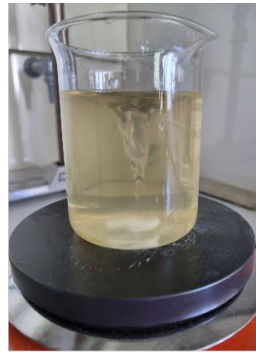
The results showed that the optimal classification and identification of the botanical categories of honey was achieved by applying cyclic voltammetry using the platinum electrode. Of the chemometric techniques used to analyze the data, PCA and PLS-DA failed to achieve a clear separation as the points captured in the score

plot showed a large dispersion making it difficult to distinguish between the samples. On the contrary, the analysis of Class Modeling, brought in each test common positive results, proving possible the classification of only thyme honey, providing a sensitivity >90% and a specificity >93%.

Graphical Abstract



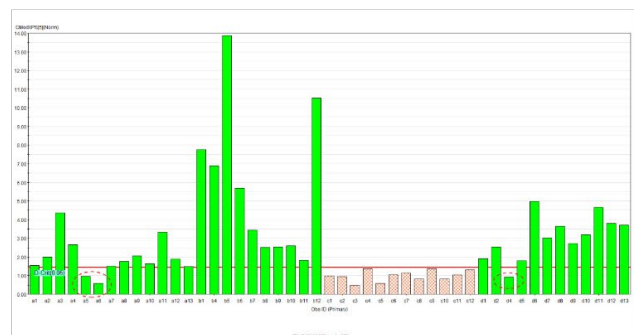
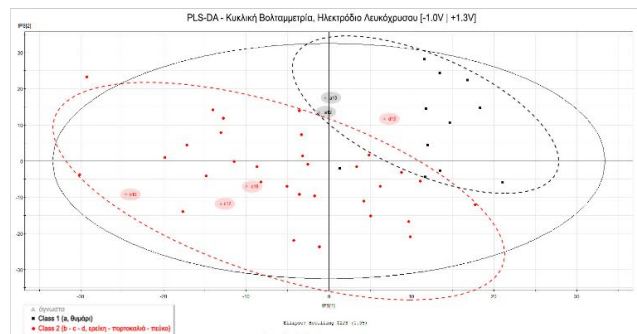
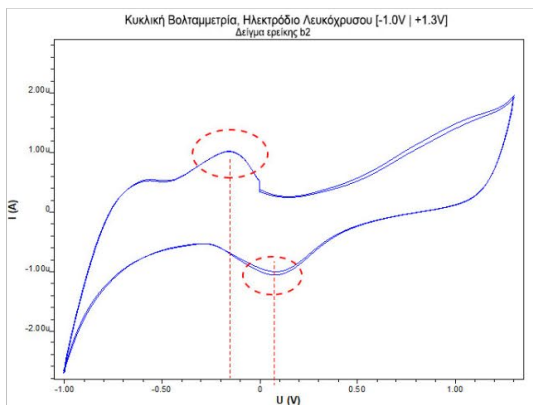
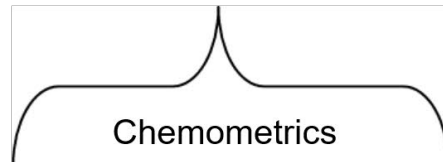
Dissolution



Drying



Cyclic Voltammetry



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Το Μέλι

Το παγκοσμίως γνωστό και διαδεδομένο σε κάθε νοικοκυριό φυσικό προϊόν, το μέλι, είναι ένα παχύρρευστο και αρωματικό υγρό με χρυσαφί χρώμα που αξιοποιείται από τα αρχαία ελληνικά χρόνια. Είναι προϊόν παραγωγής των μελισσών μέσω της συλλογής του νέκταρ ή του μελιτώματος των μυριάδων ανθοφόρων φυτών, το οποίο από τα αρχαία χρόνια μέχρι και σήμερα, η χρήση του ήταν και παραμένει να είναι μοναδική και δημοφιλής τόσο για τις γλυκαντικές του ιδιότητες όσο και για τις ευεργετικές και θρεπτικές του αξίες που προσελκύει ανελλιπώς χιλιάδες καταναλωτές. Για το λόγο αυτό παραμένει διαχρονικά ως ένα ανεκτίμητο προϊόν νοικοκυριού και όχι μόνο, με όλο και περισσότερους κλάδους να ασχολούνται με τον τομέα της μελισσοκομίας σε διεθνή επίπεδο. ^[1]

1.1.1. Το «νέκταρ των θεών»

Από τα αρχαία χρόνια χρονολογείται η ανακάλυψη του μελιού, όπου αντιμετωπίζονταν σαν φυσικό και υγιεινό προϊόν ως απαραίτητο στοιχείο της διατροφής. Μάλιστα χρονολογείται επί εποχή του Δωδεκάθεου, καθώς οι αρχαίοι Έλληνες είχαν δώσει μυθικές διαστάσεις στο μέλι, το οποίο συνέδεαν με τους θεούς ως συστατικό της αμβροσίας και το υδρόμελο ως το νέκταρ. ^{[2], [3]}

Κατά την μυθολογία, η ύπαρξη εντατικής μελισσοκομίας στην αρχαιότητα μαρτυρείται από το μύθο του Αρισταίου. Ο Αρισταίος εμφανίζεται ως το αρχαιότερο πρόσωπο στον χώρο της μελισσοκομίας, ο οποίος αποτέλεσε τον καρπό της ένωσης του Απόλλωνα με την νύμφη Κυρήνη. Αναφέρεται ότι όταν γεννήθηκε παραδόθηκε στην Γαία και στις Ώρες από τον θεό Ερμή, οι οποίες τον ανέθρεψαν στάζοντας τα χείλη του νέκταρ και αμβροσία (μέλι) για να γίνει αθάνατος. ^[2]

Αναφορές γίνονται και στην Οδύσσεια, όπου αναφέρεται το «Μελίκρατον», που ήταν μέλι αναμιγμένο με γάλα, το οποίο έπιναν ως εκλεκτό ποτό. Εκτός όμως από τον Όμηρο, παρουσιάζεται και σε θεατρικά και ποιητικά έργα και άλλων μεγάλων ιστορικών ονομάτων, όπως στον Ησίοδο, Πίνδαρο, Καλλίμαχο, Ευριπίδη, Αθηναίο, Ηρόδοτο και άλλους ποιητές, ρήτορες, ιστορικούς αλλά και πιο σύγχρονους λογοτέχνες από το Βυζάντιο και ύστερα. ^[3]

Προχωρώντας προς τους ιστορικούς χρόνους, η χρήση του μελιού εμφανίζεται επίσης από πολύ νωρίς για ιατρική χρήση. Σε πολλά συγγράμματα γίνονται αναφορές στις ευεργετικές ιδιότητες του μελιού. Ο Ιπποκράτης έκανε χρήση παρασκευασμάτων με μέλι, όπως το μελίκτριτον που ήταν μέλι με νερό ή το οξύμελι που ήταν μέλι με ξύδι, για την ανακούφιση των ασθενών με οξέα νοσήματα. Ο Πυθαγόρας από την άλλη, διαπίστωσε ότι είχε ευεργετικές ιδιότητες για την καταπολέμηση της κόπωσης καθώς ύστερα από έντονη πνευματική ή χειρωνακτική εργασία, η κατανάλωση λίγου μελιού μαζί με γάλα έδινε στον ταλαιπωρημένο οργανισμό νέες δυνάμεις.^[2] Ακόμη, στους ιστορικούς χρόνους συναντούμε συγγράμματα του Δημόκριτου και Αριστοτέλη, που αναφέρονται στις ευεργετικές ιδιότητες του μελιού για την παροχή ευεξίας και μακροζωίας.^[4]

1.1.2. Η Ιστορία και εξέλιξη του μελιού

Η εμφάνιση του μελιού, πέρα από την μυθολογία και την αρχαία Ελλάδα, παρατηρείται και στον Αιγυπτιακό πολιτισμό. Μάλιστα, οι μελετητές αναφέρουν ότι το μέλι και η τέχνη της μελισσοκομίας ήλθαν στην Ελλάδα από την Αρχαία Αίγυπτο.^[3] Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι το θεωρούσαν πολύτιμο και προσέφεραν στους θεούς κηρήθρες με μέλι για να τους δείξουν την αφοσίωση τους, όπως για παράδειγμα 15 τόνοι μελιού προσφέρθηκαν στον θεό του Νείλου από τον Ραμσή Β'. Από τις εκσκαφές, ανακαλύφθηκαν δοχεία με μέλι τα οποία ήταν θαμμένα μαζί με τους νεκρούς ως τροφή για την μετά θάνατον ζωή, καθώς και ποσότητες μελιού σε δοχείο βρέθηκαν και στον τάφο του Τουταγχαμών.^[2] Τέλος, γίνονται αναφορές για την χρήση του μελιού στην αρχαία Αίγυπτο τόσο για τα καλλυντικά της Κλεοπάτρας, όσο και πάλι για ιατρικούς σκοπούς, όπου πραγματοποιούνταν η χρήση του μαζί με αλοιφή για την χειρουργική πληγή της περιτομής, στοιχείο που αποκαλύπτει ότι γνώριζαν για τη δράση του κατά των μολύνσεων.^[4]

Μέχρι τα μέσα του 18^{ου} αιώνα, ήταν η μοναδική γλυκαντική ουσία την οποία η ανθρωπότητα είχε στην διάθεση του. Ήταν τροφή κυρίως των πλουσίων και βασιλιάδων, σε όλη την Ευρώπη, ενώ στον λαό δινόταν ο βασιλικός πολτός, ο οποίος θεωρούταν κατώτερο προϊόν καθότι δεν ήξεραν καμία από τις ιδιότητες του έως τότε. Αυτός ήταν και ο λόγος που οι επιστήμονες αποδίδουν την μακροζωία κάποιων λαών

των περασμένων αιώνων, αφού ο βασιλικός πολτός έχει αποδειχτεί ακόμη πιο ευεργετικός και θρεπτικός από το απλό μέλι. [2] Όμως, από τον 16^ο αιώνα, παράλληλα με το μέλι, εισήχθη για πρώτη φορά η ζάχαρη στην Ευρώπη, η οποία επικράτησε από τα τέλη του 18^{ου} αιώνα ως ένα νέο προϊόν με μεγάλες δυνατότητες παραγωγής και φθηνό κόστος. Το αποτέλεσμα αυτού ήταν να ελαχιστοποιηθεί η κατανάλωση του μελιού και να παραμείνει τροφή εκλεκτή για λίγους που γνώριζαν και απολάμβαναν τις ιδιότητες του. [4]

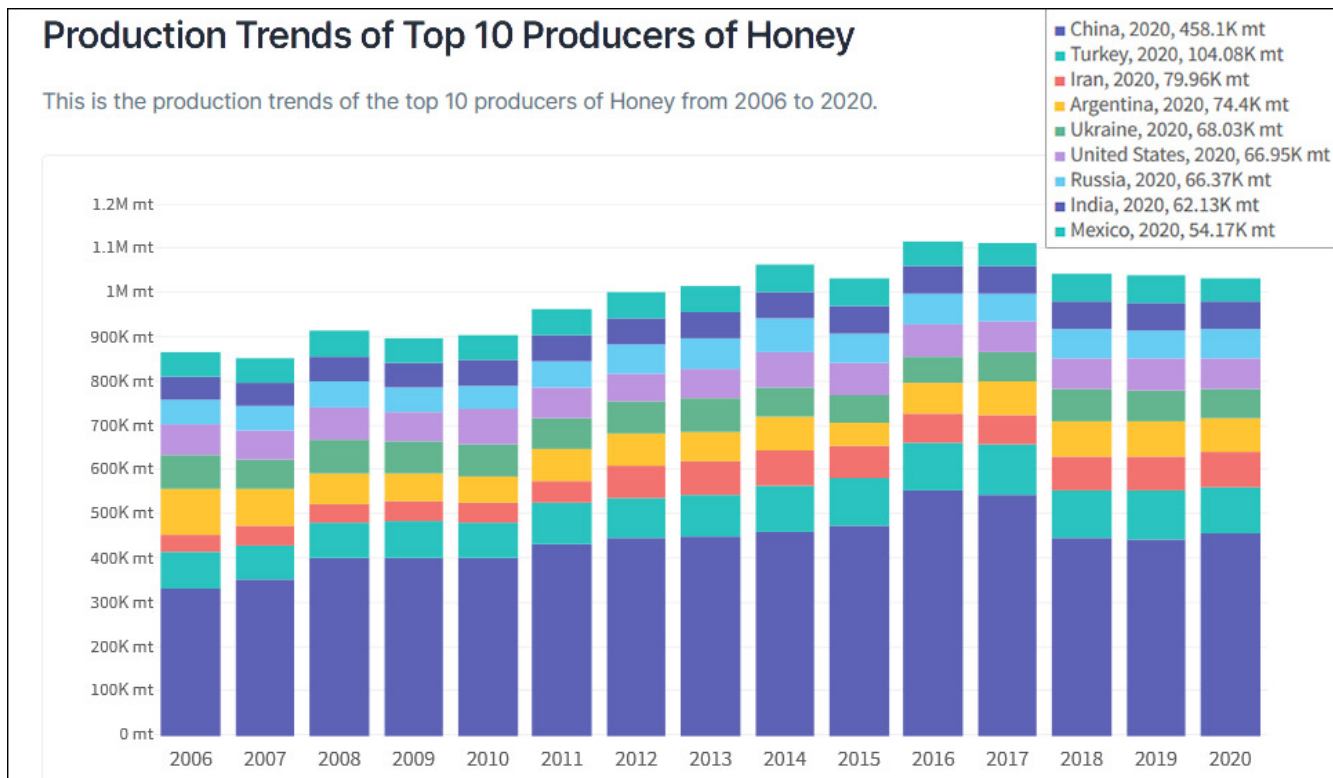
Στις αρχές του αιώνα μας όμως, ο κόσμος στράφηκε πάλι στο μέλι διότι η παραγωγή του αυξήθηκε, έγινε πιο αποδοτική με τα σύγχρονα πρότυπα των ευρωπαϊκών κυψελών και το μέλι κατέστη πιο προσιτό στον λαό, ενώ παράλληλα όλο και περισσότερες νέες επιστημονικές έρευνες επιβεβαιώνουν τις βιολογικές ιδιότητες του. Έτσι, σήμερα το μέλι κερδίζει συνεχώς νέους καταναλωτές και πλέον αποτελεί ένα σύνηθες προϊόν νοικοκυριού. [4]

1.1.3. Παραγωγή

Το μέλι είναι ένα προϊόν, το οποίο παράγεται και παράλληλα εξάγεται σε πολλές χώρες σε όλη την υφήλιο, με τεράστια και αυξανόμενη ζήτηση κατά το πέρασμα των χρόνων. Η παγκόσμια παραγωγή του μελιού, αυξήθηκε από τους 771 χιλιάδες τόνους το 1971 στους 1.77 εκατομμύρια τόνους το 2020, με ένα μέσο ετήσιο αυξανόμενο ρυθμό της τάξεως του 1.79%. [5] Τη χρονολογία αυτή, η παγκόσμια αγορά μελιού αποτιμήθηκε περίπου στα 8 δισεκατομμύρια δολάρια. Όμως, το 2017 ήταν η χρονιά που παρατηρήθηκε το σημείο καμπής της σταθερά ανοδικής τάσης, όπου εμφανίστηκε η κορύφωση της παραγωγής ανερχόμενη στους 1.88 εκατομμύρια τόνους, παρουσιάζοντας έκτοτε έως σήμερα μια ελαφρά πτωτική τάση. [6]

Η Ασία αποτελεί την ήπειρο με την μεγαλύτερη παραγωγή μελιού παγκοσμίως, αποτελώντας μόλις το 47.5% της παγκόσμιας παραγωγής (842830 τόνους) και συγκεκριμένα με την Κίνα στο ~26% (458100 τόνους) να κατέχει την πρώτη θέση στην υφήλιο. Στο πλαίσιο των 10 μεγαλύτερων παγκόσμιων παραγωγών ακολουθούν με φθίνουσα σειρά οι χώρες όπως η Τουρκία, το Ιράν, η Αργεντινή, η Ουκρανία και οι υπόλοιπες χώρες όπως φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα [εικόνα 1]. Η Ελλάδα,

καταλαμβάνει την 18^η θέση, μεταξύ των υπολοίπων, με την παραγωγή της το 2020 να φτάνει περίπου το 1.3% παγκοσμίως (22590 τόνους). ^[5]



Εικόνα 1: Οι 10 μεγαλύτερες χώρες παγκοσμίως με την μεγαλύτερη παραγωγή μελιού από το έτος 2006 μέχρι και το 2020 ^[5]

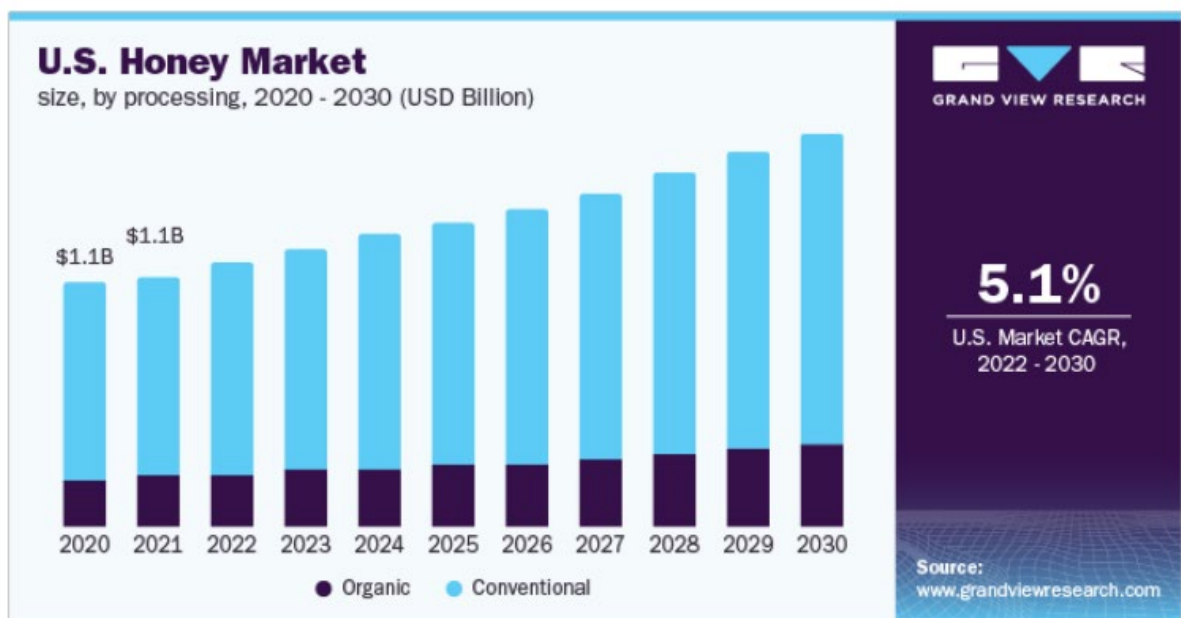
1.1.4. Παγκόσμια αγορά και κατανάλωση

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το μέλι, ότι εκτός από ποικίλες ωφέλιμες ιδιότητες του, είναι και το μόνο φυσικά παραγόμενο βιολογικό γλυκαντικό, το οποίο μπορεί να καταναλωθεί απευθείας χωρίς καμία εκτεταμένη επεξεργασία. ^[7] Οι νέες τάσεις της υγιεινής διατροφής και η στροφή του κόσμου, πρωτίστως των νέων γενιών, προς φυσικότερα και φυτικά γλυκαντικά, έχουν συμβάλει στην δυνατή αγορά του μελιού η

Κεφάλαιο 2 - Νοθεία

οποία αυξάνεται χρόνο με το χρόνο, καθώς αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο η αξία του.

Σύμφωνα με έρευνες, το μέγεθος της παγκόσμιας αγοράς μελιού αποτιμήθηκε σε 8,58 δισεκατομμύρια αμερικάνικα δολάρια το 2021 και αναμένεται να επεκταθεί με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 5,2% από το 2022 έως το 2030. [8] Το 2021, το μεγαλύτερο μέρος των εσόδων, άνω του 80%, το κατείχε η συμβατική κατηγορία μελιού (η διατροφή της μέλισσας γίνεται με ανθρώπινη παρέμβαση με προσθήκη γλυκόζης για την μεγιστοποίηση της παραγωγής [9]) έναντι της οργανικής ενώ αναμένεται να διατηρήσει το προβάδισμα της κατά την προβλεπόμενη περίοδο 2022-2030, λόγω των χαμηλότερων τιμών και της ευρύτερης διαθεσιμότητας του σε σύγκριση με το βιολογικό μέλι. [8]



2: Αντικειμενική αξία της αγοράς του μελιού στην Αμερική και προβλεπόμενη αυξητική πορεία από το 2020 μέχρι το 2030 [8]

Όπως προαναφέρθηκε στις προηγούμενες παραγράφους, η Κίνα είναι η πρωτεύουσα χώρα παραγωγής μελιού παγκοσμίως και αφενός η ζήτηση της είναι πολύ μικρότερη από την παραγωγή της αφετέρου είναι η χώρα με την μεγαλύτερη εξαγωγή στην γη (121 χιλιάδες τόνους, το 2019). Όμως, κύριος ανταγωνιστής της, η Νέα Ζηλανδία, που ενώ τη χρονιά του 2019 εξήγαγε μόλις ~8.5 χιλιάδες τόνους, έχει μαζί με την Κίνα την υψηλότερη εξαγωγική αξία, ανερχόμενες και οι δύο στα 230 εκατομμύρια αμερικάνικα δολάρια, αποτελούμενες από το ~11% έκαστος της

συνολικής αξίας εξαγωγής, μετατρέποντας την στην χώρα με την μεγαλύτερη εξαγωγική αξία μελιού. Ακολουθεί η Αργεντινή (6.8%), Γερμανία (6.7%), η Ευρωπαϊκή Ένωση (6.4%) και η Ελλάδα να ανήκει στην 27^η θέση με 0.7%. [\[10\]](#)

Καθώς η Ε.Ε. είναι η δεύτερη χώρα με την μεγαλύτερη παραγωγή μελιού, δεν καλύπτει την ζήτηση και για αυτό το 2016, εισήχθησαν στην Ε.Ε. 200 χιλιάδες τόνους μέλι, κυρίως από την Κίνα. [\[11\]](#) Συγκεκριμένα η Ελλάδα, κατατάσσεται στις πρώτες θέσεις στη ζήτηση μεταξύ των κρατών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με τη κατά κεφαλή κατανάλωση μελιού να υπολογίζεται το 2018, στο 1.5 κιλό. Προηγούνται η Σλοβενία (1.6kg), η Νέα Ζηλανδία (2kg) και πρώτη η Δημοκρατία Κεντρικής Αφρικής (3.5kg). [\[12\]](#)

Σε σχέση με άλλες χώρες τα έξοδα παραγωγής που έχουν οι ευρωπαίοι μελισσοκόμοι είναι πολύ μεγάλα, ενώ οι ευρωπαϊκές εξαγωγές μελιού έχουν πολύ υψηλότερο κόστος από το μέλι που εισάγεται στην ΕΕ. Χαρακτηριστικά, ένα κιλό μέλι εισαγωγής στην ΕΕ το 2016, κόστιζε 2,23 ευρώ ενώ ένα κιλό μέλι που εξαγόταν από την ΕΕ προς τρίτες χώρες, κόστιζε 5,69 ευρώ. [\[11\]](#)

1.1.5. Η μελισσοκομία στην Ελλάδα

Οι Έλληνες τεκμηριωμένα ασχολούνται με τη μελισσοκομία από τα πολύ παλιά και άρχισε να εξασκείται κυρίως ήδη από τον 15^ο μ.Χ. αιώνα. [\[3\]](#) Από τότε μέχρι και σήμερα διατηρείται μια σημαντική παράδοση. Το επάγγελμα της μελισσοκομίας εξασκείται στην χώρας μας σήμερα από 15000 περίπου μελισσοκόμους, οι οποίοι διαχειρίζονται περίπου 1,2 εκατομμύρια κυψέλες που είναι κατανεμημένες σε όλο τον ελλαδικό χώρο. Το 1/5 από αυτούς, απαρτίζεται από επαγγελματίες (έχουν στην κατοχή τους πάνω από 150 κυψέλες και τουλάχιστον το 50% του ετήσιου οικογενειακού τους εισοδήματος είναι μελισσοκομικό). [\[13\]](#) Μελισσοκομεία οργανωμένα υπάρχουν στην Αττική, στη Θεσσαλία, στην Εύβοια, στην Αχαΐα, στην Αρκαδία και στα περισσότερα νησιά του Αιγαίου (Σκύρος, Κάλυμνος κ.α.). [\[3\]](#)

Ο μελισσοκόμος στην Ελλάδα, εξασκεί κυρίως νομαδική μελισσοκομία (με εξαίρεση κάποια μικρά νησιά του Αιγαίου), σε αντίθεση με αυτόν της Κεντρικής και Βόρειας Ευρώπης. Αυτό σημαίνει ότι αντί να έχει σταθερές περιοχές με μελίσινα, κάθε χρόνο ακολουθεί διαδρομές με το μελισσοκομικό του φορτηγό, αναζητώντας κάθε

εποχή την κατάλληλη ανθοφορία για τα μελίσσια του. Αυτός είναι και ο λόγος που κάνει το ελληνικό μέλι να είναι ξεχωριστό ως προς το εύρος ποικιλιών αλλά και προς την ποιότητα του. [\[13\]](#)

Από τις μεγαλύτερες στον κόσμο εκτιμάται η πυκνότητα των κυψελών στην Ελλάδα. Πάραυτα, η παραγωγή ανά κυψέλη είναι συγκριτικά χαμηλή λόγω της ιδιομορφίας της χλωρίδας μας και των εδαφοκλιματολογικών μας συνθηκών. [\[13\]](#)

Οι μεγαλύτερες ποσότητες μελιού προέρχονται:

- από πεύκο (60-65%) από την Θάσο, Χαλκιδική, Εύβοια και Κρήτη
- από έλατο (5-10%) από την Στ. Ελλάδα και Κεντρική Πελοπόννησο
- από θυμάρι (15%) από νησιά Αιγαίου και Ιόνιου πελάγους, Στ. Ελλάδα και Πελοπόννησο

Η παραγωγή της χώρας μας αγγίζει τις 14-16000 τόνους μέλι ετησίως. Όπως προαναφέρθηκε, οι εξαγωγές μας είναι όντως μικρές (περίπου 200 τόνοι, με ανοδικές όμως τάσεις) καθώς αυτό οφείλεται στις πολύ χαμηλές διακίνησης υποδεέστερων μελιών στο εμπόριο (όπως από Ανατολική Ευρώπη, Λατινική Αμερική, Κίνα), τα οποία βαφτίζονται Ευρωπαϊκά και διακινούνται στην Κεντρική Ευρώπη. Ένας δεύτερος λόγος όμως που η ελληνική παραγωγή δεν πλεονάζει, είναι ότι και εμείς οι ίδιοι σαν λαός καταναλώνουμε πολύ μέλι σύμφωνα με στατιστικές μελέτες, με μέση κατανάλωση 1,7 κιλά κατά κεφαλή ετησίως, αποτελώντας μία από τις υψηλότερες στον κόσμο, σχεδόν διπλάσιο από τον ευρωπαϊκό μέσο όρο. [\[13\]](#)

1.2. Δημιουργία και σύσταση μελιού

Το μέλι δεν είναι μια απλή φυσική γλυκαντική ουσία. Η παραγωγή του είναι μια χρονοβόρα και περίπλοκη διαδικασία όπου χρειάζεται μεγάλο πλήθος μελισσών για την επίτευξη και συγκέντρωση του σε μεγάλες ποσότητες. Επίσης, αποτελείται από πλήθος στοιχείων και κυρίως από απλά ζάχαρα. Μέχρι στιγμής, έχουν ανιχνευτεί και πιστοποιηθεί 182 διαφορετικές ουσίες ενώ παράλληλα η έρευνες ακόμα συνεχίζονται. Όμως δεν είναι η συνύπαρξη των ουσιών αυτών η κύρια ουσία, αλλά η αναλογία τους και η οργανική τους διασύνδεση σε μια βιολογική φυσική τροφή, με πρόσθετες ιδιότητες από αυτές που έχουν τα διάφορα συστατικά του μεμονωμένα. [\[13\]](#)

1.2.1. Πως δημιουργείται το μέλι

Το μέλι παράγεται μέσα από μια περίπλοκη διαδικασία από τις εργάτριες μέλισσες, οι οποίες αποτελούν το 98% τουλάχιστον του πληθυσμού των κυψελών. Καθημερινά και όταν η ημερήσια θερμοκρασία είναι πάνω από τους 14°C, επισκέπτονται πολλά και διάφορα λουλούδια είτε δέντρα, για να συλλέξουν νέκταρ ή μελίτωμα και γύρη. Αφού ρουφήξουν το νέκταρ από τους ανθούς και το αποθηκεύσουν στο δεύτερο ειδικό στομάχι που έχουν (ειδικά σχεδιασμένο για την αποθήκευση μελιού), επιστρέφουν πίσω στην κυψέλη και με την είσοδο τους ανταλλάζουν όσο πιο γρήγορα μπορούν την συλλογή τους στις οικιακές μέλισσες που είναι έτοιμες να παραλάβουν το φορτίο. Αυτές στην συνέχεια το διαμοιράζουν μέσα στην κυψέλη προσθέτοντας το ένζυμο ιμβερτάση, υπεύθυνο για την μετατροπή της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, πραγματοποιώντας έτσι την διαδικασία ονόματι τροφάλλαξη. Εν συνεχεία, αποθηκεύουν και διαχέουν την νέα ουσία στα κελιά της κηρήθρας με σκοπό την εξάτμιση του μεγάλου ποσοστού υγρασίας που περιέχει, συμπυκνώνοντας το και σταδιακά μετατρέποντας το στο γνωστό μας μέλι. Όταν πλέον είναι έτοιμο, οι μέλισσες σφραγίζουν κάθε γεμάτο κελί με φυσικό κερί μέλισσας, προκειμένου να προστατευτεί και να αποθηκευτεί. [\[14\]](#)

1.2.2. Σύσταση Μελιού

Τα κύρια συστατικά του μελιού είναι υδατάνθρακες (σάκχαρα) που συμβάλλουν σχεδόν στο 95% κ.β. του ξηρού βάρους του. Από αυτούς, περιέχει κατά 75% κατά βάρος μονοσακχαρίτες (γλυκόζη και φρουκτόζη) καθώς και ελάχιστες ποσότητες δισακχαριτών (σακχαρόζη, γνωστή ως η κοινή σε μας άσπρη ζάχαρη) καθώς και 10-15% κατά βάρος άλλων τύπων σακχάρων (ολιγοσακχαρίτες και τετρασακχαρίτες). Μέχρι σήμερα, με χρήση αέριας χρωματογραφίας με φασματοόμετρο μαζών (GC-MS), 16 διαφορετικοί τύποι ολιγοσακχαριτών, που αποτελούνται από 11 δισακχαρίτες και 5 τρισακχαρίτες, έχουν βρεθεί στο μέλι. [\[7\]](#)

Εκτός από σάκχαρα, στο μέλι συμπεριλαμβάνονται και άλλα συστατικά όπως: [\[15\]](#)

- Πρωτεΐνες

Περίπου 20 διαφορετικές μη ενζυματικές πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί στο μέλι, πολλές από τις οποίες είναι κοινές σε όλα τα μέλια. Η συνολική πρωτεΐνη του μελιού μπορεί να κυμαίνεται από 0.1 έως 0.5%, καθώς σε ορισμένα μέλια όπως αυτό της ερείκης, έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα της τάξεως 1 με 2%.

- Αμινοξέα

Τα ελεύθερα αμινοξέα είναι ενώσεις που συμπεριλαμβάνονται στο μέλι τα οποία ευθύνονται για κάποιες από τις ιδιότητες του ως αντιοξειδωτική δράση στον οργανισμό μας. Τα περισσότερα όμως αμινοξέα βρίσκονται σε δεσμευμένη μορφή, οπότε η περιεκτικότητα των ελεύθερων είναι τόσο μικρή όσο περίπου το 20% του συνόλου των αμινοξέων.

- Οργανικά οξέα

Πάνω από 30 διαφορετικά μη αρωματικά οργανικά οξέα εντοπίζονται στο μέλι όπως το κιτρικό, οξικό και φωσφορικό οξύ, με το κυριότερο να είναι το γλυκονικό οξύ αποτελώντας το 70-90% του συνόλου. Αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 0.5% των συνολικών στερεών, αλλά είναι σημαντικά για την γεύση, το άρωμα, το χρώμα αλλά και για την συντήρηση του μελιού καθώς δυσκολεύουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Επιπλέον έχουν ιδιαίτερη θεραπευτική αξία για τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ αποτελούν και δομικά στοιχεία για διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό.

- Ένζυμα

Το φυσικό μέλι περιέχει μικρές ποσότητες ενζύμων, από τα οποία τα σημαντικότερα είναι η ιμπερτάση και η γλυκόζη-οξειδάση. Είναι από τα σημαντικότερα συστατικά του μελιού, καθώς είναι απαραίτητη η δράση τους για να επιτευχθεί η διαδικασία ωρίμασης του μελιού. Κάποια από αυτά προέρχονται από το νέκταρ, το μελίτωμα ή την γύρη που συγκεντρώνει η μέλισσα. Ακόμη και όταν το μέλι είναι ώριμο, κάποια από αυτά συνεχίζουν να δρουν μέσα του και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ως δείκτης για γήρανση ή υπερθέρμανση καθώς οι δραστηριότητες τους μειώνονται υπό αυτές τις συνθήκες.

- Ιχνοστοιχεία

Η περιεκτικότητα σε μέταλλα στο μέλι είναι γενικά χαμηλή, παρόλο που υπάρχουν πολλά διαφορετικά ιχνοστοιχεία, κυμαινόμενη μεταξύ 0.02 και 0.3% στα ανθόμελα, ενώ σε πιο σκουρόχρωμα μέλια ή στα μέλια μελιτωμάτων είναι αυξημένη και μπορεί να φτάσει το 1% του συνόλου. Επηρεάζονται από εδαφοκλιματικές συνθήκες καθώς και από την χημική σύσταση του νέκταρ που ποικίλλει ανάλογα με τις διάφορες βοτανικές πηγές που εμπλέκονται στον σχηματισμό του μελιού. Τα σημαντικότερα από αυτά που συναντώνται είναι το κάλιο, νάτριο, ασβέστιο και μαγνήσιο.

- Βιταμίνες

Το μέλι περιέχει βιταμίνες που προέρχονται κυρίως από την γύρη των ανθών. Οι ποσότητες των βιταμινών είναι τόσο μικρές, που το τρόφιμο αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί ως βιταμινούχο. Φαίνεται όμως ότι οι παρούσα των βιταμινών που περιέχει αποσκοπεί στην βέλτιστη απορρόφηση και αφομοίωση των σακχάρων και των μεταλλικών στοιχείων από τον ανθρώπινο οργανισμό

- Φαινολικές ενώσεις

Οι πιθανές θεραπευτικές ιδιότητες του μελιού έχουν αποδοθεί σε βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες παρέχουν το τρόφιμο αυτό με αντιοξειδωτικές, αντιβακτηριακές και αντιφλεγμονώδης ιδιότητες μεταξύ άλλων. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις, αποτελούν οι φαινολικές. Πολλές από αυτές τις ενώσεις, έχουν προταθεί και ως δείκτες για την αναγνώριση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης των μελιών. [\[15\]](#)

1.2.3. Υπόλοιπα παράγωγα κυψέλης

Πέρα από το μέλι, σε μια κυψέλη παράγονται και άλλα προϊόντα, τα οποία είτε συμβάλλουν για την ωρίμανση του μελιού, είτε παράγονται από τις μέλισσες για άλλες λειτουργίες και ανάγκες της κυψέλης. Η σύγχρονη ορθολογική και οικονομική μελισσοκομία όμως στηρίζεται στην αξιοποίηση – παραγωγή όλων των δυνατών προϊόντων της κυψέλης. Αυτά είναι: [\[16\]](#)

- Γύρη

Η πλουσιότερη τροφή σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, απαραίτητα αμινοξέα, ένζυμα και άλλα χρήσιμα συστατικά, η οποία συγκεντρώνεται από τις μέλισσες από τα διάφορα άνθη και αποτελεί μεγάλη βιολογική αξία για τη μέλισσα αλλά και για τον ανθρώπινο οργανισμό. Αναφέρεται ότι 35gr γύρης την ημέρα, ικανοποιεί τις ημερήσιες ανάγκες του ανθρώπου σε πρωτεΐνες. Επίσης έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ρουτίνη, υπεύθυνη για μείωση εγκεφαλικών επεισοδίων, βοηθάει την διανοητική λειτουργία, δίνει ευεξία, αυξάνει την αυτοπεποίθηση, έχει διουρητική δράση, βελτιώνει την όρεξη και το μεταβολισμό θα και καταπολεμά τη γενική αδυναμία και εξασθένηση του οργανισμού.

- Βασιλικός πολτός

Είναι κρεμώδης ουσία που εκκρίνεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των εργατριών μελισσών. Είναι πλούσια πηγή πρωτεϊνών, αμινοξέων, λιπιδίων, βιταμινών και ανόργανων στοιχείων. Για το λόγο αυτό έχει γίνει αντικείμενο πολλών ιατρικών μελετών για τις ευεργετικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς επίσης με το πέρασμα των χρόνων παρουσιάζει αυξημένη ζήτηση στην αγορά.

- Πρόπολη

Ρητινώδης κολλητική ουσία που συλλέγουν οι μέλισσες από διάφορα φυτά, εμπλουτίζεται από αυτές με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες και τη χρησιμοποιούν για στεγανοποίηση και απολύμανση του εσωτερικού της φωλιάς τους. Παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβονόνες με αποτέλεσμα να έχει βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται για την θεραπεία τραυμάτων, παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος, την στοματικής κοιλότητας και άλλων περιοχών του ανθρώπινου σώματος.

- Κερί

Παράγεται από τους κηρογόνους αδένες της μέλισσας και χρησιμοποιείται για την κατασκευή και σφράγιση των κηρηθρών για να καλύψουν το ώριμο μέλι, καθώς έχει και αντιβιοτικές ουσίες που συμβάλλουν στην συντήρησή του. Αξιοποιείται κυρίως από βιομηχανίες καλλυντικών, κεριών και παραγωγής φύλλων κηρήθρας. [\[16\]](#)

1.3. Κατηγορίες και είδη μελιού

Η ποιότητα, η σύσταση, τα οργανοληπτικά στοιχεία και η μορφή (κρυσταλλωμένη ή ρευστή) του μελιού, διαφέρουν με βάση τη βοτανική τους προέλευση, την γεωγραφική τους προέλευση αλλά και από χρονιά σε χρονιά, καθώς επηρεάζεται από τις καιρικές συνθήκες αλλά και την χλωρίδα, που προφανώς διαφέρει ανά χώρα σε χώρα ανάλογα με την γεωμορφολογία και το κλίμα της. Για το λόγο αυτό, εμφανίζονται διαφορετικές κατηγορίες μελιών καθώς και μια τεράστια ποικιλία ειδών, από τις οποίες κάποιες συναντώνται πιο συχνά και παράγονται σε πολλές χώρες αλλά υπάρχουν και πιο σπάνια είδη που συναντώνται μόνο σε συγκεκριμένες χώρες. [\[13\]](#)

1.3.1. Κατηγορίες

Γενικά, τα μέλια ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, το μέλι ανθέων (το γνωστό «ανθόμελο») και το μέλι κωνοφόρων δένδρων από μελιτώματα (συχνά λέγεται και «δασόμελο»).

i. Το μέλι ανθέων πηγάζει από το νέκταρ που μαζεύουν οι μέλισσες από πληθώρα ανθοφόρων φυτών. Αν το μέλι είναι αμιγώς καθαρό (νέκταρ άνθους ενός είδους), τότε το μέλι παίρνει την ονομασία του φυτού από το οποίο προέρχεται. Όμως είναι λογικό να μην μπορεί να παραχθεί μέλι από ένα μόνο φυτό, οπότε σύμφωνα με την νομοθεσία ένα μέλι παίρνει την ονομασία του φυτού όταν υπάρχουν πάνω από ένα συγκεκριμένο ποσοστό γυρεόκοκκων του φυτού που έχει οριστεί. Σε αντίθετη περίπτωση, αν προέρχεται από μεγάλο μείγμα διαφόρων ανθών, τότε απλά ονομάζεται ανθόμελο. Όπως είναι κατανοητό, το μέλι από ένα μοναδικό άνθος (ή τουλάχιστον στο μεγαλύτερο ποσοστό συγκεντρώσεως του) είναι πολυτιμότερο καθώς παράγεται από καθορισμένη βοτανική πηγή που διαθέτει χαρακτηριστικές οργανοληπτικές ιδιότητες και όχι από μίγμα διαφόρων πηγών υποδεέστερης αξίας.

ii. Το μέλι κωνοφόρων δένδρων, είναι μέλι που προέρχεται από φυτά που δίνουν μελίτωμα το οποίο παράγεται από εκκρίματα κοκκοειδών εντόμων που απομυζούν φυτά. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το μέλι του πεύκου, της ελάτης και άλλων δασικών φυτών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για την ονομασία, το ίδιο ισχύει νομοθετικά και εδώ, οπότε στην περίπτωση που δεν υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση συγκεκριμένου μελιτώματος, τότε ονομάζεται απλά μέλι κωνοφόρων δένδρων. [\[17\]](#)

Οι διαφορές μεταξύ των ανθόμελων και των μελιών που προέρχονται από μελιτώματα είναι σημαντικές. Για παράδειγμα, τα ανθόμελα περιέχουν πολλούς γυρεόκοκκους οι οποίοι προσθέτουν θρεπτική αξία και είναι ανοιχτόχρωμα, ελαφρύτερα και κρυσταλλώνουν ταχύτερα. Από την άλλη, τα μέλια που προέρχονται από κωνοφόρα δέντρα είναι πλούσια σε μεταλλικά άλατα και αντιοξειδωτικά, είναι σκουρόχρωμα και κρυσταλλώνουν πιο αργά. Υπάρχουν επίσης αρκετές διαφορές μεταξύ όλων των μελιών όσον αφορά την χημική τους σύσταση. Έτσι, μεγαλύτερο ποσοστό γλυκόζης και φρουκτόζης (>45%) συναντάται στα ανθόμελα ενώ στα μέλια κωνοφόρων δέντρων περιέχεται μικρότερο ποσοστό (από 38-65%) [\[18\]](#)

1.3.2. Βοτανικά είδη και ονομασίες μελιών

Το μέλι, ακριβώς επειδή μπορεί να προέλθει σχεδόν από οποιοδήποτε φυτό που βγάζει ανθούς αλλά και όχι μόνο, καθώς μπορεί να παραχθεί και από τα μελιτώματα φυτών, παρουσιάζει μια τεράστια ποικιλία βοτανικής προέλευσης.

Στην Ελλάδα συγκεκριμένα, λόγω της μεγάλης βιοποικιλότητας της, της πλούσιας χλωρίδας και γεωμορφολογίας και διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών, συναντάται στον ελληνικό εμπόριο μια μεγάλη ποικιλία μελιών, η οποία όχι μόνο διαφέρει ανά βοτανική προέλευση, αλλά παρουσιάζει και μεγάλη διαφορετικότητα ανά γεωγραφική προέλευση

Παρακάτω, παρατίθενται αναφορικά μερικά από τα είδη μελιών που συναντώνται στη Ελλάδα, προερχόμενα είτε από άνθη είτε από μελιτώματα: [\[19\]](#)

Πίνακας 1: Τα είδη μελιών που συναντώνται στην Ελλάδα

Μέλι ανθέων

- Θυμαρίσιο
- Ερείκης
- Εσπεριδοειδή (πορτοκαλιάς, λεμονιάς)
- Βαμβακιού
- Ηλίανθου
- Ακακίας
- Μηλιάς
- Κερασιάς
- Λεμονιάς
- Καστανιάς
- Κουμαριάς
- Ασφάκας
- Τριφυλλιού
- Ευκάλυπτου
- Ελαιοκράμβης

Μέλι κωνοφόρων δένδρων

- Πεύκου
- Έλατου
- Βελανιδιάς
- Καστανιάς
- Πολύκομβου

Το 70 με 80% από τη συνολική ελληνική παραγωγή μελιού προέρχεται από φυτά του δάσους. Από το πεύκο προέρχονται οι μεγαλύτερες ποσότητες μελιού (55-60%), ενώ σημαντική είναι και η παραγωγή μελιού ελάτης και βελανιδιάς (5-10%). Μια σχετικά μικρή παραγωγή είναι από άνθη φυτών και κυρίως του θυμαριού, καστανιάς, ερείκης, πορτοκαλιάς και λεμονιάς. [\[19\]](#)

Αξίζει να αναφερθεί και το μέλι Μανούκα, το οποίο δεν παράγεται στην Ελλάδα αλλά και πουθενά αλλού στην υφήλιο, πέρα από την Νοτιοανατολική Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Είναι το είδος μελιού με την μεγαλύτερη θρεπτική αξία με διαφορά από κάθε άλλο μέλι που παράγεται, τόσο που χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς και στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών όπως αμυγδαλίτιδες, βρογχίτιδες, βήχα και γενικότερα ως τονωτικό του ανοσοποιητικού καθώς και για εξωτερικό ίαμα χάρη στην αντιβακτηριακή και αντιβιοτική του δράση. [\[20\]](#)

Στην παρούσα διπλωματική, θα ασχοληθούμε συγκεκριμένα με τα εξής 4 είδη διαφορετικής βοτανικής προέλευσης: [\[18\]](#), [\[19\]](#)

Θυμαρίσιο μέλι:

Αποτελεί άριστης ποιότητας μέλι λόγω του εξαιρετικού αρώματος και της γεύσης του και έχει την μεγαλύτερη ζήτηση. Η παραγωγή του ανέρχεται περίπου στο 10% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα και οι καλύτερες περιοχές παραγωγής του θεωρούνται τα ελληνικά νησιά και ιδιαίτερα στην Κρήτη και στα Κύθηρα. Θεωρείται ότι έχει τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες

Μέλι ερείκης:

Υπάρχουν 2 ειδών ερείκης, η φθινοπωρινή και η ανοιξιάτικη. Το μέλι από τη φθινοπωρινή ερείκη είναι πιο αρωματικό και διακρίνεται για τη δυνατή γεύση του. Θεωρείται ένα πολύ θρεπτικό είδος μελιού καθώς βρέθηκε σε έρευνες ότι περιέχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινόλες, άρα έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Έχει τη μοναδική ιδιότητα να ρίχνει την χοληστερίνη και είναι πραγματικό φάρμακο για παιδιά που πάσχουν από αδενοπάθεια και αναιμία. Για αυτό πωλείται κυρίως σε καταστήματα υγιεινής διατροφής.

Μέλι πεύκου:

Περίπου το 60% της συνολικής παραγωγής μελιού στην Ελλάδα είναι πευκόμελο. Θεωρείται μάλιστα το σημαντικότερο μελισσοκομικό φυτό της χώρας μας. Οι κυριότερες περιοχές παραγωγής του είναι η βόρεια Εύβοια, η Χαλκιδική, η Θάσος, η Σκόπελος, η Ζάκυνθος και η Ρόδος. Έχει χαμηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα και για αυτό δεν είναι πολύ γλυκό. Θεωρείται υψηλής θρεπτικής αξίας και αυτό οφείλεται κυρίως στο μεγάλο αριθμό διαφορετικών ουσιών που υπάρχουν στην σύστασή του.

Μέλι πορτοκαλιάς:

Το μέλι πορτοκαλιάς μαζί με άλλα εσπεριδοειδή και οπωροφόρα, αποτελεί ~25% της ελληνικής παραγωγής. Είναι ιδιαίτερα αρωματικό, ανοιχτόχρωμο και σχετικά λεπτόρρευστο. Παράγεται στα νησιά (Χανιά, Πόρο κλπ.), στην Πελοπόννησο και στην Ήπειρο. Περιέχει την υψηλότερη περιεκτικότητα ψευδαργύρου συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλια. Πρέπει να καταναλώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και να προφυλάσσεται από υψηλές θερμοκρασίες για να μπορέσει να διατηρηθεί η θρεπτική αξία αυτού του τύπου μελιού. [\[18\]](#), [\[19\]](#)

1.4. Ιδιότητες μελιού

Στην μακρά ανθρώπινη παράδοση, το μέλι δεν χρησιμοποιείται μόνο ως θρεπτικό συστατικό, πλούσιο σε πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, ένζυμα, ιχνοστοιχεία και σε αντιοξειδωτικές ουσίες όπως πολυφαινόλες για την ευεξία και υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Γίνεται χρήση και στην προληπτική ιατρική ως θεραπευτικό προϊόν, χορηγούμενο για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού και για την θωράκιση εναντίων σοβαρών ασθενειών, όπου μέχρι και σήμερα επιστημονικές μελέτες συνεχίζουν να αποδεικνύουν τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. [\[21\]](#)

1.4.1. Ευεργετικές και βιολογικές ιδιότητες

Μία από τις πιο γνωστές του ιδιότητες, είναι η αντιοξειδωτική του δράση, παρεμποδίζοντας επιβλαβείς αντιδράσεις από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παρουσιάζονται στον οργανισμό αποτρέποντας διάφορες ασθένειες. Υπεύθυνες κυρίως είναι οι φαινολικές ενώσεις αλλά και ο συνδυασμός του μεγάλου εύρους ενεργών συστατικών που εμπεριέχονται στο μέλι. Η αντιοξειδωτική δράση σχετίζεται με την φωτεινότητα του μελιού, καθώς στα πιο σκούρα παρατηρείται υψηλότερη αντιοξειδωτική αξία.

Το μέλι ξεχωρίζει επίσης για την αντιμικροβιακή του δράση, η οποία οφείλεται στην αντίδραση της ενζυματικής οξειδωσης της γλυκόζης, την υψηλή ωσμωτική πίεση (χαμηλή ενεργότητα νερού), στο χαμηλό pH (όξινο περιβάλλον), στο χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής, στο ιξώδες που περιορίζει το διαλυμένο οξυγόνο και άλλους χημικούς παράγοντες. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών, το μέλι δεν βοηθά στην ανάπτυξη ζυμομυκήτων και βακτηρίων. Συγκεκριμένα, έρευνες έδειξαν ότι η αντιβακτηριακή δράση του μελιού μανούκα που αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι αποτελεσματική σε πολλά παθογόνα βακτήρια και μύκητες, συμβάλλοντας ακόμα και στην πρόληψη ενάντια στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Σταφυλόκοκκο*.

Επιπλέον, οι αποπρωτικές ιδιότητες του μελιού και κυρίως του μελιού μανούκα, το καθιστούν μια πιθανή φυσική ουσία με αντικαρκινική δράση καθώς πολλές χημειοθεραπείες που πραγματοποιούνται επί του παρόντος είναι επαγωγικοί παράγοντες απόπτωσης.

Τέλος, παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές δραστηριότητες, καθώς οι φαινολικές ενώσεις που περιέχει είναι υπεύθυνες για την αντιφλεγμονώδη δράση ενώ η παρουσία ενός ολιγοσακχαρίτη, της νιγερόζης, μαζί με διάφορα άλλα μη σακχαρικά συστατικά που περιλαμβάνει ευθύνονται για την ανοσορύθμιση του οργανισμού. [\[21\]](#)

1.4.2. Φαρμακευτικές ιδιότητες

Το μέλι είναι η παλαιότερη ουσία επούλωσης πληγών που ήταν γνωστή στην ανθρωπότητα όταν άλλες σύγχρονες χημικές ουσίες έχουν αποτύχει σε αυτό το θέμα. Αυτό οφείλεται στις αντιβακτηριακές, αντιϊκές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, συμβάλλοντας στην δημιουργία αντισωμάτων στον οργανισμό. Συστήνεται η χρήση του για τον έλεγχο και την θεραπεία οξέων τραυμάτων καθώς και για ήπια προς μέτρια επιφανειακά εγκαύματα. [\[21\]](#)

Ισχυρές ενδείξεις υποδεικνύουν τις ευεργετικές επιδράσεις του μελιού και στην θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Έχει γλυκαιμικό δείκτη (GI) γύρω στο 55, κατηγοριοποιώντας το μεταξύ των τροφίμων με χαμηλό και μέτριο GI, το οποίο εμφανίζεται δραματικά χαμηλότερο σε σχέση με τη σακχαρόζη (ζάχαρη) ή τη γλυκόζη στον διαβήτη τύπου 1. Ο διαβήτης τύπου 2 όμως έχει παρόμοιες τιμές για το μέλι, τη γλυκόζη και τη σακχαρόζη. Στους διαβητικούς ασθενείς, το μέλι μπορεί να προκαλέσει σημαντική μείωση του επιπέδου γλυκόζης στο πλάσμα ενώ σε φυσιολογικούς και υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς, μειώνει επίσης τα λιπίδια του αίματος, την ομοκυστεΐνη και την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. [\[21\]](#)

Επιπλέον οφέλη που έχουν παρατηρηθεί να κατέχει το μέλι είναι:

- η ικανότητα του να δρα στη μείωση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με το άσθμα ή ακόμη και προληπτικός παράγοντας για την αποτροπή της πρόκλησης άσθματος.
- η αντικαρκινική του δράση η οποία έχει αναδειχθεί για την αποτροπή του πολλαπλασιασμού κυττάρων, τη πρόκληση απόπτωσης, την τροποποίηση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και τη πρόκληση εκπόλωσης της μιτοχονδριακής

μεμβράνης σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως δέρματος, τραχήλου, ενδομήτριου, ήπατος, παχέος εντέρου, προστάτη και άλλων πολλών.

- μείωση του κινδύνου καρδιαγγειακής ανεπάρκειας λόγω της περιεκτικότητας του σε φλαβονοειδή, πολυφαινόλικα, βιταμίνη C και μονοφαινόλικα.
- συμβολή σε νευρολογικές παθήσεις, καθώς είναι ένα πολλά υποσχόμενο διατροφικό αντιοξειδωτικό, το οποίο ασκεί αγχολυτική, αντικαταθλιπτική, αντισπασμωδική και αντιαλγαισθητική δράση. [\[21\]](#)

1.4.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κάθε μέλι που παράγεται και πρόκειται να προετοιμαστεί για εμπόριο, πρέπει να πληροί κάποιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές, σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (οδηγία 2001/110/ΕΚ του συμβουλίου της 20^{ης} Δεκεμβρίου του 2001) [\[22\]](#), παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 2:

Κεφάλαιο 2 - Νοθεία

Πίνακας 2: Όρια φυσικοχημικών ιδιοτήτων μελιού σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία

Ποιοτικό κριτήριο	Τιμή
<u>Υγρασία</u>	
Γενικά	≤ 20%
Μέλι ερείκης (<i>Calluna</i>) και μέλι ζαχαροπλαστικής	≤ 23%
Μέλι ζαχαροπλαστικής από ερείκη (<i>Calluna</i>)	≤ 25%
<u>Άθροισμα φρουκτόζης και γλυκόζης</u>	
Μέλι νέκταρ	≥ 60 g/100 g
Μέλι μελιτώματος, μείγμα μελιού μελιτώματος με μέλι ανθέων	≥ 45 g/100 g
<u>Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη (σουκρόζη)</u>	
Γενικά	≤ 5 g/100 g
Ψευδακακία (<i>Robinia pseudoacacia</i>), μηδική (<i>Medicago sativa</i>), βαγξία (<i>Banksia menziesii</i>), ηδύσαρον (<i>Hedysarum</i>), ερυθρός ευκάλυπτος (<i>Eucalyptus camadulensis</i>), (<i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i>), εσπεριδοειδή spp.	≤ 10 g/100 g
Λεβάντα (<i>Lavandula</i> spp.), μποράντζα (<i>Borago officinalis</i>)	≤ 15 g/100 g
<u>Μη υδατοδιαλυτά συστατικά</u>	
Γενικά	≤ 0,1 g/100 g
Μέλι πιέσεως	≤ 0,5 g/100 g
<u>Ηλεκτρική αγωγιμότητα</u>	
Μέλι μη αναφερόμενο κατωτέρω και μείγματα των μελιών αυτών	≤ 0,8 mS/cm
Μέλι μελιτώματος και μέλι ανθέων καστανιάς και μείγματα των μελιών αυτών, πλην των μειγμάτων με τα αναφερόμενα κατώτερα μέλια	≥ 0,8 mS/cm
Εξαιρέσεις: κουμαριά (<i>Arbutus unedo</i>), ερείκη (<i>Erica</i>), ευκάλυπτος, φιλύρα (<i>Tilia</i> spp), καλούνα η κοινή (<i>Calluna vulgaris</i>), Manuka ή Jelly bush (<i>Leptospermum</i>), φυτό τσαγιού (<i>Melaleuca</i> spp.)	
<u>Ελεύθερα οξέα</u>	
Γενικά	≤ 50 meq/Kg
Μέλι ζαχαροπλαστικής	≤ 80 meq/Kg
<u>Δείκτης διάστασης (κλίμακα Schade)</u>	
Γενικά, εκτός από το μέλι ζαχαροπλαστικής	≥ 8
Μέλι με χαμηλή περιεκτικότητα σε φυσικά ένζυμα (π.χ. μέλι εσπεριδοειδών) και του οποίου η περιεκτικότητα σε HMF δεν υπερβαίνει τα 15 mg/kg	≥ 3
<u>HMF</u>	
Γενικά, εκτός από το μέλι ζαχαροπλαστικής	≤ 40 mg/Kg
Μέλι δηλωμένης προέλευσης από περιοχές με τροπικό κλίμα και μείγματα των μελιών αυτών	≤ 80 mg/Kg

2.1. Νοθεία

Το μέλι, είναι το μόνο φυσικά παραγόμενο βιολογικό γλυκαντικό που μπορεί να καταναλωθεί απευθείας χωρίς καμία εκτεταμένη επεξεργασία. Ολοένα και περισσότερος κόσμος το χρησιμοποιεί στις καθημερινές του διατροφικές συνήθειες είτε σαν γλύκισμα αλλά είτε και σαν συμπλήρωμα διατροφής, καθώς όπως έχει προαναφερθεί, τα οφέλη και τα συστατικά του μελιού είναι ποίκιλα και ευεργετικά. Κατά συνέπεια με την αύξηση της ζήτησης η οποία οδήγησε στην αύξηση της αξίας αυτού του ακριβού προϊόντος διατροφής, έχει γίνει στόχος ανέντιμων ατόμων και παραγωγών, οι οποίοι επωφελούνται από αυτή την επικερδή επιχείρηση ενσωματώνοντας φθηνότερα γλυκαντικά στο φυσικό μέλι, ώστε να αυξήσουν την παραγωγή τους μειώνοντας το κόστος και κατ' επέκταση να αυξήσουν το εισόδημα τους. [\[7\]](#)

2.1.1. Λόγοι νοθείας

Η αυξανόμενη αυτή ζήτηση για μέλι έχει μεγαλώσει το χάσμα μεταξύ προσφοράς και ζήτησης. Παράλληλα, παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική ρύπανση, οι νέες ταχέως εξαπολυόμενες ασθένειες από μύκητες και παράσιτα καθώς και οι απώλειες και περιβαλλοντικές καταστροφές οικοσυστημάτων χλωρίδας και πανίδας, έχουν προκαλέσει παγκόσμια μείωση στον πληθυσμό των μελισσών, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την παγκόσμια παραγωγή. [\[23\]](#)

Η αυθεντικότητα του μελιού μπορεί να φανεί από την παραγωγή του καθώς και από τη γεωγραφική και βοτανική του προέλευση. Όσο αφορά την παραγωγή, προκειμένου να επιτύχουν την μεγιστοποίηση της, ανέντιμοι μελισσοκόμοι νοθεύουν το μέλι με την προσθήκη άλλων συστατικών τροφίμων, όπως σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη (HFCS), ιμβερτοποιημένο σιρόπι ζάχαρης (ISS) και άλλα. Έτσι, ως αποτέλεσμα, μπορεί να βρεθούν στο εμπόριο, σφραγισμένα δοχεία που να περιέχουν κατά το ήμισυ (ή και καθόλου) μέλι, αναμιγμένα και συμπληρωμένα με άλλα υποκατάστατα, αυξάνοντας αυτομάτως την διαθεσιμότητα του εμπορεύματος τους στο διπλάσιο ή και παραπάνω. Με βάση τις γεωγραφικές περιοχές ή τη βοτανική προέλευση, ορισμένα είδη έχουν υψηλότερη οικονομική αξία, οπότε

άλλος ένας τρόπος για να αυξήσουν το εισόδημα τους, είναι η ανάμειξη μελιού πιο σύννητες γεωγραφικής ή βοτανικής προελεύσεως, με πιο σπάνιου και ακριβότερου, για την επίτευξη πάλι μεγαλύτερης ποσότητας για διάθεση. Για παράδειγμα, το πιο ακριβό μέλι ακακίας νοθεύεται με το φθηνότερο μέλι ελαιοκράμβης, που είναι δύσκολο να διακριθεί μόνο με γυμνό μάτι ή γευστικά. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί η αυθεντικότητα του μελιού. [\[7\]](#)

2.1.2. Νοθεία σε διεθνή επίπεδο

Εντός μιας συγκεκριμένης γεωγραφικής προέλευσης, η σχέση κόστους – αποτελεσματικότητας και διαθεσιμότητας των σακχάρων ή γλυκαντικών, είναι οι καθοριστικοί παράγοντες για την επιλογή τους ως νοθευτές στο μέλι. Για παράδειγμα, τα σιρόπια που εξάγονται από σιτάρι και ρύζι χρησιμοποιούνται ευρέως ως νοθευτές στο μέλι που παράγεται στην Τουρκία και τη Γαλλία. [\[7\]](#) Τα φυτικά σιρόπια που παρασκευάζονται από τους χυμούς λαχανικών με χρήση θερμότητας, είναι επίσης καλοί υποψήφιοι ως συστατικά νοθείας του μελιού. Η ινουλίνη, που εξάγεται από τις ρίζες κιχωρίου, περιέχει αλυσίδες φρουκτόζης που παρουσιάζουν ποικίλους βαθμούς πολυμερισμού συνήθως μεταξύ 3 και 80, ενώ τα βιομηχανικά παρασκευασμένα σιρόπια ινουλίνης υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη προέρχονται από ενζυματική υδρόλυση της ινουλίνης.

Τα μέλια από τις ευρωπαϊκές χώρες είναι συνήθως νοθευμένα με σιρόπι ινουλίνης υψηλό σε περιεκτικότητα φρουκτόζης, ως το κύριο συστατικό σακχάρου. Στην Κίνα, πολύ δημοφιλείς νοθευτές είναι το σιρόπι ρυζιού (από την υδρόλυση ολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών στο ρύζι) και το σιρόπι μαλτόζης, τα οποία είναι πιο δύσκολα να εντοπιστούν με κοινές αναλυτικές μεθόδους. Επίσης, ενδιαφέρον είναι ότι στο Ιράν, το μέλι νοθεύεται κυρίως από σάκχαρα που εξάγονται από χουρμάδες, καθώς η περιοχή έχει μεγάλες φυτείες χουρμαδιών. Το πλούσιο σε φρουκτόζη και γλυκόζη προφίλ του σιροπιού από χουρμά, είναι παρόμοιο με αυτό των φυσικών μελιών που παράγονται σε κείνη την περιοχή. Από την άλλη πλευρά, το φτηνά διαθέσιμο σιρόπι Jaggegy, που είναι πυκνή σκούρα ζάχαρη παρασκευαζόμενη από την εξάτμιση των συμπυκνωμένων χυμών φοινίκων, είναι ένας δημοφιλής νοθευτής μελιού στην Ινδία. Η χαρακτηριστική σκουρόχρωμη καφέ εμφάνιση των σιροπιών

αυτών, αποτελεί πρόκληση να ξεχωριστεί με το φυσικό μέλι, ιδιαίτερα αν πρόκειται για μέλι πολυανθών. [\[7\]](#)

2.1.3. Κίνδυνοι και επιπτώσεις

Κίνδυνοι στην ανθρώπινη υγεία

Οι αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία εξ αιτίας της κατανάλωσης νοθευμένου μελιού δεν έχουν καθιερωθεί εντελώς λόγω απουσίας συστηματικών και επιστημονικών μελετών καθώς και της ελλιπής αντίληψης του κοινού. Μία εμφανή διαφορά είναι ότι το αγνό μέλι παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη τοξικότητα λόγω της περιεκτικότητας σε απλή ζάχαρη (γλυκόζη και φρουκτόζη) καθώς και απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, αντιοξειδωτικά και ιχνοστοιχεία σε αντίθεση με το νοθευμένο μέλι που υπερτερεί σε μίγμα πολυσύνθετων σακχάρων. Επίσης, ενώ το μέλι έχει αντιβακτηριδιακή δράση, βοηθώντας στην καταπολέμηση του κοινού κρυολογήματος και ορισμένων πεπτικών προβλημάτων, συγκεκριμένα το μείγμα ιμβερτοζάχαρου ή ζάχαρη φοίνικα που χρησιμοποιούνται ως νοθευτές σε κάποιες χώρες, μπορούν μερικές φορές να περιορίσουν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού οδηγώντας σε στομαχικές διαταραχές. [\[24\]](#)

Η νοθεία βλάπτει την υγεία των καταναλωτών, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει αύξηση στα επίπεδα σακχάρου στο αίμα με αποτέλεσμα μεγαλύτερη έκκριση ινσουλίνης και αυξημένη επιβάρυνση του συκωτιού, οδηγώντας σε διαβήτη τύπου Β σε άτομα με υπάρχον προδιάθεση, αύξηση κοιλιακού λίπους και παχυσαρκία, αύξηση του επιπέδου λιπιδίων του αίματος και υψηλή αρτηριακή πίεση. Επίσης, η αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, μπορεί να αυξήσει επίσης το ουρικό οξύ σε ανθρώπους και τρωκτικά, στα οποία έγιναν εργαστηριακές μελέτες, το οποίο έχει δυσμενείς επιπτώσεις στον οργανισμό. [\[24\]](#)

Έως τώρα, παρόλο που δεν υπάρχει εμφανής εικόνα για την επίπτωση στον ανθρώπινο οργανισμό λόγω απουσίας μελετών, έχουν πραγματοποιηθεί όμως αρκετές εργαστηριακές έρευνες σε ποντίκια, για τις επιπτώσεις και την βραχυχρόνια και μακροχρόνια επιρροή τους από την κατανάλωση νοθευμένου μελιού σε σύγκριση με αγνά δείγματα. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ανωμαλίες όπως αύξηση σημαντικού

σωματικού βάρους, επιθέματα λίπους και αύξηση του δείκτη μάζας σώματος καθώς και των λιπιδίων στο αίμα (τριγλυκερίδια, χοληστερόλη και το επίπεδο γλυκόζης). Επίσης, αποδείχθηκε ότι μακροχρόνια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε σακχαρόζη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση τόσο της ουρίας όσο και της κρεατινίνης στο αίμα, ενώ ορολογικές και τοξικολογικές μελέτες νεφρών στους αρουραίους που καταλάωναν νοθευμένο μέλι για 16 εβδομάδες, παρουσίασαν νεφρική βλάβη λόγω της μη ικανότητας αποβολής αυτών των ουσιών από τον ορό του αίματος. [24]

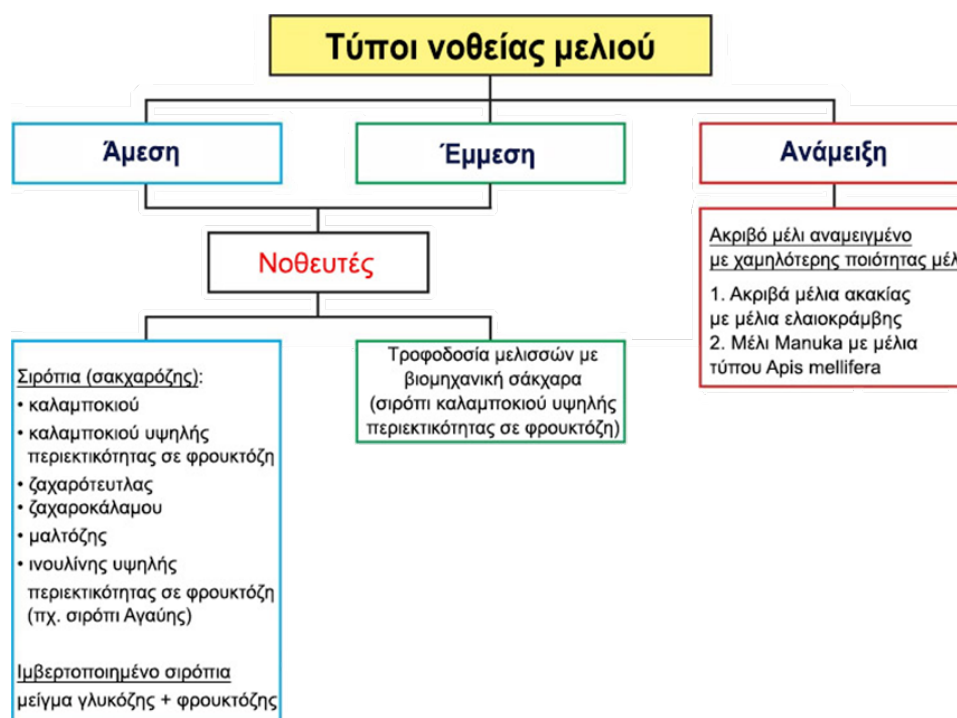
Από όσο γνωρίζουμε, δεν έχει πραγματοποιηθεί καμία έρευνα για την μελέτη της τοξικής επίδρασης του νοθευμένου μελιού στον άνθρωπο. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες μελέτες σε ζώα για την τοξική επίδραση νοθευμένου μελιού προκειμένου να συσχετιστούν τα αποτελέσματα με τον άνθρωπο. Αν και η διερεύνηση της άμεσης επίδρασης του νοθευμένου μελιού στην ανθρώπινη υγεία είναι μια αδύνατη διαδικασία, είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα απαιτώντας ενέργειες των τοπικών και διεθνών αρχών για τον έλεγχο και την ρύθμιση αυτού του θέματος. [24]

Επιπτώσεις στο οικοσύστημα των μελισσών

Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι η ανίχνευση νοθευμένου μελιού δεν περιορίζεται απλώς στην άμεση προσθήκη σακχάρων στο φυσικό μέλι, αλλά επεκτείνεται στην έμμεση τροφοδοσία των αποικιών μελισσών με συμπυκνωμένα διαλύματα ζάχαρης κατά την διάρκεια της κύριας περιόδου άνθισης και συλλογής νέκταρ. Μελισσες που αναφέρθηκαν ότι τρέφονταν με σάκχαρα όπως σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη, σιρόπι σακχαρόζης και σιρόπια άγνωστης σύνθεσης, παρουσίασαν υψηλά ποσοστά θανάτου, πιθανώς λόγω των υψηλών επιπέδων υδροξυμεθυλοφουρφουράλης που σχηματίζεται από τη διάσπαση της φρουκτόζης, το οποίο έγινε τοξικό για τις μέλισσες. Οπότε, αυτό εκτός από την ανθρώπινη υγεία, το πρόβλημα της νοθείας του μελιού επεκτείνεται και στην γενικότερη ζημιά του οικοσυστήματος, με ότι συνεπάγεται αυτό, καθώς οι μέλισσες θεωρούνται από τους πολυτιμότερους οργανισμούς στο οικοσύστημα, που συμβάλλουν σε τεράστιο ποσοστό για την επικονίαση των φυτών. [7]

2.2. Τύποι νοθείας

Η νόθευση του μελιού του εμπορίου, ταξινομείται συνήθως σε 3 κατηγορίες: ως άμεση, έμμεση και ανάμειξη. Κάθε μία από αυτές παρουσιάζει την δική του δυσκολία και απαιτεί διαφορετικό τρόπο ανίχνευσης απαιτώντας την ανακάλυψη συνεχών νέων μεθόδων για την διάκριση μεταξύ αγνού και νοθευμένου μελιού. Παρακάτω αναλύονται ξεχωριστά η καθεμία από τις κατηγορίες αυτές. [7], [23]



Εικόνα 3: Διάγραμμα ροής των διαφορετικών τρόπων νόθευσης

2.2.1. Άμεση νόθευση

Η άμεση νόθευση των μελιών, με την απευθείας προσθήκη σιροπιών ζάχαρης, είναι μια διαδικασία προσθήκης ορισμένων αναλογιών μετά την παραγωγή του για την αύξηση της γλυκύτητας του μελιού, καθώς και την αύξηση του όγκου του για μεγιστοποίηση των ποσοτήτων του εμπορεύματος. Τα σιρόπια σακχαρόζης που προστίθενται, μπορεί να είναι ζαχαρότευτλα (φυτό του οποίου η ρίζα περιέχει υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης), σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη (HFCS), σιρόπι μαλτόζης, ιμβερτοποιημένο σιρόπι ζάχαρης, ή βιομηχανικά

σιρόπια ζάχαρης (γλυκόζη και φρουκτόζη) που λαμβάνονται από θερμική, ενζυμική ή όξινη επεξεργασία του άμυλου. [25] Για παράδειγμα, στην έρευνα της Amiry et al. [24], πραγματοποιήθηκε άμεση νόθευση μελιού σε εργαστηριακά πειράματα σχεδιασμού, με την ανάμειξη σκόνης γλυκόζης σε απιονισμένο νερό και στην συνέχεια προσθήκη αυτού σε αγνό μέλι, ανιχνεύοντας το ύστερα στην έρευνα αυτή με έναν αισθητήρα οπτικών μικροϊνών.

2.2.2. Έμμεση νόθευση

Εν αντιθέσει, η έμμεση νόθευση πραγματοποιείται κατά την παραγωγή του μελιού. Επιτυγχάνεται με την τροφοδοσία των μελισσών με βιομηχανικά σάκχαρα, χαμηλής ποιότητας μέλι ή άλλες χημικές ουσίες κατά την διάρκεια της συγκομιδής για την πρόσληψη περισσότερης ποσότητας του, με αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης των ουσιών αυτών στο παραγόμενο μέλι κατά τη διάρκεια της φυσικής διαδικασίας που συνέβη στο πεπτικό σύστημα της μέλισσας. [23], [25] Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται με την προσθήκη σιροπιού σακχαρόζης σε άδεια μελίτσια, ώστε στις κύριες περιόδους συγκομιδής νέκταρ να εγκαθίστανται αποικίες μελισσών οι οποίες δελεάζονται και τρέφονται από εκεί, όπου μετά την εγκατάστασή τους δεν χορηγείται άλλο σιρόπι πλέον. Έρευνες έδειξαν ότι παρατεταμένη σίτιση μελισσών με σιρόπι σακχαρόζης, επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα στην σύσταση, δηλαδή τη μείωση των θρεπτικών ιδιοτήτων του μελιού, με τον ίδιο τρόπο κατά την τεχνητή άμεση νόθευση. Αυτό το είδος νοθείας είναι δύσκολο να εντοπιστεί καθώς τα σιρόπια ζάχαρης έχουν παρόμοια χημική σύσταση με το μέλι. [25]

2.2.3. Νόθευση με ανάμειξη

Ο τρίτος τρόπος, δεν αφορά με την προσθήκη άλλων ουσιών μέσα στο μέλι, αλλά την ίδια ανάμειξη υψηλής ποιότητας (είτε αγνό είτε σπάνιο) μελιού με φθηνότερα, χαμηλότερης ποιότητα και διατροφικής αξίας, ή και με ήδη νοθευμένου. Η νοθεία αγνού μελιού με ανάμειξη με άλλα συνθετικά μέλια έχει γίνει πολύ πιο εμφανής και επικρατέστερη τα τελευταία χρόνια. Για παράδειγμα, στην Κίνα και στην Βενεζουέλα, μια γνωστή απάτη στη βιομηχανία μελιού για την αύξηση του κέρδους του, είναι η

ανάμειξη των ακριβών μελιών ακακίας με μέλια ελαιοκράμβης (φθηνότερο μέλι) καθώς το ανοιχτό κεχριμπαρένιο χρώμα του είναι πολύ παρόμοιο με αυτό του κίτρινου μελιού ακακίας. ^[25]

2.3. Αναγνώριση νοθευμένου μελιού

Το μέλι μπορεί να είναι ένα πολύπλοκο προϊόν, με τη σύνθεσή του να ποικίλλει ανάλογα με το είδος του λουλουδιού, το είδος της μέλισσας, τη γεωγραφική περιοχή, την εποχή και τις συνθήκες αποθήκευσης. Τα είδη μελιού με πανομοιότυπη βοτανική προέλευση μπορεί να έχουν διαφορετική χημική σύνθεση λόγω διαφορετικών καιρικών συνθηκών και χαρακτηριστικών του εδάφους. Οι έρευνες φυτικής και γεωγραφικής προέλευσης είναι σημαντικά ζητήματα για τη διαδικασία πιστοποίησης. Η επιλογή των κατάλληλων τεχνικών οργάνων και συγκεκριμένων δεικτών ικανών να επιλύσουν αυτά τα ζητήματα μπορεί να είναι μια πρόκληση. ^[23]

Σύμφωνα με την έρευνα του Se et al. (2019),^[7] διάφορες βιοχημικές παράμετροι μπορούν να μετρηθούν για την ανίχνευση νοθείας στο μέλι, συμπεριλαμβανόμενης της περιεκτικότητας σε σακχαρόζη, του προφίλ φρουκτόζης-γλυκόζης-σακχαρόζης, της περιεκτικότητας σε ολιγοσακχαρίτες, της περιεκτικότητας σε προλίνη και των επιπέδων υδροξυμεθυλοφουρουράλης (HMF). Το HMF είναι συστατικό που σχηματίζεται από την διάσπαση της φρουκτόζης, αποτελώντας ένα από τα κύρια σάκχαρα που βρίσκονται στο μέλι και είναι ένας καλός δείκτης για την ανίχνευση νοθευμένου μελιού επειδή μπορεί να υποδεικνύει την παρουσία ιμβερτοποιημένου σιροπιού ζάχαρης (ISS). ^[7] Το HMF είναι μια ένωση που προκύπτει από την αποσύνθεση της φρουκτόζης και δεν πρέπει να υπάρχει στο αγνό μέλι, οπότε έτσι η παρουσία του υποδεικνύει σημάδια ανεπαρκούς αποθήκευσης, υπερβολικής θέρμανσης ή νοθείας με προσθήκη ζάχαρης. Στο αγνό μέλι, οι περισσότεροι από τους υδατάνθρακες που περιέχονται είναι από μονοσακχαρίτες τύπου γλυκόζης και φρουκτόζης και υπάρχει μόνο μια μικρή ποσότητα του τύπου ολιγοσακχαρίτη. ^[23]

Σύμφωνα με την έρευνα του Damto (2019)^[26], δεν υπάρχουν στο μέλι, ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο από 5, αλλά αυτοί οι

ολιγοσακχαρίτες εμφανίζονται σε αφθονία στο σιρόπι αμύλου, οπότε η εμφάνιση υψηλή περιεκτικότητας των ανωτέρω στο μέλι είναι επίσης ένδειξη νοθείας με το σιρόπι αυτό. Επιπλέον, η ενζυμική δράση του ενζύμου διαστάσης παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση των συγκεντρώσεων και στην ταξινόμηση των τύπων προσθέτων ουσιών στο μέλι. Συγκεκριμένα, η ποσότητα και η δραστηριότητα του ενζύμου διαστάσης μειώθηκε στην νοθεία του μελιού με σιρόπι σακχαρόζης και σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη (HFCS).^[23], ^[26] Η ανάλυση χημικής σύνθεσης χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση άμεσης νοθείας, αλλά αυτή η μέθοδος είναι σχετικά χρονοβόρα, απαιτεί προετοιμασία δειγμάτων και εξοπλισμό καθώς και πολύπλοκη ανάλυση. Η σύσταση των υδατανθράκων, καθώς και η αναλογία τους, έχουν υπάρξει χρήσιμοι δείκτες για την ταξινόμηση μονοανθών μελιών ως ανεξάρτητες παραμέτρους είτε σε συνδυασμό με άλλες φυσικοχημικές παραμέτρους, όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα.^[23]

Επιπλέον, οι φυσικοχημικές παράμετροι του μελιού, αντιπροσωπεύουν σημαντικούς ιχνηθέτες για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης του, όπως το pH, η περιεκτικότητα σε τέφρα, η συνολική οξύτητα, το ιξώδες, το χρώμα, καθώς και η σύνθεση των σακχάρων που προαναφέρθηκε. Τέλος, μπορεί να επιτευχθεί και η διάκριση του μελιού, μέσω της γύρης, η οποία είναι αποτελεσματική για την διάκριση του ως προς την γεωγραφική του προέλευση. Ωστόσο, έχει περιορισμούς αφού είναι επίπονη και χρονοβόρα.^[23]

2.4. Έλεγχοι

2.4.1. Έλεγχος νοθείας σε Διεθνή επίπεδο

Ο ορισμός της «Νοθείας με οικονομικά κίνητρα» (economically motivated adulteration - EMA), σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), είναι η “δόλια, σκόπιμη αντικατάσταση ή προσθήκη μιας ουσίας με σκοπό της αύξηση της φαινόμενης αξίας του προϊόντος ή μείωση του κόστους παραγωγής, προς οικονομικό όφελος”. Η νοθεία με οικονομικά κίνητρα μπορεί να εμφανιστεί σε όλα τα

τρόφιμα και συχνά αναφέρεται ως απάτη τροφίμων. Στην βιομηχανία γλυκαντικών τροφίμων, συνήθεις στόχοι της απάτης αυτή είναι διάφορα σιρόπια (πχ σφενταμιού) αλλά και το μέλι. [\[27\]](#)

Για το λόγο αυτό, έχει ιδρυθεί και αναγνωριστεί παγκόσμια από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας καθώς και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο Codex Alimentarius (λατινικός κώδικας τροφίμων) το 1981, εξυπηρετώντας σε πολλές περιπτώσεις ως βάση για την εθνική νομοθεσία, ο οποίος απαρτίζεται από μια συλλογή διεθνώς αναγνωρισμένων προτύπων, κωδικών πρακτικής, κατευθυντήριων γραμμών και άλλων συστάσεων που δημοσιεύονται από τους οργανισμούς αυτούς, που συμβάλλουν στην ασφάλεια, την ποιότητα και την δικαιοσύνη του διεθνή εμπορίου τροφίμων. [\[27\]](#), [\[28\]](#)

Ο Codex Alimentarius ορίζει το μέλι ως «η φυσική γλυκαντική ουσία που παράγεται από τις μέλισσες από το νέκταρ φυτών ή από εκκρίσεις ζωντανών τμημάτων του φυτού ή εκκρίσεις εντόμων που απομυζούν το φυτό (μελιτώματα), που συλλέγουν οι μέλισσες και μεταμορφώνουν συνδυάζοντας τα με συγκεκριμένες δικές τους ουσίες, όπου στην συνέχεια αποθέτουν, αφυδατώνουν, αποθηκεύουν και αφήνουν στις κυψέλες να ωριμάσει». [\[27\]](#)

Μία από τις προκλήσεις με τον προσδιορισμό της Νοθείας Οικονομικών Κινήτρων στο μέλι, είναι η έλλειψη ομοσπονδιακού προτύπου ταυτοποίησης για το μέλι στις ΗΠΑ. Ορισμένες πολιτείες εργάζονται για να επιλύσουν αυτή την ασάφεια και για αυτό το λόγο, πολλές πολιτείες έχουν δικά τους πρότυπα ταυτοποίησης που μοιάζουν με του Codex Alimentarius. [\[27\]](#)

Η Ε.Ε. εξέδωσε ένα πρότυπο ταυτότητας για το μέλι, που είναι σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό του Codex Alimentarius, την Ευρωπαϊκή Οδηγία (EU Directive) 2001/110/EK (ΕΚ, 2001), τροποποιημένη 2014/63/ΕΕ (ΕΕ, 2014) που καθόριζε τις παραμέτρους παραγωγής και εμπορίας μελιού στα κράτη μέλη της ΕΕ [\[29\]](#). Ο Codex Alimentarius και η Ευρωπαϊκή Οδηγία καθορίζουν ορισμένα κριτήρια σύνθεσης για το μέλι όπως τα φυσιολογικά όρια περιεκτικότητας φρουκτόζης και γλυκόζης, και διαφόρων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών όπως του pH, οξύτητας, ηλεκτρικής αγωγιμότητας και άλλα που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Η μόνη διαφορά μεταξύ των 2, είναι πως η Ευρωπαϊκή Οδηγία ορίζει συγκεκριμένα το μέλι ως παράγωγο των Ευρωπαϊκών μέλισσών *Apis mellifera*. [\[28\]](#), [\[29\]](#)

Ο κώδικας τροφίμων, η Ευρωπαϊκή Οδηγία και το εθνικό δίκαιο ορίζουν διάφορες επιλογές επισήμανσης και προϋποθέσεις για το μέλι εκτός από τις γενικές απαιτήσεις επισήμανσης στα τρόφιμα για την προστασία της γνησιότητας του. [\[29\]](#)

2.4.2. Έλεγχοι της ΕΕ

Το 2015 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή διοργάνωσε ένα συντονισμένο σχέδιο ελέγχου της ΕΕ για να αξιολογήσει την συχνότητα επικράτησης στην αγορά, μελιού νοθευμένο με σάκχαρα και μελιών με εσφαλμένη επισήμανση ως προς τη βοτανική ή γεωγραφική τους προέλευση. Όλες οι 28 χώρες της ΕΕ με επιπρόσθετα τη Νορβηγία και την Ελβετία, συμμετείχαν στο σχέδιο, όπου συνέλεξαν πάνω από 2000 δείγματα μελιού σε όλα τα στάδια της εφοδιαστικής αλυσίδας. Το συντονισμένο σχέδιο ελέγχου (Σύσταση της Επιτροπής C (2015) 1558), προέβλεπε μια προσέγγιση τριών επιπέδων για την ανάλυση των δειγμάτων μελιού που συλλέχθηκαν:

1. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν από τις χώρες της ΕΕ για αισθητηριακά χαρακτηριστικά και το προφίλ γύρης για να ελεγχθεί η συμμόρφωση με τις σχετικές διατάξεις της Ευρωπαϊκής οδηγίας για το μέλι (001/110/EC)
2. Στη συνέχεια, τα συμμορφούμενα δείγματα υποβλήθηκαν σε χημική ανάλυση σακχάρου
3. Τα δείγματα που πέρασαν όλους αυτούς τους ελέγχους (ή φάνηκαν ύποπτα), στάλθηκαν στη συνέχεια στην επιτροπή του Κοινού Κέντρου Ερευνών (ΚΚΕρ) για πρόσθετες δοκιμές που στοχεύουν ειδικά στον εντοπισμό νοθείας με πρόσθετα σάκχαρα.

Τα μη συμμορφούμενα δείγματα που εντοπίστηκαν κατά το στάδιο 1 και 2, αφορούσαν κυρίως στη πιστοποίηση της βοτανικής προέλευσης και στη νόθευση με σάκχαρα, καθώς αυτά που αφορούσαν στην πιστοποίηση της γεωγραφικής προέλευσης ήταν λιγότερο συχνά. Η επιτροπή του Κοινού Κέντρου Ερευνών βρήκε ότι από αυτά που πέρασαν στην 3η φάση, στο 14% των δειγμάτων διαπιστώθηκε να περιέχουν προστιθέμενη ζάχαρη. Οπότε, εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα από το συντονισμένο σχέδιο ελέγχου του μελιού, έδειξαν ότι η νόθευση με προσθήκη σακχάρων στο μέλι υφίσταται, τόσο εντός της ΕΕ όσο και σε τρίτες χώρες. [\[30\]](#)

2.4.3. Εθνικοί έλεγχοι

Ο αρμόδιος οργανισμός για την πραγματοποίηση ελέγχων των τροφίμων στην Ελλάδα, είναι ο ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τους ελέγχους ποιότητας καθώς και για τις πιστοποιήσεις ΠΟΠ και ΠΓΕ. Όμως, όσο αφορά το μέλι, στην τοποθέτηση σε ομιλία του κ. Σ.Χαρουτουιάν, προέδρου του ΔΣ του οργανισμού ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ, αναφέρει ότι «παρότι οι προδιαγραφές του ελληνικού σήματος έχουν καταρτιστεί εδώ και λίγα χρόνια, ο ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ δεν έχει προχωρήσει στην καθιέρωση του μελιού γιατί δεν έχει τα επαρκή εργαλεία, πραγματικά και νομοθετικά, για να ελέγξει επαρκώς την αγορά και ότι η Ελλάδα υποφέρει από τις παράνομες εισαγωγές μελιού». Παρόλα αυτά όμως, πραγματοποιεί φυσικοχημικές αναλύσεις σύμφωνα με το προφίλ που είναι καθορισμένο από την Ευρωπαϊκή Οδηγία και έχει ήδη πιστοποιήσει ως μέλι ΠΟΠ κάποια ελληνικά μέλια όπως το πευκοθυμαρομελο Κρήτης και μέλι ελάτης του Μαίναλου. [\[31\]](#)

3.1. Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας

Το μέλι είναι ένα πολύπλοκο προϊόν, με τη σύνθεση του να ποικίλλει ανάλογα με το είδος του ανθού, το είδος της μέλισσας, την γεωγραφική περιοχή, την εποχή και τις συνθήκες αποθήκευσης. Τα είδη μελιού με πανομοιότυπη βοτανική προέλευση μπορεί να έχουν διαφορετική χημική σύνθεση λόγω διαφορετικών καιρικών συνθηκών και διαφορετικών χαρακτηριστικών του εδάφους ανά γεωγραφική περιοχή. Οι έρευνες βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης είναι σημαντικά ζητήματα για τη διαδικασία ελέγχου ταυτοποίησης του μελιού. Η επιλογή των κατάλληλων τεχνικών οργάνων και συγκεκριμένων δεικτών ικανών να επιλύσουν αυτά τα ζητήματα, μπορεί να εμφανιστεί ως μια πρόκληση. [\[23\]](#)

Ο έλεγχος της ταυτότητας του μελιού είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Η πιστοποίηση της βοτανικής προέλευσης του μελιού περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό συγκεκριμένων ενώσεων και ιδιοτήτων του μελιού, ακολουθούμενη από την σύγκριση με τις φυσικές πραγματικές τιμές του για παρατήρηση αποκλίσεων. Η ταυτοποίηση του μελιού στα παλαιότερα χρόνια, αρχικά ξεκίνησε με κλασσικές μεθόδους όπως της φυσικοχημικής, αισθητηριακής και μελισσοπαλυνολογικής ανάλυσης, [\[23\]](#) αλλά με την εξέλιξη της επιστήμης περιλαμβάνει πλέον και πολλές οργανικές τεχνικές για καλύτερη ακρίβεια πιστοποίησης όσο αφορά την βοτανική του προέλευση. Τα τελευταία χρόνια ο έλεγχος της γνησιότητας του μελιού βασίστηκε στην αξιολόγηση διαφορετικών παραμέτρων όπως φυσικοχημικές παράμετροι, πτητικό προφίλ, σάκχαρα, περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία, ρεολογικές παράμετροι (αλλαγή του σχήματος και της ροής των ρευστών) και συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων. [\[32\]](#)

Ωστόσο, η πλειονότητα των αναλυτικών τεχνικών που αναφέρθηκαν για ανάλυση μελιού ή ανίχνευση νοθευτών, είναι συνήθως χρονοβόρες, καταστροφικές και δαπανηρές τεχνικές, που δύσκολα εφαρμόζονται σε in-situ εφαρμογές (δηλαδή ανάλυση επί τόπου στον χώρο συλλογής του δείγματος, ενώ αντιθέτως πρέπει τα δείγματα να μεταφέρονται στους αρμόδιους εργαστηριακούς χώρους) και on-line, εν ολίγης μακριά από τις οικονομικές δυνατότητες και τις τεχνικές δεξιότητες που είναι διαθέσιμες στην πλειονότητα των μικρών και μεσαίων μελισσοκομικών βιομηχανιών. [\[33\]](#) Για τους λόγους αυτούς, πολλοί ερευνητές έχουν αρχίσει να στρέφονται σε νέες μεθόδους ανάλυσης που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια: τις ηλεκτροχημικές

μεθόδους, οι οποίες αποτελούν τις μεθόδους που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, καθώς θα αναλυθούν και θα προσδιοριστούν περαιτέρω στο πειραματικό μέρος του εγγράφου.

3.2. Κλασσικές μέθοδοι

3.2.1. Μελισσοπαλυνολογική μέθοδος

Η παραδοσιακή τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού, είναι η τεχνική της μελισσοπαλυνολογίας. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αναγνώριση της γύρης με χρήση μικροσκοπίου. Η χρήση της μικροσκοπίας για την παρουσία κόκκων αμύλου μπορεί να αποκαλύψει γρήγορα την ακατέργαστη προσθήκη σιροπιών που προέρχονται από άμυλο. [\[29\]](#)

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής καθώς η τεχνική αυτή πρέπει να διεξαχθεί από μια ομάδα πολύ ειδικών ελεγκτών και μερικές φορές μπορεί να είναι ανακριβής ή διφορούμενη. [\[1\]](#) Η ποσότητα της γύρης μπορεί να ποικίλλει από εποχή σε εποχή και μερικές γύρεις μπορεί να συλλέγονται από φυτά που δεν αποτελούν πηγές μελιού. Επίσης, οι μέλισσες μπορούν να πάρουν γύρη χωρίς να συλλέξουν νέκταρ και έτσι με την χρήση μικροσκοπίας, η μεταβλητότητα δεν μπορεί να εκτιμηθεί. Ακόμη, ένας άλλος σημαντικός περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι η απάτη με προσθήκη γύρης στα προϊόντα για να την παρουσίαση του ως αυθεντικό. [\[34\]](#) Τέλος, όσο αφορά την εγγύτητα της γεωγραφικής προελεύσεως η διάκριση γίνεται πιο δύσκολη ακόμη, εξ ου και η επιπρόσθετη χρήση εναλλακτικών αναλυτικών μελετών για τον ίδιο σκοπό. [\[35\]](#)

3.2.2. Εκτίμηση φυσικοχημικών παραμέτρων

Σε αρκετές περιπτώσεις, η φυσικοχημική ανάλυση έχει εμφανίσει καλό ποσοστό επιτυχίας στην ταξινόμηση του μελιού. Γενικότερα, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, το μέλι μελιτώματος χαρακτηρίζεται από υψηλότερες τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας αλλά και οξύτητας συγκρινόμενο με το ανθόμελο. Από την άλλη, το ανθόμελο είναι πλουσιότερο σε μονοσακχαρίτες και πιο ανοιχτόχρωμο. Άλλες φυσικοχημικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη πέρα από την ηλεκτρική αγωγιμότητα, το pH και η ανάλυση χρώματος είναι η υγρασία, τη φρεσκάδα, τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής του. [\[36\]](#)

Στα αρνητικά αυτού είναι ότι υπάρχει μεγάλη διασπορά των παραπάνω τιμών που οφείλεται με την φύση και ετερογένεια του μελιού μειώνοντας έτσι τη χρησιμότητα τους. Επιπλέον οι φυσικοχημικές αναλύσεις γενικά είναι χρονοβόρες τεχνικές και μη φιλικές προς το περιβάλλον. Απαιτούν μεγάλες ποσότητες μελιού, πολλά χημικά αντιδραστήρια και εκπαιδευμένο εργαστηριακό προσωπικό.

Ωστόσο, οι τεχνικές αυτές αποτελούν πολύτιμη αναφορά και επίσημα αναγνωρισμένες μεθόδους, καθώς χρησιμοποιούνται ευρέως για την αξιολόγηση και τον χαρακτηρισμό του μελιού ανθέων και μελιτώματος, παρέχοντας συνήθως ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα. [\[36\]](#)

3.3. Συνήθεις αναλυτικές τεχνικές

3.3.1. Χρωματογραφικές τεχνικές

Οι χρωματογραφικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων κυρίως της αέριας και υγρής χρωματογραφίας οι οποίες θα αναφερθούν παρακάτω, είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες για τον έλεγχο της ταυτότητας του μελιού. Μια ποικιλία μεθόδων έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία 20 χρόνια για να ανταποκριθούν στη ζήτηση για αξιόπιστη πιστοποίηση του μελιού ανθών. [\[36\]](#)

3.3.1.1 Αέρια χρωματογραφία (GC)

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography / GC) είναι μια εξαιρετικά ευέλικτη τεχνική για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση (σε συνδυασμό με έναν κατάλληλο ανιχνευτή) σακχάρων νοθευτών στο μέλι, επιτρέποντας την άμεση ανάλυση πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων (άρωμα μελιού). Η αξιοπιστία της αέριας χρωματογραφίας για την ανίχνευση μονοσακχαριτών, δισακχαριτών, πολυσακχαριτών και νοθευτών (όπως σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη HFCS ή ιμβερτοποιημένο σιρόπι ζάχαρης ISS) στο μέλι έχει αποδειχτεί να αποδίδει υψηλότερο βαθμό ανάλυσης (ποσοτική και ποιοτική) συγκριτικά με άλλες αναλυτικές μεθόδους.

Η υψηλή ευαισθησία της αέριας χρωματογραφίας, το καθιστά ένα αποτελεσματικό εργαλείο για τον εντοπισμό μιας ποικιλίας νοθευτών υδατανθράκων στον μέλι. Η τεχνική αυτή, ήταν η πρώτη τεχνική με επιτυχία στην ανίχνευση HFIS (σιρόπι ινουλίνης υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη πχ. σιρόπι Αγαύης) χρησιμοποιώντας την ινυλοτριόζη ως δείκτη, ενώ η χρήση του DFA (ανυδρίτων διφρουκτόζης) ήταν πρακτική για την αναγνώριση HFCS (σιρόπι καλαμποκιού) και ISS (ιμβερτοποιημένο σιρόπι ζάχαρης). Όμως, η επίπονη παρασκευή πτητικών παραγώγων σακχάρων μέσω επεξεργασία ζύμης (για την συγκέντρωση DFA), μπορεί να εισάγει ξένες ουσίες στο δείγμα, επομένως παραμένει ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας για την τεχνική αυτή. ^[7]

3.3.1.2 Υγρή χρωματογραφία (LC)

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι άλλη μια πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για τον έλεγχο της ταυτότητας του μελιού, η οποία μπορεί να συνδυαστεί με πολλούς ανιχνευτές για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολλαπλών χημικών ενώσεων. ^[36] Η συγκεκριμένη τεχνική ξεχωρίζει καθώς είναι από τις λίγες καθιερωμένες τεχνικές για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο μέλι προερχόμενα από φυτά C3 και C4, τα οποία προσδιορίζονται έτσι λόγω του διαφορετικού μεταβολικού μηχανισμού φωτοσύνθεσης με παραγόμενα προϊόντα των 3 και 4 ατόμων άνθρακα αντίστοιχα. Μερικά από τα σάκχαρα όπως πχ από καλαμπόκι και ζαχαροκάλαμο, προέρχονται από τύπου C4 φυτά, ενώ η ζάχαρη από τεύτλα από

C3 φυτά εκ των οποίων το νέκταρ προτιμάται περισσότερο από τις μέλισσες.^[7] Τα σάκχαρα νοθευτές από C4 φυτά, είναι ευκολότερο να εντοπιστούν λόγω του διαφορετικού λόγου των ισοτόπων του άνθρακα $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ συγκριτικά με τον λόγο ισοτόπων άνθρακα των φυσικών σακχάρων που υπάρχουν στο μέλι. Αντιθέτως, είναι πιο δύσκολος ο εντοπισμός νοθευτών προερχόμενοι από C3 φυτά, καθώς ο λόγος ισοτόπων άνθρακα $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ είναι αρκετά παρόμοιος με αυτόν των φυσικών σακχάρων.^[7]

Πριν από την ανάλυση υγρής χρωματογραφίας, πραγματοποιείται εκχύλιση στοχευμένων ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των φαινολικών ενώσεων, των αμινοξέων και άλλων μορίων. Οι φαινολικές ενώσεις υπάρχουν σε όλα τα μέλια και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική προέλευση, ενώ ορισμένες από αυτές προέρχονται από την πρόπολη της μέλισσας. Τα αμινοξέα προέρχονται κυρίως από τη γύρη με αποτέλεσμα τη μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των διαφορετικών ειδών ανθού του μελιού. Ως αποτέλεσμα, ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης και την πολικότητα των διαλυτών, κάθε φορά απομονώνεται διαφορετικό κλάσμα ενώσεων. Ωστόσο, αυτή η επιλεκτική εξαγωγή είναι ένα σημαντικό κομμάτι έρευνας που μπορεί να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα.^[36]

Το κύριο πλεονέκτημα της παραπάνω τεχνικής, είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλών ενώσεων σε μία ανάλυση. Ωστόσο, απαιτούνται διαδικασίες απομόνωσης δειγμάτων, οι οποίες συχνά θεωρούνται χρονοβόρες. Επιπλέον, ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας είναι ακριβό και πολύπλοκο.

3.3.1.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι μια απλή αναλυτική τεχνική για αναγνώριση και εντοπισμό άγνωστων χημικών συστατικών στα φυσικά μέλια. Αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970, για την ανίχνευση νοθευμένου μελιού με σιρόπι καλαμποκιού υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη HFCS, στο οποίο η σύνθεση των μονοσακχαριτών του είναι παρόμοια με το φυσικό μέλι αλλά με τη μέθοδο αυτή εμφανιζόταν διαφορά στα πειραματικά αποτελέσματα ενός νοθευμένου και ενός αγνού μελιού. Μια ακόμη καλύτερη τεχνική για την αναγνώριση νοθευτών, είναι με τη

χρήση της πιο εξειδικευμένης τεχνικής της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). [7]

Παρά την απλότητα και την ταχύτητα της τεχνικής αυτής για τον εντοπισμό προσθήκης βιομηχανικών σιροπιών ζάχαρης στο μέλι, ακόμη να υπάρξουν εκτενείς έρευνες για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας του. Επιπλέον, πιο εξελιγμένα συστήματα γίνονται αναγκαία καθώς οι νέες ποικιλίες μελιού που εισέρχονται στην αγορά, είναι νοθευμένες με διαφορετικά και πιο πολύπλοκα μη εντοπίσιμα είδη νοθευτών ζάχαρης, όπως ζαχαρότευτλα, ιμβερτοποιημένη ζάχαρη και σιρόπι ρυζιού. [7]

3.3.1.4 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής υψηλής απόδοσης συζευγμένης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (HPAEC-PAD)

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης ενσωματωμένη με σύστημα παλμικής αμπερομετρικής ανίχνευσης μπορεί να αξιολογήσει με ακρίβεια τη σύνθεση υδατανθράκων συμπεριλαμβανομένων των μονο-, δι-, ολιγο- και πολυσακχαριτών. Τα ελαφρώς όξινα σάκχαρα ή υδατάνθρακες με μέγεθος pK_a (λογάριθμοι της σταθερά διάστασης οξέος) μεταξύ 12 – 14, μπορούν εύκολα να μεταφερθούν σε οξυανιόντα και να διαχωριστούν από αποτελεσματικές στήλες ανταλλαγής ανιόντων σε υψηλό pH. [37] Η μέθοδος αυτή απαιτεί λιγότερο χρόνο και είναι φθηνότερη συγκριτικά με άλλες μεθόδους. [38]

3.3.2. Φασματομετρικές τεχνικές

Η φασματομετρία είναι μια τεχνική που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης. Οι αποκρίσεις από αυτή την αλληλεπίδραση παρέχουν πληροφορίες για τη συνολική χημική σύνθεση ενός δείγματος. [39] Τα τελευταία χρόνια, οι φασματομετρικές μέθοδοι γίνονται όλο και πιο πρακτικές ως μια νέα εφαρμογή για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού. Έχουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή απλότητα, η ταχύτητα, η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια, ενώ είναι φιλικά προς το περιβάλλον, μη καταστροφικά και μη επεμβατικά

για τα δείγματα. Στο πλαίσιο αυτό, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την εφαρμογή τους στη βοτανική διαφοροποίηση του ελληνικού μελιού. [\[36\]](#)

3.3.2.1 Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματομετρία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού έχει χρησιμοποιηθεί από αρκετούς ερευνητές για την εκτίμηση της ανθικής προελεύσεως των μελιών. Είναι μια ισχυρή τεχνική για τον προσδιορισμό της μοριακής δομής. Ως εκ τούτου, μπορεί επίσης να παρέχει καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων δομών σε πολύπλοκα συστήματα όπως τα τρόφιμα. [\[40\]](#)

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα της τεχνικής NMR σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως η μη επεμβατική φύση της, η σχετική ευκολία και η ταχύτητα εκτέλεσης των δεδομένων, καθώς και η ικανότητα παρουσίασης πληροφοριών σχετικά με ευρύ φάσμα μεταβολιτών σε μία μόνο εκτέλεση. [\[40\]](#) Λόγω της πολύπλοκης φύσης των δεδομένων που λαμβάνονται και του πολύπλοκου φάσματος της, η πολυμεταβλητή ανάλυση είναι χρήσιμη για την εξαγωγή χρηστικών πληροφοριών κυρίως για το προφίλ του σακχάρου. Από όσο γνωρίζουμε, καμία μελέτη με χρήση φασματομετρία NMR δεν έχει πραγματοποιηθεί για τον έλεγχο ταυτότητας του ελληνικού μελιού. [\[36\]](#)

3.3.2.2 Φασματομετρία Raman

Η φασματομετρία Raman είναι μια απλή τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη δονητικών, περιστροφικών και άλλων μοντέλων χαμηλής συχνότητας σε ένα δείγμα όπως το μέλι. Τα φάσματα Raman δεν επηρεάζονται από την παρουσία νερού, αποτελώντας πλεονέκτημα σε σύγκριση με το FTIR. [\[36\]](#) Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή της ανταλλαγής ενέργειας (μεταβολή της πόλωσης) όταν το μονοχρωματικό φως (λείζερ) αλληλοεπιδρά με το νέφος ηλεκτρονίων ενός μορίου. Τα φαινόμενα Raman συμβαίνουν όταν το προσπίπτον φως σκεδάζεται ανελαστικά, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μήκους κύματος που διέπτετε από τον τρόπο δόνησης ενός μοριακού

δεσμού. Αυτό αποδίδει μοναδικές εκφράσεις των απόκρυφων μοριακών δομών που σχηματίζουν τα υπογραφικά μοριακά αποτυπώματα. [7]

Σε προηγούμενες έρευνες με χρήση της τεχνικής αυτής για την ανίχνευση νοθευτών, τα δεδομένα από τα φάσματα Raman συγκρίθηκαν σε ποιοτικές και ποσοτικές μετρήσεις προστιθέμενων σακχάρων με χρήση ΗΡΑΕC – PAD, με αποτέλεσμα να αποκαλυφθεί ότι οι μετρήσεων των φασμάτων Raman με στατιστικά εργαλεία, έδειξαν μεγάλη ακρίβεια στην πρόβλεψη των σακχάρων R2 και κάλιο. [7] Ωστόσο, αυτή η αναλυτική τεχνική έχει μελετηθεί ελάχιστα για την αξιολόγηση στην πιστοποίηση ελληνικού μελιού. [36]

3.3.2.3 Φασματομετρία υπέρυθρου (IR)

Η υπέρυθρη φασματομετρία έγινε μια δημοφιλής τεχνική για την ανίχνευση των νοθευτών στο μέλι. Η τεχνική αυτή προτιμάται λόγω πολλών αξιοσημείωτων χαρακτηριστικών όπως η ταχύτητα, τα απλά και εύκολα πρωτόκολλα προετοιμασίας δειγμάτων, το χαμηλό κόστος, η μη καταστροφική και φιλική προς το χρήστη φύση της αλλά και την καταλληλότητα χρήσης της για παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο στο ερευνητικό πεδίο συλλογής. [7]

Για την εκτίμηση της βοτανικής προέλευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές περιοχές απορρόφησης υπέρυθρων. Τα φάσματα IR μετρούνται σε δύο περιοχές, όπως τα κοντινά φάσματα (εγγύς υπέρυθρου N-IR) και τα μεσαία φάσματα (μέσου υπέρυθρου M-IR). Τα M-IR είναι χρήσιμα για την παρακολούθηση θεμελιωδών δονήσεων ενώ αντίθετα τα N-IR αποδίδουν πληροφορίες σχετικά με τους σύνθετους τόνους υψηλής συχνότητας και την επικάλυψη των κορυφών δόνησης. [7]

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, η φασματομετρία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ταυτότητας οκτώ μονοανθών και πολυανθών τύπων μελιού, καθώς με τη φασματομετρία μεσαίας υπέρυθρης ακτινοβολίας πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση είκοσι διαφορετικών φυσικών και χημικών παραμέτρων στο μέλι. Ακόμη, πολλές μελέτες έδειξαν ξεκάθαρα ότι η φασματομετρία υπέρυθρου μπορεί να αναγνωρίσει με ακρίβεια ένα μεγάλο εύρος νοθευτών προερχόμενα από φυτά C3 και C4. Εκτός από την ταχύτητα ανάλυσης και την φιλικότητα ως προς τον χρήστη, ο μικρός όγκος δειγμάτων και η ευκολία των

πρωτοκόλλων προ κατεργασίας των δειγμάτων μπορούν να διευκολύνουν σημαντικά την επιτόπια μαζική παρακολούθηση στο ίδιο το πεδίο περισυλλογής του μελιού.^[7]

3.3.2.4 Φασματομετρία Υπεριώδους – Ορατού (UV-Vis)

Το UV-Vis (200 – 900 nm) είναι μια παραδοσιακή φασματομετρική τεχνική στην οποία αυτή η περιοχή απορρόφησης έχει συσχετιστεί με διάφορες ενώσεις όπως φαινολικά και σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη). Σύμφωνα με την έρευνα του Orfanakis et al.,^[41] με βάση την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας (200 – 400 nm) ταξινόμησε τα μέλια ανθέων και μελιτώματος με επιτυχή εκτίμηση 92.65% και 91.30% αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό έδειξε ότι η φασματομετρική τεχνική αυτή μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού.^[36]

3.3.3. Τεχνικές φασματομετρίας μαζών

3.3.3.1 Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)

Ο προσδιορισμός ιχνοστοιχείων σε δείγματα τροφίμων με φασματομετρικές τεχνικές ατομικής απορρόφησης έχουν χρησιμοποιηθεί ως βασική αναλυτική μέθοδος. Η χρήση της επαγωγικά συζευγμένης φασματομετρίας μαζών πλάσματος (ICP-MS) γίνεται πιο δημοφιλής στην ανάλυση τροφίμων. Αυτή η τεχνική έχει το πλεονέκτημα της μέτρησης πολλαπλών στοιχείων σε χαμηλά όρια ανίχνευσης.^[40]

Το ICP-MS έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με προσεγγίσεις εξόρυξης δεδομένων για την εκτίμηση της γεωγραφικής προέλευσης των βραζιλιάνικων μελιών. Ταυτοποιήθηκαν σαράντα δύο χημικά στοιχεία και χρησιμοποιήθηκαν τρία εργαλεία μηχανικής μάθησης για την ταξική διάκριση. Απέδειξε ότι είναι πιθανό να χρησιμοποιηθούν εργαλεία εξόρυξης δεδομένων για τον εντοπισμό της περιοχής από την οποία προέρχεται το μέλι.^[42]

3.3.3.2 Φασματομετρία μαζών αναλογίας ισοτόπων άνθρακα (IR-MS)

Μία από τις τυπικές και πιο αποδεκτές μεθόδους μεταξύ των υπολοίπων τεχνικών για τον έλεγχο της ταυτότητας και της ανίχνευση νοθευτών στο μέλι, είναι η ανάλυση της σταθερής αναλογίας ισοτόπων του ατόμου του άνθρακα (SCIRA). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση φασματομέτρου μαζών και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη διάκριση μελιών διαφορετικής βοτανικής προέλευσης. [\[7\]](#)

Η φασματομετρία μαζών αναλογίας ισοτόπων του άνθρακα, είναι μια ακριβής μεθοδολογία που διακρίνεται μεταξύ των υπολοίπων καθώς μπορεί να ανιχνεύσει πολύ χαμηλά επίπεδα νοθείας. Καθορίζεται από την αναλογία ισοτόπων $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, η οποία είναι διαφορετική στα μονοκοτυλήδονα φυτά (φυτά C4, όπως ζαχαροκάλαμο και καλαμπόκι), σε σύγκριση με τα δικοτυλήδονα (φυτά C3, όπως τα περισσότερα ανθοφόρα φυτά από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στην υγρή χρωματογραφία, οι διαφορετικές αναλογίες των ισοτόπων άνθρακα παράγονται από διαφορετικούς κύκλους φωτοσύνθεσης. Τα φυτά C4 έχουν υψηλό αριθμό ισοτόπων ^{13}C σε σύγκριση με τα φυτά C3. Έτσι, συγκρίνοντας τις αναλογίες ισοτόπων άνθρακα στην πρωτεΐνη και στα σάκχαρα του μελιού, οι οποίες θα πρέπει να είναι ίδιες εάν προέρχονται από την ίδια πηγή, καθορίζεται εάν το μέλι είναι νοθευμένο καθώς και σε τι ποσοστό. [\[43\]](#)

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση νοθείας με προσθήκη σακχάρων προερχόμενα από φυτά C3 λόγω των ομοιοτήτων στην ισοτοπική σύνθεση. Ως εκ τούτου, η φασματομετρία IRMS εφαρμόζεται σε συνδυασμό με κάποια χρωματογραφική τεχνική, αέρια ή υγρή. [\[39\]](#)

3.4. Άλλες μέθοδοι

Πέρα από τις κλασσικές και συνήθεις αναλυτικές τεχνικές, σε λιγοστές βιβλιογραφίες γίνονται αναφορά σε ανάπτυξη διαφορετικού τύπου μεθόδων, βασιζόμενες σε διαφορετικό υπόβαθρο.

- **DNA γύρης**

Εκτός από την κλασσική μικροσκοπική ανάλυση της γύρης που αναφέρθηκε στις κλασσικές μεθόδους, έχουν λάβει χώρα έρευνες για την μελέτη του DNA της γύρης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), για την ταυτοποίηση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης, ωστόσο η διαδικασία εξαγωγής του DNA είναι χρονοβόρα και επίπονη.^[29]

- **Δείκτης διάθλασης νερού (RI)**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε νερό στο μέλι είναι πολύ σημαντικός για να διαπιστωθεί η εμπορευσιμότητα και η ποιότητα του μελιού. Γενικά, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε νερό εφαρμόζεται η μέτρηση RI (διαθλαστικός δείκτης) χρησιμοποιώντας έναν σχετικό πίνακα μετατροπής ή έναν εμπειρικό τύπο. Η μέτρηση RI πραγματοποιείται με διαθλασίμετρο τύπου Abbe ή διαθλασίμετρο χειρός. Ωστόσο, απαιτείται θερμική προεπεξεργασία σε κρεμώδες (κρυσταλλωμένο) μέλι πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης με τη χρήση διαθλασίμετρου προσέγγισης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια νερού και επομένως ο εμπειρικός τύπος ή ο πίνακας μετατροπής είναι εσφαλμένος για διαφορετικούς τύπους μελιού.^[39]

- **Τιτλοδότηση Karl Fischer (KFT)**

Το KFT είναι μια τεχνική που βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ του μορίου του νερού και της χημικής ουσίας. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε (Gallina et al., 2010)^[44], πραγματοποιήθηκε σύγκριση του KFT με τον προσδιορισμό RI σε αρκετά δείγματα μελιών, με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι η KFT απεδείχθη πιο αξιόπιστη μέθοδος.

- **Μέθοδος ξήρανσης**

Η μέθοδος αυτή αποτελεί τη θερμικά ελεγχόμενη διαδικασία κατά την οποία οι πτητικές ενώσεις του δείγματος εξατμίζονται. Στη συνέχεια υπολογίζεται η απώλεια μάζας στο δείγμα έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί το ποσοστό υγρασίας που περιέχεται στο δείγμα. Ωστόσο, άλλες πτητικές ενώσεις που παρουσιάζονται στο μέλι

μπορεί επίσης να εξατμιστούν μαζί με το νερό, εκτός εάν οι παράμετροι ξήρανσης είναι σωστά επιλεγμένες.^[39]

- **Οπτικές ίνες**

Πολλοί οπτικοί αισθητήρες έχουν επιδειχθεί και δημοσιευτεί για μέτρηση νοθείας μελιού. Έρευνες έχουν αποδείξει την ανίχνευση καθαρότητας μελιού σε απεσταγμένο νερό χρησιμοποιώντας αισθητήρα μετατόπισης οπτικών ινών διαμορφωμένης έντασης.^[39]

- **Χαρακτηρισμός πρωτεϊνών**

Οι κύριες πρωτεΐνες στο μέλι έχουν διαφορετικά μοριακά βάρη ανάλογα με το είδος της μέλισσας. Επομένως, η μέτρηση των βασικών πρωτεϊνών στο μέλι είναι μια χρήσιμη μέθοδος για τη διάκριση του μελιού που παράγεται από διαφορετικά είδη μελισσών.^[38]

- **Περιεκτικότητα σε ορυκτά και ιχνοστοιχεία**

Η περιεκτικότητα σε ορυκτά μπορεί να αναγνωριστεί με ανάλυση φασματομετρίας ICP-MS ή Οπτική Φασματομετρία Εκπομπών (OES). Ωστόσο, το προφίλ της περιεκτικότητας σε ορυκτά μπορεί να δώσει πληροφορίες κυρίως για τη γεωγραφική προέλευση και δευτερευόντως για τη βοτανική προέλευση των δειγμάτων ελληνικού μελιού.^[36]

- **Θερμιδομετρικές μέθοδοι**

Η εφαρμογή της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) έδειξε τη δυνατότητα χρήσης της θερμοκρασίας μετάπτωσης υάλου για τη διάκριση μεταξύ μελιών και σιροπιών και είναι μια ισχυρή τεχνική για τον χαρακτηρισμό της θερμικής συμπεριφοράς των μελιών και για την ανίχνευση της επίδρασης της νοθείας στις φυσικοχημικές και δομικές ιδιότητες των δειγμάτων.^[38]

3.5. Σύνθετες – συνδυαστικές τεχνικές

Αναφέρθηκαν κάποιες από τις πιο βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται έως και σήμερα για την βοτανική και γεωγραφική ταυτοποίηση και ανίχνευση νοθευτών του μελιού. Παρόλα αυτά, καμία τεχνική από μόνη της δεν μπορεί να καλύψει στο 100% όλες τις υποπεριπτώσεις ή και ακόμη νέες περιπτώσεις νοθείας με νέα σάκχαρα, καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω κάθε αναλυτική τεχνική έχει τις δικές της ιδιαιτερότητες και περιορισμούς, οπότε για το λόγο αυτό πολλές από τις παραπάνω συνδυάζονται μεταξύ τους ή με διάφορους ανιχνευτές για την μεγιστοποίηση των δεδομένων και αποτελεσμάτων.

Αυτό το συναντάμε στις φασματομετρικές τεχνικές αλλά κυρίως στις χρωματογραφικές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων της αέριας και ιδιαίτερα της υγρής χρωματογραφίας οι οποίες είναι και οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες για τον έλεγχο της ταυτότητας του μελιού, όπου μπορούν να συνδυαστούν με πολλούς ανιχνευτές για ποιοτική ή ποσοτική ανάλυση πολλών και διαφόρων ενώσεων.^[36]

Παρακάτω αναγράφονται επιγραμματικά μερικές τεχνικές συνδυασμένες με κάποιο ανιχνευτή ή με κάποια μεθοδολογία επεξεργασίας:

- Αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC-MS)
- Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (LC-MS)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης – φασματομετρία μαζών (HPLC-MS)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (HPLC-DAD)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διαθλάσεως (HPLC-RID)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FS)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (HPLC-PAD)
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φασματομετρία μαζών αναλογίας ισοτόπων άνθρακα (HPLC-IRMS)
- Φασματομετρία Raman με μετασχηματισμό Fourier (FT-Raman)
- Φασματομετρία εγγύς υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-NIR)
- Φασματομετρία μέσου υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-MIR)

Συνοψίζοντας, παρατίθεται ένας συγκεντρωτικός και συνοπτικός πίνακας με όλες τις συνήθεις μεθόδους και μερικές λιγότερο συνηθισμένες, με τους κύριους αναλυτές και παραμέτρους τους, που χρησιμοποιούνται έως και σήμερα για την βοτανική ταυτοποίηση του μελιού:

Πίνακας 3: Πίνακας μεθόδων για την βοτανική ταυτοποίηση του μελιού

Κεφάλαιο 3 – Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας

Αναλυτική τεχνική	Συντομογραφία	Κύριοι αναλυτές και παράμετροι
Μελισσοπαλυνολογικές και φυσικοχημικές τεχνικές		
Οπτική μικροσκοπία (Optical microscopy)	OM	Ανάλυση γύρης
Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscope)	SEM	
Ανάλυση DNA (DNA analysis)	DNA	
Διαθλασιμετρία (Refractometer - Refractive Index)	RI	Υγρασία
Τιτλοδότηση Karl Fischer (Karl Fischer Titration)	KFT	
Μέθοδος ξήρασης (drying method)		
Αγωγιμομετρία (Conductimetry)		Ηλεκτρική αγωγιμότητα
Ποτενσιομετρία (Potentiometry)		Οξύτητα
Ιξωδομετρία (Viscometry)		Ρεολογικές ιδιότητες
Πεχαμετρία (pH-meter)		pH
Διεθνή επιτροπή για φωτισμό (International commission on Illumination)	CIE	Φωτεινότητα, χρώμα, απόχρωση
Χρωματογραφικές τεχνικές		
Αέρια χρωματογραφία φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography Mass Spectrometry)	GC-MS	Πτητικά Ημι-πτητικά
Υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)	LC-MS	Φαινολικά Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF)
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης φασματομετρία μαζών (High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry)	HPLC-MS	
Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας (High-Performance Thin-Layer Chromatography)	HPTLC	Φαινολικά Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF) Μη πτητικά συστατικά Σάκχαρα και/ή αναλογία φρουκτόζης/γλυκόζης
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής υψηλής απόδοσης συζευγμένης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (High-Performance Anion-Exchange Chromatography With Pulsed Amperometric Detection)	HPAEC-PAD	Μόνο-, δι-, ολιγο- και πολυσακχαρίτες όξινα σάκχαρα ή υδατάνθρακες μεγέθους pKa
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (High-Performance Liquid Chromatography Diode-Array Detector)	HPLC-DAD	Φαινολικά Υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF)
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή δείκτη διαθλάσεως	HPLC-RID	Σάκχαρα

Κεφάλαιο 3 – Μέθοδοι ανίχνευσης νοθείας

(High-Performance Liquid Chromatography Refractive Index Detector)		
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή φθορισμού (High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detector)	HPLC-FS	Φαινολικά Αμινοξέα
Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (High-Performance Liquid Chromatography Pulsed Amperometric Detector)	HPLC-PAD	Σάκχαρα
Φασματομετρικές τεχνικές		
Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)	NMR	Σάκχαρα, στοχευμένος και άστοχος έλεγχος
Φασματομετρία Ράμαν (Raman Spectroscopy)	Raman	Φάσματα σακχάρων και δευτερευόντων συστατικών
Φασματομετρία εγγύς υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-Transform Near-Infrared Spectroscopy)	FT-NIR	Φάσματα σακχάρων και δευτερευόντων συστατικών
Φασματομετρία μέσου υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy)	FT-MIR	Φάσματα σακχάρων και δευτερευόντων συστατικών
Φασματομετρία Υπεριώδους – Ορατού (Ultraviolet–Visible Spectroscopy)	UV-Vis	Φάσματα φαινολικών
Φασματομετρία Φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy)	FS	Φάσματα αμινοξέων, φαινολικών Υποπροϊόντα αντιδράσεως Maillard
Τεχνικές φασματομετρίας μαζών		
Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)	ICP-MS	Χημικά στοιχεία
Φασματομετρία μαζών αναλογίας ισοτόπων άνθρακα (Isotope-Ration Mass Spectrometry)	IRMS	Αναλογία ισοτόπων ατόμων H, C, N, S και 13C

4.1. Ηλεκτροανάλυση

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναφερθήκαμε σε πληθώρα τεχνικών, από τις παλιές κλασσικές τεχνικές των παλαιότερων ετών έως τις πιο σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές, που εφαρμόζονται και αναπτύσσονται όλο και περισσότερο, προκειμένου να μπορούν να ανταπεξέλθουν σε πιο πολύπλοκες και περισσότερες αναλύσεις για την ταυτοποίηση της βοτανικής και γεωγραφικής προέλευσης του μελιού αλλά και την ανίχνευση των διαφόρων ουσιών και μεθόδων νοθείας. Γενικά όλες αυτές οι τεχνικές παρέχουν καλές δυνατότητες διάκρισης, ακρίβεια και αξιοπιστία, αλλά είναι ογκώδεις, δαπανηρές και χρονοβόρες για την προετοιμασία δειγμάτων και τις διαδικασίες μέτρησης, καθιστώντας τις ακατάλληλες για επιτόπια παρακολούθηση.^[35]

Για να προσδιοριστεί η αυθεντικότητα του μελιού, η βιομηχανία πρέπει να έχει απλές, γρήγορες και εύκολες στον χειρισμό τεχνικές χωρίς την ανάγκη για ακριβό εξοπλισμό και εργατικό δυναμικό υψηλής εξειδίκευσης. Επιπλέον, ο κλάδος του μελιού δεν απαιτεί στοιχεία για τα ακριβή επίπεδα νοθείας του μελιού, καθώς απαγορεύεται κάθε είδους προσθήκη, οπότε αρκεί μια γρήγορη τεχνική για τον εντοπισμό του χαμηλότερου βαθμού νοθείας.^[45]

Προκειμένου να ξεπεραστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν, μεταξύ των πιο υποσχόμενων τεχνικών που πληρούν αυτή την απαίτηση, έχουν εισαχθεί εναλλακτικές απλούστερες ηλεκτροαναλυτικές μεθοδολογίες, οι οποίες εκτός του ότι είναι πιο φιλικές προς το περιβάλλον από τις συνήθεις μεθόδους, μπορούν να αποτελέσουν και εναλλακτικό εργαλείο στις παραδοσιακές αναλυτικές μεθόδους. Μία από τις πιο σημαντικές σε αυτόν τον τομέα ως αποτελεσματικό εργαλείο στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων γενικότερα, είναι η “ηλεκτρονική γλώσσα” (E-tongue).^[45] Σε αντίθεση με τις τυπικές αναλυτικές μεθόδους, οι αρχικές ηλεκτρονικές γλώσσες ανέλυσαν ποιοτικά και ταξινόμησαν τα δακτυλικά αποτυπώματα των προϊόντων διατροφής, χωρίς να ποσοτικοποιήσουν τις ενώσεις τους. Ωστόσο, πιο πρόσφατα η εφαρμογή τέτοιων συσκευών στον γρήγορο, ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών των τροφίμων λαμβάνει αυξανόμενη προσοχή.

4.2. «Ηλεκτρονική γλώσσα»

Τα ηλεκτρονικά συστήματα γλώσσας είναι ικανά να αναγνωρίζουν και να ταξινομούν υγρά δείγματα σε διάφορα είδη τροφίμων όπως σε κρασί, μπύρα, καφέ, γάλα, χυμό, τσάι και φυτικά έλαια. Επιπλέον χρησιμοποιείται στην αξιολόγηση της ποιότητας στερεών τροφίμων όπως το κρέας, τα ψάρια, τα φρούτα και τα λαχανικά. Στο πλαίσιο της διάκρισης διαφορετικών κατηγοριών στον ίδιο τύπου τρόφιμου, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο μέλι, εστιάζοντας ειδικά στη διαφοροποίηση του ανάλογα με τη βοτανική και γεωγραφική του προέλευση. [\[45\]](#)

Μία από τις πιο υποσχόμενες εφαρμογές των ηλεκτρονικών συστημάτων γλώσσας είναι η ανίχνευση νοθείας στα τρόφιμα. Όσο αφορά το μέλι, είναι ικανό να ανιχνεύει και να διακρίνει σημάδια νόθευσης του με σιρόπια ζάχαρης, καθώς να εκτιμήσει και το επίπεδο νοθείας. Είναι σε θέση να διακρίνει ανεξάρτητα το μέλι μονοανθού από πολυανθού, το μέλι φτιαγμένο από σιρόπι ζάχαρης και ένα μίγμα αγνού μελιού προστιθέμενου διαφόρων σακχάρων. [\[23\]](#)

Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους ανάλυσης, η μεθοδολογία της ηλεκτρονικής γλώσσας δεν παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη φύση των υπό εξέταση ενώσεων που εμπεριέχονται σε δείγμα είτε υγρού τρόφιμου είτε στερεού τρόφιμου που έχει μετατραπεί σε υγρό δείγμα, αλλά παρουσιάζει ένα ψηφιακό «δακτυλικό» αποτύπωμα, εξειδικευμένου του τρόφιμου αυτού. [\[32\]](#), [\[45\]](#)

4.2.1. Αρχή λειτουργίας

Η ηλεκτρονική γλώσσα μιμείται τα συστήματα γεύσης των ανθρώπων και αναπτύσσεται σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της απλότητας και της στιβαρότητας της. Η τεχνική αυτή είναι μια ηλεκτροχημική ποιοτική τεχνική ανίχνευσης για την ποιοτική ανάλυση των τροφίμων, που επιτρέπει την αναγνώριση και την ταξινόμηση των δειγμάτων αναλόγως τη σύνθεση της διάταξης των αισθητήρων και τις μαθηματικές διαδικασίες καθώς και τις τεχνικές επεξεργασίας δεδομένων πολλαπλών μεταβλητών. Βασίζεται σε μια σειρά αισθητήρων με χαμηλή επιλεκτικότητα, αλλά παρουσιάζουν μερική ειδικότητα (διασταυρούμενη ευαισθησία), δηλαδή είναι ευαίσθητοι σε μερικά συγκεκριμένα στοιχεία του δείγματος. [\[23\]](#)

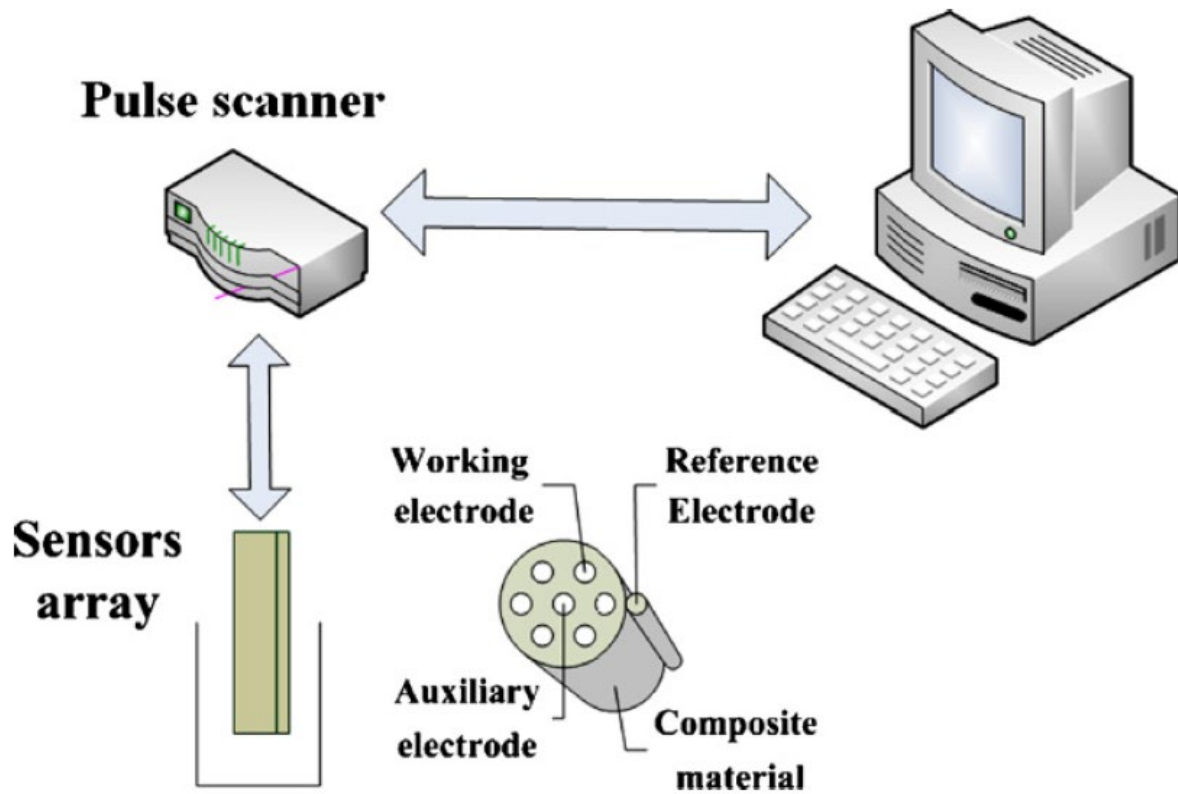
Το σήμα συλλέγεται μέσω αισθητήρων και επεξεργάζεται για τον εντοπισμό μοτίβων με σκοπό την δημιουργία ενός μοντέλου πρόβλεψης, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η ταξινόμηση του δείγματος και ο υπολογισμός ορισμένων φυσικοχημικών συστατικών σε αυτό. Στη συνέχεια τα δεδομένα που προκύπτουν επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας χημειομετρικές τεχνικές, όπως τεχνικές πολυμεταβλητής ανάλυσης πχ PCA (ανάλυση κύριας συνιστώσας), LDA (γραμμική ανάλυση διάκρισης) ή CA (ανάλυση ομαδοποίησης).^[23]

Η απόδοση του αισθητήρα της τεχνικής αυτής, εξαρτάται από την απορρόφηση και την κατάλυση των υλικών σε ιόντα. Βασίζεται σε διάφορες αρχές, όπως μεθόδους ηλεκτροχημείας (αμπερομετρία, ποτενσιομετρία, κυκλική βολταμμετρία), ανίχνευσης μεταβολής μάζας, οπτικές (φωταύγεια, απορρόφηση, ανάκλαση) και ενζυματικές. Ιδιαίτερη σημασία μεταξύ των ηλεκτροχημικών μεθόδων έχουν οι αισθητήρες που κατασκευάζονται από απλά μέταλλα/ ηλεκτρόδια με οξείδια μετάλλων, ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα, τυπωμένα ηλεκτρόδια γραφίτη, τα οποία βυθίζονται σε διάλυμα που παράγει τάση σε σχέση με ένα ποτενσιομετρικό ηλεκτρόδιο αναφοράς. Υπάρχουν πολλοί σχεδιασμένοι αισθητήρες, αλλά μόνο ορισμένοι έχουν βασικά χαρακτηριστικά όπως επιλεκτικότητα, ανθεκτικότητα και ευαισθησία.^[46]

4.2.2. Διάταξη μεθόδου

Η διάταξη των μεθόδων ηλεκτρονικής γλώσσας, απαρτίζεται είτε από ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων (ένα μεμονωμένο ηλεκτρόδιο εργασίας WE σε συνδυασμό με ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς RE και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο AU) ή συσκευές πολλαπλών ηλεκτροδίων εργασίας WE (σε συνδυασμό με ένα βοηθητικό και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς). Γενικά το ηλεκτρόδιο εργασίας περιλαμβάνει ευγενή μέταλλα (πχ λευκόχρυσος, χρυσός, παλλάδιο), μη ευγενή μέταλλα (χαλκός, υαλώδης άνθρακας, νικέλιο) ή αντιδραστικά ευγενή μέταλλα (πχ ασήμι). Το ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι είτε ηλεκτρόδιο αργύρου – χλωριούχου αργύρου Ag/AgCl με γέφυρα άλατος χλωριούχου καλίου KCl ή χλωριούχου νατρίου NaCl, είτε κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλας (SCE). Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο AE είναι συνήθως ένα σύρμα ή ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου.^[33]

Τα αποτελούμενα τμήματα της μεθόδου είναι: αυτόματος δειγματολήπτης, σετ χημικών αισθητήρων και ένα λογισμικό για την επεξεργασία σήματος και τη λήψη αποτελεσμάτων. Υπάρχουν διάφοροι τύποι ηλεκτρονικών συστημάτων γλώσσας, με τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο να αποτελεί η βολταμμετρική μέθοδος.^[46]



4: Διάταξη μεθόδων ηλεκτρονικής γλώσσας^[1]

4.2.3. Κύριες ηλεκτροχημικές τεχνικές

Οι πληροφορίες που παρέχονται από την ηλεκτρονική γλώσσα, ποιοτικές ή ημι-ποσοτικές πληροφορίες, είναι χρήσιμες στη διαδικασία ελέγχου ταυτότητας και παρακολούθησης του μελιού. Διάφορες ηλεκτροχημικές τεχνικές ηλεκτρονικής γλώσσας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύνθετες αναλύσεις υγρών μέσων, με τις δύο κυριότερες και πιο διαδεδομένες από αυτές, που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια, να είναι η ποτενσιομετρία και η βολταμμετρία.

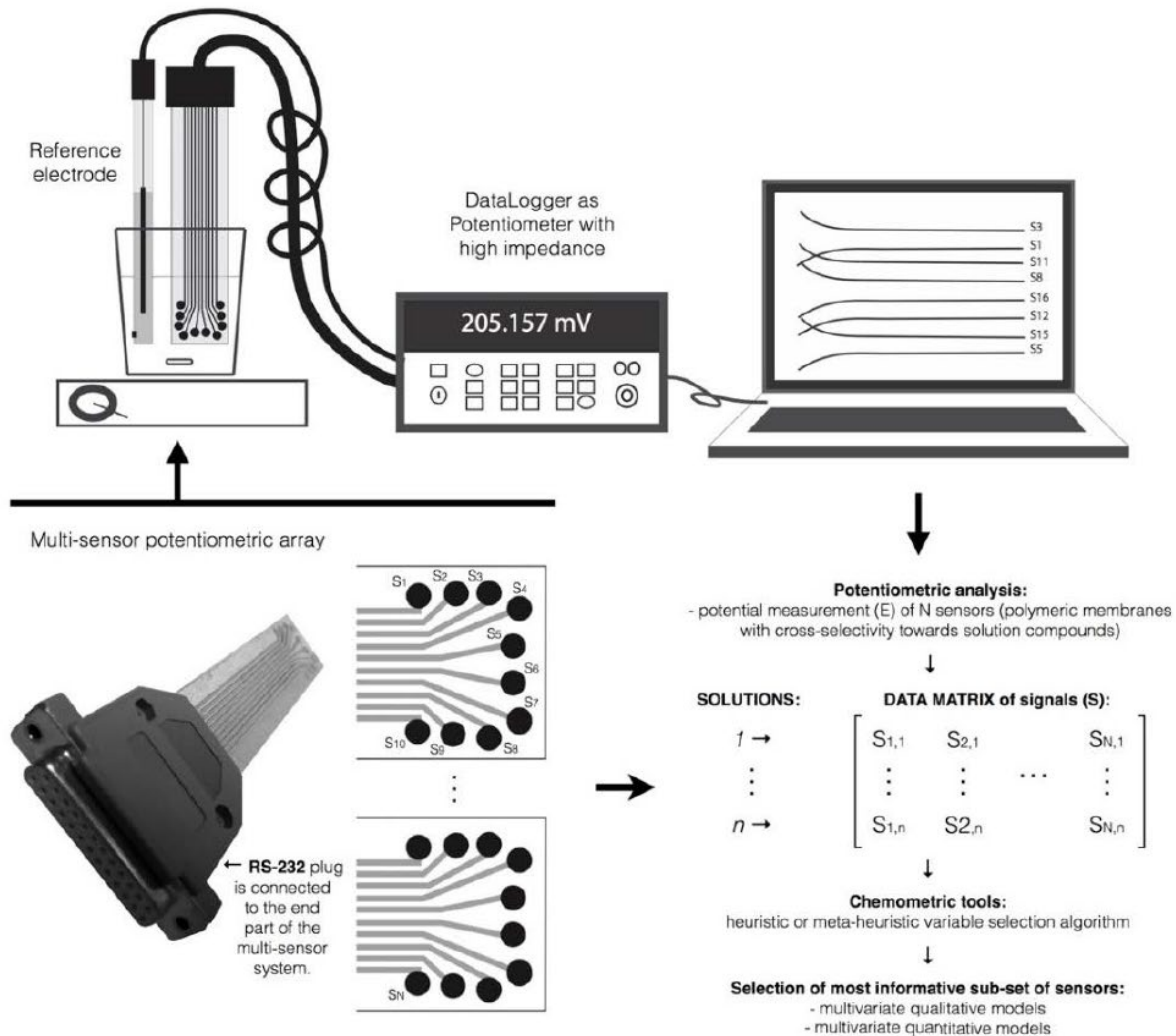
4.2.3.1 Ποτενσιομετρική ηλεκτρονική γλώσσα (PE tongue)

Η ποτενσιομετρική ηλεκτρονική γλώσσα, η οποία περιλαμβάνει διάφορους τύπους μεμβρανών λιπιδίου ή πολυμερών, είναι σε θέση να ταξινομήσει τα τρόφιμα και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση αλκοολούχων ποτών όπως τη μπύρα, το κόκκινο κρασί και άλλα. Περιλαμβάνει επτά ποτενσιομετρικούς χημικούς αισθητήρες που βασίζονται σε τεχνολογία τρανζίστορ χημικώς τροποποιημένων φαινομένων πεδίου (ChemFET), η οποία είναι παρόμοια με την ιοντο-εκλεκτική τεχνολογία FET. Ωστόσο οι αισθητήρες είναι επικαλυμμένοι με συγκεκριμένα υλικά που έχουν διαφορετικές ευαισθησίες στις πέντε βασικές γεύσεις (πίκρα, αλμυρή, ξινή, γλυκιά, ουμάμι).^[47]

Η ποτενσιομετρική ηλεκτρονική γλώσσα χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ταξινόμηση δειγμάτων μελιού από διαφορετικές περιοχές και έδειξε πολλά υποσχόμενη συμπεριφορά για την ποικιλία μελιού με μονοανθών. Όμως, η διαδικασία κατασκευής ποτενσιομετρικών αισθητήρων, η οποία απαιτεί κάποια τεχνογνωσία, είναι πολύπλοκη. Επίσης, οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες λειτουργούν ως προς τη φόρτιση της μεμβράνης, περιορίζοντας τη χρήση τους στην ανίχνευση φορτισμένων ιοντικών ειδών και κατά συνέπεια, η ευαισθησία σε φυσικές γλυκές ουσίες (γενικά μη ηλεκτρολύτες) είναι πολύ χαμηλή.^[11]

Παρόλα αυτά, θα μπορούσε να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι ποτενσιομετρικές γλώσσες μπορούν να παρέχουν ένα ευρύτερο χημικό αποτύπωμα ενός συγκεκριμένου δείγματος μελιού, αφού μπορούν να ανιχνεύσουν την παρουσία οποιασδήποτε χημικής ένωσης που μπορεί να επιβάλει μια πιθανή μετατόπιση των μεμβρανών των αισθητήρων, λόγω παραδείγματος χάρη ηλεκτροστατικών ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, χωρίς να περιορίζονται στην ανάλυση χημικών ενώσεων που οξειδοαναγωγής. Ακόμη, οι ποτενσιομετρικές συσκευές γενικά απαιτούν λιγότερο περίπλοκες προεργασίες δειγμάτων σε σύγκριση με της βολταμετρικές που θα αναλυθούν παρακάτω. Αντιθέτως, οι συστοιχίες ποτενσιομετρικών αισθητήρων χρησιμοποιούνται κυρίως για ποιοτικές αξιολογήσεις, ενώ η πληθώρα πληροφοριών των βολταμογραμμάτων προσφέρει μια βαθύτερη ανάλυση που περιλαμβάνει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές προοπτικές. Επιπλέον, οι μετατοπίσεις σήματος είναι συνήθως πιο σχετικές στην ποτενσιομετρική ανάλυση με αποτέλεσμα την μετέπειτα απαίτηση πολύπλοκης στατιστικής ανάλυσης.^[33]

Παρακάτω απεικονίζεται μια τυπική διάταξη μιας ποτενσιομετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας: [33]



5: Διάταξη ποτενσιομετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας [33]

4.2.3.2 Βολταμμετρική ηλεκτρονική γλώσσα (VE tongue)

Η χρήση βολταμμετρικών ηλεκτρονικών γλωσσών για ανάλυση μελιού είναι μια πιο πρόσφατη πρακτική (από το 2011), σε σύγκριση με τις ποτενσιομετρικές προσεγγίσεις (από το 2008) που χρησιμοποιούνται μαζί με χημειομετρικές και στατιστικές τεχνικές ως επιτυχημένα ποσοτικά αναλυτικά εργαλεία. [33] Έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ταξινόμηση και αξιολόγηση ποιότητας άλλων τροφίμων και

ποτών, καθώς και αντιοξειδωτικές δράσεις και περιεκτικότητα σακχάρων.^[32] Η βολταμμετρία προτιμάται συχνά καθώς αυτή η τεχνική προσφέρει διάφορα πλεονεκτήματα όπως ευελιξία, καλή ευαισθησία, απλότητα, στιβαρότητα και καλή αναλογία σήματος προς θόρυβο.^[35] Ως εκ τούτου, η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει δείγματα διαφορετικής γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση νοθευμένου μελιού.^[46] Στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιλέχθηκε η τεχνική της βολταμμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας για την ανάλυση δειγμάτων μελιού για την προσπάθεια ταξινόμησης και αποτύπωσης του μοναδικού προφίλ βοτανικής προελεύσεως.

Η αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία της βολταμμετρίας, είναι η εφαρμογή τάσεως μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας (WE) και του ηλεκτροδίου αναφοράς (RE) και μέτρηση του ρεύματος που προκύπτει μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του βοηθητικού (AU). Το παραδοικό ρεύμα και οι διάφορες μετρήσεις του δυναμικού οξειδοαναγωγής που λαμβάνονται, σχετίζεται με την περιεκτικότητα των συνολικών αναγωγικών / οξειδωτικών παραγόντων που υπάρχουν μέσα στα δείγματα.^[46] Συγκεκριμένα στο μέλι, μπορεί αυτά να είναι τα διάφορα σάκχαρα, πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία ή οι διάφορες φαινολικές ενώσεις που πρέπει να είναι διαφορετικές αναλόγως την βοτανική προέλευση του. Η βολταμμετρική γλώσσα παράγει μεγάλο όγκο δεδομένων, το οποίο δεν μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία χωρίς την χρήση χημειομετρικών τεχνικών για την δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης που επιτρέπουν την ταξινόμηση και την ποσοτικοποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δειγμάτων προς ανάλυση.^{[32], [46]} Αυτές αναφέρονται αναλυτικά στο παρακάτω υπο-κεφάλαιο.

Στην μεθοδολογία της βολταμμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας, έχουν εφαρμοστεί διαφορετικές τεχνικές, όπως:

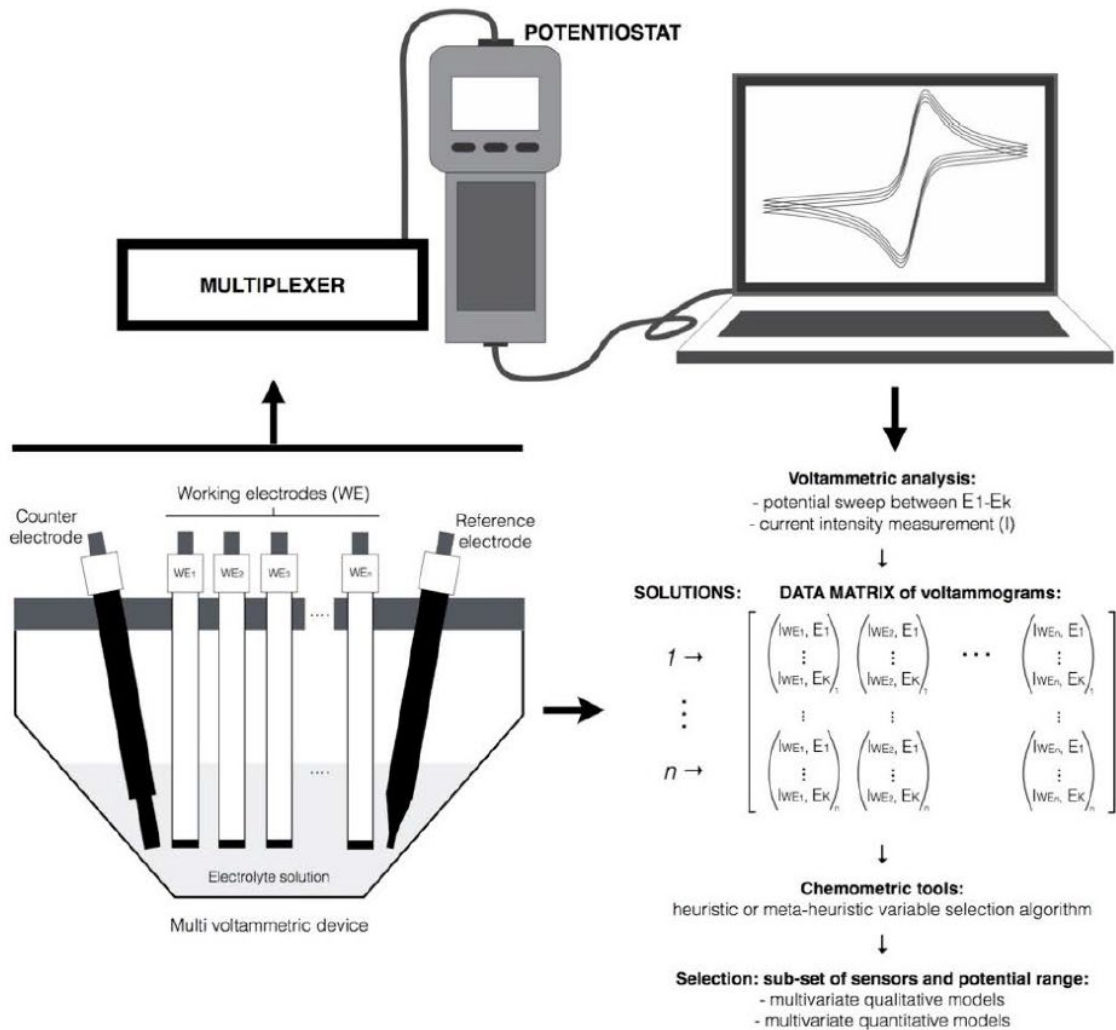
- **κυκλική βολταμμετρία**
(*cyclic voltammetry CV*)
- **βολταμμετρία τετραγωνικού κύματος**
(*square-wave voltammetry SWV*)
- **καθοδική βολταμμετρία απογύμνωσης τετραγωνικού κύματος**
(*square-wave cathodic stripping voltammetry SWCSV*)

- **διαφορική παλμική βολταμμετρία**
(*differential pulse voltammetry DPV*)
- **παλμική βολταμμετρία πολλαπλών συχνοτήτων μεγάλου πλάτους**
(*multifrequency large amplitude pulse voltammetry MLAPV*)
- **γραμμική βολταμμετρία σάρωσης**
(*linear sweep voltammetry LSV*)

με την πιο κοινή να αποτελεί η κυκλική βολταμμετρία. Συνολικά, όλες οι παραπάνω τεχνικές επιδεικνύουν την ευελιξία και την υλοποιησιμότητα της εφαρμογής των βολταμμετρικών ηλεκτρονικών γλωσσών ως ενός εναλλακτικού – συμπληρωματικού αναλυτικού εργαλείου για την ανάλυση μελιού, επιτρέποντας σε ορισμένες περιστάσεις και την πραγματοποίηση επιτόπιας ανάλυσης λόγω της πιθανής φορητής φύσεως αυτών των ηλεκτρονικών συσκευών. [\[33\]](#)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η πειραματική διαδικασία για την ανάλυση των δικών μας δειγμάτων μελιού και για την αξιολόγηση των τεχνικών, εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της κυκλικής και της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας. Χρησιμοποιώντας την κυκλική βολταμμετρία, οι κορυφές οξειδωσης / αναγωγής λαμβάνονται μόνο από τις αντίστοιχες δυναμικές τους τιμές, έχοντας την δυνατότητα να αναγνωρίσουν μια συγκεκριμένη ένωση και να λάβουν επίσης τη συγκέντρωση της, ενώ παράλληλα γίνεται χρήση και της παλμικής διαφορετικής βολταμμετρίας καθώς επιτρέπει υψηλότερη ευαισθησία και ανάλυση, επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση χαμηλότερων συγκεντρώσεων των χημικών ενώσεων. [\[45\]](#), [\[46\]](#)

Παρακάτω απεικονίζεται μια τυπική διάταξη μιας βολταμμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας: [\[33\]](#)



Εικόνα 6: Διάταξη βολταμμετρικής ηλεκτρονικής γλώσσας [33]

4.2.4. Προβλήματα και δυσκολίες των ηλεκτροχημικών μεθόδων / θετικά και αρνητικά ηλεκτροχημικών μεθόδων

Όπως και σε κάθε αναλυτική τεχνική, τόσο οι ποτενσιομετρικές όσο και οι βολταμμετρικές τεχνικές, έχουν τα πλεονεκτήματά τους αλλά και τους περιορισμούς τους, τα οποία έχουν αποτρέψει την ευρεία χρήση των ηλεκτρονικών γλωσσών στην αγορά.

Όσον αφορά τις βολταμμετρικές συσκευές, η ανάλυση του μελιού απαιτεί την προηγούμενη διάλυσή του χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη (π.χ. αλατούχο διάλυμα KCl ή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, PBS) ή σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις, βήματα εκχύλισης ή φυγοκέντρησης. Όπως επισημάνθηκε από αρκετούς

ερευνητές, και οι δύο μεθοδολογίες απαιτούν ορισμένες διαδικασίες πλύσης και καθαρισμού, μεταξύ των μετρήσεων ή μετά από ένα σύνολο δοκιμασιών, προκειμένου να αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα των προηγούμενων δειγμάτων από τις επιφάνειες των μεμβρανών των αισθητήρων με σκοπό να διασφαλιστούν σταθερά και επαναλαμβανόμενα προφίλ σημάτων. Οι βολταμμετρικές συσκευές επιπλέον μπορεί να χρήζουν ανάγκη για γυάλισμα των επιφανειών των ηλεκτροδίων τους. Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος, οι μεμβράνες αισθητήρων μπορεί να είναι αρνητικά ή θετικά φορτισμένες και έτσι συνήθως χρησιμοποιούνται όξινα ή βασικά διαλύματα πλύσης, αντίστοιχα, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται μόνο ένα στάδιο πλύσης με υπερκάθαρο νερό. Η βολταμμετρική ανάλυση μπορεί να απαιτεί περαιτέρω ένα βήμα απαερίωσης για την απομάκρυνση του οξυγόνου με χρήση ενός αδρανούς αερίου όπως το άζωτο, καταλήγοντας σε μια πιο περίπλοκη προεπεξεργασία δείγματος σε σύγκριση με την ποτενσιομετρική ανάλυση. [\[33\]](#)

Επίσης ακόμη ένα πρόβλημα που έχει αποκλείσει την ευρεία υιοθέτηση των ηλεκτρονικών γλωσσών ως αναλυτικά εργαλεία ρουτίνας, είναι η εμφάνιση μετατοπίσεων σήματος και/ή επιδράσεων θορύβου όταν η ηλεκτροχημική ανάλυση πραγματοποιείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πράγματι, η διάρκεια ζωής βαθμονόμησης της ηλεκτρονική γλώσσας είναι τυπικά περιορισμένη λόγω των αλλαγών των υλικών των αισθητήρων που σχετίζονται με διάφορα φυσικά και χημικά φαινόμενα όπως η προσρόφηση συστατικών του δείγματος, οι αποκλίσεις θερμοκρασίας, οι χημικές αντιδράσεις της επιφάνειας και άλλων. [\[33\]](#)

Στα θετικά των μεθόδων αυτών εκτός αυτών που αναφέρθηκαν προηγουμένως όπως η υψηλή ευαισθησία, γρήγορη ταχύτητα ανίχνευσης, ευελιξία, απλότητα, καλή αναλογία σήματος προς θόρυβο και στιβαρότητα του, παρουσιάζονται και άλλα πλεονεκτήματα σε γενικές γραμμές σύμφωνα όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία. Και οι δύο ηλεκτροχημικές τεχνικές δείχνουν μακροχρόνια σταθερότητα ηλεκτροχημικής απόκρισης και επαναληψιμότητας με την πάροδο του χρόνου και μετά την αποθήκευση, καθώς οι ποτενσιομετρικές συσκευές είναι πιο προσεκτικές στο να σηματοδοτούν προβλήματα μετατόπισης, τα οποία μπορεί να ελαχιστοποιηθούν ή να ξεπεραστούν με τις διαδικασίες πλύσης ή με την επακόλουθη χρήση στατιστικών διορθώσεων για την αντιμετώπιση των μετατοπίσεων σήματος. [\[33\]](#)

Επιπλέον, τα προφίλ των ηλεκτρονικών γλωσσών μαζί με χημειομετρικά εργαλεία επιτρέπουν την αξιολόγηση των φυσικοχημικών και βιοχημικών παραμέτρων του

μελιού χρησιμοποιώντας τα ηλεκτροχημικά δακτυλικά αποτυπώματα που καταγράφηκαν σε μια ενιαία πειραματική εκτέλεση, γεγονός που αποφεύγει την ανάγκη εφαρμογής πολλών διαφορετικών αναλυτικών τεχνικών. Τέλος, η πλειονότητα των αναλύσεων μπορεί να διεξαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, οι ηλεκτροχημικές τεχνικές αυτές μπορούν εύκολα να σμικρυνθούν, να χειριστούν και να καθαριστούν, να έχουν χαμηλή κατανάλωση ενέργειας καθώς και την φορητότητα των μηχανημάτων επιτρέποντας την ανάλυση δείγματος στο ερευνητικό πεδίο ακόμη και σε σκληρά βιομηχανικά περιβάλλοντα. [33]

Ο τεράστιος αριθμός ερευνητικών εργασιών που διατίθενται στη βιβλιογραφία επισήμανε ξεκάθαρα ότι αυτές οι συσκευές είναι πολλά υποσχόμενα εργαλεία για ανάλυση μελιού, φιλικές προς τον χρήστη και με πράσινες δυνατότητες, καθιστώντας τα ένα ξεχωριστό αναλυτικό εργαλείο διαφορετικό των υπολοίπων μηχανημάτων που συναντάμε στα μεγάλα εργαστήρια. Επιπλέον, αυτές οι συσκευές μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματικά εργαλεία, ειδικά σε συνδυασμό με κατάλληλες χημειομετρικές τεχνικές και με τη χρήση βελτιωμένων τεχνικών εξαγωγής χαρακτηριστικών για την ανάλυση απόκρισης ηλεκτρονικών αισθητήρων. [33]

4.3. Χημειομετρία

Η χημειομετρία εμφανίστηκε γύρω στο 1970 με την επίγνωση ότι τα χημικά αναλυτικά όργανα άρχιζαν να παράγουν πολλά περισσότερα δεδομένα από την δυνατότητα να επεξεργαστούν εύλογα οι εκάστοτε τεχνικές αναλύσεων χημικών δεδομένων, με αποτέλεσμα η μη αξιοποιήσιμες πληροφορίες στο πλήθος των δεδομένων αυτών να ήταν και οι κρίσιμες. Καθώς οι αναλυτικές τεχνικές παρουσιάζουν ένα τεράστιο όγκο δεδομένων, είναι αναγκαία και ορθολογική η εφαρμογή κατάλληλων στατιστικών μεθόδων για την ανάλυση και μεγιστοποίηση των αντλούμενων ποσοτικών και ποιοτικών πληροφοριών των αναλυόμενων δειγμάτων. [48]

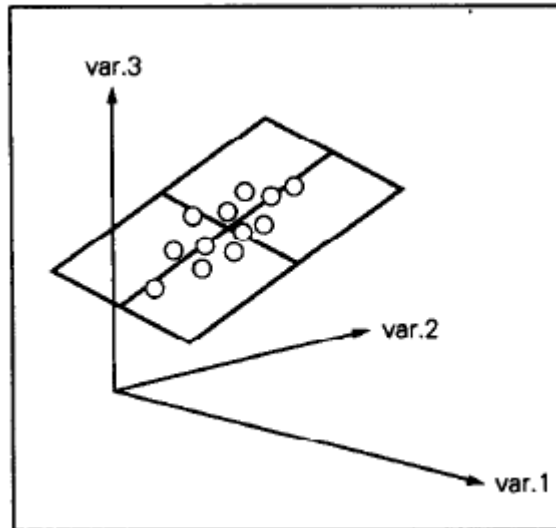
Η αναγκαιότητα χρήσης τεχνικών χημειομετρίας εμφανίζεται ιδιαίτερα στις ηλεκτρονικές γλώσσες, που περιλαμβάνουν μονούς ή πολλαπλούς αισθητήρες μη ειδικής διασταυρούμενης ευαισθησίας και μη ειδικής εκλεκτικότητας, με στόχο τη δημιουργία προγνωστικών πολυμεταβλητών στατιστικών μοντέλων που μπορούν να συσχετίσουν τα σήματα των αισθητήρων με την αναλυτική τους σημασία.

Αναπτύσσονται ποιοτικά και ποσοτικά πολυμεταβλητά μοντέλα με βάση το ουσιαστικό χημικό αποτύπωμα που περιέχεται στα καταγεγραμμένα σύνθετα ηλεκτροχημικά προφίλ δεδομένων, τα οποία προσδιορίζονται μετά την αφαίρεση περιττών δεδομένων μέσω της εφαρμογής διαφορετικών στατιστικών τεχνικών επιλογής μεταβλητών. [33]

Η χημειομετρία είναι συνήθως πολυπαραμετρική τεχνική, επεξεργάζεται δηλαδή πολλές μεταβλητές για κάθε δείγμα και έχει δύο βασικές γραμμές ανάπτυξης. Η πρώτη αφορά αυτή της ανάλυσης των δεδομένων (μέθοδος ταξινόμησης δεδομένων), κάνοντας χρήση των εγγενών πληροφοριών στα χημικά δεδομένα με τον καλύτερο τρόπο. Η δεύτερη πρόκειται για εκείνη του πειραματικού σχεδιασμού (μέθοδος εξαγωγής μοντέλου), δηλαδή του σχεδιασμού και της εκτέλεσης πειραμάτων με τρόπο ώστε τα δεδομένα που προκύπτουν να περιέχουν τις μέγιστες πληροφορίες για τις δηλωμένες ερωτήσεις. Αυτές οι δύο γραμμές χημειομετρικών τεχνικών δεν διαχωρίζονται αλλά συμπλέκονται. [48]

Πολυμεταβλητή ανάλυση

Η αρχή της πολυμεταβλητής ανάλυσης είναι απλή. Τα δεδομένα έχουν μετρηθεί σε ένα σύνολο αντικειμένων/ παρατηρήσεων (μπορεί να είναι οτιδήποτε το οποίο προσπαθούμε να αναλύσουμε με βάση κάποιες παραμέτρους όπως πχ ένα δείγμα, μια ένωση, χρονικά σημεία διεργασίας κλπ.). Σε κάθε παρατήρηση έχουν μετρηθεί οι τιμές των X μεταβλητών όπως για παράδειγμα η φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε ένωσης ή συγκεντρώσεις διάφορων ενώσεων στα ούρα και στο αίμα κάθε ποντικού. Αυτά τα δεδομένα αντιπροσωπεύονται ως σημεία σε έναν πολυμεταβλητό χώρο (multivariate space, M-space) με τόσους άξονες όσο και τις μεταβλητές [εικόνα 7]. Στη συνέχεια κατασκευάζονται παράθυρα (επίπεδα με 2 κάθετους άξονες, μοιάζοντας οπτικά σαν παράθυρα) σε αυτόν τον χώρο μέσω προβολών σε επίπεδα ή υπερ-επίπεδα. Οι πληροφορίες στα δεδομένα φαίνονται ως “μοτίβα” σε αυτά τα παράθυρα, πχ τάσεις, διαχωρισμένες ομάδες και έκτροπων τιμών (outliers). [48]



Εικόνα 7: Αποτύπωση πολυμεταβλητού χώρου με 3 μεταβλητές και ένα παράθυρο (επίπεδο), που μας επιτρέπει να δούμε τις τάσεις, διαχωρισμένες ομάδες και έκτροπες τιμές [\[48\]](#)

Ένα από τα κύρια μοντέλα πολυμεταβλητής ανάλυσης ονομάζεται ανάλυση κύριων συνιστωσών (principal component analysis, PCA) το οποίο δίνει την πρόβλεψη της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας. Επιπλέον υπάρχει ένας αριθμός εναλλακτικών τεχνικών για την εύρεση μοντέλων πολυμεταβλητής παλινδρόμησης. Από τα πιο κοινά είναι η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, η παλινδρόμηση κύριας συνιστώσας, τα νευρωνικά δίκτυα τροφοδοσίας, η παλινδρόμηση χρησιμοποιώντας συναρτήσεις ακτινικής βάσης, η παλινδρόμηση κορυφογραμμής και η παλινδρόμηση βασικών συμμεταβλητών. Αν και υπάρχουν διαφορές μεταξύ αυτών των μεθόδων και παρόλο που συχνά παρουσιάζονται με πολύ διαφορετική ορολογία, η κύρια ιδιότητά τους είναι ότι χειρίζονται μη επιλεκτικές πολυμεταβλητές μετρήσεις και επιτρέπουν τη χρήση όλων των μετρούμενων δεδομένων σε ομαδοποίηση αντί να χρειάζεται να καταφεύγουν σε προεπιλογή μερικών ξεχωριστών μετρήσεων. [\[49\]](#)

Στα παρακάτω υποκεφάλαια αναλύονται οι πιο βασικές χημειομετρικές τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας διπλωματικής.

4.3.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών ανακαλύφθηκε από τον Karl Pearson το 1901 και αναπτύχθηκε ανεξάρτητα από τον Harold Hotelling το 1930. Είναι μια στατιστική διαδικασία με την οποία αναπαριστούμε ένα πίνακα συνδιακύμανσης ενός συνόλου αρχικών μεταβλητών μέσα από ένα διαφορετικό (και συνήθως μικρότερο) σύνολο νέων μεταβλητών οι οποίες προκύπτουν από τον γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών. Χρησιμοποιώντας την στατιστική αυτή τεχνική, τα μετρούμενα δεδομένα που έχουν ληφθεί θα μετατραπούν σε συντεταγμένες. Η αντίστοιχη γραφική παράσταση των σημείων δείχνει τη σχέση μεταξύ των παρατηρήσεων ή των πειραμάτων και οι ομαδοποιήσεις των παρατηρήσεων στο γράφημα συντεταγμένων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ταξινόμηση. [\[47\]](#)

Η μέθοδος πολυμεταβλητής ανάλυσης, όπως η ανάλυση κυρίων συνιστωσών, ασχολείται με την ανάπτυξη μοντέλων στον πολυμεταβλητό χώρο, όπως γραμμές και επίπεδα [\[εικόνα 7\]](#). Η προβολή των σημείων προς τα κάτω σε ένα επίπεδο μπορεί στη συνέχεια να εμφανιστεί στη οθόνη ενός υπολογιστή ή να εμφανιστεί ως γράφημα, επιτρέποντας την αναγνώριση μοτίβων στα δεδομένα. Η κατεύθυνση του επιπέδου προβολής δίνει πληροφορίες σχετικά με το ποιες μεταβλητές είναι σημαντικές και ποιες όχι και πως οι σημαντικές μεταβλητές συνδυάζονται σε ξεχωριστές ομάδες αντικειμένων, για να καθορίσουν τις τάσεις μεταξύ των αντικειμένων με την πάροδο του χρόνου. [\[48\]](#)

Η τεχνική PCA εφαρμόζεται σε ένα πίνακα παρατηρήσεων X με ένα σετ N παρατηρήσεων, με k τυχαίες X -μεταβλητές $x = [x_1 \ x_2 \ \dots \ x_k]$, στον οποίο κάθε διάνυσμα στήλης, δηλαδή κάθε σειρά του πίνακα αποτελεί τις παρατηρήσεις - αντικείμενα N πλήθους n και αντιπροσωπεύει ένα σημείο σε ένα πολυδιάστατο χώρο k -διαστάσεων. [\[50\]](#)

$$X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1k} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nk} \end{bmatrix}$$

Η ιδέα πίσω από την PCA, είναι η εξαγωγή ενός νέου σύνολο μεταβλητών που ονομάζονται κύριες συνιστώσες (principal component, PC) Z_1, Z_2, \dots, Z_p , και είναι

γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών X που περιέχουν την πληροφορία και περιγράφουν το κάθε δείγμα – παρατήρηση X_1, X_2, \dots, X_n [51]

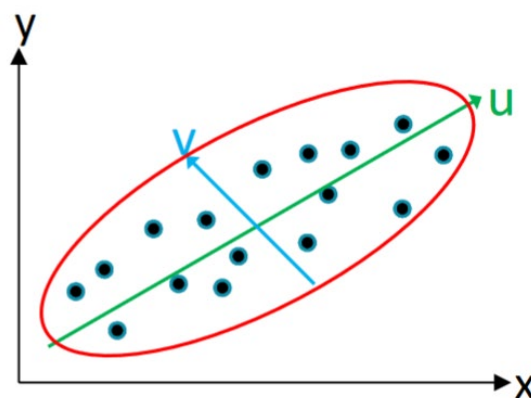
$$Z_1 = \alpha_{11}X_1 + \alpha_{12}X_2 + \alpha_{13}X_3 + \dots + \alpha_{1n}X_n$$

$$Z_2 = \alpha_{21}X_1 + \alpha_{22}X_2 + \alpha_{23}X_3 + \dots + \alpha_{2n}X_n$$

κλπ

Οι συντελεστές επιλέγονται έτσι ώστε οι νέες μεταβλητές (δηλαδή οι κύριες συνιστώσες), σε αντίθεση με τις αρχικές μεταβλητές, να μην σχετίζονται μεταξύ τους. Η δημιουργία ενός νέου συνόλου μεταβλητών με αυτόν τον τρόπο μπορεί να φαίνεται άσκοπη, καθώς λαμβάνουμε n νέες μεταβλητές στη θέση των n αρχικών, και επομένως δεν υπάρχει μείωση του όγκου των δεδομένων. Ωστόσο, οι κύριες συνιστώσες επιλέγονται επίσης έτσι ώστε η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) = Z_1 , να αντιπροσωπεύει την διεύθυνση που υπάρχει η μεγαλύτερη διασπορά στο σύνολο δεδομένων, η δεύτερη (PC2) = Z_2 , να αντιπροσωπεύει την αμέσως επόμενη διεύθυνση μεγαλύτερης διασποράς κ.ο.κ. Ως εκ τούτου, όταν παρουσιάζεται σημαντική συσχέτιση, ο αριθμός των χρήσιμων κυρίων μεταβλητών είναι πολύ μικρότερος από τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών. [51]

Γεωμετρικά το σύνολο των μεταβλητών X μπορεί να απεικονιστεί ως σημεία σε ένα πολυδιάστατο χώρο, στον οποίο οι μεταβλητές προσδιορίζουν τους άξονες. Για ένα γνωστό σύνολο δεδομένων $\{x, y\}$, καθορίζουμε την διεύθυνση στην οποία έχω την μεγαλύτερη διασπορά (u). Μετά βρίσκω την επόμενη διεύθυνση στην οποία έχω την αμέσως μεγαλύτερη διασπορά (v). Έτσι βρίσκουμε το νέο σύστημα συντεταγμένων $\{u, v\}$ που αναπαριστά με πιο συμπαγή τρόπο τα αρχικά δεδομένα.



8: Χαρακτηριστικό διάγραμμα των συντεταγμένων (score plot)

Η γραφική αυτή απεικόνιση που προκύπτει από τον μετασχηματισμό ονομάζεται διάγραμμα των συντεταγμένων (scores) [εικόνα 8], η οποία δίνει την σχετική θέση των αντικειμένων στο χώρο και παρέχει πληροφορίες για την μεταξύ τους σχέση. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώνεται η ύπαρξη ομάδων ή τάσεων. [51]

Στην στατιστική ανάλυση της τεχνικής των κυρίων συνιστωσών, για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται κάποιοι στατιστικοί δείκτες που μας υποδηλώνουν και αξιολογούν την ακρίβεια του μοντέλου μας: [52]

- Συντελεστής συσχέτισης R^2X :
είναι το κλάσμα του του αθροίσματος των τετραγώνων (SS) όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα
- Συνολικός συντελεστής συσχέτισης $R^2X_{(cumulative)}$:
το συνολικό άθροισμα των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις κύριες συνιστώσες
- Διασταυρωμένος-επικυρωμένος συντελεστής συσχέτισης Q^2 (cross-validated R^2):
το κλάσμα της συνολικής διακύμανσης των X που μπορεί να προβλεφθεί από την κύρια συνιστώσα
- Συνολικός Διασταυρωμένος-επικυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2_{(cumulative)}$:
Το συνολικό Q^2 για όλες τις κύριες συνιστώσες

4.3.2. Ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression PLSR)

Στην ποσοτική ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων, είναι συχνά πρακτικό να χρησιμοποιούνται δύο πολυμεταβλητοί χώροι, ένα για τις παραμέτρους-παρατηρήσεις και άλλες προγνωστικές μεταβλητές (X), και ένα για τα δεδομένα απόκρισης (Y). [48] Η ανάλυση παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (γνωστή και ως προβολή σε λανθάνουσες δομές), είναι μια πρόσφατη τεχνική που συνδυάζει χαρακτηριστικά και γενικεύει την τεχνική της ανάλυσης κύριας συνιστώσας PCA. Στόχος είναι να προβλέψει ένα σύνολο εξαρτημένων μεταβλητών Y από ένα σύνολο ανεξάρτητων μεταβλητών ή προγνωστικών X . [53] Μέθοδοι όπως το PLSR αναπτύσσουν μοντέλα που συνδέουν τους δύο χώρους X και Y . Όλα αυτά τα μοντέλα μπορούν να θεωρηθούν γραμμές και επίπεδα στους χώρους X και Y , παρόμοια με αυτή της τεχνικής PCA. [48]

Ένα από τα πιο κοινά προβλήματα ανάλυσης δεδομένων στην επιστήμη είναι το πρόβλημα της παλινδρόμησης, δηλαδή τον τρόπο μοντελοποίησης μία ή περισσότερων εξαρτημένων μεταβλητών (αποκρίσεις Y), μέσω ενός συνόλου μεταβλητών πρόβλεψης (προγνώσεις X). Παραδείγματα στην χημεία περιλαμβάνουν την συσχέτιση Y = ιδιότητες των χημικών δειγμάτων με X = τη χημική τους σύσταση, ή Y = χημικές ιδιότητες, αντιδραστικότητα ή βιολογική δραστηριότητα ενός συνόλου μορίων με X = τη χημική τους δομή κοκ. Αυτή η μοντελοποίηση του Y μέσω του X γίνεται με τη χρήση τεχνικής «Πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης MLR», η οποία λειτουργεί καλά εφόσον οι μεταβλητές X είναι αρκετά λίγες και αρκετά ασύνδετες. Επειδή όμως με τα σύγχρονα όργανα μέτρησης, συμπεριλαμβανομένων των φασματομέτρων και χρωματογράφων, οι μεταβλητές X τείνουν να είναι πολλές και επίσης ισχυρά συσχετισμένες. Επομένως δεν θα τις ονομάσουμε ανεξάρτητες αλλά αντ' αυτού προγνωστικές καθώς συνήθως είναι συσχετισμένες και με θόρυβο. [\[54\]](#)

Η τεχνική PCR μπορεί να αναλύσει δεδομένα με ισχυρά συγγραμμικές (σχετιζόμενες), με θόρυβο πολυάριθμες μεταβλητές πρόβλεψης X και επίσης να μοντελοποιήσει ταυτόχρονα πολλές μεταβλητές απόκρισης Y . Αντίθετα με την τεχνική PCA, που αποσυνθέτει το σύνολο X για να αποκτήσει συστατικά που εξηγεί καλύτερα το X , η παλινδρόμηση PLS βρίσκει στοιχεία από το X που προβλέπουν καλύτερα το σύνολο Y . Συγκεκριμένα αναζητά ένα σύνολο συστατικών (που ονομάζονται λανθάνοντα διανύσματα) που εκτελεί ταυτόχρονη αποσύνθεση του X και του Y με τον περιορισμό ότι αυτές οι συνιστώσες εξηγούν όσο το δυνατόν περισσότερο τη συνδιακύμανση μεταξύ X και Y . Το βήμα αυτό γενικεύει την PCA και ακολουθείται από ένα βήμα παλινδρόμησης όπου τα λανθάνοντα διανύσματα που λαμβάνονται από το X χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη του Y . [\[53\]](#)

Το μοντέλο PLSR αναπτύσσεται από ένα σετ N παρατηρήσεων – αντικειμένων πλήθους n (δείγματα, ενώσεις, χρονικά σημεία διεργασίας) και με πλήθος k X -μεταβλητών σχηματίζοντας τον πίνακα X και ένα σετ πλήθους n αποκρίσεων με πλήθος m Y -μεταβλητών, σχηματίζοντας τους δύο πίνακες X και Y .

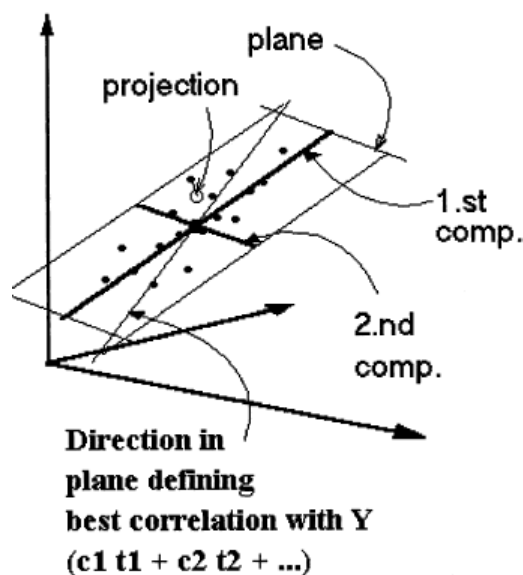
$$X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1k} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nk} \end{bmatrix} \quad Y = \begin{bmatrix} Y_{11} & Y_{12} & \dots & Y_{1m} \\ Y_{21} & Y_{22} & \dots & Y_{2m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ Y_{n1} & Y_{n2} & \dots & Y_{nm} \end{bmatrix}$$

Αργότερα, οι προβλέψεις για νέες παρατηρήσεις πραγματοποιούνται με βάση τα X -δεδομένα τους, όπου δίνουν τις προβλεπόμενες νέες μεταβλητές δεικτών πρόβλεψης (X -scores), τις υπολειπόμενες X μεταβλητές (αυτές που δεν χρησιμοποιούνται για την μοντελοποίηση του Y), τις τυπικές αποκλίσεις και τις τιμές y . [54]

Πριν την ανάλυση, οι X - και Y - μεταβλητές συχνά μετασχηματίζονται για να μετατραπούν οι κατανομές τους έτσι ώστε να είναι αρκετά συμμετρικές. Έτσι μεταβλητές με εύρος μεγαλύτερο του μεγέθους του 10, συχνά μετασχηματίζονται λογαριθμικά. Σε περίπτωση που εμφανιστεί μια μεταβλητή τιμής μηδέν, τότε ο τέταρτος μετασχηματισμός ρίζας είναι μια καλή εναλλακτική λύση στον λογάριθμο. Τα αποτελέσματα του μοντέλου PLSR εξαρτώνται από την κλιμακοποίηση των δεδομένων (scaling). Με την κατάλληλη κλιμάκωση, μπορεί κανείς να επικεντρώσει το μοντέλο σε πιο σημαντικές μεταβλητές Y και να χρησιμοποιήσει την εμπειρία για να αυξήσει την βαρύτητα των πιο ενημερωτικών μεταβλητών X . Η τυπική προσέγγιση των πολυμεταβλητών τεχνικών είναι πρωτίστως να κλιμακοποίηση κάθε μεταβλητής σε μοναδιαία διακύμανση διαιρώντας τις με τις τυπικές αποκλίσεις τους και δεύτερον κεντράρισμα τους αφαιρώντας τους μέσους όρους τους (αυτόματη κλιμάκωση). Αυτό επιτυγχάνει να αντιστοιχεί σε κάθε μεταβλητή (στήλη) το ίδιο βάρος και ίδια προτεραιότητα στην ανάλυση. Σε ορισμένες εφαρμογές, συνήθως στην χημεία, κατά την ανάλυση των χρωματογραφικών ή φασματογραφικών προφίλ, συνηθίζεται να κανονικοποιούνται (normalization) οι παρατηρήσεις των αντικειμένων. Η κανονικοποίηση γίνεται συνήθως κάνοντας το άθροισμα όλων των κορυφών ενός προφίλ να είναι 100 ή 1000. Αυτό αφαιρεί το μέγεθος των παρατηρήσεων – αντικειμένων, το οποίο μπορεί να είναι επιθυμητό εάν το μέγεθος δεν είναι σχετικό. [54]

Γεωμετρικά, η μέθοδος PLSR είναι μια μέθοδος προβολής και επομένως έχει μια απλή γεωμετρική ερμηνεία, ως η προβολή του πίνακα X (οι παρατηρήσεις N μπορούν να απεικονιστούν ως ένα σύνολο σημείων σε ένα K -πολυδιάστατο χώρο, στον οποίο οι μεταβλητές προσδιορίζουν τους άξονες) σε ένα υπερεπίπεδο A -διαστάσεων με τέτοιο τρόπο ώστε οι συντεταγμένες των προβολών να είναι καλοί προγνωστικοί παράγοντες του Y . Η κατεύθυνση του επιπέδου εκφράζεται ως κλίσεις p , της κάθε διεύθυνσης PLS του επιπέδου (κάθε συνιστώσα) ως προς κάθε άξονα συντεταγμένων, x . Έτσι η τεχνική αυτή αναπτύσσει ένα υπερεπίπεδο A -διάστασης στο X -χώρο τέτοιο ώστε αυτό το επίπεδο να προσεγγίζει καλά το X (τα N σημεία, διανύσματα σειρών του πίνακα X) και ταυτόχρονα τις θέσεις των προβαλλόμενων σημείων δεδομένων στο

επίπεδο αυτό, που περιγράφεται από τις νέες μεταβλητές t , που σχετίζονται με τις τιμές των αποκρίσεων Y και περιέχουν την πληροφορία που φέρουν οι αρχικές μεταβλητές. [54]

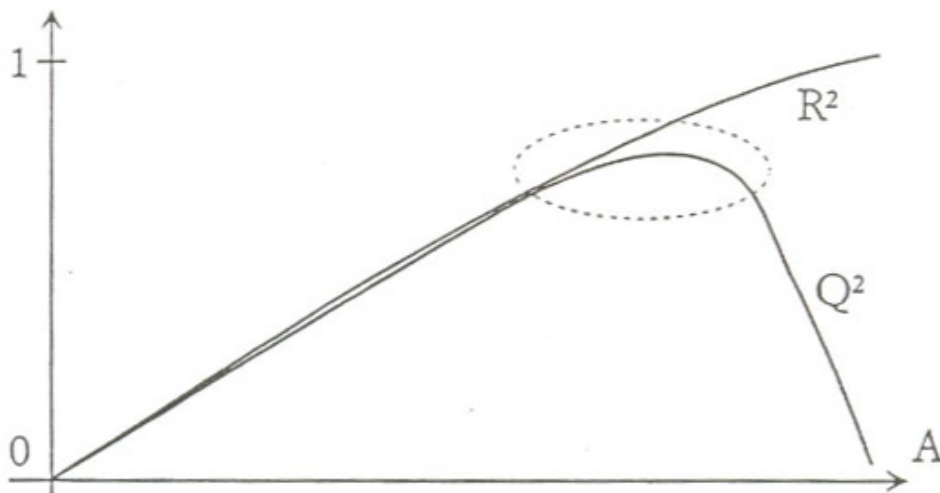


Εικόνα 9: Γεωμετρική απεικόνιση της τεχνικής PLSR [54]

Στην στατιστική ανάλυση του μοντέλου PLSR έχουν μεγάλη σημασία οι στατιστικοί δείκτες που χαρακτηρίζουν το μοντέλο, ο R^2 και Q^2 , οι οποίοι δείχνουν πόσο καλή είναι η εφαρμογή του μοντέλου που εξάχθηκε. Ο ολικός συντελεστής συσχέτισης (ή συντελεστής προσδιορισμού) R^2 ή $R^2_{(cumulative)}$ εκφράζει το ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας των y που εξηγείται (απορροφείται) από την παλινδρόμηση και παίρνει τιμές στο κλειστό διάστημα $[0, 1]$. Στην πρακτική εφαρμογή, συντελεστής αυτός για ένα μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης λαμβάνει τιμές από το 0 έως 1 και εκφράζει το ποσοστό της διακύμανσης που κατορθώνει να εξηγήσει το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης. Με λίγα λόγια δίνει ένα ανώτερο όριο για το πόσο καλά το μοντέλο εξηγεί τα δεδομένα και προβλέπει νέες παρατηρήσεις. Παράδειγμα, αν η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 για μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης είναι για παράδειγμα 0.48 αυτό σημαίνει ότι το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης είναι ικανό να εξηγήσει το 48% της διακύμανσης της εξαρτημένης μεταβλητής στο σύνολο εκπαίδευσης. [55]

Ο διασταυρωμένος-επικυρωμένος συντελεστής συσχέτισης Q^2 (cross-validated R_{cv}^2) αποτελεί βασικό στατιστικό στοιχείο για την τεχνική της PLSR καθώς καθορίζει

την βέλτιστη πολυπλοκότητα του μοντέλου και εκφράζει το σύνολο των Y που μπορούν να προβλεφθούν, παρέχοντας έτσι ένα εσωτερικό μέτρο συνέπειας μεταξύ των αρχικών και των διασταυρωμένων-επικυρωμένων δεδομένων πρόβλεψης. [54] Σε ένα μοντέλο με τυχαίες μεταβλητές, είναι κρίσιμο να καθορίσουμε τον βέλτιστο αριθμό λανθανόντων μεταβλητών για την συνέχιση της ανάπτυξης του μοντέλου. Η ποιότητα της πρόβλεψης σε ένα τυχαίο μοντέλο, δεν αυξάνεται πάντα με τον αριθμό των λανθανόντων μεταβλητών που χρησιμοποιούνται στο μοντέλο, αλλά συνήθως η ποιότητα πρώτα αυξάνεται και μετά μειώνεται. Αν η ποιότητα των προβλέψεων μειώνεται καθώς ο αριθμός των λανθανόντων μεταβλητών αυξάνεται, μας δείχνει ότι το μοντέλο μας βρίσκεται σε κατάσταση υπερπροσαρμογής (δηλαδή οι πληροφορίες που είναι χρήσιμες για να χωρέσουν τις παρατηρήσεις από το σύνολο εκμάθησης δεν είναι χρήσιμες για να χωρέσουν νέες παρατηρήσεις). Επομένως, είναι κρίσιμο να καθοριστεί ο βέλτιστος αριθμός λανθανόντων μεταβλητών που θα διατηρηθούν για την κατασκευή του μοντέλου. [53] Για το λόγο αυτό είναι σημαντικός ο διασταυρωμένος-επικυρωμένος συντελεστής συσχέτισης Q^2 , ο οποίος παρουσιάζει ένα μέγιστο, (αντίθετα με τον R^2 που κυμαίνεται μεταξύ του 0 και 100%) πέρα από το οποίο η εισαγωγή νέων συνιστωσών αν και φαίνεται να αυξάνει την περιγραφική ικανότητα του μοντέλου, μειώνει την προβλεπτική του ικανότητα, όπως φαίνεται από την *εικόνα 10*. [52]



Εικόνα 10: Σύγκριση αποτύπωσης διαγραμμάτων R^2 και Q^2 [52]

4.3.3. Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial least squares-discriminant analysis PLS-DA)

Το πρόβλημα που αντιμετωπίζεται με την διακριτική ανάλυση είναι ο βαθμός στον οποίο είναι δυνατός ο διαχωρισμός δύο ή περισσότερων ομάδων ξεχωριστών παρατηρήσεων, παρέχοντας πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για τις ξεχωριστές αυτές παρατηρήσεις σε διάφορες μεταβλητές.^[56] Η διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων προέρχεται από την παλινδρόμηση PLSR και είναι μια τεχνική ταξινόμησης, δηλαδή μια τεχνική για τον προσδιορισμό σε ποια ομάδα είναι πιο πιθανό να ανήκει ένα δείγμα από ένα σύνολο αναλυτικών μετρήσεων. Ενώ με την μέθοδο της PCA που αναφέρθηκε προηγουμένως καταγράφονται οι παρατηρήσεις στο γεωμετρικό χώρο με τον βέλτιστο δυνατόν τρόπο, δεν μας εγγυάται τον βέλτιστο διαχωρισμό τους σε ομάδες και για το λόγο αυτό τίθεται σε εφαρμογή η μέθοδος PLS-DA.^[57]

Στην γενική περίπτωση θα υπάρχουν m τυχαία δείγματα από διαφορετικές ομάδες, με μεγέθη $n_1, n_2, n_3, \dots, n_m$, και οι τιμές θα είναι διαθέσιμες για τις μεταβλητές p $X_1, X_2, X_3, \dots, X_p$ για κάθε δείγμα. Έτσι, τα δεδομένα για μια διακριτική ανάλυση θα έχουν την μορφή που φαίνεται παρακάτω στον *πίνακα 4*.

Κεφάλαιο 4 – Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές και χημειομετρικές αναλύσεις

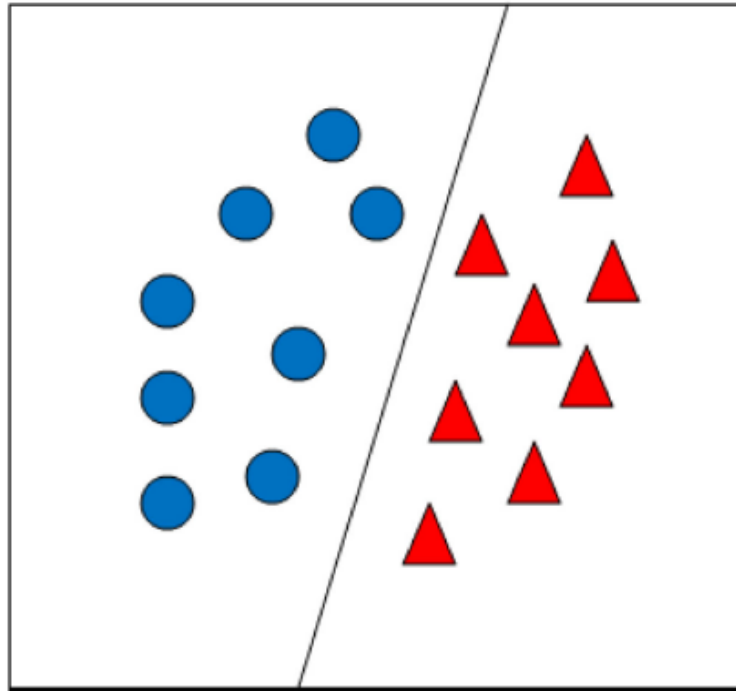
Πίνακας 4: Η μορφή δεδομένων για μια διακριτική ανάλυση με m ομάδες με πιθανώς διαφορετικά μεγέθη και p μεταβλητές που μετρούνται σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση

Περίπτωση	X_1	X_2	...	X_p	Ομάδα
1	X_{111}	X_{112}	...	X_{11p}	1
2	X_{211}	X_{212}	...	X_{21p}	1
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
n_1	X_{n_111}	X_{n_112}	...	X_{n_11p}	1
<hr/>					
1	X_{121}	X_{122}	...	X_{12p}	2
2	X_{221}	X_{222}	...	X_{22p}	2
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
n_2	X_{n_221}	X_{n_222}	...	X_{n_22p}	2
<hr/>					
1	X_{1m1}	X_{1m2}	...	X_{1mp}	m
2	X_{2m1}	X_{2m2}	...	X_{2mp}	m
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
n_m	$X_{n_m m1}$	$X_{n_m m2}$...	$X_{n_m mp}$	m

Τα δεδομένα για μια συνάρτηση διακριτικής ανάλυσης δεν χρειάζεται να είναι κανονικοποιημένα ώστε να έχουν μηδενικές διακυμάνσεις μέσω πριν από την έναρξη της ανάλυσης, καθώς το αποτέλεσμα μιας τέτοιας ανάλυσης δεν επηρεάζεται με κανέναν σημαντικό τρόπο από την κλιμάκωση των μεμονωμένων μεταβλητών, όπως συμβαίνει αντιθέτως με την τεχνική της PCA. [\[57\]](#)

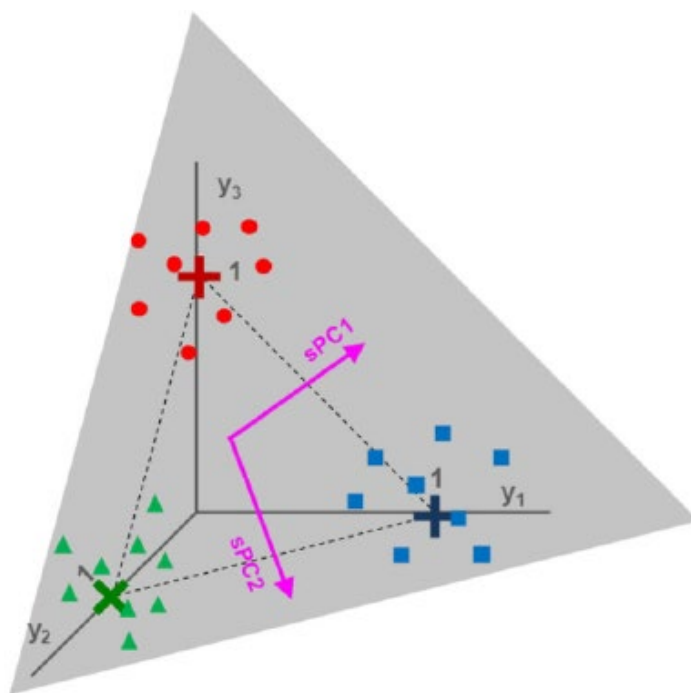
Υπάρχουν πολλαπλοί αλγόριθμοι PLS και τις επεκτάσεις τους για διακριτική ανάλυση. Υπάρχει ο αλγόριθμος PLS1 στον οποίο υπάρχουν δύο ομάδες δειγμάτων και ο στόχος είναι να αποφασιστεί σε ποια από τις δύο ομάδες ανήκει ένα δείγμα, καθώς και ο αλγόριθμος PLS2 ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν υπάρχουν περισσότερες από δύο ομάδες. Η ανάλυση διάκρισης μερικών ελαχίστων τετραγώνων μπορεί να θεωρηθεί ως ένας γραμμικός ταξινομητής δύο κλάσεων. Δηλαδή, η μέθοδος στοχεύει να βρει μια ευθεία γραμμή που χωρίζει το χώρο σε δύο περιοχές [\[εικόνα 11\]](#), το οποίο απεικονίζει μια πιθανή συνάρτηση διάκρισης για δύο ομάδες, με τα δείγματα

στα αριστερά να ανήκουν στην ομάδα που αντιπροσωπεύεται από μπλε κύκλους και τα δείγματα δεξιά στην ομάδα από κόκκινα τρίγωνα. [57]



Εικόνα 11: Ένα γραμμικός διαχωριστής δύο τάξεων για δύο ομάδες που χαρακτηρίζονται από δύο μεταβλητές

Ο στόχος του PLS-DA είναι να βρεθεί αυτός ο διαχωριστής (ή συνάρτηση απόφασης). Φυσικά, όταν υπάρχουν περισσότερες από δύο μεταβλητές, θα αντιπροσωπεύεται από ένα υπερεπίπεδο σε πολυδιάστατο χώρο. Η γεωμετρία του PCA για την περίπτωση 3 κλάσεων εμφανίζεται στην *εικόνα 12*. Τα στοιχεία του πίνακα φαίνονται με τα χρωματιστά σημάδια (κουκίδες, τετράγωνα και τρίγωνα) τα οποία ανήκουν στις 3 κατηγορίες. Όλα αυτά τα σημεία βρίσκονται σε ένα επίπεδο (το γκρι σκιασμένο τρίγωνο) το οποίο διέρχεται από τα σημεία μοτίβου κλάσης $e_1 = (1,0,0)$, $e_2 = (0,1,0)$ και $e_3 = (0,0,1)$ όπου εμφανίζονται με τους σταυρούς. Αυτό το επίπεδο είναι στην πραγματικότητα ο χώρος αποκρίσεων του PCA και οι άξονες των κυρίων συνιστωσών εμφανίζονται με τα βέλη με μωβ χρώμα. [58]



Εικόνα 12: Γεωμετρικός χώρος του PLS-DA στην περίπτωση 3 κλάσεων [\[58\]](#)

Όπως και στις προηγούμενες τεχνικές PCA και PLS, έτσι και στην PLS-DA έχουμε τους ίδιους στατιστικούς δείκτες,

- τον συνολικό συντελεστή συσχέτισης (ή συντελεστή προσδιορισμού) R^2 που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής μεταβλητότητας των y που εξηγείται (απορροφείται) από την παλινδρόμηση και
- τον διασταυρωμένο-επικυρωμένο συντελεστή συσχέτισης Q^2 που καθορίζει την βέλτιστη πολυπλοκότητα του μοντέλου και εκφράζει το σύνολο των Y που μπορούν να προβλεφθούν

Όμως, παρουσιάζονται και 2 άλλοι δείκτες του R^2 :

- ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης των X , $R^2X_{(cumulative)}$ που εκφράζει το συνολικό άθροισμα των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις κύριες συνιστώσες και
- ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης των Y , $R^2Y_{(cumulative)}$ που εκφράζει το συνολικό άθροισμα των τετραγώνων όλων των εξαρτημένων μεταβλητών X που ερμηνεύεται από όλες τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες

4.3.4. Μοντελοποίηση κλάσης (Class modeling)

Στις επιστήμες των τροφίμων κυρίως υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός πρακτικών περιπτώσεων που απαιτούν μια αναλυτική λύση και αρκούνται σε ποιοτικές απαντήσεις έναντι ποσοτικών αποτελεσμάτων. Τυπικά παραδείγματα αποτελούν οι έλεγχοι σχετικά με την ταυτότητα και την ποιότητα των συστατικών ή των τελικών προϊόντων, επαληθεύοντας την παρουσία ή απουσία στοχευμένων ουσιών και κατ' επέκταση τη γνησιότητα των δειγμάτων που θα πρέπει να συμμορφώνονται με τους συγκεκριμένους νομοθετικούς κανόνες παρασκευής οι οποίοι αναφέρονται στις προδιαγραφές του προϊόντος. [\[59\]](#)

Επομένως, για τις ποιοτικές αυτές αναλύσεις, καταλληλότερες έχουν αποδειχθεί μέθοδοι που δημιουργούν μαθηματικά μοντέλα ικανά να χαρακτηρίσουν ένα δείγμα σε σχέση με μια ποιοτική ιδιότητα η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως συμμετέχοντα σε μια συγκεκριμένη κλάση που πρέπει να οριστεί κατάλληλα. Πρόκειται για μια ομάδα χημειομετρικών τεχνικών που ασχολείται με την ανάπτυξη μοντέλων για την επιβεβαίωση της γνησιότητας ενός αριθμού δειγμάτων. Δύο κατηγορίες μεθόδων αναγνώρισης πολυμεταβλητού μοτίβου ικανοποιούν αυτές τις απαιτήσεις, η διακριτική ταξινόμηση που αναφέρθηκε με την PLS-DA και η μοντελοποίηση κλάσεως. [\[59\]](#) Ο στόχος των τεχνικών αυτών είναι να εξάγουν, με βάση ένα σύνολο αντικειμένων/ παρατηρήσεων με γνωστή κατηγοριοποίησή (σετ εκπαίδευσης), μια ταξινόμηση ή κανόνες απόφασης που στην συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση δειγμάτων άγνωστης προελεύσεως. [\[60\]](#)

Η διακριτική προσέγγιση αντιστοιχίζει τα δείγματα σε μία κλάση μεταξύ ενός αριθμού προκαθορισμένων κλάσεων (τουλάχιστον δύο). Αντίθετα, η μοντελοποίηση κλάσης (αναφέρεται και ως ταξινόμηση μιας κλάσεως), ορίζει εάν ένα δείγμα είναι συμβατό ή όχι με τα χαρακτηριστικά μιας μεμονωμένης κατηγορίας που μας ενδιαφέρει (ή σε μια μεμονωμένη κατηγορία την φορά, στην περίπτωση περισσότερων σχετικών μεταξύ τους κλάσεις). Αυτές οι θεμελιώδεις διαφορές έχουν πολύ σημαντικές πρακτικές επιπτώσεις. Ενώ στη διακριτική προσέγγιση είναι σημαντικό όλες οι κλάσεις να ορίζονται όχι μόνο με κάποιο νόημα αλλά και να δειγματίζονται με πλήρως αντιπροσωπευτικό τρόπο – δύσκολα εκπληρωμένη απαίτηση σε πολλές πραγματικές καταστάσεις – όπως για παράδειγμα στην περίπτωση επαλήθευσης της συμμόρφωσης των δειγμάτων με μια δεδομένη προδιαγραφή (πχ προστατευόμενες

ονομασίες προέλευσης, γεωγραφικές ενδείξεις, ποιότητα συστατικών, διαδικασία παρασκευής), στην περίπτωση κατηγορίας μη στόχου (μη συμμορφωμένων δειγμάτων) ορίζεται ακατάλληλα και δειγματοληπτείται ελάχιστα. Αντιθέτως, καταστάσεις όπως αυτές μπορούν να αντιμετωπιστούν σωστά με τεχνικές μοντελοποίησης τάξεως, οι οποίες χρειάζονται απλώς ένα αντιπροσωπευτικό σύνολο δείγματος για την κλάση – στόχο για να δημιουργήσουν αμερόληπτα μοντέλα επαλήθευσης.^[59] Έτσι, αφού εφαρμοστούν σε προβλήματα που εμπίπτουν σε σενάρια ασύμμετρης ταξινόμησης στα οποία τα εξωτερικά αντικείμενα είναι γενικά πολύ ετερογενή για να ομαδοποιηθούν σε μια εναλλακτική κλάση, θα μας προσδιορίσουν εάν ένα νέο δείγμα ανήκει στην κλάση που προσδιορίστηκε ή είναι έκτροπη τιμή (outlier).^[61]

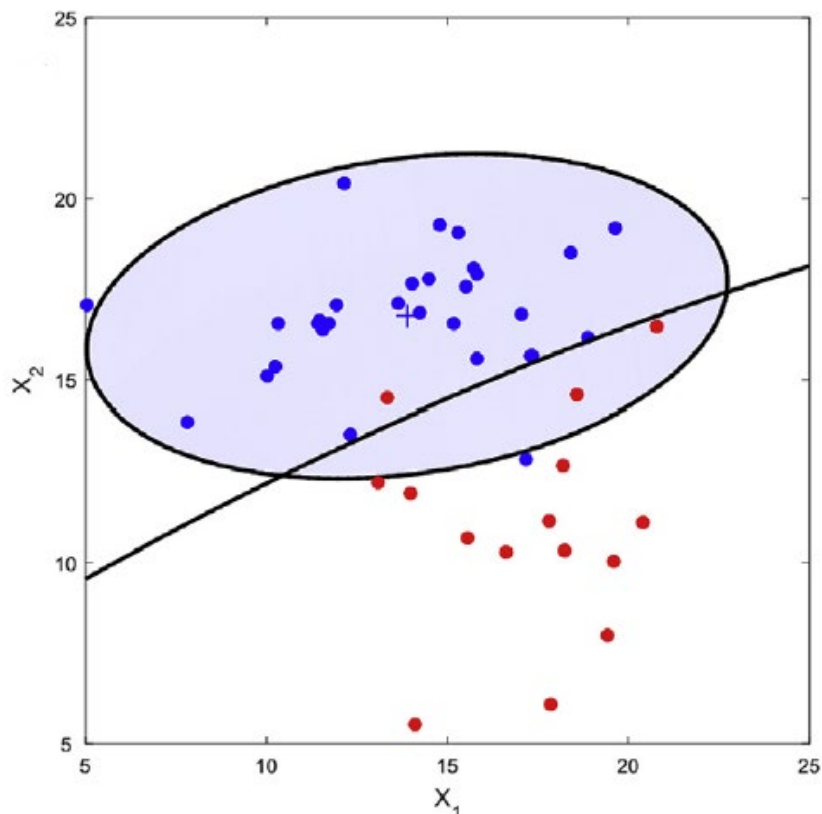
Υπάρχουν διάφορες χημειομετρικές τεχνικές μοντελοποίησης κλάσεως, όπως το μοντέλο άνισων διασκορπισμένων τάξεων UNEQ, μέθοδοι δυναμικής λειτουργίας PFM και η μέθοδος με τη οποία θα ασχοληθούμε στην παρούσα διπλωματική έρευνα για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η ήπια ανεξάρτητη μοντελοποίηση αναλογίας κλάσεων SIMCA. Εισαγμένη στον κόσμο της χημειομετρίας από τον Svante Wold, η SIMCA είναι μια μη πιθανολογική μέθοδος μοντελοποίησης βασισμένη στην απόσταση. Τα μοντέλα αυτά βασίζονται στις κύριες συνιστώσες (principal components), οι οποίες είναι όπως προαναφέρθηκαν οι κατευθύνσεις της μέγιστης διακύμανσης (και επομένως της μέγιστης πληροφορίας) σε ένα πολυμεταβλητό χώρο δεδομένων και υπολογίζονται ανεξάρτητα για κάθε μία από τις κλάσεις ενδιαφέροντος. Για τον σκοπό αυτό, τα δεδομένα μετασχηματίζονται αρχικά με αυτόματη κλιμάκωση της στήλης βασισμένης σε κλάσεις ή με τη μέση τιμή της στήλης, καθένα από τα οποία μετατοπίζει την αρχή των αξόνων αναφοράς ώστε να συμπίπτει με το κέντρο της κλάσης. Στη συνέχεια, εκτελείται PCA, με μια περιστροφή γύρω από το κέντρο της κλάσης, και ο αριθμός των σημαντικών κυρίων συνιστωσών αξιολογείται μέσω μιας διαδικασίας διπλής διασταυρούμενης επικύρωσης. Οι σημαντικές κύριες συνιστώσες ορίζουν τον λεγόμενο εσωτερικό χώρο του μοντέλου της SIMCA.^[59]

Στο γεωμετρικό χώρο, τα δείγματα εκπαίδευσης για την κλάση που πρόκειται να μοντελοποιηθεί προβάλλονται στις σημαντικές κύριες συνιστώσες, λαμβάνοντας τιμές συντεταγμένων για κάθε δείγμα σε κάθε κύρια συνιστώσα. Έτσι, ένα τέτοιο μοντέλο έχει το σχήμα ενός ευθύγραμμου τμήματος (εσωτερικός χώρος μίας διάστασης), ενός ορθογωνίου (εσωτερικός χώρος δύο διαστάσεων), ενός παραλληλεπίπεδου ή

υπερπαραλληλεπίπεδου (εσωτερικός χώρος τριών ή παραπάνω διαστάσεων). Στη συνέχεια οι «τιμές υπολείμματα», οι οποίες είναι οι αποστάσεις μεταξύ κάθε δειγμάτων και του εξωτερικού χώρου της SIMCA (ο χώρος του μοντέλου που χαρακτηρίζεται από τις μη σημαντικές κύριες συνιστώσες), υπολογίζονται και χρησιμοποιούνται για να ορίσουν μια απόσταση από το μοντέλο κλάσης (OD) σε συνδυασμό με την απόσταση των σημείων - αποτελεσμάτων του εσωτερικού χώρου (ID, για να οριστεί η λεγόμενη επαυξημένη απόσταση SIMCA από το δείγμα s στην κλάση C .

$$d_{s,C} = \sqrt{ID_{s,C}^2 + OD_{s,C}^2}$$

Η κρίσιμη τιμή αυτής της απόστασης, η οποία καθορίζει την αποδοχή/απόρριψη ενός νέου δείγματος από το μοντέλο, ορίζεται από την κρίσιμη τιμή των στατιστικών Fisher σε ένα προκαθορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης, δεδομένου ότι οι τιμές υπολείμματα υποτίθεται ότι ακολουθούν μια πολυμεταβλητή κανονική κατανομή. [59]



13: Απεικόνιση γεωμετρικού χώρου δειγμάτων σε τεχνική διακριτικής ανάλυσης και τεχνική μοντελοποίησης τάξεως. / Σετ 2 μεταβλητών: στοχευμένα δείγματα (μπλε κύκλοι), μη στοχευμένα δείγματα (κόκκινοι κύκλοι) / Μαύρες γραμμές: οριοθέτες (διακριτική προσέγγιση) / Ελλείψεις: χώρος κλάσης της στοχευμένης κατηγορίας κλάσης (μοντελοποίηση τάξεως) [59]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. Σκοπός

Ο σκοπός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι η ανάπτυξη μιας «πράσινης» ηλεκτροχημικής μεθόδου φιλική προς το περιβάλλον, η οποία βασίζεται σε βολταμετρικές μεθόδους για την ανίχνευση και καταγραφή ενός μοναδικού ηλεκτροχημικού «δαχτυλικού αποτυπώματος» για τα δείγματα των μελιών προκειμένου να είναι εφικτή η αναγνώριση και ο διαχωρισμός μεταξύ των διαφόρων βοτανικών κατηγοριών τους. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, απαιτήθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων μελιού για κάθε μία από τις τέσσερις βοτανικές κατηγορίες, όπως αυτή του θυμαριού, της ερείκης, του πορτοκαλιού και του πεύκου. Πραγματοποιήθηκαν τρεις βασικές πειραματικές μεθοδολογίες όπου σε κάθε μία από αυτές, τα επεξεργασμένα δείγματα μελιών μελετήθηκαν σε σύστημα βολταμετρικών αναλύσεων με τη χρήση δύο διαφορετικών ηλεκτροδίων (χρυσού και λευκόχρυσου) και δύο διαφορετικών βολταμετρικών τεχνικών (κυκλική και διαφορική παλμική βολταμμομετρία) για την μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Ακολούθως, τα δεδομένα που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με τη χρήση χημειομετρικών τεχνικών μέσω υπολογιστικού προγράμματος. Οι τεχνικές αυτές διακρίνονται στις μη εποπτευόμενες μεθόδους, όπως η μέθοδος της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA), και στις εποπτευόμενες μεθόδους όπως η μέθοδος της διακριτής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) και μοντελοποίησης ταξινόμησης μιας κλάσεως (Class Modeling). Συνοψίζοντας, θα αξιολογηθούν η κάθε μία από τις τεχνικές αυτές ως προς την ακρίβεια και την δυνατότητα τους για την ταξινόμηση των βοτανικών κατηγοριών, προκειμένου να βρεθεί ο αποδοτικότερος συνδυασμός παραμέτρων που οδηγούν στα βέλτιστα αποτελέσματα.

5.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός και δείγματα μελιού

Οι ηλεκτροαναλυτικές αναλύσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση συστήματος βολταμετρικών αναλύσεων 797 Computrace της Ελβετικής εταιρείας Metrohm, το οποίο συνδέεται και επικοινωνεί με

ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω θύρας USB. Το εν λόγω σύστημα βολταμετρικών αναλύσεων απεικονίζεται στην εικόνα 14.



14: Το σύστημα βολταμετρικών αναλύσεων Computrace 797 VA

Το εν λόγω όργανο έχει ενσωματωμένο έναν ποτενσιοστάτη νέας τεχνολογίας μαζί με γαλβανοστάτη, που επιτυγχάνει πολύ καλή αξιοπιστία με μειωμένο θόρυβο μετρήσεων. Ως ηλεκτρόδιο εργασίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν το ηλεκτρόδιο υδραργύρου πολλαπλών χρήσεων (multimode electrode), στερεά ηλεκτρόδια (υαλώδους άνθρακα, λευκόχρυσου, χρυσού, αργύρου) ή εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος (screen printed electrodes). Το ηλεκτρόδιο υδραργύρου πολλαπλών χρήσεων μπορεί να λειτουργήσει με επιλογή της κατάλληλης υποδοχής που σημειώνεται, είτε ως σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (dropping mercury electrode, DME), είτε ηλεκτρόδιο αιωρούμενης σταγόνας υδραργύρου (hanging 51 mercury drop electrode, HMDE), είτε ως ηλεκτρόδιο στατικής σταγόνας υδραργύρου (static mercury drop electrode SMDE). Σε κάθε περίπτωση, η λειτουργία του ηλεκτροδίου υδραργύρου πολλαπλών χρήσεων επιτυγχάνεται με την πίεση φιάλης αζώτου με την οποία συνδέεται το σύστημα βολταμετρικών αναλύσεων για την απαερίωση των διαλυμάτων πριν την ανάλυση με σκοπό την αφαίρεση του διαλυμένου οξυγόνου στο προς ανάλυση διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται στον αναλυτή η δυνατότητα να εκτελέσει διάφορες βολταμετρικές τεχνικές, όπως Πολαρογραφία, Ανοδική και

Κεφάλαιο 5 – Πειραματική διαδικασία

Καθοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία, Κυκλική Βολταμμετρία, Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία, Χρονοαμπερομετρία και Χρονοποτενσιομετρία.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τα ηλεκτρόδια εργασίας (working electrodes, WE) που χρησιμοποιήθηκαν είναι το ηλεκτρόδιο χρυσού (Au) και το ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου (Pt) [εικόνα 15]. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς (reference electrode, RE), χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο αργύρου – χλωριούχου αργύρου (Ag/AgCl) με γέφυρα άλατος χλωριούχου καλίου (KCl) 3M και ως βοηθητικό ηλεκτρόδιο σύρμα λευκόχρυσου (Pt). Ταυτόχρονα έχει την δυνατότητα σύνδεσης με αυτόματο συλλέκτη δειγμάτων (π.χ. 863 Compact Autosampler) που διατίθεται από την εταιρεία Metrohm για την αυτοματοποίηση των προσδιορισμών. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του συστήματος βολταμμετρικών αναλύσεων 797 VA Computrace απεικονίζονται στον *πίνακα 5*.

Πίνακας 5: Τεχνικά χαρακτηριστικά του συστήματος βολταμμετρικών αναλύσεων Computrace 797 VA

Σύστημα Ανάδευσης	Από 200 έως 3000 στροφές/min (ο αναδευτήρας είναι κατασκευασμένος από PET)
Όγκος Κυψελίδας	10-17 mL και 50-150mL (δυνατότητα θερμοστάτησης)
Μετρούμενη ένταση ρεύματος	7 τάξεις μεγέθους (από 10 nA έως 10 mA)
Ρυθμός Σάρωσης	<1 mV/s έως 3V/s (διαχωριστότητα 1mV) <1 mV/s έως 35 V/s (διαχωριστότητα 10mV)
Θερμοκρασία Λειτουργίας Οργάνου	0-45 °C (20-80% σχετική υγρασία)

Το σύστημα βολταμμετρικών αναλύσεων συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού που το συνοδεύει για τον προγραμματισμό των λειτουργιών του συστήματος (π.χ. χρόνος απαερίωσης, ρυθμός σάρωσης του δυναμικού, ταχύτητα ανάδευσης περιστρεφόμενου ηλεκτροδίου), την καταγραφή και την αξιολόγηση των ηλεκτροχημικών δεδομένων. Παράλληλα, το πρόγραμμα διαθέτει και ειδική «σελίδα» ελέγχου καλής λειτουργίας βασικών τμημάτων του πολαρογράφου, όπως των ηλεκτροδίων, του αναδευτήρα (stirrer) και του συστήματος απαερίωσης (purging).



Εικόνα 15: Ηλεκτρόδια εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν

Δείγματα μελιού

Για την διεκπεραίωση του πειραματικού τμήματος της παρούσας διπλωματικής εργασίας συλλέχθηκε ένας μεγάλος αριθμός τυποποιημένων μελιών των τεσσάρων βοτανικών προελεύσεων από την Ελληνική αγορά. Συνολικά συλλέχθηκαν 51 μέλια από διάφορα μέρη της Ελλάδας, κυρίως από τις ευρέως διαδεδομένες περιοχές παραγωγής μελιού όπως Κρήτη, Πελοπόννησο, Εύβοια και διάφορα νησιά των Κυκλάδων. Συγκεκριμένα, τα 51 δείγματα απαρτίζονται από 13 μέλια θυμαριού, 12 μέλια ερείκης, 13 μέλια πορτοκαλιάς και 13 μέλια πεύκου. Η αποθήκευση των μελιών πραγματοποιήθηκε σε σκιερό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου καθ' ότι στη βιβλιογραφία αναγράφεται για το μέλι ότι δεν αλλοιώνεται λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σακχάρων που εμπεριέχει εκτός της περιπτώσεως εκτεταμένης έκτασης του σε υψηλές θερμοκρασίες ή σε συνεχές ήλιο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες με όλα τα μέλια των τεσσάρων διαφορετικών βοτανικών κατηγοριών με τις αντίστοιχες κωδικές ονομασίες των δειγμάτων (που αποτελούν και το υπόμνημα στα χημειομετρικά διαγράμματα για τον διαχωρισμό τους), τις εμπορικές τους ονομασίες και τους τόπους προελεύσεως τους, οι οποίοι αποτυπώνονται συγκεντρωτικά και στον χάρτη της Ελλάδος παρακάτω.

Κεφάλαιο 5 – Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 6: Μέλια θυμαριού που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν

Μέλι Θυμαριού		
α/α	Όνομασία	Γεωγραφική Προέλευση
a1	Σπύρος Λάζαρης	Λευκάδα
a2	Melira	Κυκλάδες
a3	Μελιπεια Γη	Αργολίδα
a4	Melefsis	Νησιά Σαρωνικού
a5	Μελίγυρις	Ηράκλειο Κρήτης
a6	Θαύμα Θεών	Δωδεκανήσου
a7	Μελομανία	Χανιά
a8	Melirryto	Λασιίθι (Κρήτη)
a9	Carpo	Τήνο
a10	Το Καλαβρυτινό	Καλάβρυτα
a11	Vasilissa	Εύβοια
a12	Χρυσόμελο	Μεσσηνία
a13	Μελίδωρον	Κεντρική & Ανατολική Κρήτη

Πίνακας 7: Μέλια ερείκης που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν

Μέλι Ερείκης		
α/α	Όνομασία	Γεωγραφική Προέλευση
b1	My Precious	Κύθηρα
b2	Κτήμα Φουγκά	Ηλεία
b3	Helmos	Χελμός
b4	Mèli	Ίος
b5	Μέλι Σερρών	Σέρρες
b6	Άξιον Εστί	Ορεινή Αρκαδία Και Εύβοια
b7	Χρυσόμελο	Χαλκιδική
b8	Λαγκάδια Αρκαδίας	Αρκαδία
b9	Μελομανία	*Ελληνικής προέλευσης
b10	Αρινίτα	Αρκαδία Ή Μαίναλο
b11	Μελίδωρον	Νοτιοανατολική Πελοπόννησος
b12	Όλα Βίο	*Ελληνικής προέλευσης

Κεφάλαιο 5 – Πειραματική διαδικασία

Πίνακας 8: Μέλια πορτοκαλιάς που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν

Μέλι Πορτοκαλιάς		
α/α	Όνομασία	Γεωγραφική Προέλευση
c1	Melefsis	Ανατολική Πελοπόννησο
c2	Μέλι Σερρών	Σέρρες
c3	Χρυσόμελο	Αργολίδα
c4	Biohoney	Άργος
c5	Physis	Ηράκλειο Κρήτης
c6	Χαράλαμπος Φωτόπουλος	Ταΰγετος
c7	Μελομανία	Χανιά
c8	Helmos	Χελμός
c9	Μελίδωρον	Λακωνία & Αργολίδα
c10	Macronita	Άρτα
c11	Κτήμα Τοπλού	Σητεία
c12	Γύρη Γύρη	Ηλεία
c13	Μέλι Λακωνίας	Λακωνία

Πίνακας 9: Μέλια πεύκου που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν

Μέλι Πεύκου		
α/α	Όνομασία	Γεωγραφική Προέλευση
d1	Μέλι Θάσου	Θάσος
d2	Άξιον Εστί	Βόρεια Εύβοια
d3	Χρυσόμελο	Εύβοια
d4	Biohoney	Βόρεια Εύβοια
d5	Λαγκάδια Αρκαδίας	Αρκαδία
d6	Helmos	Χελμός
d7	Όλα Βίο	*Ελληνικής προέλευσης
d8	Μέλι Μεσσηνιακής Μάνης	Μάνη
d9	Μελίδωρον	Εύβοια
d10	Χαράλαμπος Φωτόπουλος	Ταΰγετος
d11	Kostas	*Ελληνικής προέλευσης
d12	Γαλαξίας	*Ελληνικής προέλευσης
d13	Μελομανία	Κρήτη



Εικόνα 16: Χάρτης τοποθεσιών των μελιού που συλλέχθηκαν ανά βοτανική προέλευση



Εικόνα 17: Φωτογραφία μελιών που συλλέχθηκαν

5.3. Πειραματικές μέθοδοι

Στην παρούσα διπλωματική εργασία δοκιμάστηκαν τρεις ξεχωριστές πειραματικές μεθοδολογίες και κατεργασίες δειγμάτων, όπου στην κάθε μία ξεχωριστά πραγματοποιήθηκαν πολλαπλοί πειραματισμοί στις παραμέτρους και στα αντιδραστήρια προκειμένου να καταλήξουν στον συνδυασμό με τα βέλτιστα αποτελέσματα για την αντίστοιχη μέθοδο. Όλες οι παρακάτω μέθοδοι δοκιμάστηκαν στις τεχνικές της κυκλική βολταμμετρίας και της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας.

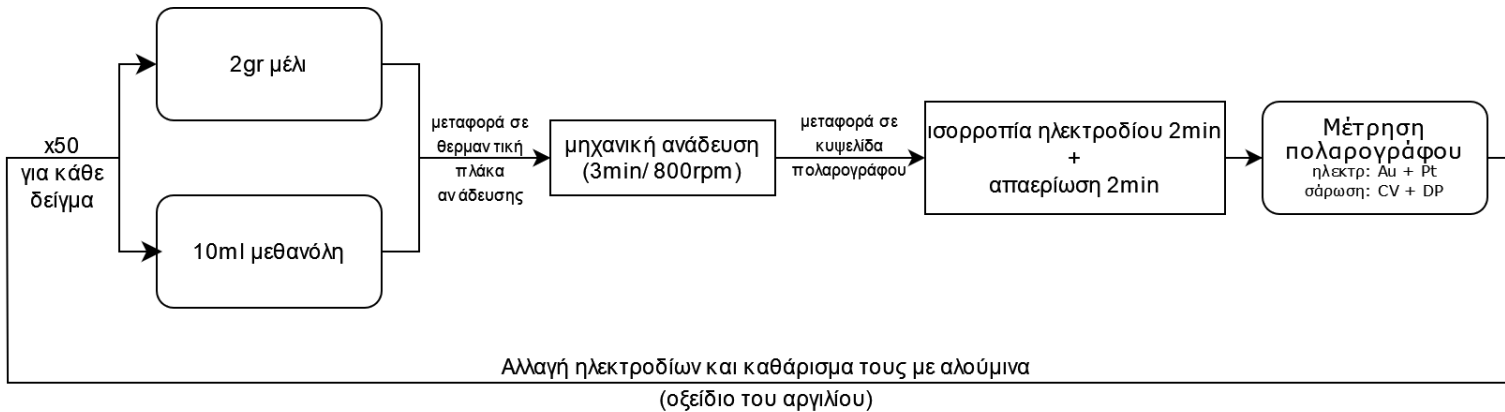
5.3.1. Μεθοδολογία A – απλή διαλυτοποίηση/εκχύλιση

Η πρώτη πειραματική μεθοδολογία που δοκιμάστηκε για την ανάλυση των μελιών με βολταμμετρικές τεχνικές, είναι αυτή της απλής διαλυτοποίησης ή εκχύλισης των μελιών με νερό ή άλλα αντιδραστήρια. Η κατεργασία των δειγμάτων που επέφερε τα βέλτιστα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων συνδυασμών που πραγματοποιήθηκαν αναλύεται παρακάτω.

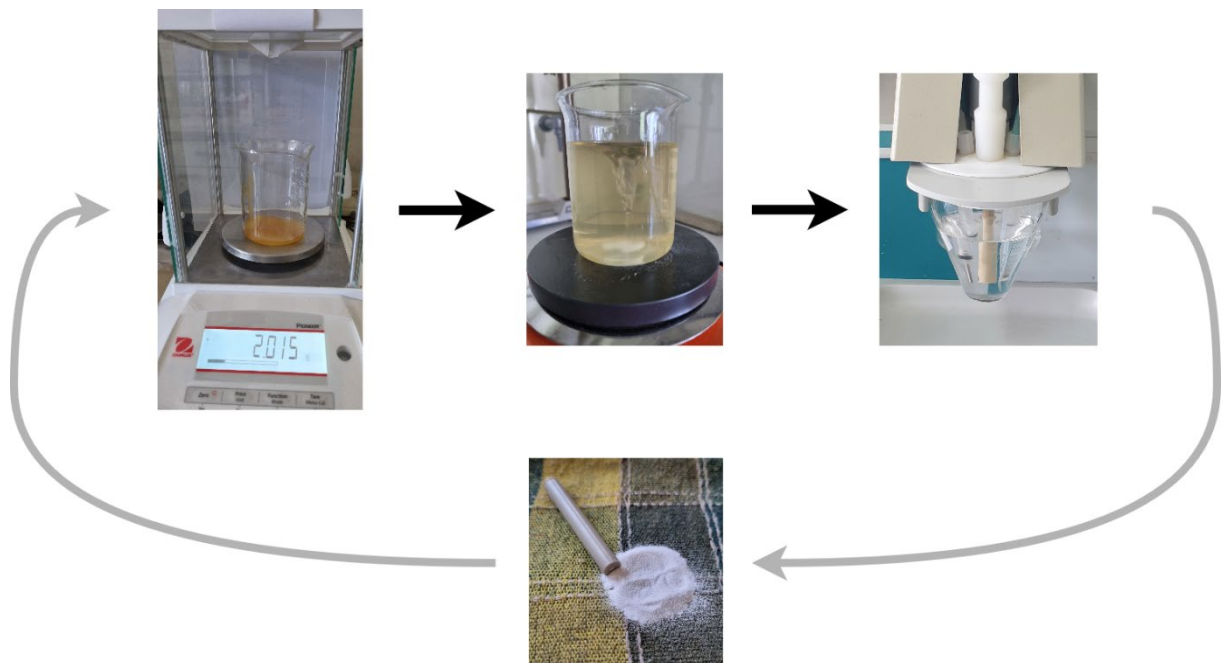
Αρχικά συλλέχθηκαν 2 γραμμάρια δείγματος μελιού σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε σε αυτό 10mL μεθανόλης. Για την ανάμειξη τους και την διαλυτοποίηση του μελιού στην μεθανόλη, προστίθεται ένας ειδικός μαγνήτης ανάδευσης και το ποτήρι ζέσεως με το ετερογενές μίγμα τοποθετείται πάνω σε θερμαντική πλάκα μαγνητικής ανάδευσης. Η συσκευή ρυθμίστηκε να λειτουργεί στις 800 στροφές ανά λεπτό (rpm) και χωρίς θέρμανση στην προκειμένη μέθοδο καθώς δεν χρειάστηκε για την διαλυτοποίηση. Στην συνέχεια αφού αναδεύτηκε για 3 λεπτά και γίνεται επαλήθευση ότι ομογενοποιήθηκε το διάλυμα, μεταφέρεται στην κυψελίδα του πολαρογράφου. Αλλάζεται το ηλεκτρόδιο του συστήματος στο ηλεκτρόδιο χρυσού, αφού πρωτίστως καθαριστεί η επιφάνεια του με τρίψιμο αυτής σε αλούμινα (οξειδίο του αργιλίου) με ένα πανάκι, ώστε να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν περισσότερο οι προσροφήσεις ουσιών λόγω των διαφόρων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Στη συνέχεια, βυθίζεται το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα προς ανάλυση και αφήνεται δύο λεπτά σε ηρεμία για να επέλθει σε ηλεκτροχημική ισορροπία προτού εφαρμοστεί ηλεκτρική τάση. Στη συνέχεια ξεκινούν οι βολταμμετρικές αναλύσεις (κυκλική και παλμική διαφορική βολταμμετρία),

Κεφάλαιο 5 – Πειραματική διαδικασία

όπου προηγείται η απαερίωση του διαλύματος με αέριο άζωτο με σκοπό την απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου από το διάλυμα και στη συνέχεια συλλέγονται τα δεδομένα και αποτυπώνονται τα βολταμμογραφήματα. Σε επόμενο βήμα, γίνεται αλλαγή του ηλεκτροδίου σε λευκόχρυσου, αφού πρωτίστως έχει υποβληθεί πάλι στην διαδικασία καθαρισμού της επιφανείας του, ώστε να ξαναγίνουν οι 2 βολταμμετρικές μετρήσεις. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 18: Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας A – απλή διαλυτοποίηση/εκχύλιση



Εικόνα 19: Φωτογραφική απεικόνιση βημάτων μεθοδολογίας A

Η παραπάνω κατεργασία δείγματος, ήταν αυτή η οποία παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις υπόλοιπες που δοκιμάστηκαν. Παρακάτω αναφέρονται

επιγραμματικά όλες οι υπόλοιπες δοκιμασίες και συνδυασμοί που πραγματοποιήθηκαν:

- Διαλυτοποίηση σε νερό + προσθήκη ηλεκτρολύτη (LiClO_4 σε νερό)
- Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα + ηλεκτρολύτη (LiClO_4 σε προπανόλη)
- Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο + ηλεκτρολύτη (LiClO_4 σε προπανόλη)
- Διαλυτοποίηση σε νερό (χωρίς ηλεκτρολύτη)
- Εκχύλιση σε διχλωρομεθάνιο (χωρίς ηλεκτρολύτη)
- Διαλυτοποίηση σε 1-προπανόλη
- Διαλυτοποίηση σε αιθανόλη
- Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο σε όξινο περιβάλλον (υπερχλωρικό οξύ)
- Εκχύλιση με ακετονιτρίλιο

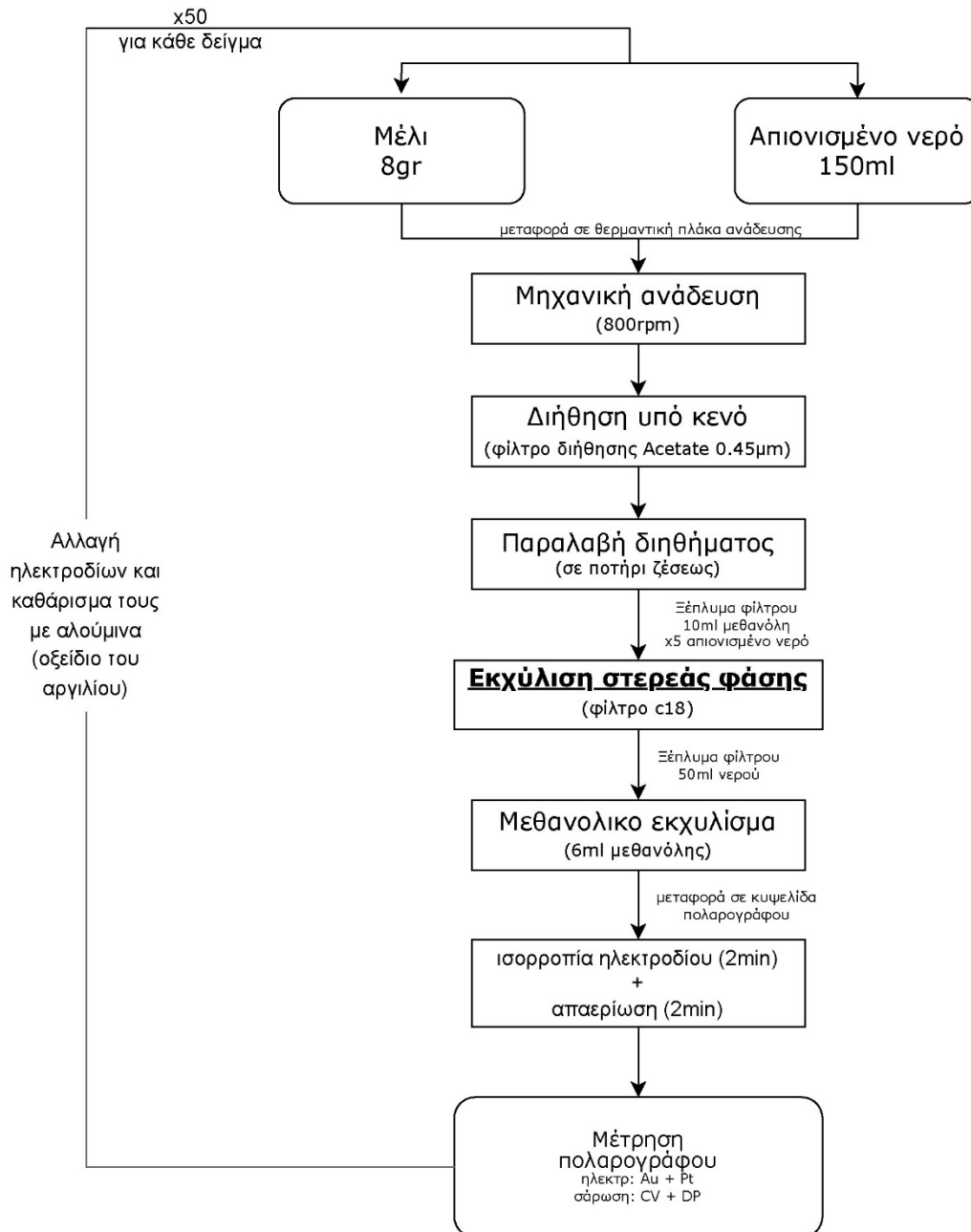
5.3.2. Μεθοδολογία B – εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Η δεύτερη πειραματική μεθοδολογία που δοκιμάστηκε για την ανάλυση των μελιών με βολταμμετρικές τεχνικές, είναι αυτή εκχύλισης στερεάς φάσης. Η κατεργασία των δειγμάτων που επέφερε τα βέλτιστα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων συνδυασμών που πραγματοποιήθηκαν αναλύεται παρακάτω.

Αρχικά συλλέχθηκαν 8 γραμμάρια δείγματος μελιού σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε σε αυτό 150mL απιονισμένου νερού. Αφού προστεθεί το μαγνητάκι ανάδευσης, τοποθετείται πάνω σε θερμαντική πλάκα μαγνητικής ανάδευσης. Η συσκευή ρυθμίστηκε να λειτουργεί στις 800 στροφές ανά λεπτό (rpm) και χωρίς θέρμανση στην προκειμένη μέθοδο καθώς δεν χρειάστηκε για την διαλυτοποίηση. Στη συνέχεια αφού αναδεύτηκε έως ότου πλήρης ομογενοποίησης του διαλύματος, μεταφέρεται σε φιάλη διήθησεως υπό κενό, με χρήση φίλτρων διήθησης Acetate 0.45 μm . Μετά το πέρας της διήθησης, συλλέγεται το διήθημα σε ποτήρι ζέσεως και μεταφέρεται στο όργανο εκχύλισης στερεάς φάσεως. Προτού χυθεί το διήθημα στο φίλτρο c18 isolute (EC) που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction SPE), υπόκειται σε ξέπλυμα με 10ml μεθανόλης και 5 φορές με απιονισμένο νερό. Εν συνεχεία, εγχέεται το διάλυμα στο φίλτρο και αφού γίνει έκπλυση του φίλτρου με 50ml απιονισμένου νερού, τοποθετούνται οι δοκιμαστικοί σωλήνες στο όργανο και πραγματοποιείται έκλουση με 8ml μεθανόλης για την συλλογή του μεθανολικού εκχυλίσματος. Τέλος, μεταφέρεται στην κυψελίδα του πολαρογράφου, όπου και πραγματοποιούνται οι μετρήσεις αφού πρώτα γίνουν οι απαραίτητες

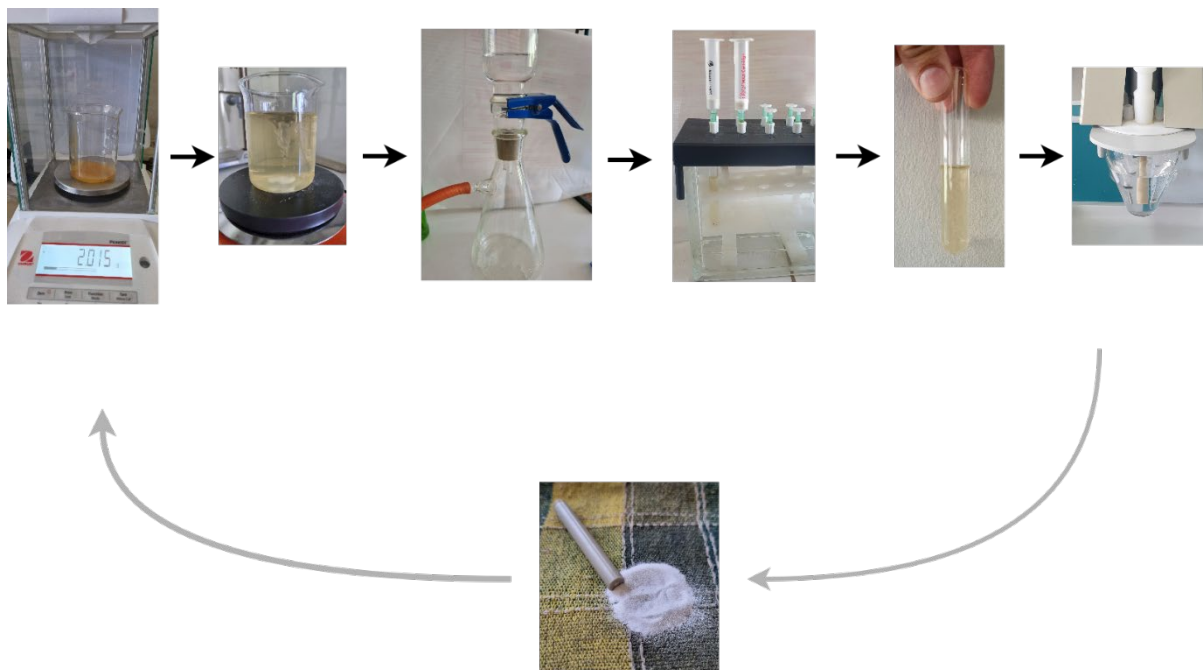
Κεφάλαιο 5 – Πειραματική διαδικασία

διεργασίες καθαρισμού και ισορροπίας των ηλεκτροδίων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη μεθοδολογία. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 20: Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας B – εκχύλιση στερεάς φάσης

Κεφάλαιο 5 – Πειραματική διαδικασία



Εικόνα 21: Φωτογραφική απεικόνιση βημάτων μεθοδολογίας Β

Η παραπάνω κατεργασία δείγματος, ήταν αυτή η οποία παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις υπόλοιπες που δοκιμάστηκαν. Παρακάτω αναφέρονται επιγραμματικά όλες οι υπόλοιπες δοκιμασίες και συνδυασμοί που πραγματοποιήθηκαν:

- Διαλυτοποίηση σε νερό, ρύθμιση pH=7 με NaOH, SPE και έκλουση με μεθανόλη (φίλτρο ασθενούς ανιόντος “Chromabond Easy”)
- Διαλυτοποίηση σε υπερχλωρικό οξύ 0.1M, SPE και έκλουση με μεθανόλη (φίλτρο ασθενούς ανιόντος “Chromabond Easy”)
- Διαλυτοποίηση σε νερό, ρύθμιση pH=7 με NaOH, SPE και έκλουση με μεθανόλη (φίλτρο ανιόντος “OASIS Max”)
- Διαλυτοποίηση σε νερό, SPE και έκλουση με οξικό οξύ 0.5ml + απιονισμένο νερό 5.5ml (φίλτρο ανιόντος “OASIS Max”)

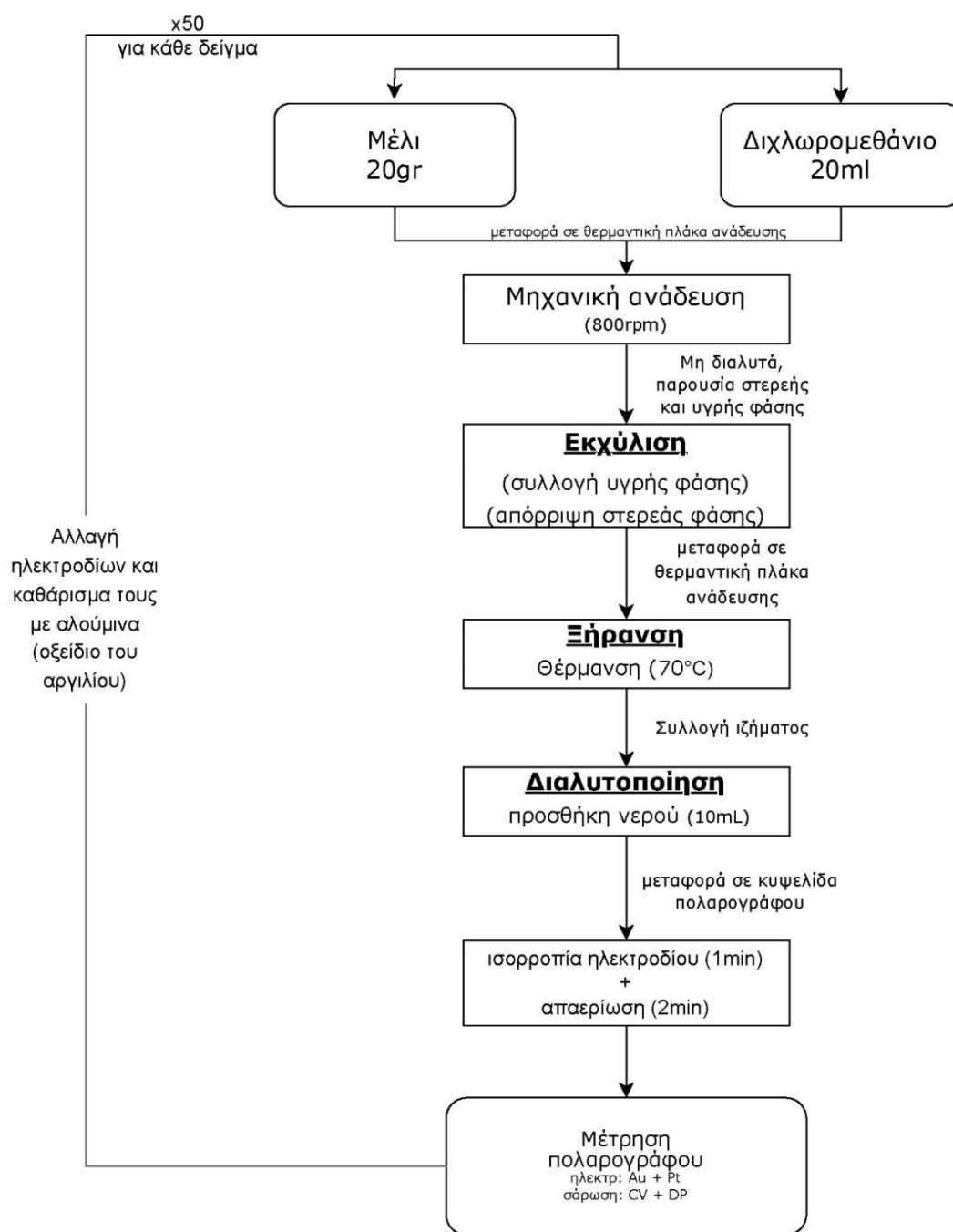


Εικόνα 22: Φίλτρα εκχύλισης στερεάς φάσης

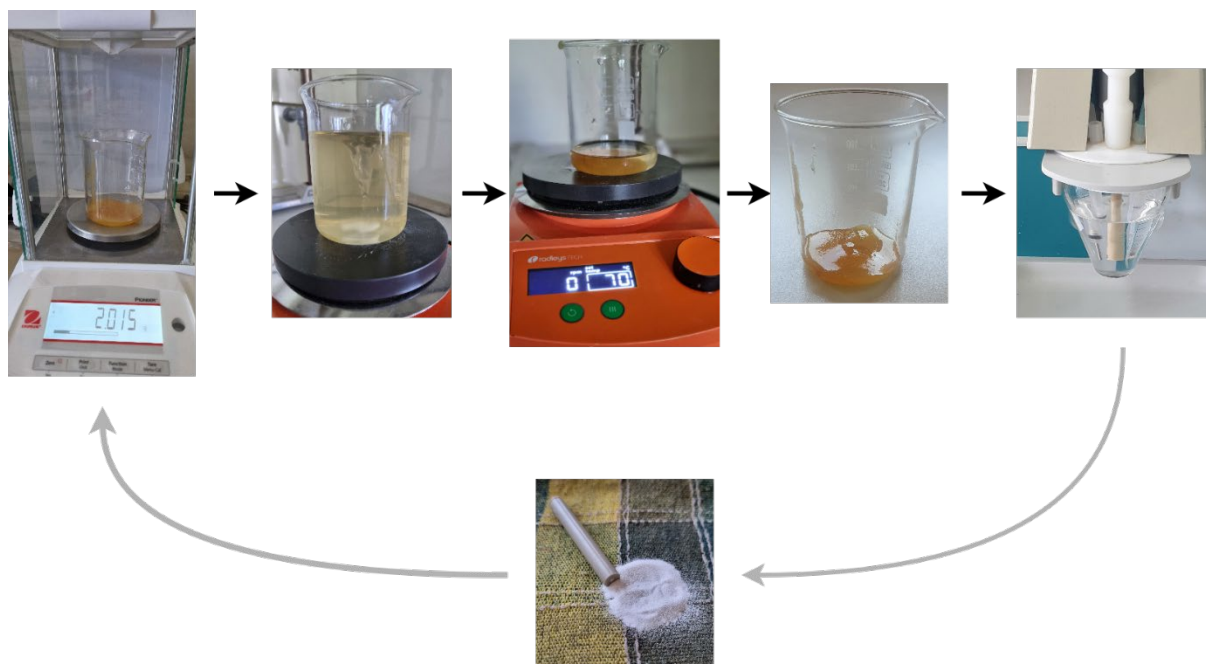
5.3.3. Μεθοδολογία Γ – Διπλή εκχύλιση/διαλυτοποίηση με ξήρανση

Η τρίτη πειραματική μεθοδολογία που δοκιμάστηκε για την ανάλυση των μελιών με βολταμμετρικές τεχνικές, είναι αυτή της εκχύλισης, ξήρανσης και στη συνέχεια διαλυτοποίησης του μελιού. Η κατεργασία των δειγμάτων που επέφερε τα βέλτιστα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων συνδυασμών που πραγματοποιήθηκαν αναλύεται παρακάτω.

Αρχικά συλλέχθηκαν 20 γραμμάρια δείγματος μελιού σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε σε αυτό 20mL διχλωρομεθάνιου. Αφού προστεθεί το μαγνητάκι ανάδευσης, τοποθετείται πάνω σε θερμαντική πλάκα μαγνητικής ανάδευσης. Η συσκευή ρυθμίστηκε να λειτουργεί στις 800 στροφές ανά λεπτό (rpm). Στο βήμα αυτό επιτυγχάνεται η εκχύλιση των φαινολικών και οργανικών ενώσεων και απομάκρυνση των ανεπιθύμητων σακχάρων που δεν συμβάλλουν στην διάκριση των ειδών μελιού. Εμφανίζονται δύο φάσεις, μια υγρή και μια στερεή, καθώς δεν διαλυτοποιείται το μέλι στο διχλωρομεθάνιο και σε αυτήν έχουν παρακρατηθεί τα σάκχαρα καθώς δεν διαλύεται με τον διαλύτη, επομένως συλλέγεται η υγρή φάση με τα συστατικά που μας ενδιαφέρουν και τοποθετείται πάλι στη θερμαντική πλάκα μαγνητικής ανάδευσης. Πραγματοποιείται εξάτμιση μέχρι ξηρού, ρυθμίζοντας την θερμαντική πλάκα στους 65-70 °C (η πραγματική θερμοκρασία λόγω απωλειών ~50°C) εφόσον το διχλωρομεθάνιο είναι πτητικό με θερμοκρασία βρασμού ~40°C. Ελέγχεται τακτικά η πορεία της εξάτμισης καθώς δεν είναι επιθυμητή η περεταίρω θέρμανση του εναπομείναντος ιζήματος μετά το πέρας της. Στη συνέχεια, μετά το πέρας της εξάτμισης, αφού αφεθεί το υπόλειμμα να ψυχθεί ομαλά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 10mL απιονισμένου νερού και πραγματοποιείται πάλι ανάδευση για την ομογενοποίηση του διαλύματος. Τέλος, το ομογενές διάλυμα μεταφέρεται στην κυψελίδα του πολαρογράφου, όπου και πραγματοποιούνται οι μετρήσεις αφού πρώτα γίνουν οι απαραίτητες διεργασίες καθαρισμού και ισορροπίας των ηλεκτροδίων που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες μεθοδολογίες. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής της διαδικασίας που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 23: Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας C – Διπλή εκχύλιση/διαλυτοποίηση με ξήρανση



Εικόνα 24: Φωτογραφική απεικόνιση βημάτων μεθοδολογίας C

Η παραπάνω κατεργασία δείγματος, ήταν αυτή η οποία παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις υπόλοιπες που δοκιμάστηκαν. Παρακάτω αναφέρονται επιγραμματικά όλες οι υπόλοιπες δοκιμασίες και συνδυασμοί που πραγματοποιήθηκαν:

- Εκχύλιση με ακετονιτρίλιο, ξήρανση, διαλυτοποίηση με μεθανόλη
- Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, ξήρανση, διαλυτοποίηση με μεθανόλη
- Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση, διαλυτοποίηση με μεθανόλη
- Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση, διαλυτοποίηση με νερό + προσθήκη ηλεκτρολύτη (υπερχλωρικό λίθιο σε αιθανόλη 0.1M)

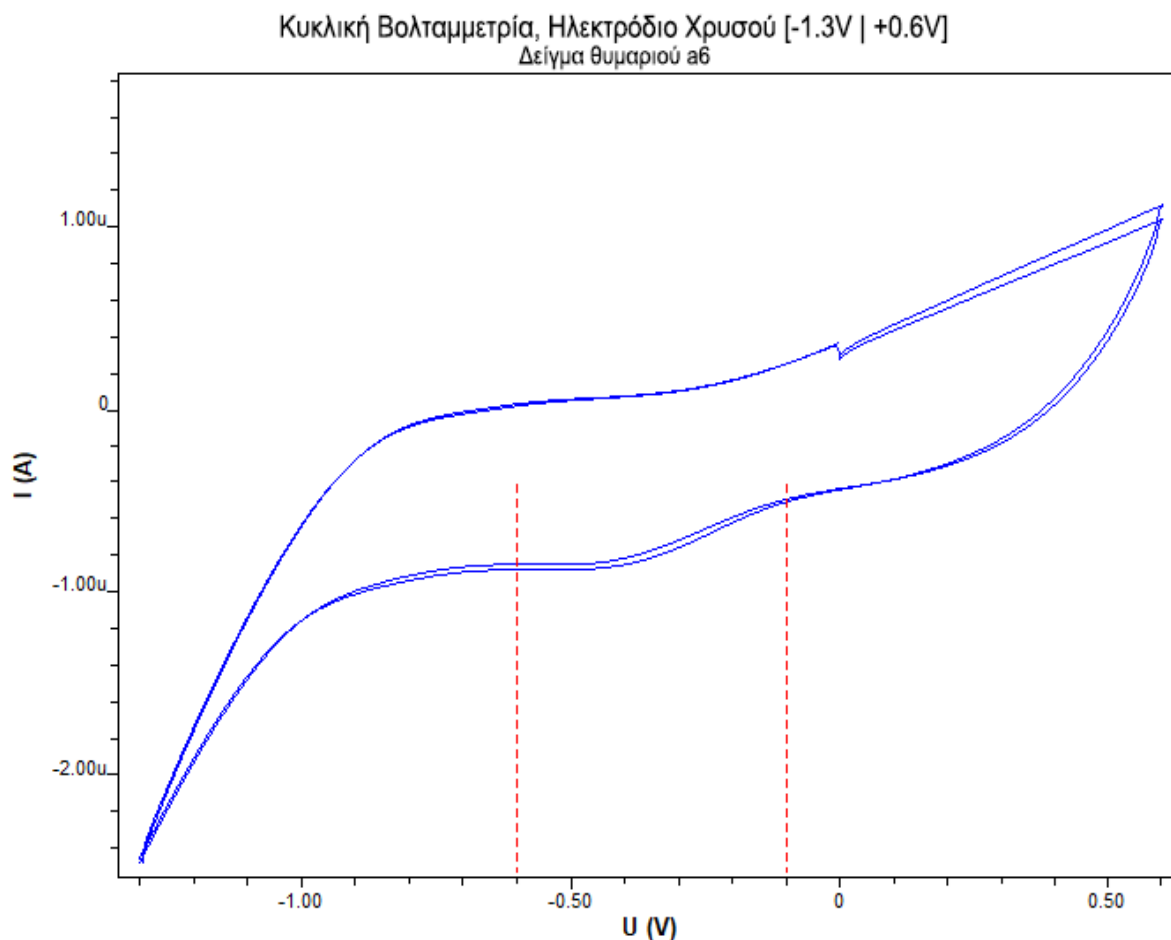
6.1. Ανάλυση δεδομένων με χημειομετρικές τεχνικές και αποτελέσματα

Από τις 3 μεθοδολογίες που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο της πειραματικής διαδικασίας, μόνο τα δεδομένα της 3^{ης} μεθόδου C συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση μέσω χημειομετρικών τεχνικών, καθότι ανέδειξε τις μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στα βολταμμογραφήματα συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Παρότι έγιναν πολλαπλοί συνδυασμοί διαφορετικών αντιδραστηρίων, ηλεκτροδίων και βολταμμετρικών τεχνικών, οι άλλες δύο μέθοδοι αποτύπωσαν πανομοιότυπα βολταμμογραφήματα για την κάθε βοτανική κατηγορία και εφόσον δεν μπορεί να επιτευχθεί τουλάχιστον κάποιος οπτικός διαχωρισμός σε πρώτο βήμα, δεν αναμένονται θετικά αποτελέσματα από τις χημειομετρικές τεχνικές. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δεδομένα της μεθόδου της διπλής εκχύλισης/διαλυτοποίησης με ξήρανση, με χρήση ηλεκτροδίων χρυσού και λευκόχρυσου μέσω κυκλικής και παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας.

6.1.1. Ηλεκτρόδιο Χρυσού, κυκλική βολταμμετρία

Η πρώτη από τις τέσσερις πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της μελετώμενης μεθοδολογίας Γ - της διπλής εκχύλισης με θέρμανση - είναι η μελέτη με τη χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και σάρωση με τεχνική της κυκλικής βολταμμετρίας CV, για κάθε ένα από τα 51 δείγματα. Μέσα στα δείγματα υπάρχουν αρκετές φαινολικές ενώσεις και άλλα χημικά είδη τα οποία υπόκεινται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οπότε συγκεκριμένα για το ηλεκτρόδιο χρυσού, το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως για αναγωγές και οπότε δουλεύει καλύτερα στα αρνητικά δυναμικά, το εύρος σάρωσης του δυναμικού από τον πολαρογράφο περιορίζεται στο [-1.3V | +0.6V].

Ένα χαρακτηριστικό κυκλικό βολταμμογράφημα που καταγράφηκε για τα μέλια που ανήκουν στην βοτανική ομάδα του θυμαριού, παρουσιάζεται στην παρακάτω *εικόνα 25*.

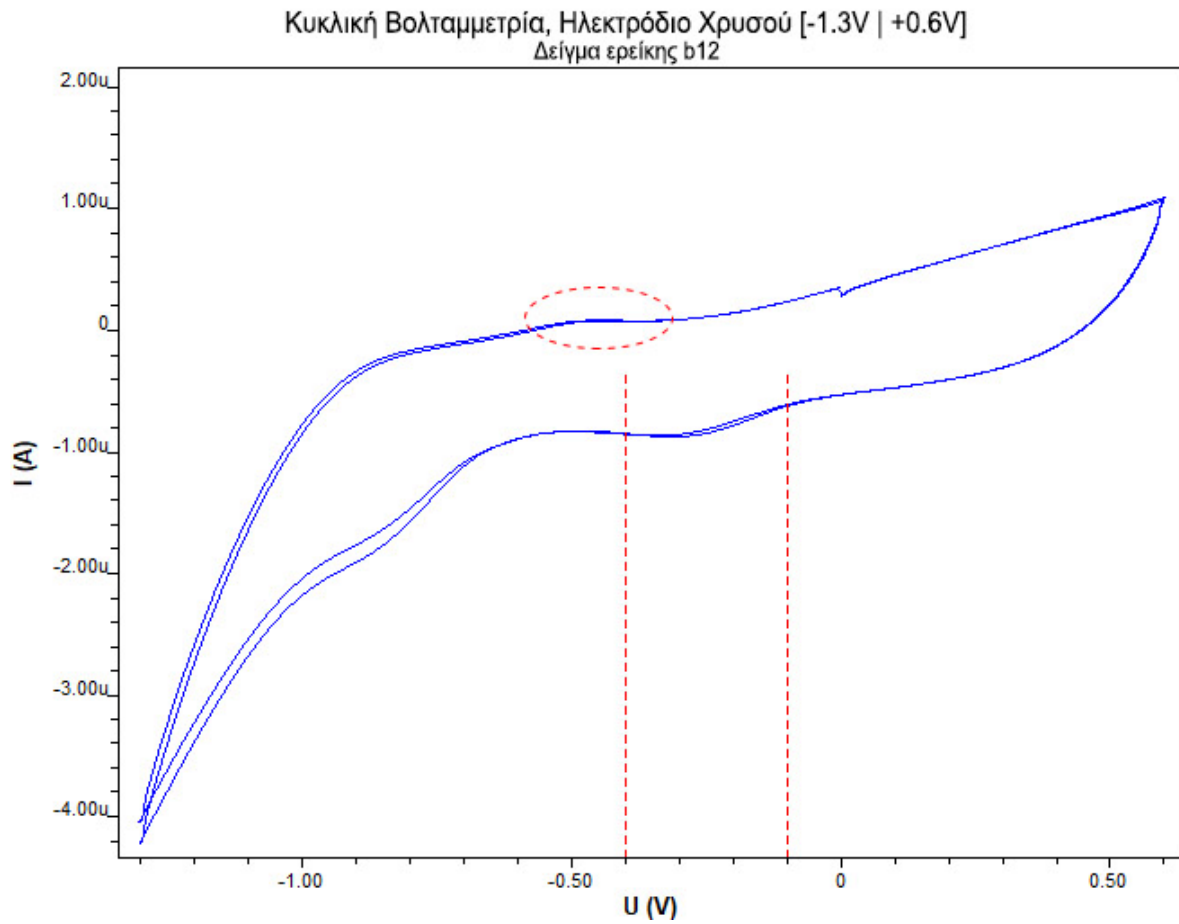


Εικόνα 25: Κυκλικό βολταμμογράφημα θυμαρισιού μελιού με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Παρατηρείται από το παραπάνω βολταμμογράφημα ότι εκτός από τις κορυφές στα δύο άκρα του εύρους σάρωσης οι οποίες προκύπτουν προφανώς λόγω της αντίθετης αύξησης ή μείωσης της έντασης του δυναμικού στα ηλεκτρόδια, εμφανίζεται ακόμη μία κορυφή αν και όχι τόσο ευδιάκριτη, στο εύρος περίπου [-0.6V | -0.1V]. Η ακριβής θέση της κορυφής δεν είναι σαφής, γεγονός το οποίο υποδηλώνει διάφορα επικαλυπτόμενα στάδια αναγωγής μέσα στο εύρος αυτό. Παρακάτω παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα των υπολοίπων 3 κατηγοριών (ερείκη, πορτοκαλιά, πεύκο) στις εικόνες 26, 27 και 28 αντίστοιχα για την οπτική σύγκριση μεταξύ τους σε πρώτο στάδιο ώστε να γίνει μια εκτίμηση πριν ακολουθήσει η χημειομετρική ανάλυση.

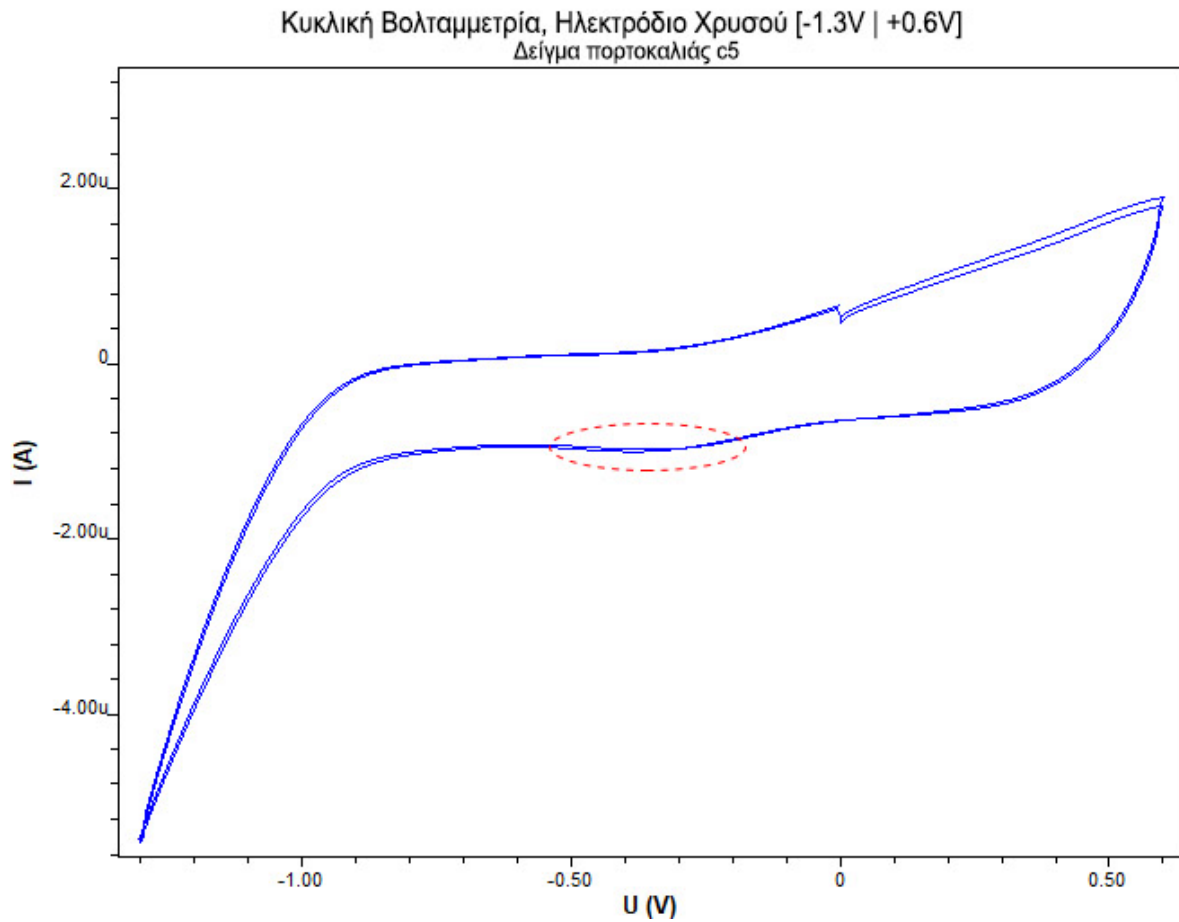
Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Για το δείγμα ερείκης [εικόνα 26] παρατηρείται κορυφή στο κάτω βολταμμογράφημα στην περιοχή [-0.4V | -0.1V] ενώ φαίνεται και μια πολύ μικρή και δυσδιάκριτη κορυφή στο άνω βολταμμογράφημα.



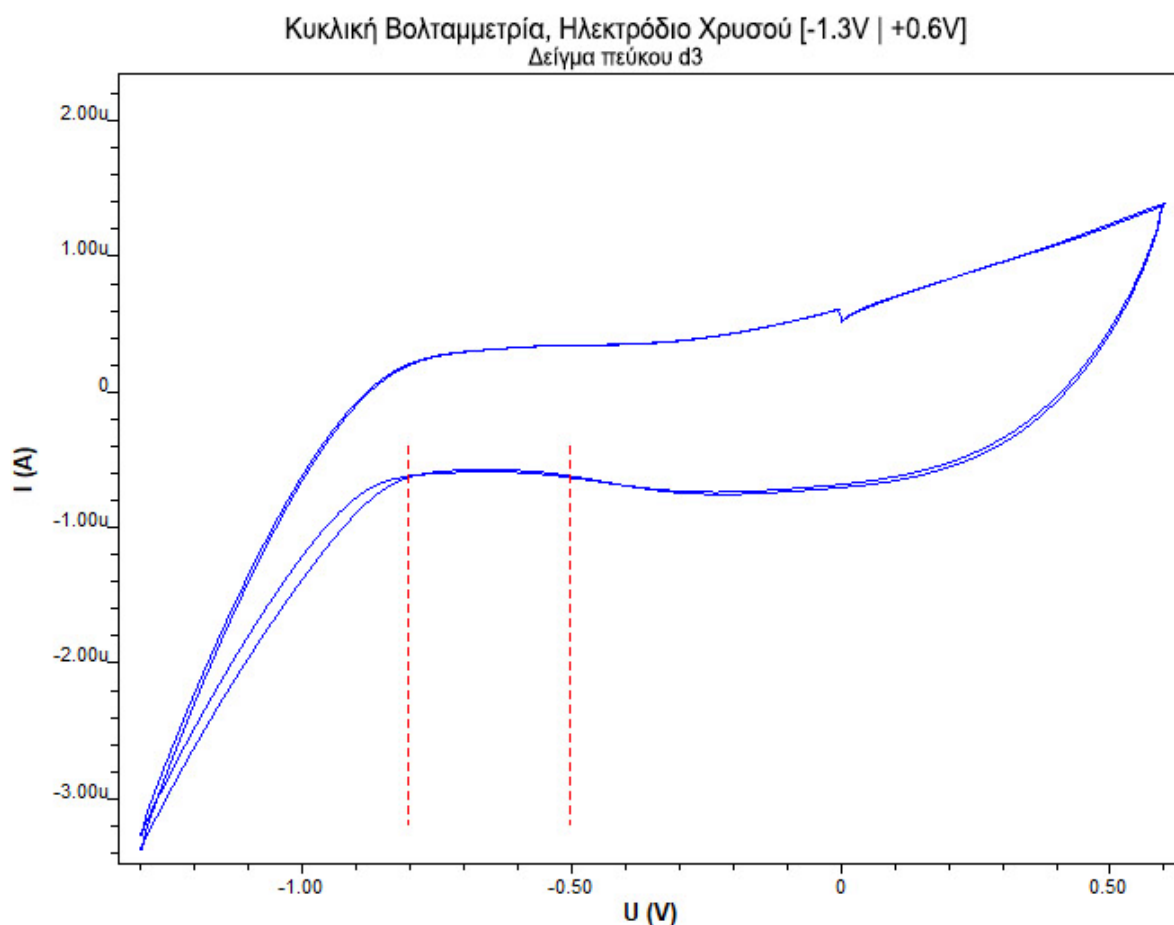
Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Για το δείγμα πορτοκαλιάς [εικόνα 27] παρατηρείται μια ασθενή κορυφή συγκριτικά με τα προηγούμενα γραφήματα στο κάτω βολταμμογράφημα στην περιοχή [-0.4V | -0.1V].

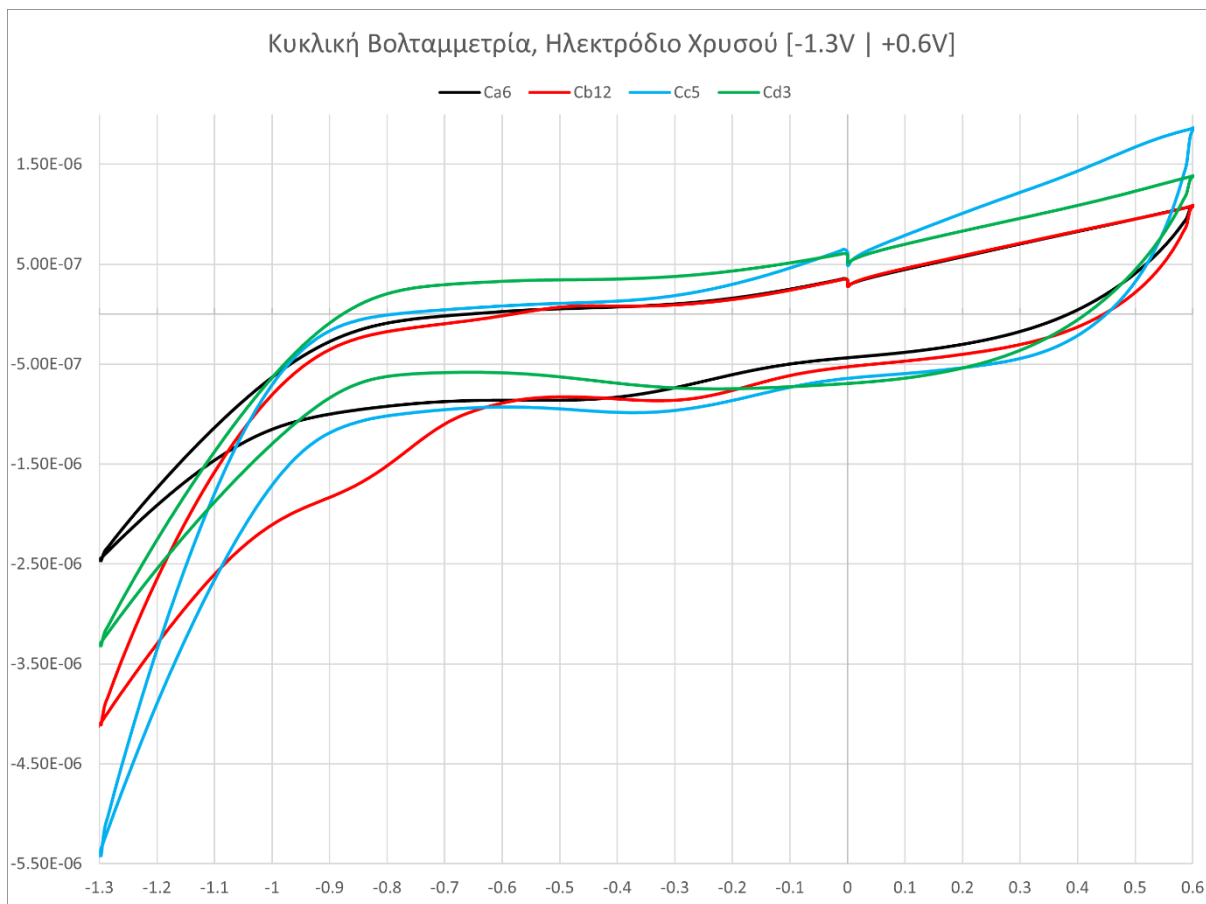


Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Τέλος, στα δείγματα της κατηγορίας του πεύκου [εικόνα 28], δεν παρατηρείται κάποια κορυφή, αλλά μια στένωση του γραφήματος στην περιοχή [-0.8V | -0.5V].



Δυστυχώς, οι οπτικές διαφορές στα γραφήματα των τεσσάρων κατηγοριών βοτανικής προέλευσης, είναι πολύ μικρές και τα διαγράμματα είναι αρκετά πανομοιότυπα καθώς και οι περιοχές που εμφανίζονται οι διάφορες κορυφές, όπως φαίνεται και στο συνολικό βολταμμογράφημα της *εικόνας 29*. Βέβαια, η χημειομετρική ανάλυση τελικώς θα επιβεβαιώσει αν μπορεί να γίνει κάποιος διαχωρισμός μεταξύ των 4 κατηγοριών αυτών και με πόση επιτυχία, αλλά γενικά ένας καλός οπτικός διαχωρισμός προοικονομεί καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα.

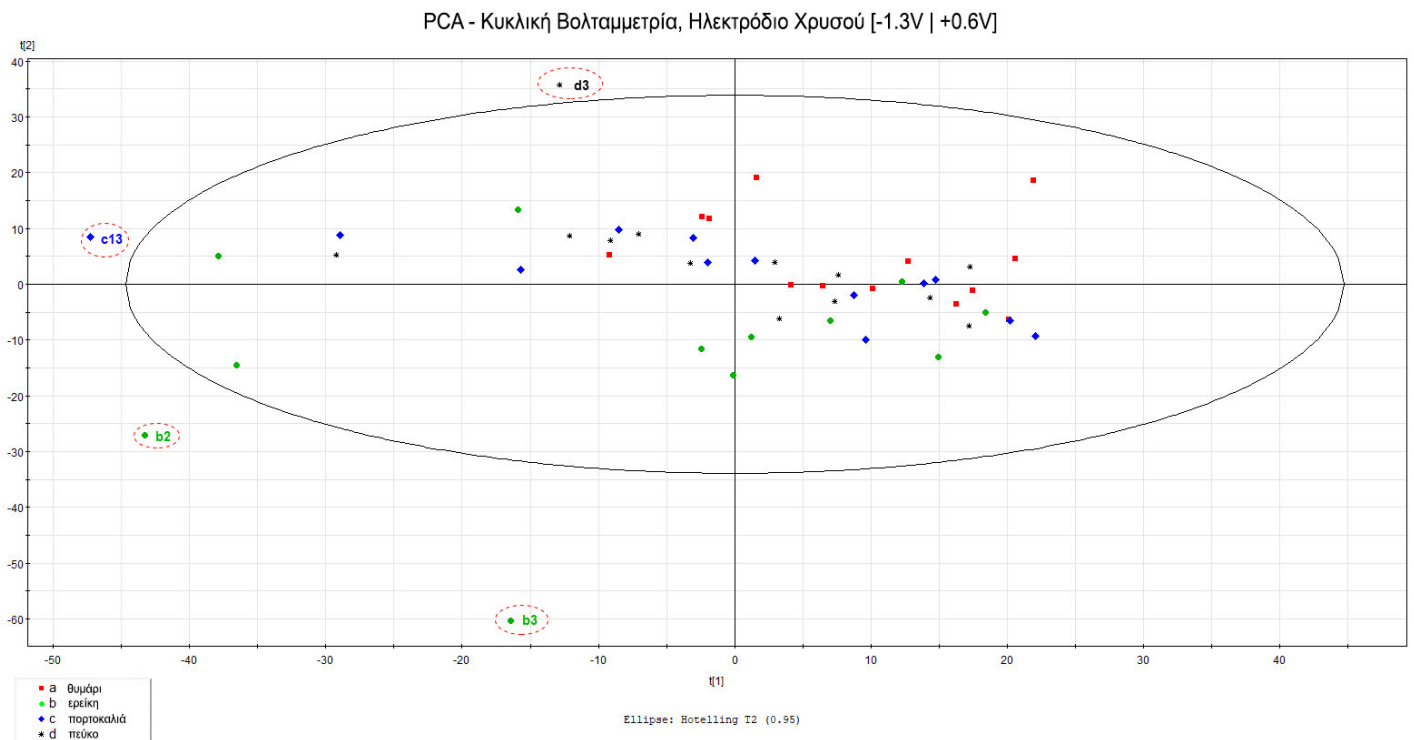


Για όλα τα σημεία των παραπάνω βολταμμογραφημάτων τα οποία αντιστοιχούν στις τιμές του μετρούμενου ρεύματος για το εκάστοτε δυναμικό, πάρθηκε ο μέσος όρος των δύο τιμών των εντάσεων του ρεύματος καθώς ο ποτενσιοστάτης πραγματοποίησε για κάθε ένα δείγμα, τριπλή σάρωση του εύρους δυναμικού από -1.3 έως 0.6V απορρίπτοντας την πρώτη (για σταθεροποίηση των ρευμάτων). Ύστερα για όλα αυτά τα σημεία, προκειμένου να υποβληθούν σε πολυμεταβλητή ανάλυση όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος, φτιάχτηκε ο πίνακας δεδομένων X που αποτελείται από 51 γραμμές - αντικείμενα (δείγματα προς εξέταση) και 641 στήλες - μεταβλητές (τιμή ρεύματος για την εκάστοτε τιμή τάσεως) και εισάχθηκε στο υπολογιστικό πρόγραμμα SIMCA για μοντελοποίηση.

6.1.1.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA

Η πρώτη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, είναι η ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA που είναι μη εποπτευόμενη μέθοδος (όπου οι ομάδες δεδομένων είναι άγνωστες), για την απόκτηση μιας γενικής εικόνας για το κατά πόσο δύναται να ταξινομηθούν από μόνα τους με κάποια άγνωστα χαρακτηριστικά τα οποία όμως μπορεί να κατατάσσονται σε κάποιο μοτίβο μεταξύ τους, χωρίς να δοθεί η πληροφορία ότι ανήκουν αντικειμενικά ήδη σε κάποια κατηγορία.

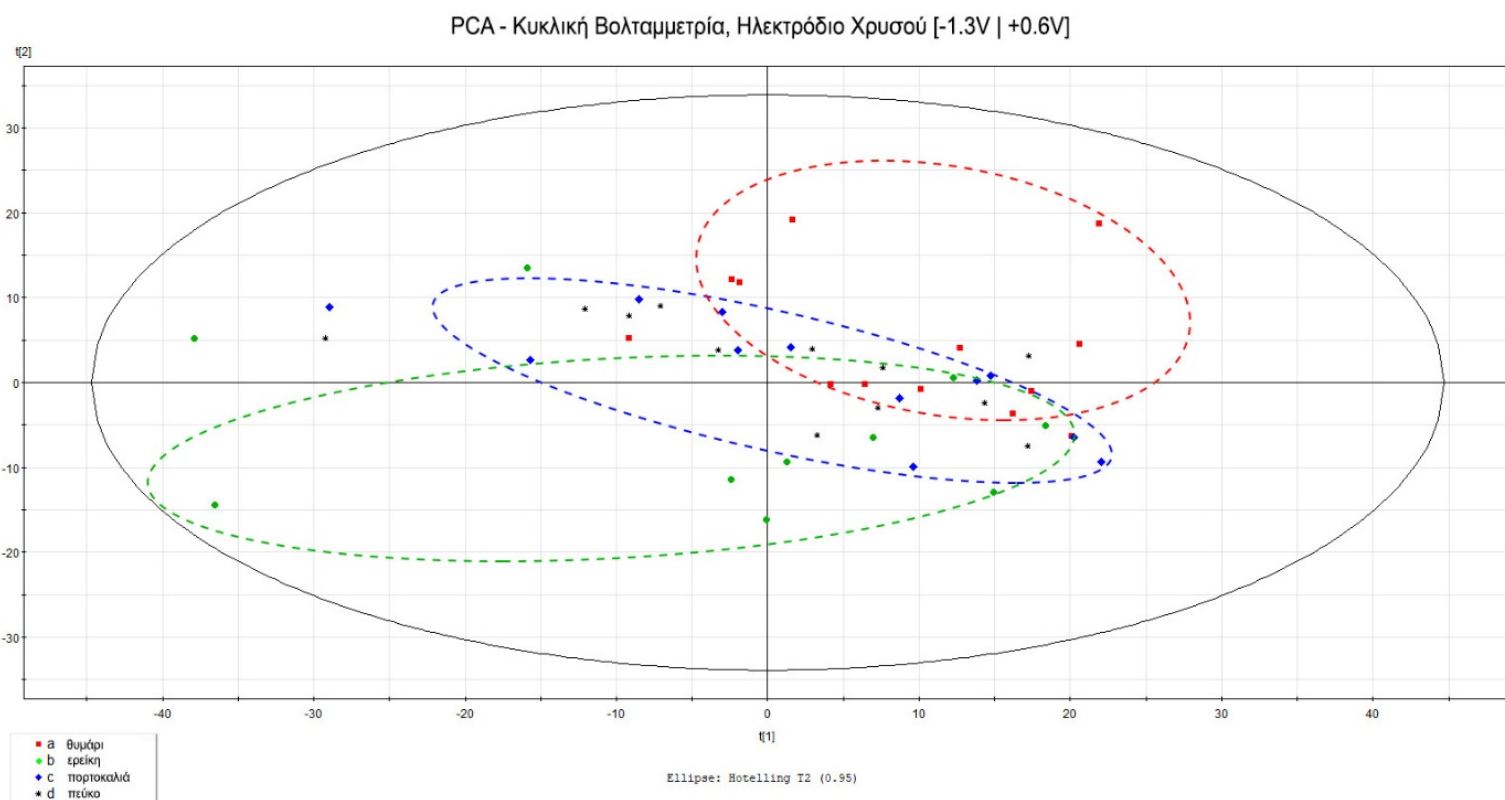
Το μοντέλο εμφάνισε 8 κύριες συνιστώσες (PCs), με συνολικό συντελεστή προσδιορισμού $R^2X_{(cum)} = 0.994$ και συνολικό διασταυρωμένο-επικυρωμένο συντελεστή προσδιορισμού $Q^2_{(cum)} = 0.983$. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα συντεταγμένων (score plot) στην *εικόνα 30*, όπου εμφανίζονται και 4 έκτροπες τιμές - outliers (b2, b3, c13, d3) που βρίσκονται εκτός της έλλειψης του μοντέλου και δείχνουν ότι έχουν αρκετά διαφορετική συμπεριφορά συγκριτικά με το υπόλοιπο πλήθος δειγμάτων, οπότε μπορούν να αγνοηθούν και να μην συμπεριληφθούν στα μοντέλα που αναπτύσσονται.



Εικόνα 30: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και επισήμανση των έκτροπων τιμών

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Αφαιρούνται οι outliers τιμές από το διάγραμμα ώστε να είναι πιο κανονικοποιημένο και με την έλλειψη να πιάνει τον μέγιστο χώρο, με σκοπό τον σχεδιασμό χωρίων και την προσπάθεια ομαδοποίησης των 4 διαφορετικών δειγμάτων [εικόνα 31]. Παρόλα αυτά, ενώ οι συντελεστές των μοντέλων ήταν πολύ κοντά στο 1 δείχνοντας ότι τα δείγματα μετέφραζαν το μοντέλο πολύ καλά, παρατηρείται ότι δεν είναι αποκομμένη και απομακρυσμένη η κάθε μία κατηγορία μεταξύ τους ώστε να φαίνονται ευδιάκριτα ότι ανήκουν σε διαφορετική κλάση, αλλά αντιθέτως υπάρχει μεγάλη διασπορά και είναι ανακατεμένα μεταξύ τους.



6.1.1.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA

Στην συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση εποπτευόμενης μεθόδου, στην οποία προσδιορίζονται στο μοντέλο ποια δείγματα θεωρείται ότι ανήκουν σε μια κλάση και πόσες είναι αυτές, για την επίτευξη μιας καλύτερης ταξινόμησης στο διάγραμμα των συντεταγμένων. Υπάρχουν δύο τρόποι που μπορούν να οριστούν οι κλάσεις. Οι κλάσεις μπορούν είτε να οριστούν με βάση την πραγματική βοτανική προέλευση των δειγμάτων με μια ξεχωριστή κλάση για κάθε διαφορετική βοτανική κατηγορία στην οποία ήδη ανήκουν, είτε μπορούν να ομαδοποιηθούν κάποιες κατηγορίες μεταξύ τους

και να οριστούν σαν μια κλάση με βάση τις ομοιότητες που παρουσιάζουν στα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα κατά την οπτική παρατήρηση τους.

Σε αντίθεση με την τεχνική της PCA, στην τεχνική PLS-DA πρέπει καθώς ορίζονται οι κλάσεις και δίνεται η πληροφορία στο υπολογιστικό πρόγραμμα, να γίνει και επικύρωση (validation) κρατώντας κάποια δείγματα ως άγνωστα (απροσδιόριστη κλάση) για την επαλήθευση αν πράγματι τοποθετούνται σωστά με βάση το μοντέλο πρόβλεψης. Στις επιβλεπόμενες τεχνικές ορίζεται ένα 10-15% ως άγνωστο και αγγίζει μέχρι και το 20% αν υπάρχει μεγάλος όγκος δειγμάτων και ζητείται η επίτευξη αυστηρότερης και ακριβέστερης επαλήθευση του μοντέλου.

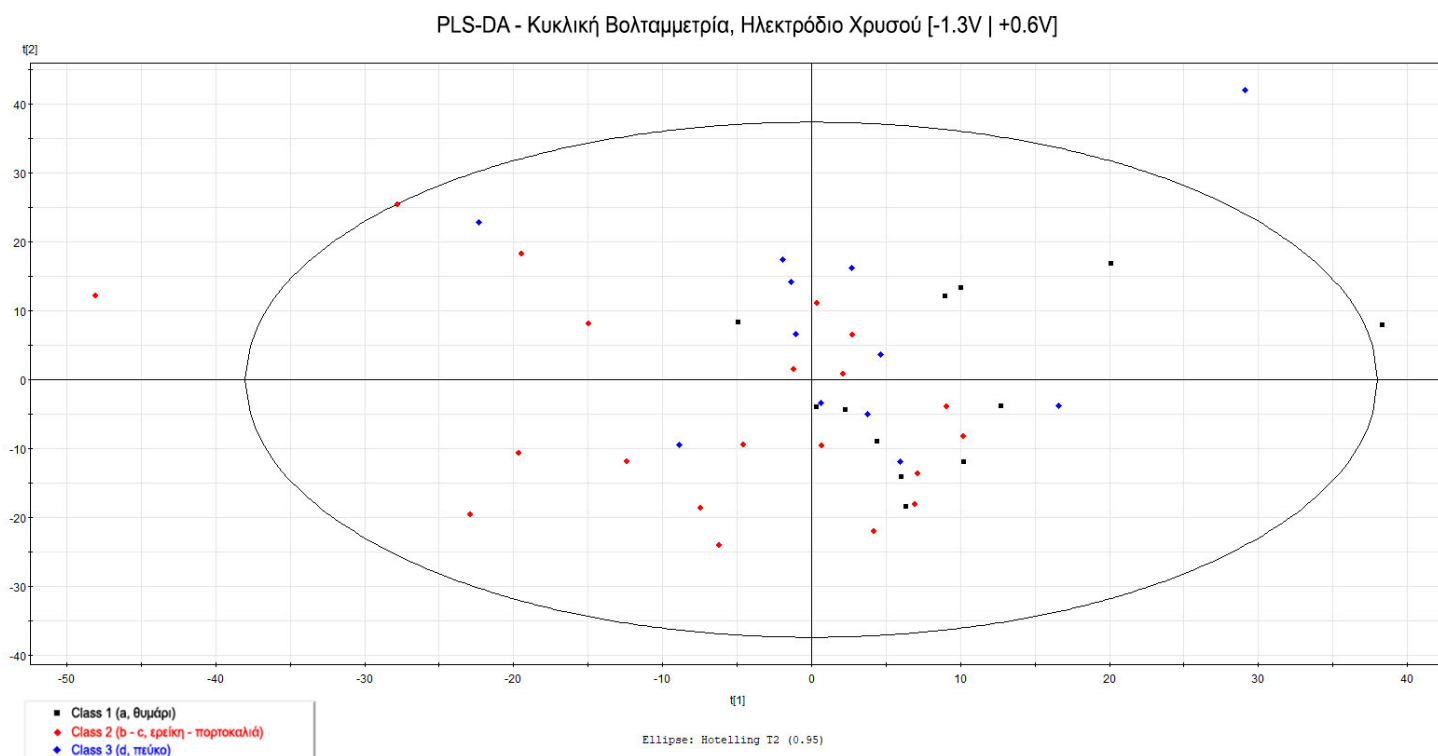
Δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί ομαδοποιήσεων, αλλά παρακάτω παρατίθενται μόνο οι περιπτώσεις που επέφεραν τα καλύτερα αποτελέσματα μεταξύ των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν. Επίσης στο υπολογιστικό πρόγραμμα SIMCA τα μοντέλα κατασκευάστηκαν με μέγιστο τις 3 κλάσεις, καθώς με την προσθήκη περισσότερων δεν υπολογίζονται σωστά και παρουσιάζονται σφάλματα.

Αρχικά ορίστηκαν 3 κλάσεις, με την κατανομή των δειγμάτων σε

- Κλάση 1 = θυμάρι
- Κλάση 2 = ερείκη + πορτοκαλιά
- Κλάση 3 = πεύκο

όπου αφαιρέθηκαν οι έκτροπες τιμές b2,b3 και c13 και αφέθηκαν ως άγνωστα τα τυχαία δείγματα [a4], [b6, c4] και [d5], προκύπτοντας μοντέλο με 3 κύριες συνιστώσες και $R^2X_{(cum)} = 0.844$, $R^2Y_{(cum)} = 0.272$ και $Q^2_{(cum)} = 0.131$. Όπως παρατηρείται και στο διάγραμμα της *εικόνας 32* δεν γίνεται διακριτή κάποια κατάταξη των κλάσεων που έχουν οριστεί καθώς ο συνολικός διασταυρωμένος συντελεστής προσδιορισμού είναι αρκετά χαμηλός δείχνοντας ότι δεν επιτυγχάνεται καλή πρόβλεψη από το μοντέλο σε νέες άγνωστες μεταβλητές.

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα



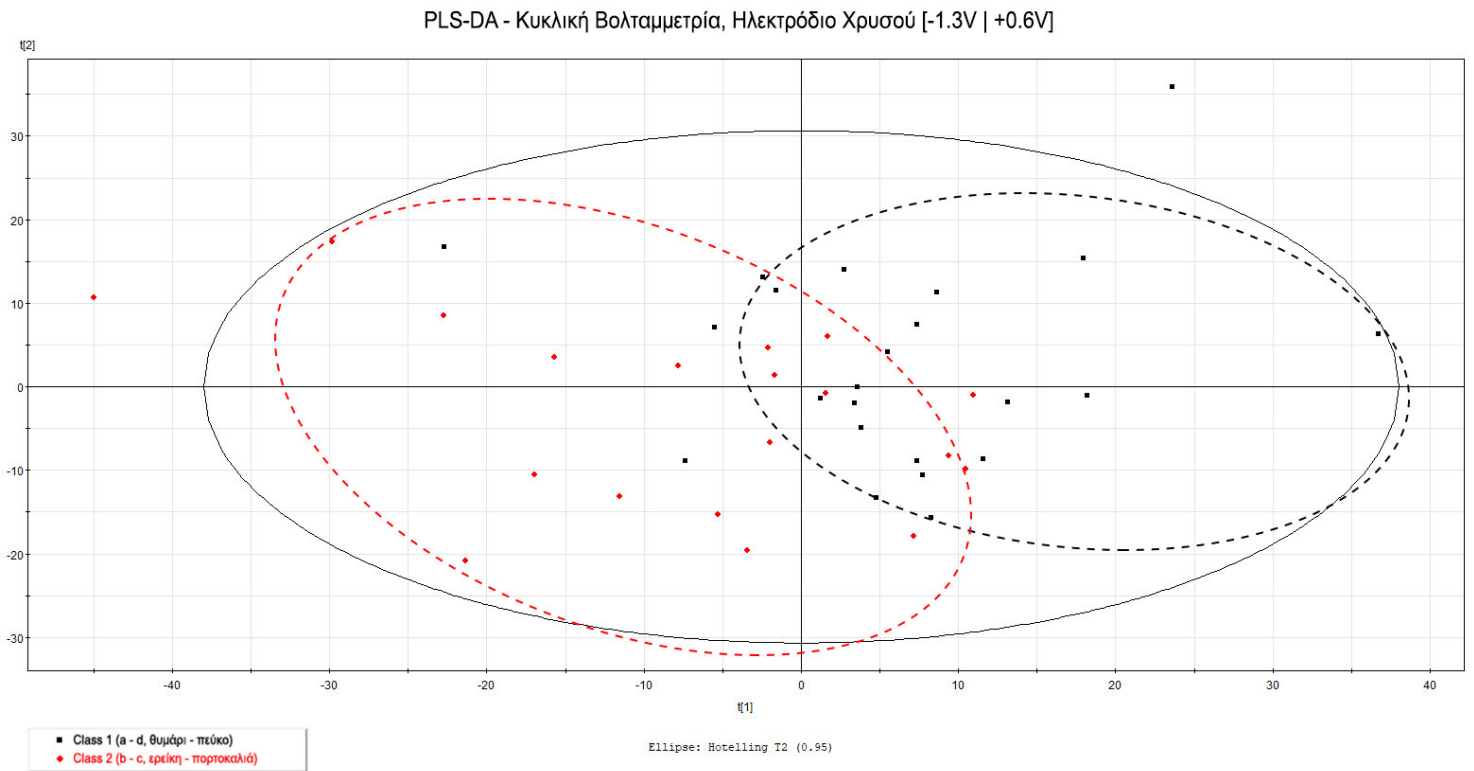
Εικόνα 32: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Έγινε άλλη μια ανάλυση, η οποία έδειξε καλύτερα αποτελέσματα, ορίζοντας 2 κλάσεις

- Κλάση 1 = θυμάρι + πεύκο
- Κλάση 2 = ερείκη + πορτοκαλιά

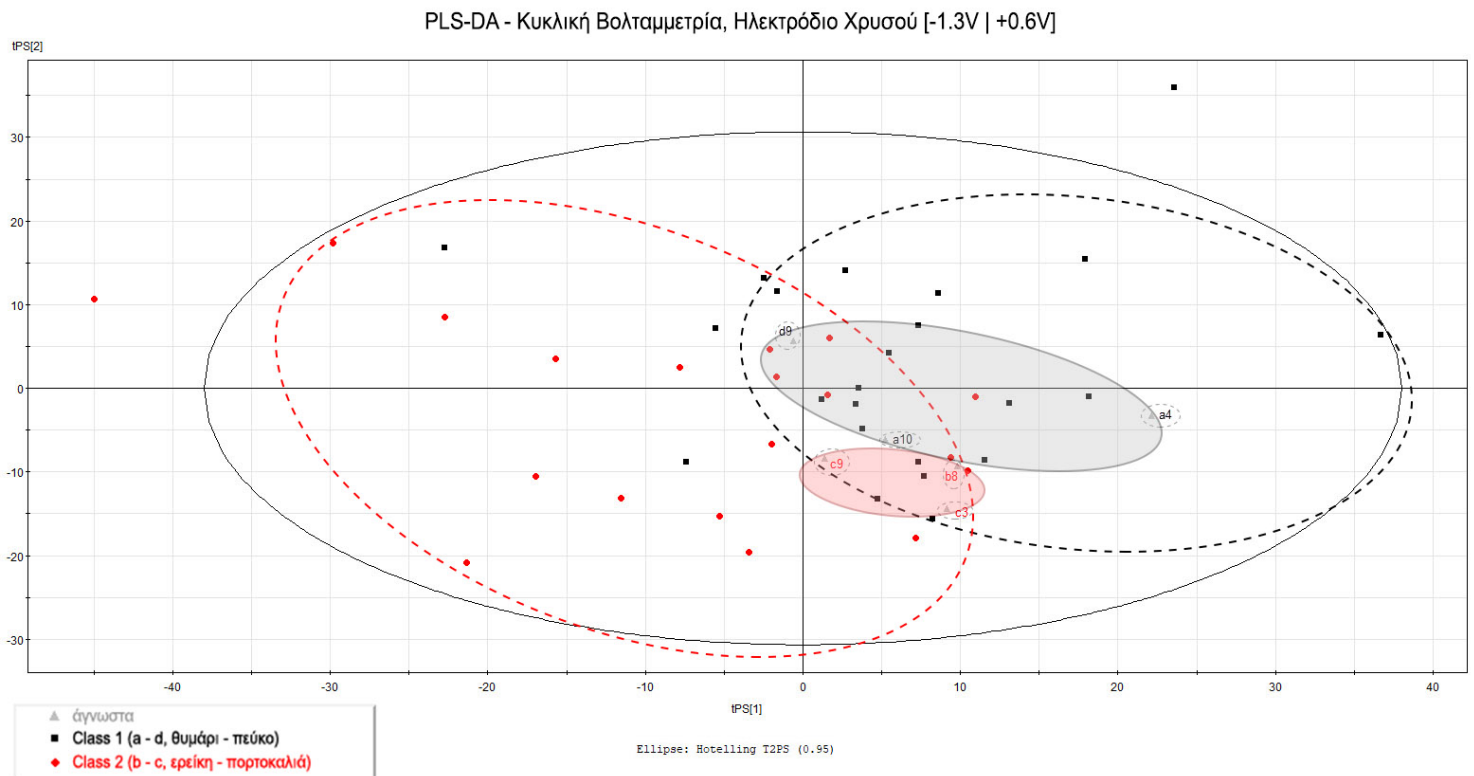
σύμφωνα με τις ομοιότητες που δείξαν τα παραπάνω ζεύγη στα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα, με αφαίρεση των έκτροπων τιμών b2, b3 και c13 και θέτοντας ως άγνωστα δείγματα τα [a4, a10, d9] και [b8, c3, c9]. Προέκυψε μοντέλο με 3 κύριες συνιστώσες και $R^2X_{(cum)} = 0.847$, $R^2Y_{(cum)} = 0.404$ και $Q^2_{(cum)} = 0.277$, λίγο καλύτερο από το προηγούμενο και με κάποια μικρή οπτική διαφοροποίηση στο διάγραμμα των συντεταγμένων [εικόνα 33].

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα



Εικόνα 33: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και διαχωρισμό των κλάσεων

Παρακάτω, πάνω στο ίδιο διάγραμμα αποτυπώνονται και τα 6 προβλεπόμενα από το μοντέλο δείγματα που ορίστηκαν ως άγνωστα [εικόνα 34].



Εικόνα 34: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων

Παρατηρούμε ότι ενώ η πρόβλεψη επιτεύχθηκε με επιτυχία και ορθώς αποτύπωσε τα σημεία μέσα στους αντίστοιχους χώρους των κλάσεων 1 και 2 (τα 3 άγνωστα που ανήκουν στην κλάση 1 βρίσκονται στο μαύρο σύνολο και αντίστοιχα αυτά της κλάσης 2 στο κόκκινο), παρόλα αυτά βρίσκονται στο σημείο τομής των 2 τους, όπου είναι η περιοχή στην οποία είδαμε ότι δεν διαχωρίζονται επιτυχώς μερικά από τα δείγματα μας.

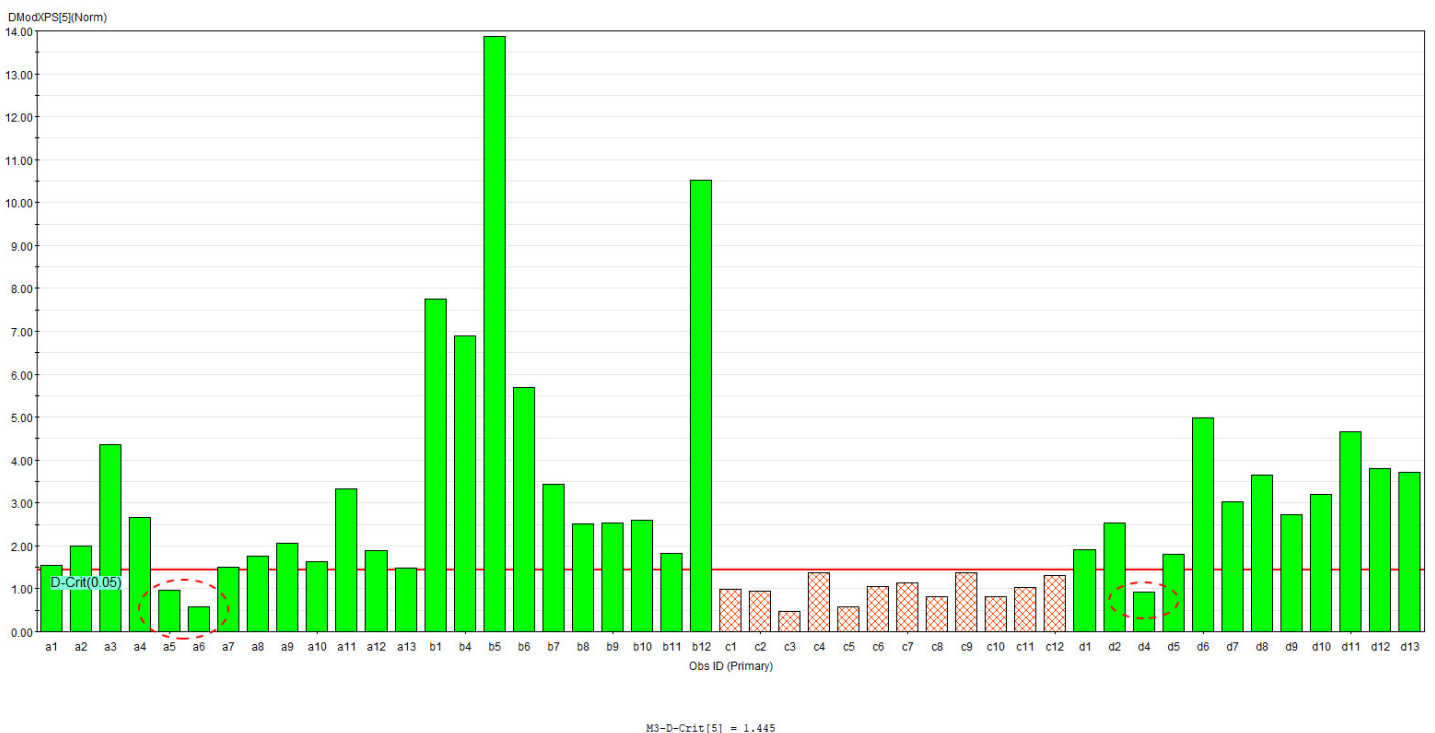
6.1.1.3 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class)

Μετά τις 2 αναλύσεις PCA και PLS-DA, ακολουθεί η μοντελοποίηση μιας κλάσης, η οποία μοντελοποιείται με τον ίδιο τρόπο όπως με την τεχνική της PCA, αλλά με την διαφορά ότι ορίζεται μία μοναδική κλάση. Στην περίπτωση αυτή, εισάγεται η πληροφορία για το ποια δείγματα ανήκουν σε κάποια πραγματική ομάδα ή υποθετικό συνδυασμό ομάδων και το μοντέλο για κάθε επιπλέον άγνωστο δείγμα απαντά στην ερώτηση για το αν ανήκει ή δεν ανήκει στην κλάση αυτή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται κυρίως για την αναγνώριση νοθευμένων δειγμάτων, με την λογική ότι γίνεται μοντελοποίηση εισάγοντας επιβεβαιωμένα γνήσια δείγματα ως γνωστά δεδομένα και ταξινομούνται τα υπόλοιπα προς αυτά σαν σημείο αναφοράς. Για την μοντελοποίηση αυτή απαιτείται ο ορισμός ενός 20% με 30% των δειγμάτων ως μια κλάση και των υπολοίπων ως άγνωστα για την παρατήρηση για το αν θα μπορέσει το μοντέλο να προβλέψει επιτυχώς την ταξινόμηση τους. Η τεχνική αυτή πέρα από τις τιμές $R^2X_{(cum)}$ και $Q^2_{(cum)}$, χαρακτηρίζεται και από την ευαισθησία (sensitivity) και την ειδικότητα (specificity). Η ευαισθησία προσδιορίζει τον αριθμό των αληθώς θετικών δειγμάτων (δείγματα που ταξινομούνται κάτω από την κρίσιμη τιμή του μοντέλου, που παρουσιάζεται ως μια κόκκινη γραμμή) και η ειδικότητα προσδιορίζει τον αριθμό των αληθώς αρνητικών δειγμάτων τα οποία γνωρίζουμε στην θεωρία ότι είναι διαφορετικά και δεν θα πρέπει να ταξινομηθούν με τα ορισμένα μας (υπερβαίνουν την κρίσιμη τιμή - κόκκινη γραμμή).

Πραγματοποιήθηκε μελέτη και ορίστηκαν μοντέλα με ξεχωριστή κλάση για κάθε ξεχωριστή κατηγορία βοτανικής προέλευσης (a - θυμάρι, b - ερείκη, c - πορτοκαλιά, d - πεύκο) αλλά και συνδυασμών αυτών σύμφωνα με τις πιθανές ομοιότητες που παρουσιάστηκαν από τα βολταμμογραφήματα (a-b, a-c) καθώς και τους υπόλοιπους πιθανούς συνδυασμούς σε περίπτωση που μπορούν να παρουσιάσουν παρόμοια κατηγοριοποίηση την οποία δεν παρατηρείται οπτικά (a-d, b-c, b-d, c-d). Από όλα τα

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

10 μοντέλα που αναπτύχθηκαν, μόνο ένα από αυτά έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα, το οποίο ήταν αυτό με επιλεγμένα τα δείγματα της πορτοκαλιάς (c) ως γνωστά. Στο μοντέλο αφαιρέθηκαν οι 4 έκτροπες τιμές που παρουσίασαν περίεργη συμπεριφορά (b2, b3, c13, d3) και ορίστηκαν ως άγνωστα τα δείγματα c6 και c12, για λόγους επικύρωσης του μοντέλου. Η ανάλυση οδήγησε σε 5 κύριες συνιστώσες, $R^2_{X(cum)} = 0.988$ και $Q^2_{(cum)} = 0.96$. Οι προβλέψεις με τις αποστάσεις τους από το μοντέλο (όσο πιο μακριά τόσο πιο έντονη η δήλωση ότι δεν ανήκει στην κατηγορία που μελετάται) εμφανίζονται στο παρακάτω ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης [εικόνα 35].



Εικόνα 35: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου *Class Modeling* για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Οι κατακόρυφες ράβδοι συμβολίζουν κάθε δείγμα μελιού, οι κόκκινες ράβδοι συμβολίζουν τα δείγματα που ορίστηκαν ως κλάση 1 και είναι γνωστά, οι υπόλοιπες πράσινες αναπαριστούν τα υπόλοιπα θεωρητικά άγνωστα δείγματα και οι διακεκομμένες ελλείψεις τα σφάλματα της μεθόδου. Το μοντέλο υπολόγισε κρίσιμη τιμή των 5 κύριων συνιστωσών $D-Crit(5) = 1.445$.

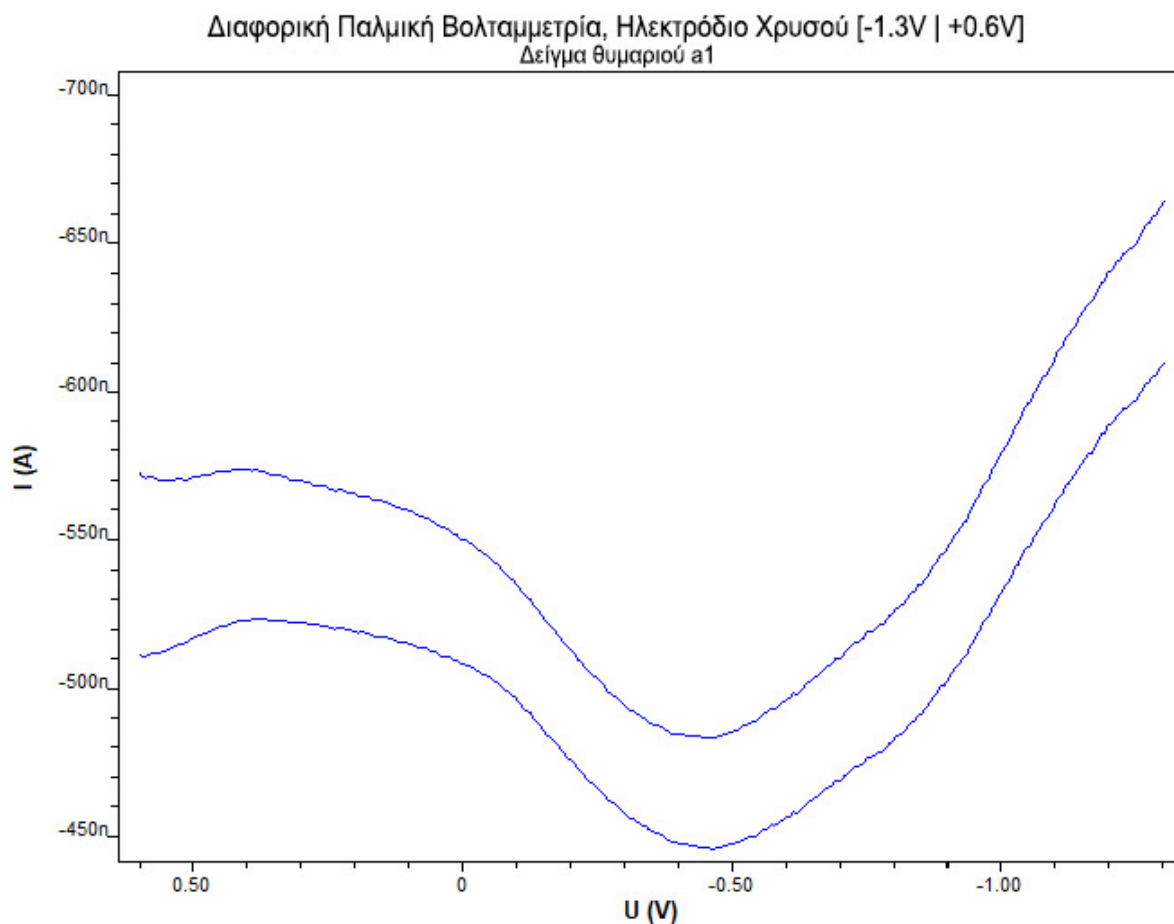
Από τα 12 δείγματα μελιού πορτοκαλιάς και τα 12 είναι μικρότερα από την κρίσιμη τιμή, δείχνοντας ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι 12/12, δηλαδή 100%, μέσα στα οποία έχει κατατάξει επιτυχώς και τα 2 μη ορισμένα δείγματα c6 και c12, επαληθεύοντας το μοντέλο. Εν συνεχεία, στα υπόλοιπα άγνωστα δείγματα, 3 από αυτά (δύο θυμαριού και ένα πεύκου) δεν περνούν την κόκκινη γραμμή, γεγονός που είναι

εσφαλισμένο καθώς είναι γνωστό ότι στην πραγματικότητα δεν ανήκουν στα μέλια πορτοκαλιάς, δείχνοντας ότι η ειδικότητα του μοντέλου είναι $32/35 = 91.43\%$.

6.1.2. Ηλεκτρόδιο Χρυσού, Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία

Για το ίδιο ηλεκτρόδιο χρυσού, πραγματοποιείται η ίδια μεθοδολογία και στη συνέχεια τα δεδομένα αναλύονται με τις ίδιες χημειομετρικές τεχνικές, ρυθμίζοντας αυτή την φορά τον πολαρογράφο να εκτελέσει διαφορική παλμική βολταμμετρία επιτρέποντας υψηλότερη ευαισθησία και ανάλυση. Τα βολταμμογραφήματα έχουν διαφορετικό σχήμα, καθώς η φύση της τεχνικής σάρωσης είναι διαφορετική, όπου αντί να πραγματοποιηθεί σάρωση του εύρους δυναμικού που ορίζεται, από το ένα άκρο έως στο άλλο και μετά να αντιστραφεί η κατεύθυνση της σάρωσης, πραγματοποιείται σάρωση μονής κατεύθυνσης από τα θετικά προς τα αρνητικά δυναμικά. Καθώς γίνεται χρήση πάλι του ηλεκτροδίου χρυσού, το εύρος σάρωσης περιορίζεται στο $[-1.3V | +0.6V]$.

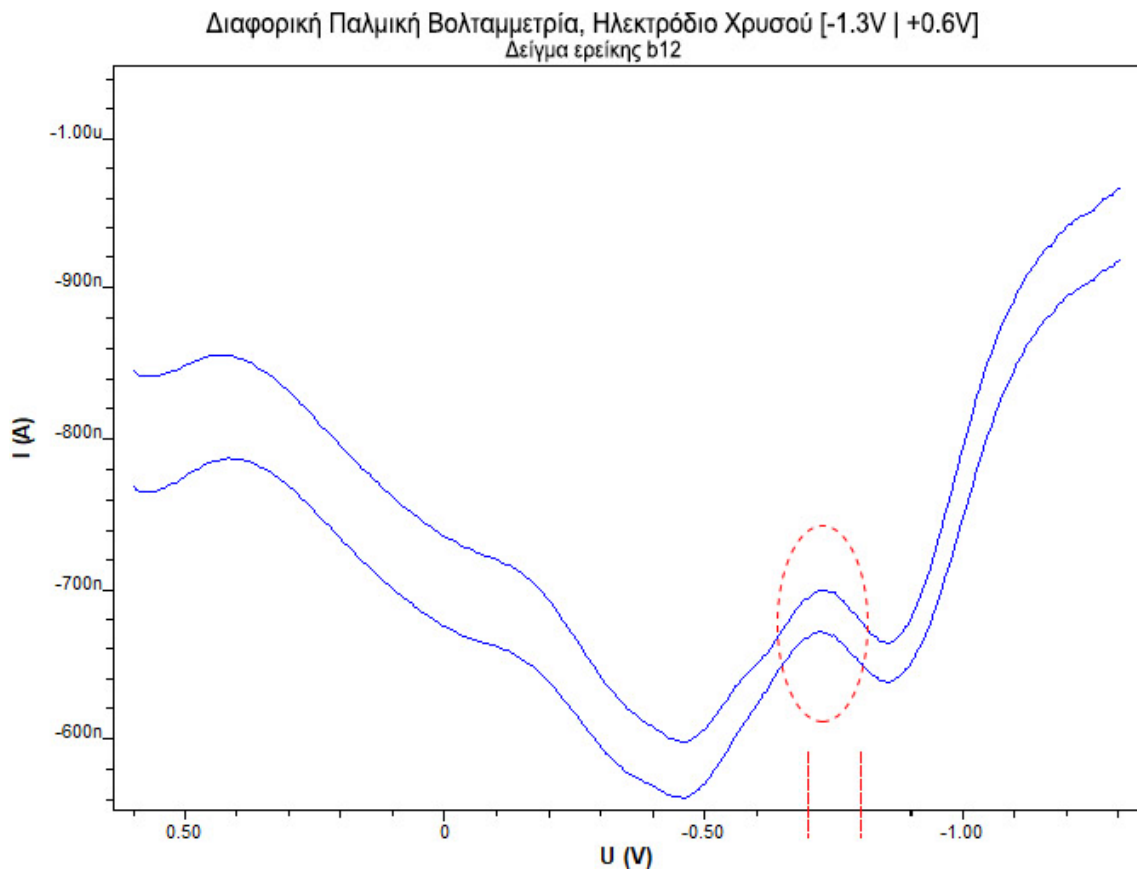
Το διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα που καταγράφηκε για τα μέλια που ανήκουν στην βοτανική ομάδα του θυμαριού, παρουσιάζεται στην παρακάτω *εικόνα 36*.



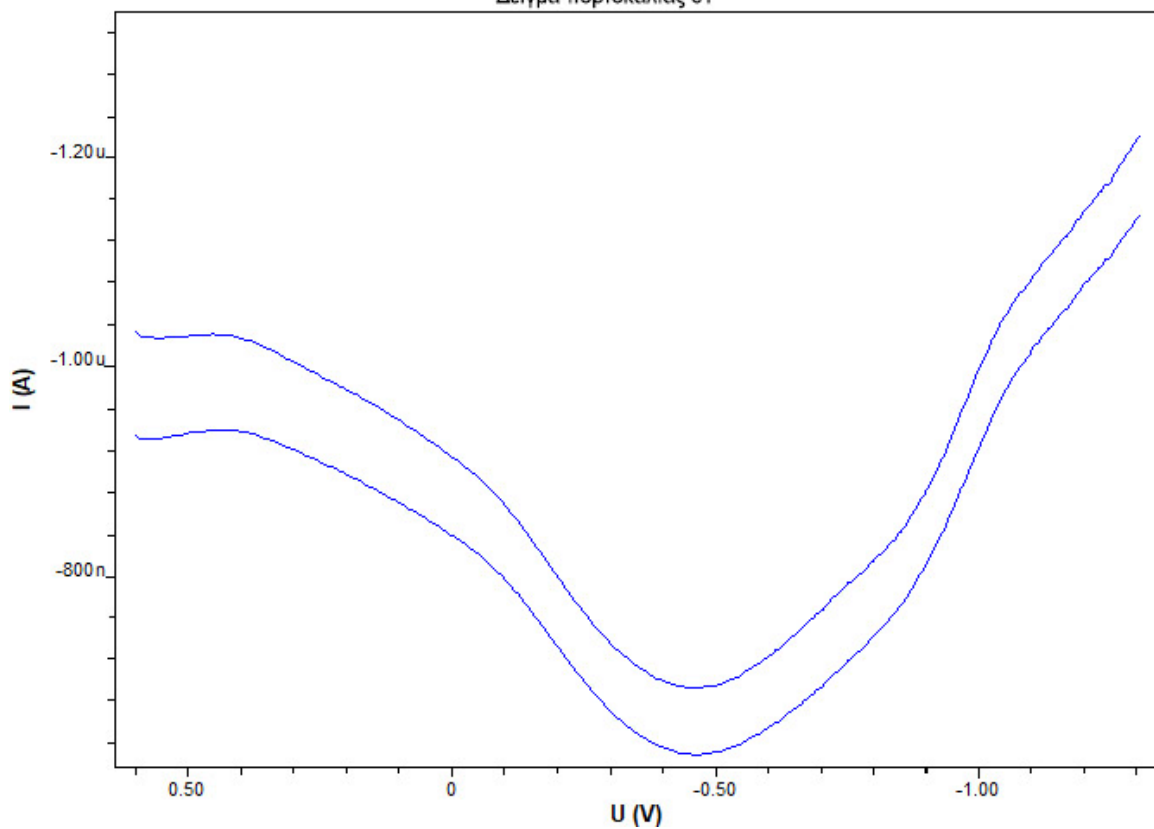
Εικόνα 36: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Στο παραπάνω βολταμμογράφημα [εικόνα 36], παρατηρείται περίπου στο σημείο [-0.45V] μια κορυφή ή αλλιώς σημείο καμπής, το οποίο είναι χαρακτηριστικό σε όλα τα βολταμμογραφήματα όλων των υπολοίπων κατηγοριών όπως θα φανεί παρακάτω. Ακολούθως παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα των υπολοίπων τριών κατηγοριών (ερείκη, πορτοκαλιά, πεύκο) στις εικόνες 37, 38 και 39 αντίστοιχα, με σκοπό την οπτική σύγκριση τους.

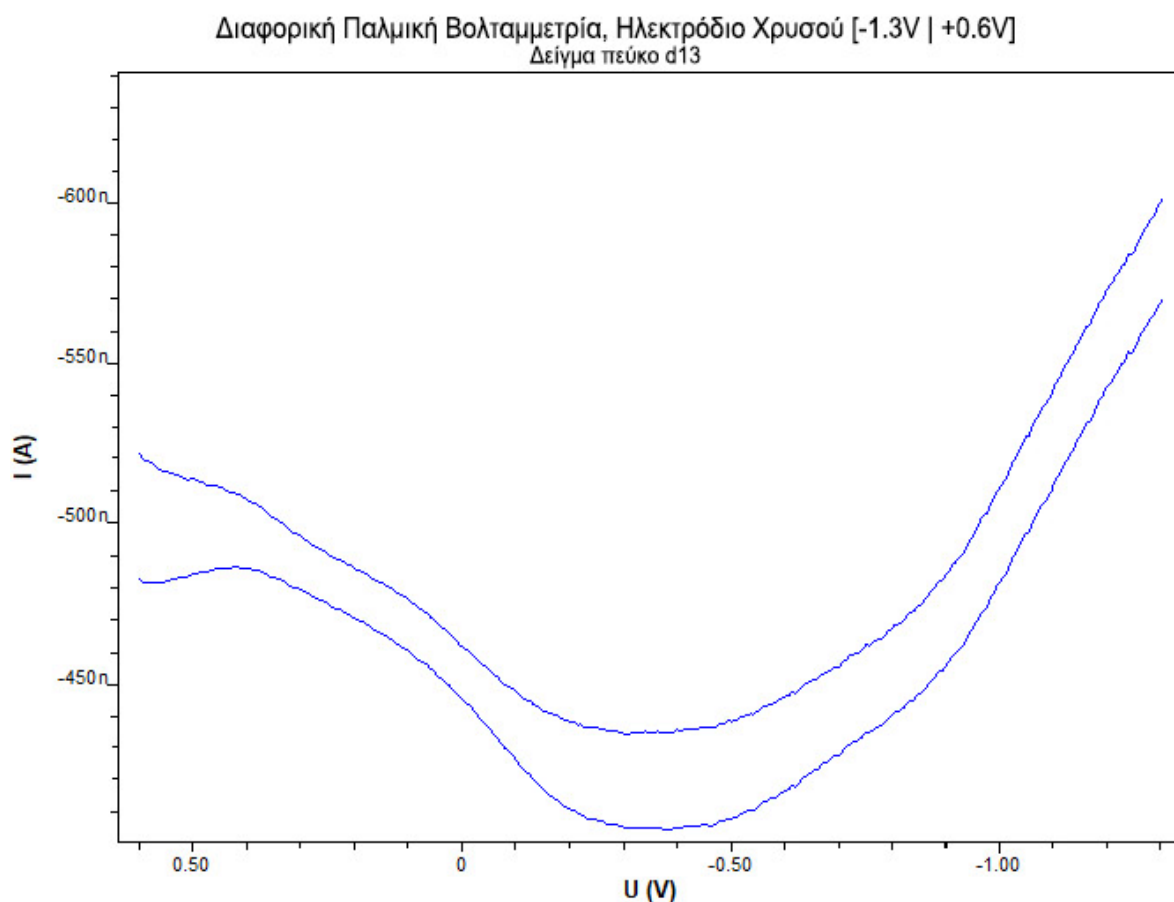
Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα



Εικόνα 37: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού
Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία, Ηλεκτρόδιο Χρυσού [-1.3V | +0.6V]
Δείγμα πορτοκαλιάς c1

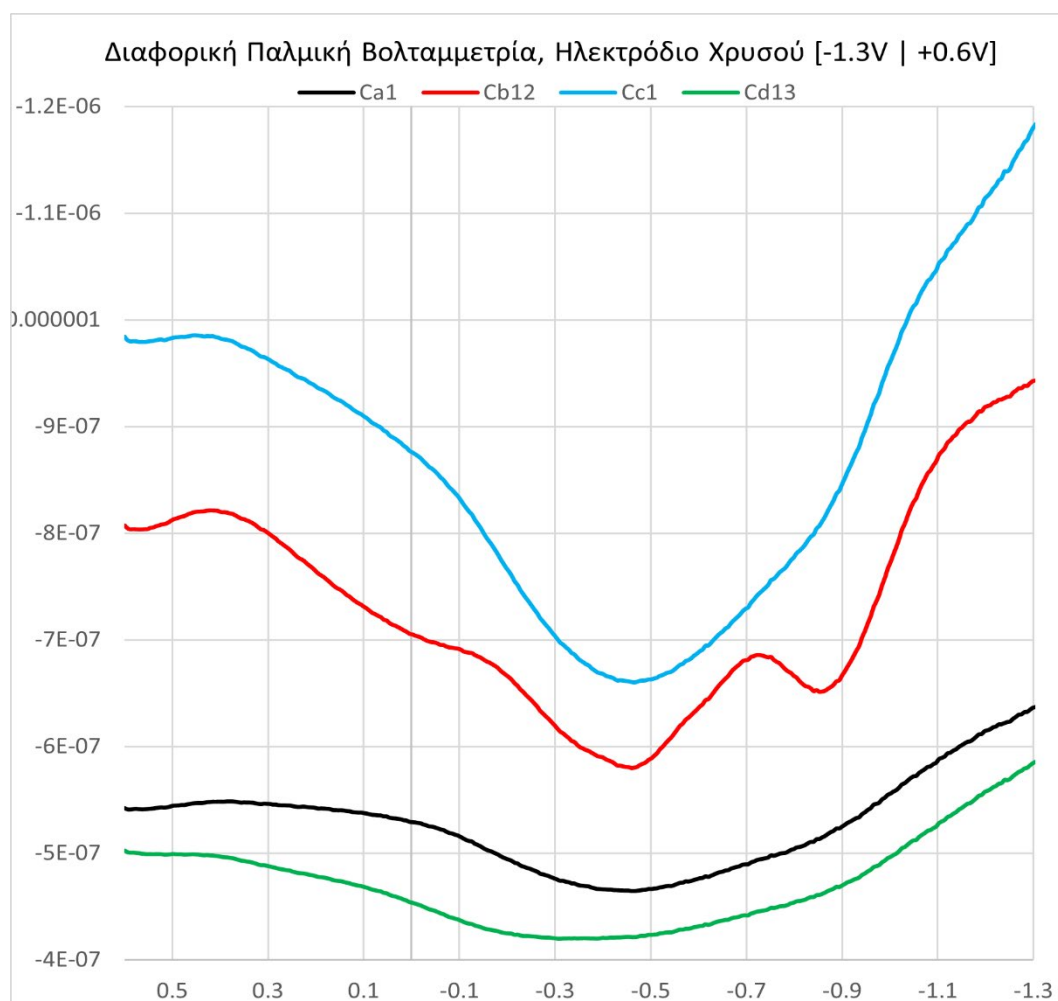


Εικόνα 38: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού



Εικόνα 39: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Παρατηρείται ότι όλα τα βολταμμογραφήματα σχεδόν μοιάζουν αρκετά ως προς το σχήμα και δεν παρουσιάζουν κορυφές, εκτός από το βολταμμογράφημα του δείγματος της ερείκης το οποίο παρουσιάζει μια κορυφή στο διάστημα [-0.8V | -0.7V]. Σημειώνεται όμως ότι η κορυφή αυτή είναι αμφισβητήσιμη καθώς στα μισά δείγματα της κατηγορίας της ερείκης, δεν εμφανίζεται η κορυφή αυτή. Παρακάτω δίνεται το συγκεντρωτικό βολταμμογράφημα με κοινούς άξονες [εικόνα 40] των τεσσάρων μελιών.



Εικόνα 40: Διαφορικό παλμικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Στο παραπάνω διάγραμμα με κοινούς άξονες, παρατηρείται ευκολότερα ότι έχουν μεγάλη διαφορά ως προς τις εντάσεις του ρεύματος, αν και η μετατόπιση των γραφημάτων προς τον οριζόντιο ή στον κατακόρυφο άξονα, δεν έχουν κάποια ιδιαίτερη σημασία, παρά μόνο οι αισθητές διαφορές ως προς την μορφή τους. Παρόλα αυτά μόνο μέσω της χημειομετρικής ανάλυσης θα διαπιστωθεί αν τελικώς μπορούν να εντοπιστούν μοτίβα ανά κατηγορία και αν γίνεται να ταξινομηθούν μεταξύ τους.

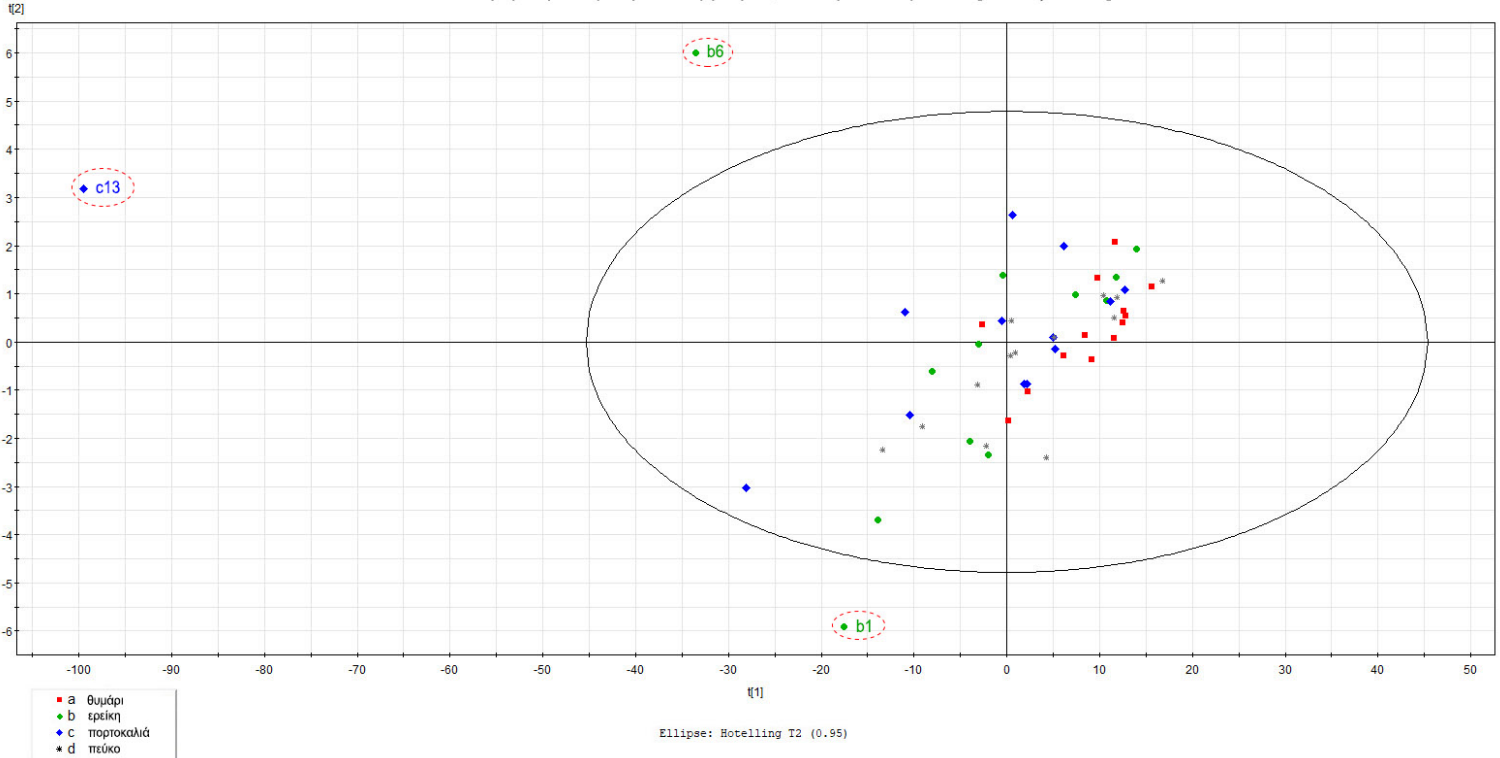
6.1.2.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA

Για κάθε ένα σημείο των προηγούμενων βολταμμογραφημάτων κατασκευάστηκε ο πίνακας δεδομένων X, αποτελούμενος από 51 γραμμές - αντικείμενα (δείγματα προς εξέταση) και 321 στήλες - μεταβλητές (τιμές ρευμάτων). Ακολουθεί ανάλυση PCA, στο οποίο διαμορφώθηκε μοντέλο με 4 κύριες συνιστώσες (PCs), με συνολικό συντελεστή συσχέτισης $R^2_{X(cum)} = 0.999$ και συνολικό διασταυρωμένο -επικυρωμένο συντελεστή συσχέτισης $Q^2_{(cum)} = 0.999$. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα συντεταγμένων

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

(score plot) στην *εικόνα 41*, όπου εμφανίζονται πάλι 3 έκτροπες τιμές - outliers (b1, b6, c13) οι οποίες μπορούν να αγνοηθούν και να μην συμπεριληφθούν στα επόμενα μοντέλα που θα αναπτυχθούν.

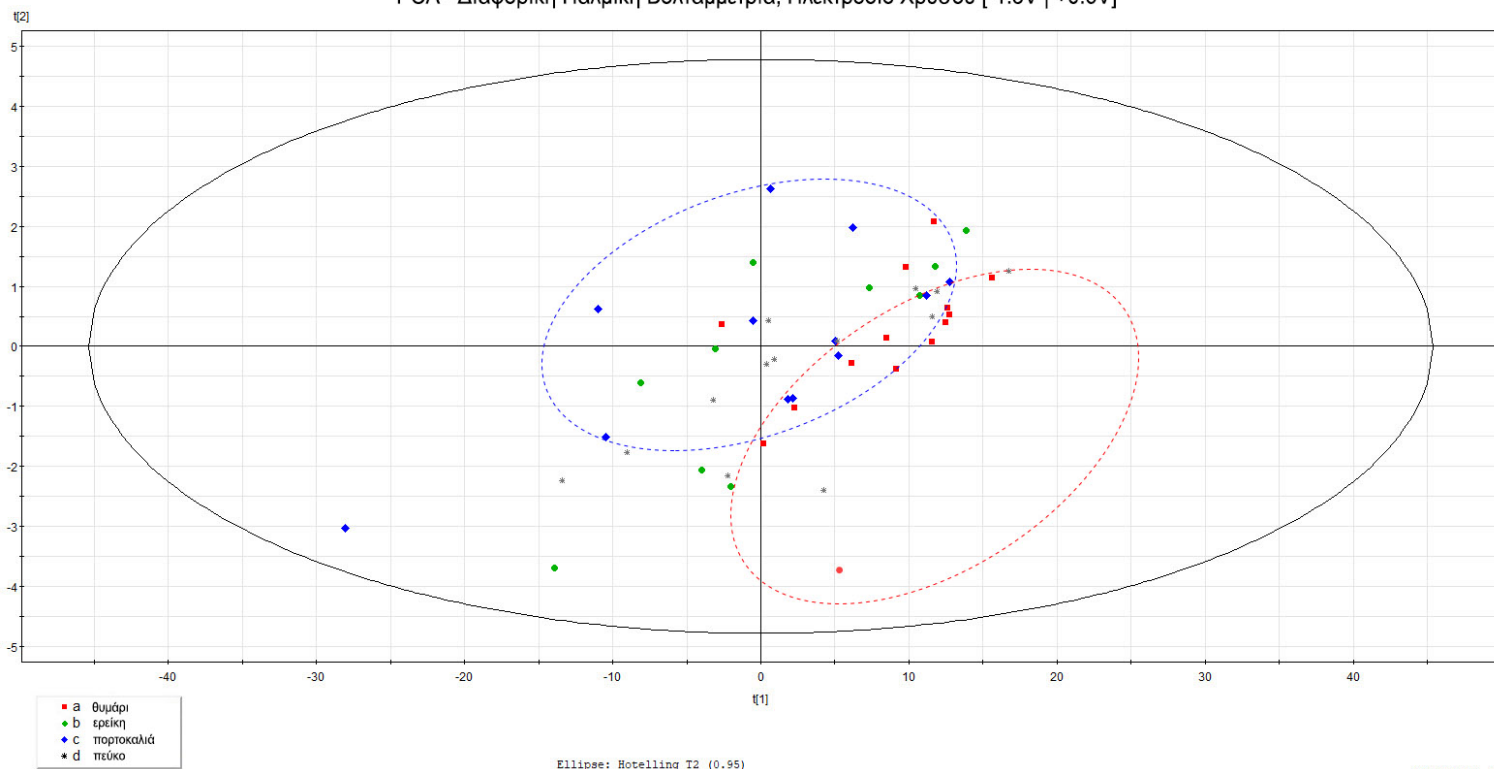
PCA - Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία, Ηλεκτρόδιο Χρυσού [-1.3V | +0.6V]



Εικόνα 41: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού και επισήμανση των έκτροπων τιμών

Αφαιρούνται οι έκτροπες τιμές και ξαναφτιάχνεται νέος πίνακας δεδομένων με σκοπό να επαναληφθεί η διαδικασία ανάλυσης PCA, ώστε να μην υπολογίζονται οι τιμές αυτές κατά την μοντελοποίηση και να εμφανιστεί πιο ευκρινές διάγραμμα συντεταγμένων [*εικόνα 42*]. Παρόλα αυτά, ενώ οι συντελεστές των μοντέλων ήταν πολύ κοντά στο 1 δείχνοντας ότι τα δείγματα μετέφραζαν το μοντέλο ικανοποιητικά, οπτικός διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί μόνο μεταξύ των δειγμάτων του θυμαριού και της πορτοκαλιάς καθώς στα υπόλοιπα υπάρχει μεγάλη διασπορά, καθιστώντας τα αδύνατα να διαχωριστούν και τα ταξινομηθούν.

PCA - Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία, Ηλεκτρόδιο Χρυσού [-1.3V | +0.6V]



Εικόνα 42: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων

6.1.2.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA

Μετά την ανάλυση PCA, ακολουθεί η εποπτευόμενη ανάλυση PLS-DA. Αφού αφαιρέθηκαν οι outliers τιμές και ξανακατασκευάστηκε ο πίνακας δεδομένων με 48 γραμμές και 321 στήλες, δοκιμάστηκαν πολλαπλοί συνδυασμοί ορισμών κλάσεων, αλλά παρακάτω παρατίθενται μόνο οι περιπτώσεις στις οποίες επιτεύχθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα μεταξύ των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν.

Αρχικά δοκιμάστηκε μοντελοποίηση ορίζοντας ως κλάση μόνο το δείγμα ερείκης (b) όπου ήταν το μοναδικό που εμφάνιζε κορυφή σε μερικά από τα γραφήματα. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά και για αυτό δεν παρουσιάζονται τα διαγράμματα.

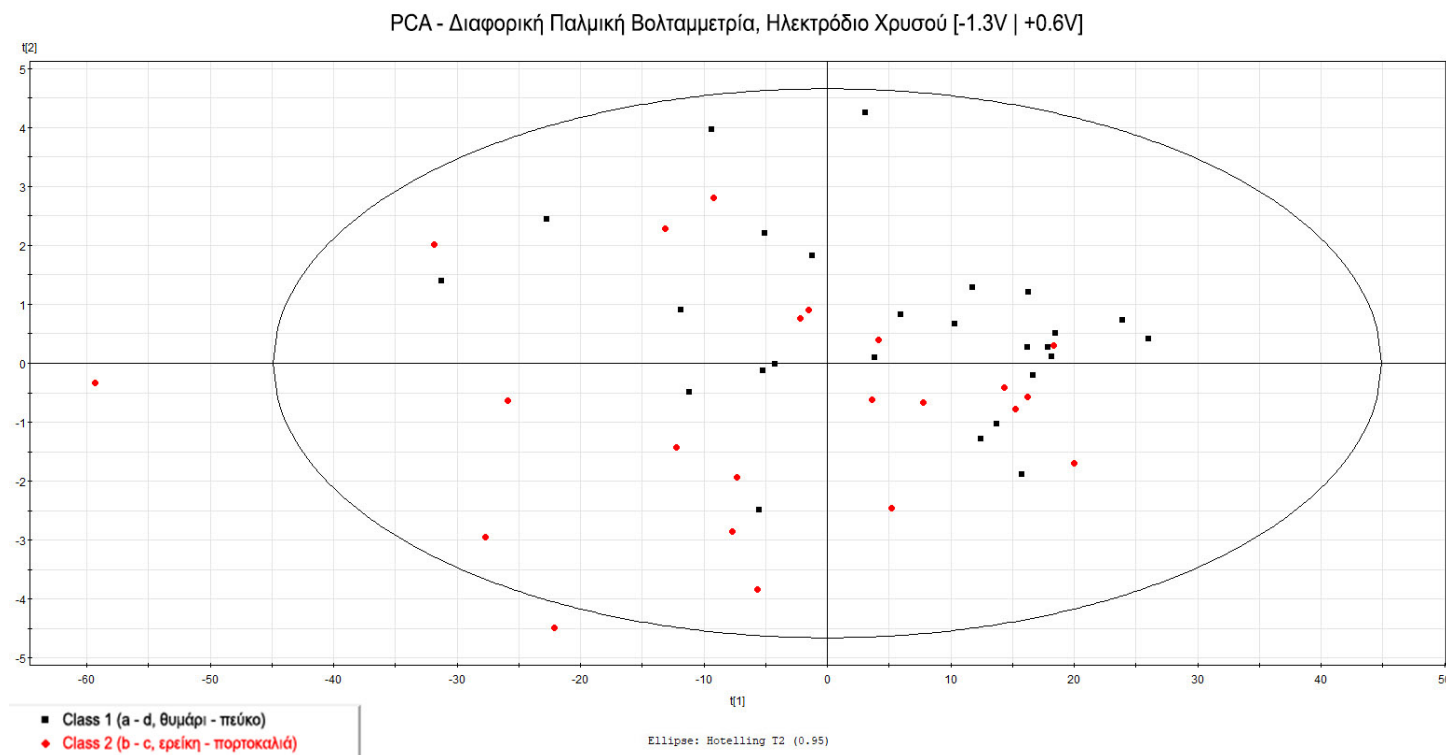
Στη συνέχεια, έγινε μοντελοποίηση με

- Κλάση 1 = θυμάρι + πεύκο (a-d)
- Κλάση 2 = ερείκη + πορτοκαλιά (b-c)

όπως έγινε στην ανάλυση της κυκλικής βολταμμετρίας ώστε να φανεί αν παρουσιάζει τα ίδια θετικά αποτελέσματα. Προέκυψε μοντέλο με 2 κύριες συνιστώσες και $R^2X_{(cum)}$

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

= 0.987, $R^2Y_{(cum)} = 0.222$ και $Q^2_{(cum)} = 0.136$. Το διάγραμμα συντεταγμένων [εικόνα 43] είναι:



Εικόνα 43: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

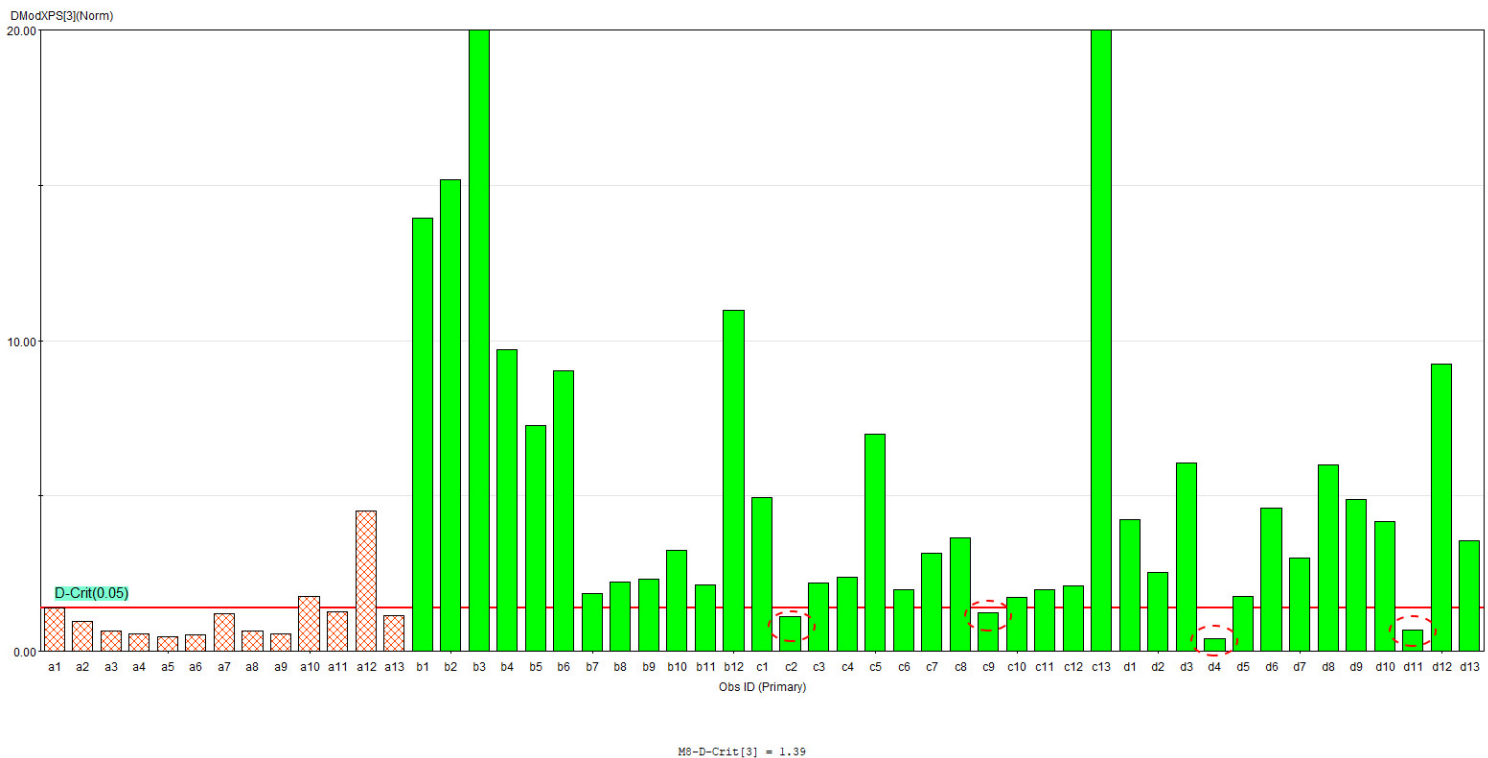
στο οποίο παρατηρείται χωρίς την ανάγκη σχεδιασμού χωρίων ότι είναι ανάμεικτα μεταξύ τους και δεν μπορεί να γίνει μια ταξινόμηση σε αντίθεση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα στην κυκλική βολταμμομετρία.

6.1.2.3 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class)

Ακολουθεί μοντελοποίηση μιας κλάσης όπου πραγματοποιήθηκε μελέτη και ορίστηκαν μοντέλα με ξεχωριστή κλάση για κάθε ξεχωριστή κατηγορία βοτανικής προέλευσης (a - θυμάρι, b - ερείκη, c - πορτοκαλιά, d – πεύκο) αλλά και συνδυασμών αυτών σύμφωνα με τις πιθανές ομοιότητες που παρουσιάστηκαν από τα βολταμμογραφήματα (a-b, a-c) καθώς και τους υπόλοιπους πιθανούς συνδυασμούς σε περίπτωση που μπορούν να παρουσιάσουν παρόμοια κατηγοριοποίηση την οποία δεν παρατηρείται οπτικός (a-d, b-c, b-d, c-d).

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Μόνο μία από όλες τις δοκιμές παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα, το οποίο ήταν αυτό με επιλεγμένα τα δείγματα του θυμαριού (α) αυτή τη φορά (αντί για της πορτοκαλιάς, c, όπως στην κυκλική βολταμμομετρία. Αφού ορίστηκαν ως άγνωστα τα υπόλοιπα δείγματα μαζί με τα δείγματα a12 και a13 για λόγους επαλήθευσης του μοντέλου, στο μοντέλο προέκυψαν 3 κύριες συνιστώσες, με $R^2X_{(cum)} = 0.999$ και $Q^2_{(cum)} = 0.998$ και κρίσιμη τιμή $D-Crit(3) = 1.39$. Παρακάτω παρουσιάζεται το ραβδοδιάγραμμα [εικόνα 44] με τις αποστάσεις των δειγμάτων από το μοντέλο.



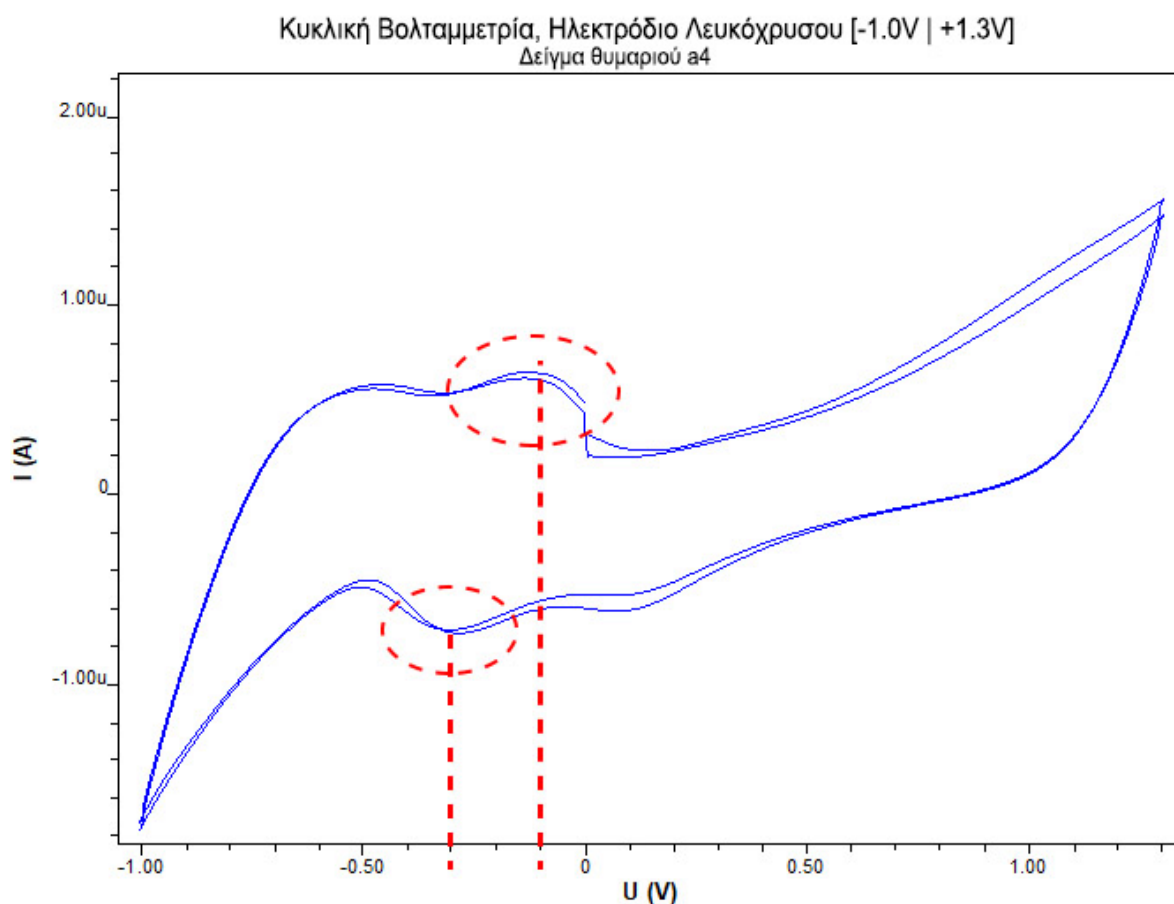
Εικόνα 44: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου *Class Modeling* για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού

Οι κατακόρυφες ράβδοι συμβολίζουν κάθε δείγμα μελιού, οι κόκκινες ράβδοι συμβολίζουν τα δείγματα που ορίστηκαν ως κλάση 1 και θεωρούνται γνωστά, οι υπόλοιπες πράσινες αναπαριστούν τα υπόλοιπα θεωρητικά άγνωστα δείγματα και οι διακεκομμένες ελλείψεις τα σφάλματα της μεθόδου. Από τα 13 δείγματα θυμαριού, τα 3 είναι μεγαλύτερα από την κρίσιμη τιμή, γεγονός λανθασμένο καθώς είναι γνωστό ότι ανήκουν στην κατηγορία αυτή, μέσα στα οποία επίσης έχει καταταχθεί λάθος το δείγμα a12 που ορίστηκε ως άγνωστο, οπότε η ευαισθησία της μεθόδου είναι $10/13 = 77\%$. Εν συνεχεία, στα υπόλοιπα άγνωστα δείγματα, 4 από αυτά (2 πορτοκαλιάς και 2 πεύκου) ταξινομήθηκαν λανθασμένα ως κατηγορία θυμαριού, δείχνοντας ότι η ειδικότητα του μοντέλου είναι $34/38 = 89.5\%$.

6.1.3. Ηλεκτρόδιο Λευκόχρυσου, Κυκλική Βολταμμετρία

Με δεδομένο ότι η ένταση και η θέση των κορυφών εξαρτώνται από το υλικό του ηλεκτροδίου εργασίας, όπου λαμβάνουν χώρα διαφορετικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καθώς λειτουργούν σε διαφορετικά δυναμικά, μελετήθηκε η κυκλική βολταμμετρία με ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου. Το εύρος του δυναμικού στο οποίο πραγματοποιήθηκε σάρωση από τον πολαρογράφο, κυμαίνεται από [-1.0V | +1.3V] εφόσον το ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου χρησιμοποιείται κυρίως για οξειδώσεις και οπότε δουλεύει καλύτερα στα θετικά δυναμικά.

Ένα χαρακτηριστικό κυκλικό βολταμμογράφημα που καταγράφηκε για τα μέλια που ανήκουν στην βοτανική ομάδα του θυμαριού, παρουσιάζεται στη παρακάτω εικόνα 45.



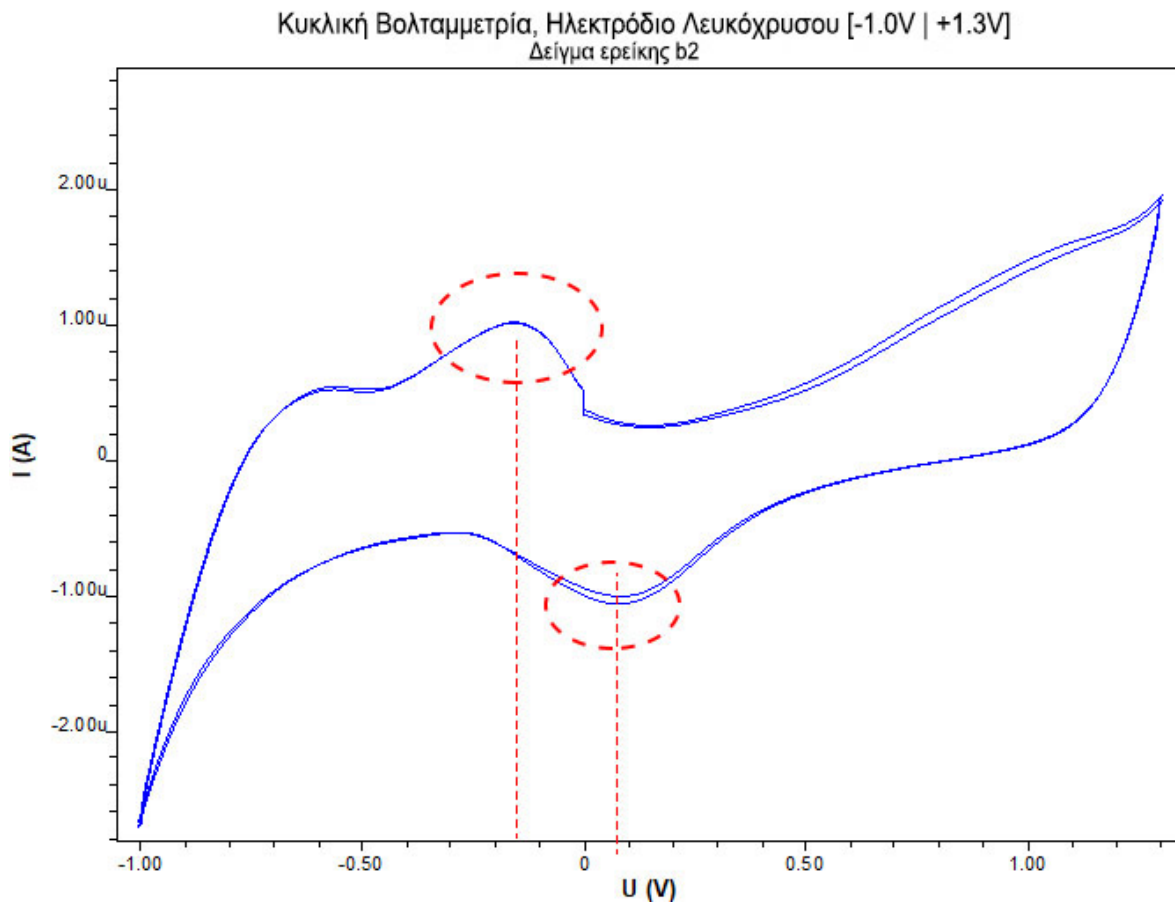
Εικόνα 45: Κυκλικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα [εικόνα 45], εκτός από τις κορυφές στα δύο άκρα του εύρους σάρωσης οι οποίες προκύπτουν προφανώς λόγω της αντίθετης αύξησης ή μείωσης της έντασης του δυναμικού στα ηλεκτρόδια, παρατηρούνται ακόμη δύο κορυφές, μία στο κάτω τμήμα του βολταμμογραφήματος

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

περίπου στο $[-0.4\text{V} \mid -0.2\text{V}]$ και μία στο άνω τμήμα στο $[-0.2\text{V} \mid 0\text{V}]$. Παρακάτω παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα βολταμμογράφημα των υπολοίπων 3 κατηγοριών (ερείκη, πορτοκαλιά, πεύκο) στις εικόνες 46, 47 και 48 αντίστοιχα για την οπτική παρατήρηση και σύγκριση μεταξύ τους σε πρώτο στάδιο ώστε να γίνει μια εκτίμηση πριν ακολουθήσει η χημειομετρική ανάλυση.

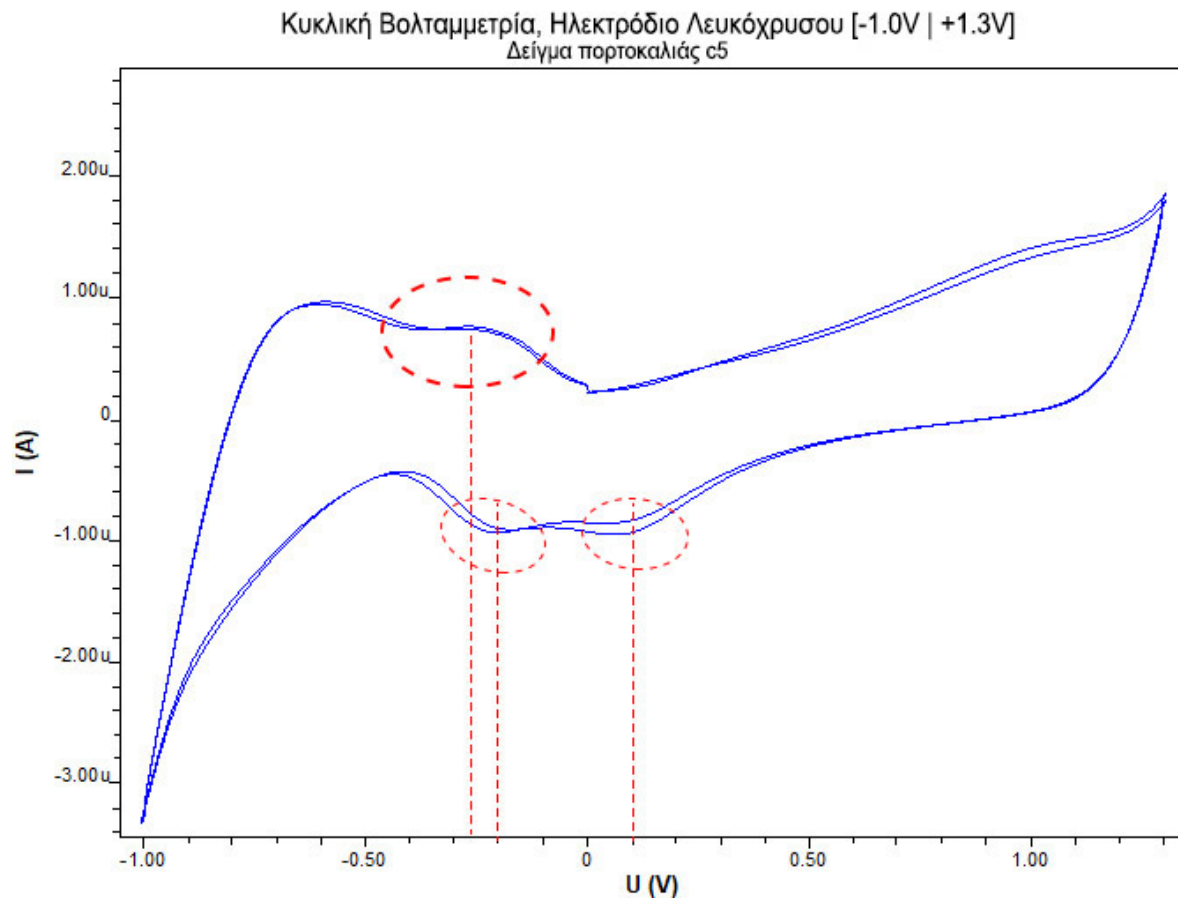
Για το δείγμα ερείκης [εικόνα 46] παρατηρείται κορυφή στο άνω τμήμα στο εύρος $[-0.3\text{V} \mid 0\text{V}]$ και στο κάτω τμήμα στο εύρος $[0\text{V} \mid +0.2\text{V}]$.



Εικόνα 46: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

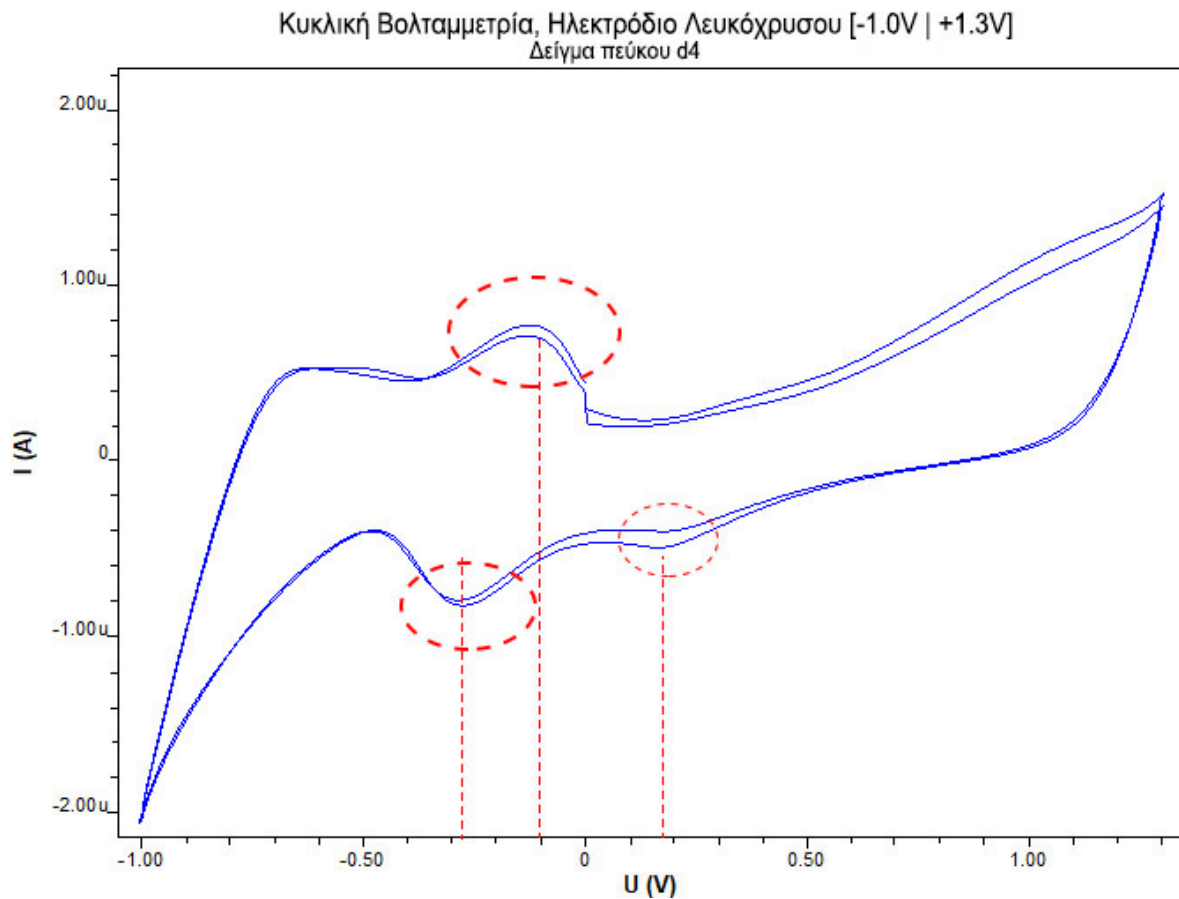
Για το δείγμα πορτοκαλιάς [εικόνα 47] παρατηρείται πάλι μια κορυφή στο άνω τμήμα στο εύρος $[-0.3\text{V} \mid -0.1\text{V}]$ και στο κάτω τμήμα φαίνονται 2 πολύ ασθενείς κορυφές στο $[-0.3\text{V} \mid -0.15\text{V}]$ και $[0\text{V} \mid +0.2\text{V}]$.



Εικόνα 47: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

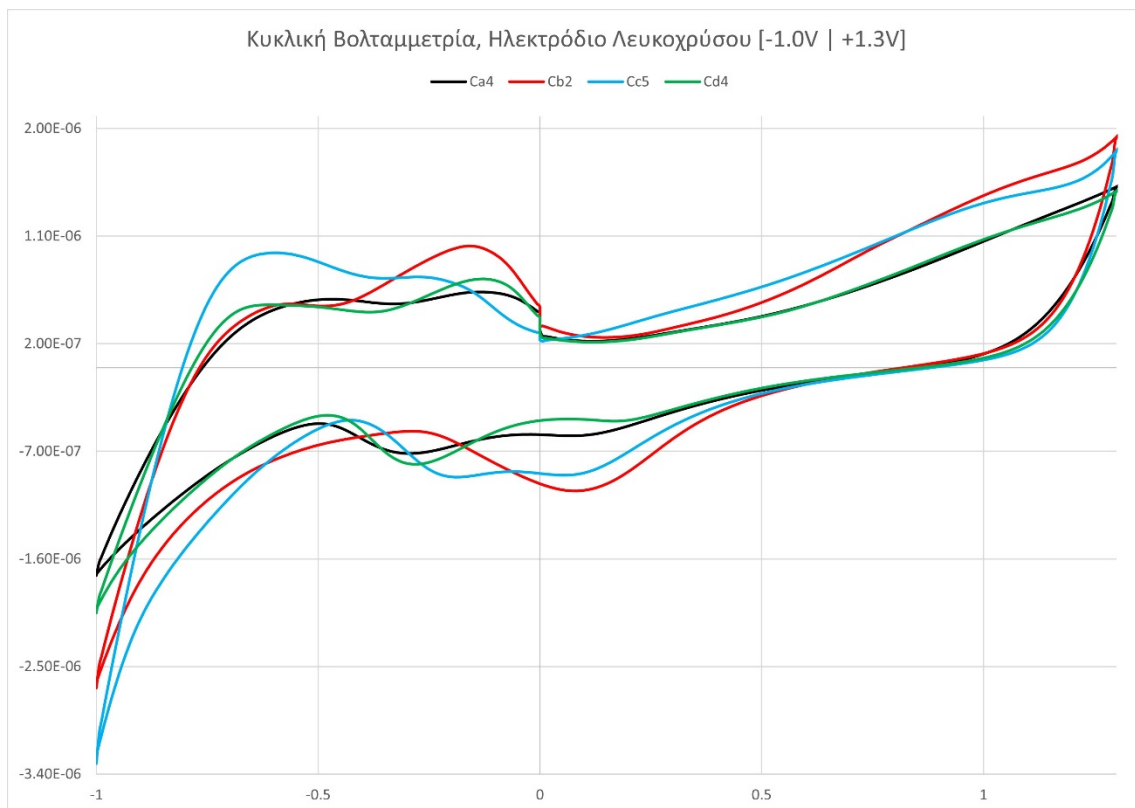
Τέλος, για τα δείγματα πεύκου [εικόνα 48], φαίνονται και πάλι 3 κορυφές, μία στο άνω τμήμα μεταξύ $[-0.2\text{V} \mid 0\text{V}]$ και δύο στο κάτω μεταξύ $[-0.4\text{V} \mid -0.2\text{V}]$ και $[+0.1\text{V} \mid +0.3\text{V}]$.



Εικόνα 48: Κυκλικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Καθώς τα 4 αυτά δείγματα παρουσιάζουν σχεδόν κοινές κορυφές και περίπου στις ίδιες τοποθεσίες, παρακάτω δίνεται ένα συνολικό διάγραμμα με κοινούς κατακόρυφους άξονες για να γίνουν πιο ευδιάκριτες οι διαφορές τους [εικόνα 49].



Εικόνα 49: Κυκλικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

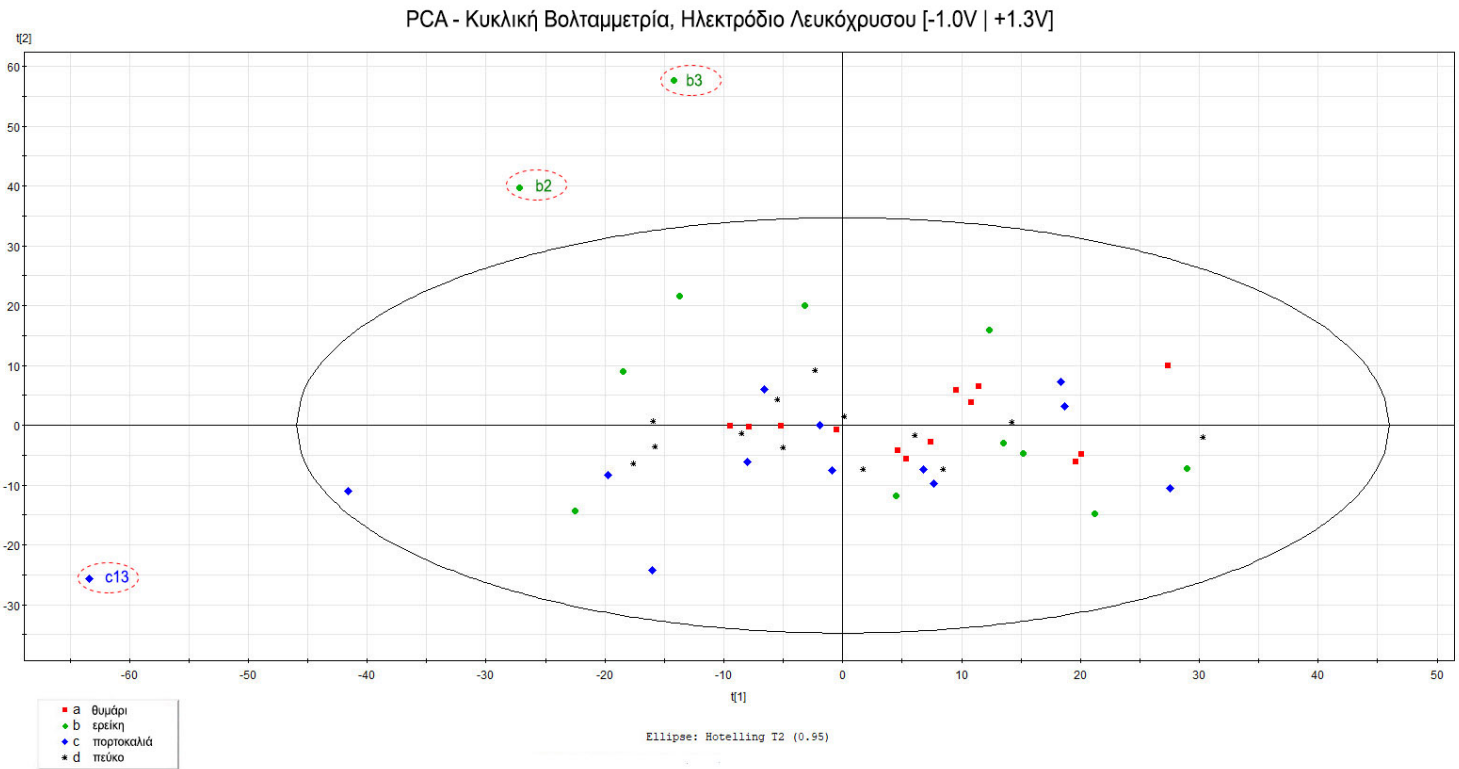
Στο διάγραμμα αυτό παρατηρείται ότι τα βολταμμογραφήματα των 4 δειγμάτων, έχουν πάλι πανομοιότυπο σχήμα, απλά οι κορυφές του καθενός είναι ελαφρά μετατοπισμένες ή μεγαλύτερες συγκριτικά μεταξύ τους. Παρακάτω στην χημειομετρική ανάλυση θα φανεί αν τελικώς είναι εφικτή η ταξινόμηση των δειγμάτων.

6.1.3.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA

Για κάθε ένα σημείο των προηγούμενων βολταμμογραφήματων κατασκευάστηκε ο πίνακας δεδομένων X , αποτελούμενος από 51 γραμμές - αντικείμενα (δείγματα προς εξέταση) και 777 στήλες - μεταβλητές (τιμές ρευμάτων). Ακολουθεί ανάλυση PCA, στο οποίο διαμορφώθηκε μοντέλο με 11 κύριες συνιστώσες (PCs), με συνολικό συντελεστή προσδιορισμού $R^2X_{(cum)} = 0.992$ και συνολικό διασταυρωμένο-επικυρωμένο συντελεστή προσδιορισμού $Q^2_{(cum)} = 0.975$. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα

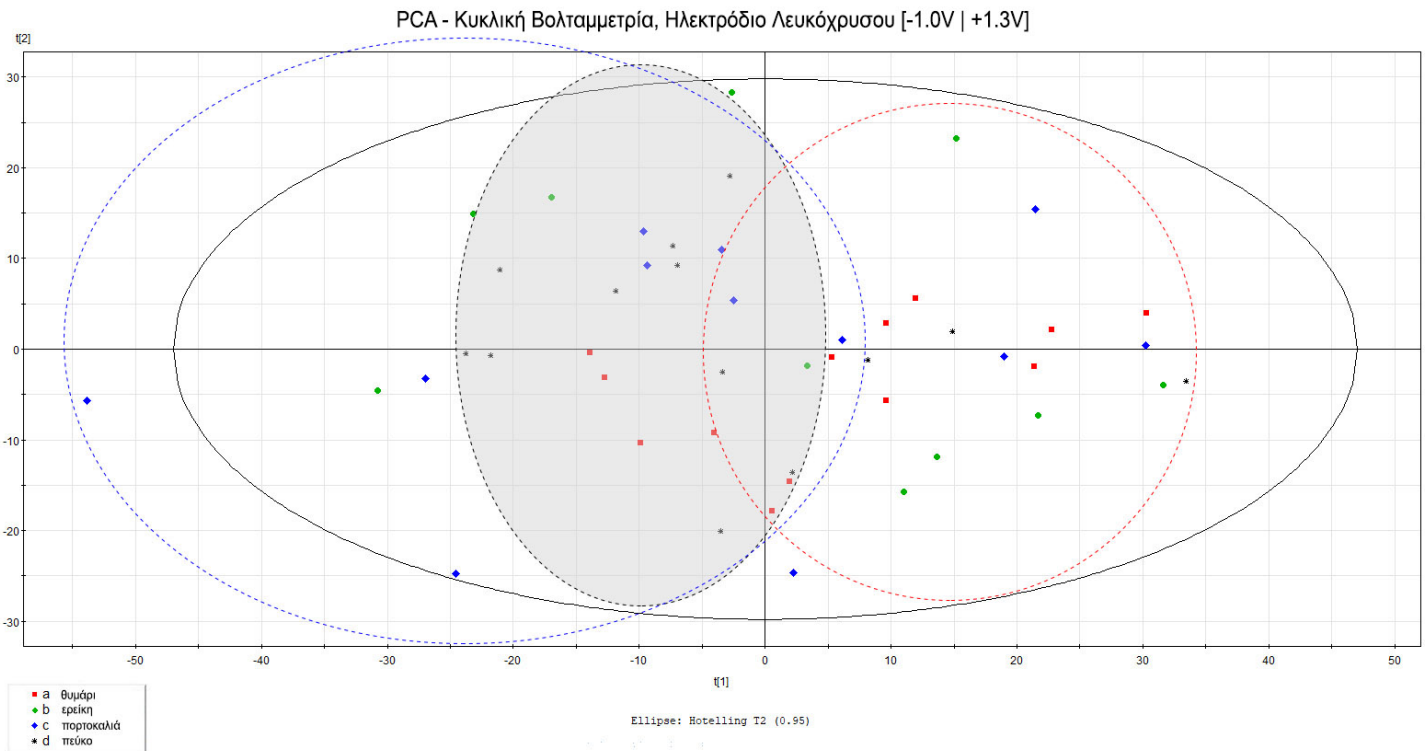
Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

συντεταγμένων (score plot) στην *εικόνα 50*, όπου εμφανίζονται οι ίδιες 3 έκτροπες τιμές – outliers με αυτές της κυκλικής βολταμμετρίας με χρήση του ηλεκτροδίου χρυσού (b2, b3, c13) και οι οποίες μπορούν να αγνοηθούν και να μην συμπεριληφθούν στα επόμενα μοντέλα που θα υπολογιστούν.



Εικόνα 50: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και επισήμανση των έκτροπων τιμών

Πραγματοποιείται ξανά μοντελοποίηση PCA αφαιρώντας τις έκτροπες τιμές που εμφανίστηκαν, οι οποίες εμφανίζονται ίδιες σε όλα τα πειράματα και δείχνουν ότι τα δείγματα αυτά παρουσιάζουν μια περίεργη συμπεριφορά. Στο διάγραμμα συντεταγμένων που προκύπτει σχεδιάζονται οπτικά οι περιοχές στις οποίες ανήκουν τα δείγματα [εικόνα 51].



Εικόνα 51: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου χρυσού χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων

Υπάρχει μια σχετική ταξινόμηση με μια πρώτη ματιά, με τα δείγματα της πορτοκαλιάς (c) και πεύκου (d) να βρίσκονται στο αριστερό τμήμα και τα δείγματα του θυμαριού (a) επί τον πλείστον στο δεξί τμήμα της έλλειψης. Οπότε είναι δυνατό να παρθεί μια αρχική πληροφορία ότι τα δείγματα πορτοκαλιάς και πεύκου δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους και επομένως μπορούν να οριστούν ως κοινή κλάση μιας και παρουσιάζουν παρόμοια ταξινόμηση, ενώ παράλληλα ξεχωρίζουν με τα δείγματα του θυμαριού.

6.1.3.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA

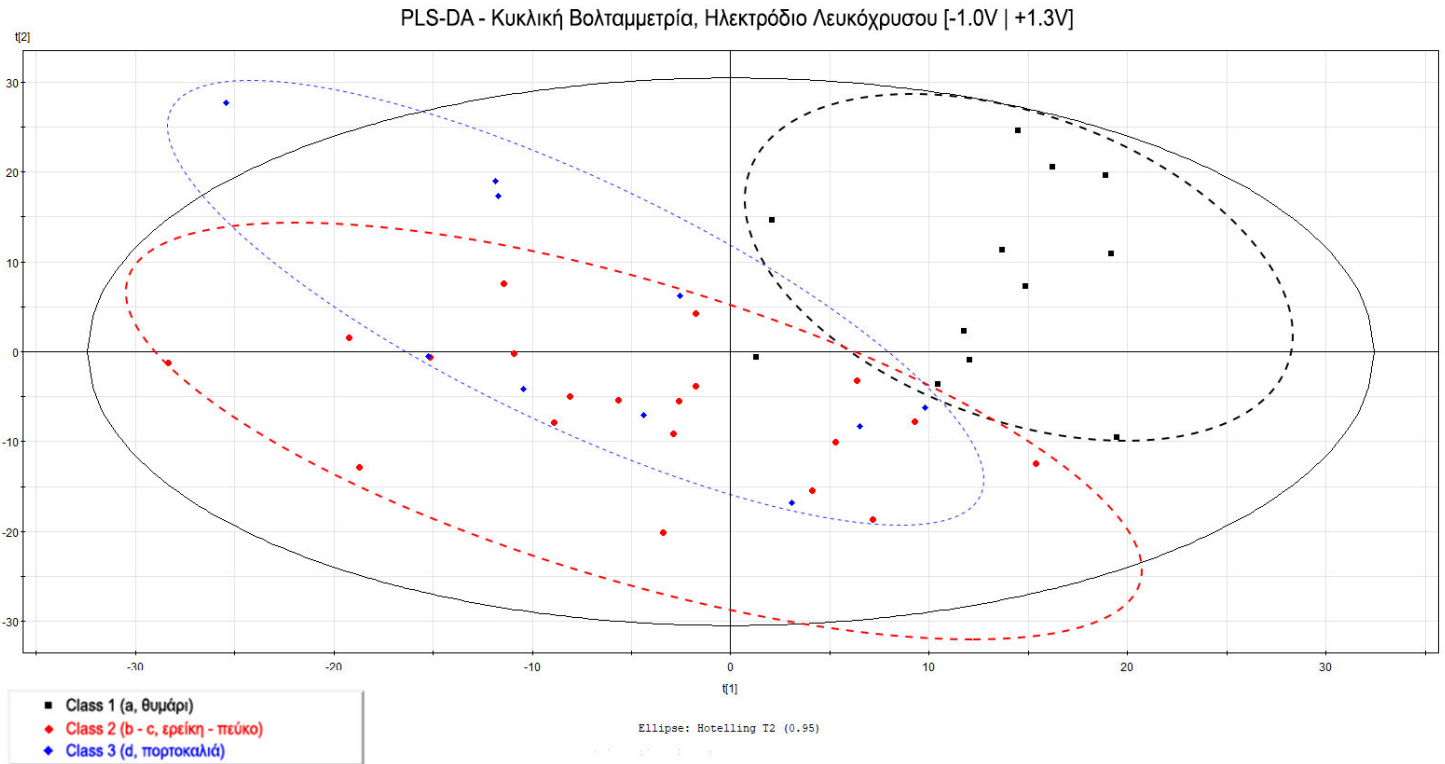
Μετά την ανάλυση PCA, ακολουθεί η εποπτευόμενη ανάλυση PLS-DA με τον νέο πίνακα χωρίς τα outlier δείγματα (b2, b3, c13), όπου δοκιμάστηκαν πολλαπλοί συνδυασμοί ορισμών κλάσεων.

Αρχικά αναπτύχθηκε μοντέλο με:

- Κλάση 1 = θυμάρι
- Κλάση 2 = ερείκη + πεύκο
- Κλάση 3 = πορτοκαλιά

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

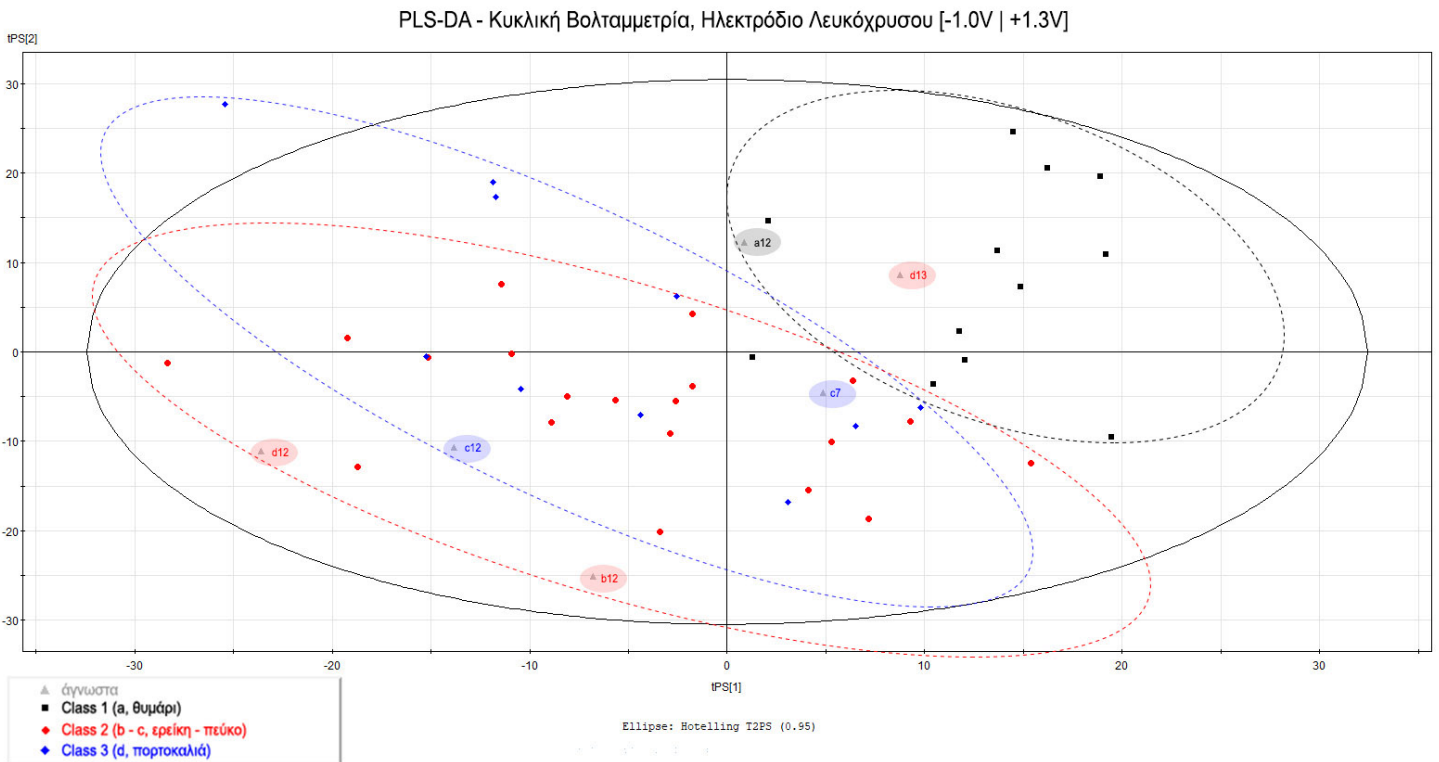
και ορίστηκαν ως άγνωστα τα τυχαία δείγματα [a12], [b12,d12,d13] και [c7,c12], προκύπτοντας μοντέλο με 3 κύριες συνιστώσες και $R^2X_{(cum)} = 0.681$, $R^2Y_{(cum)} = 0.542$ και $Q^2_{(cum)} = 0.334$. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα των συντεταγμένων [εικόνα 52], στο οποίο φαίνεται ξεκάθαρα αυτή τη φορά ο διαχωρισμός μεταξύ των κλάσεων.



Εικόνα 52: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και διαχωρισμό των κλάσεων

Παρόλο που υπάρχει πάλι μια διασπορά των σημείων στο διάγραμμα, παρατηρείται ότι η κλάση του θυμαριού ταξινομείται και ξεχωρίζει από αυτήν της ερείκης και του πεύκου καθώς και με αυτήν της πορτοκαλιάς. Στην συνέχεια, μελετήθηκε και εφαρμόστηκε το μοντέλο πρόβλεψης στο οποίο αποτυπώνονται πάνω στο ίδιο διάγραμμα [εικόνα 53], τα 6 δείγματα που ορίστηκαν ως άγνωστα ώστε να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος εγκυρότητας του μοντέλου.

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα



Εικόνα 53: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (3 κλάσεων) για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων

Παρατηρείται ότι όλες οι προβλέψεις εκτός από το δείγμα d13, επαληθεύουν το μοντέλο που κατασκευάστηκε, καθώς είναι γνωστό ότι το δείγμα a12 είναι θυμάρι και άρα πρέπει να βρίσκεται στην περιοχή της πρώτης κλάσης (μαύρη), τα δείγματα d12 και b12 είναι μέλια ερείκης και πεύκου άρα ορθώς βρίσκονται στην περιοχή της δεύτερης κλάσης (μαύρη) και τα δείγματα c7 και c12 είναι μέλια πορτοκαλιάς που ορθώς βρίσκονται στην περιοχή της τρίτης κλάσης (μπλε).

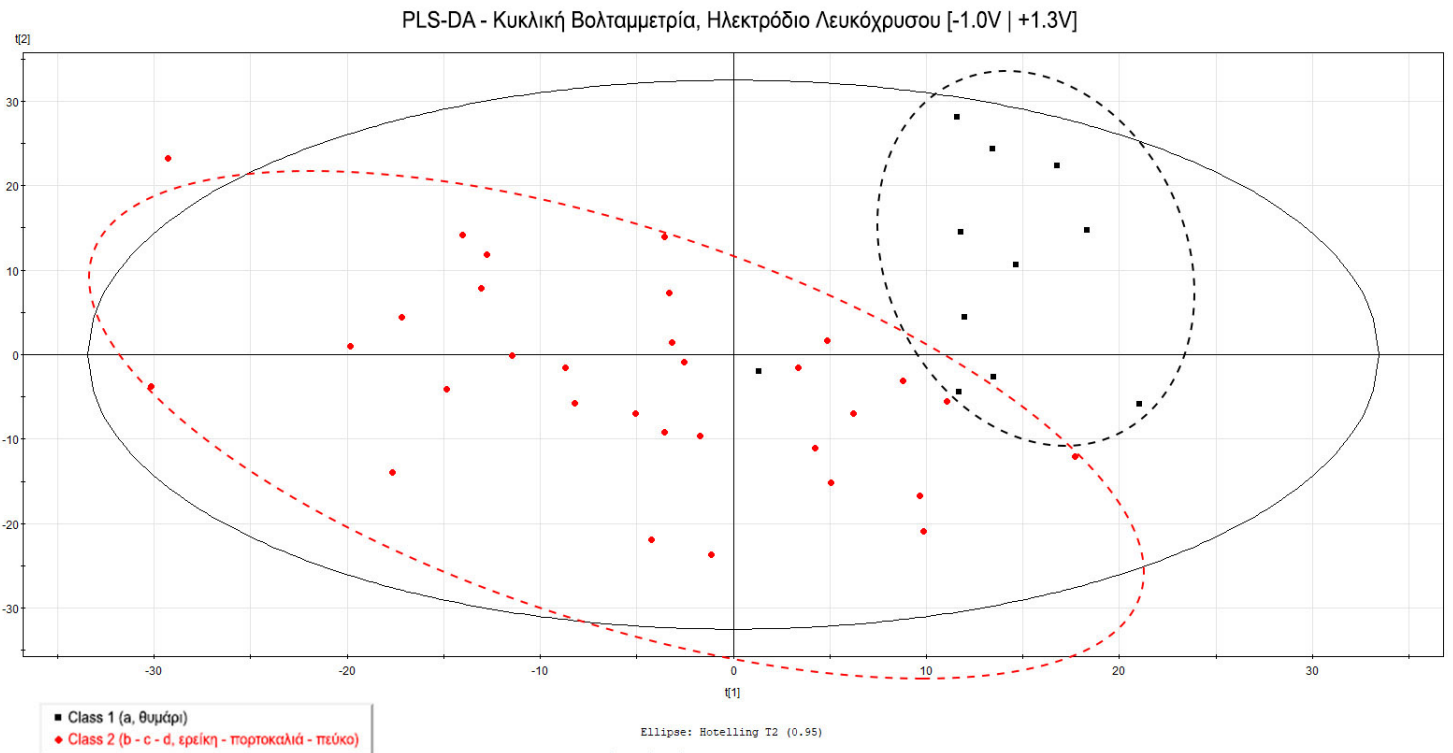
Να σημειωθεί ότι τα μοντέλα 3 κλάσεων όλων των υπολοίπων δυνατών συνδυασμών ορίζοντας πάντα ως πρώτη κλάση τα δείγματα θυμαριού, επιτύχανε πάντοτε πανομοιότυπο διαχωρισμό συμπεραίνοντας ότι είναι εφικτή η ταξινόμηση του θυμαριού σε σχέση με τις υπόλοιπες 3 βοτανικές κατηγορίες.

Για την περαιτέρω ανάλυση του εγχειρήματος αυτού, μελετήθηκε άλλο ένα μοντέλο, με κλάσεις

- Κλάση 1 = θυμάρι (a)
- Κλάση 2 = ερείκη, πορτοκαλιά και πεύκο (b,c,d)

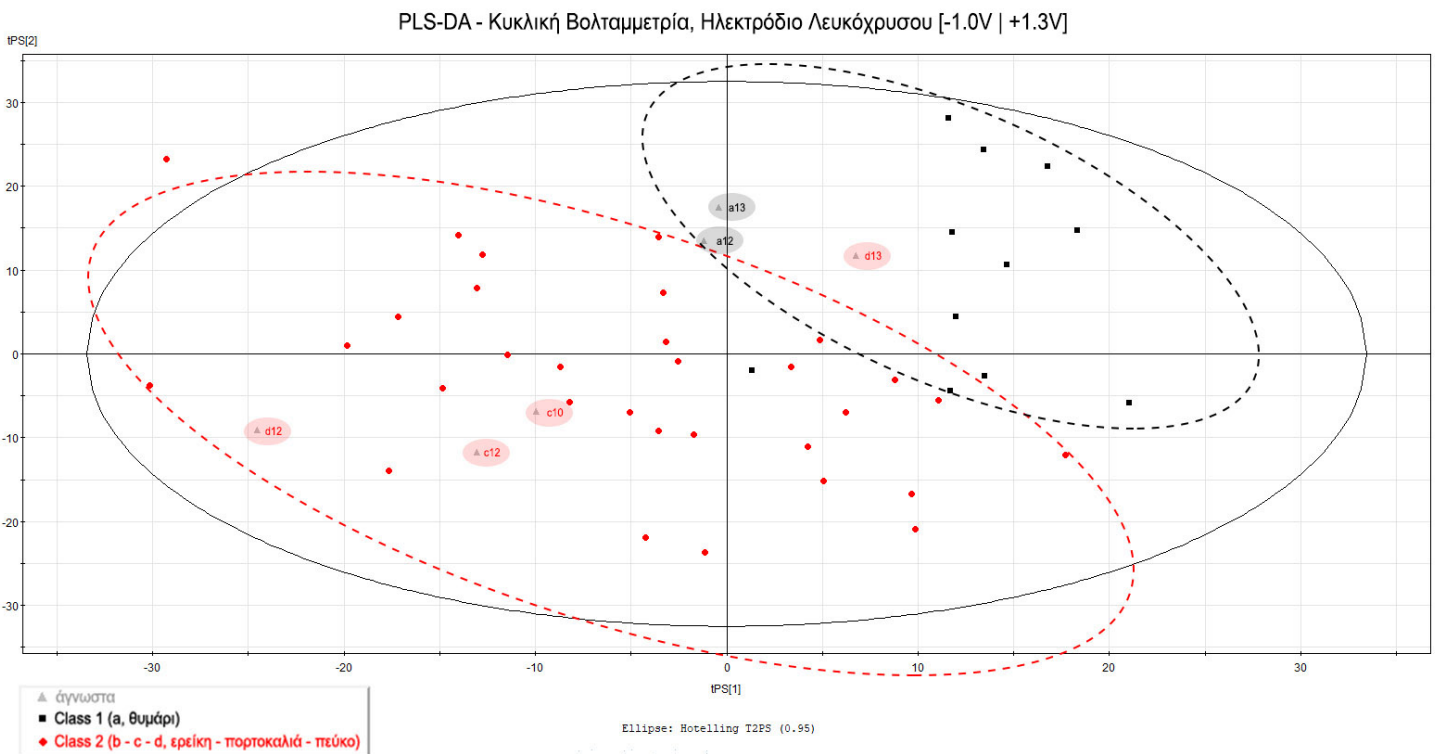
ώστε να γίνει σύγκριση των δειγμάτων θυμαριού με όλα τα υπόλοιπα. Ορίζονται ως άγνωστα τα δείγματα [a12,a13] και [c10,c12,d12,d13] και το μοντέλο που προκύπτει αποτελείται από 3 συστατικές με τιμές $R^2X_{(cum)} = 0.561$, $R^2Y_{(cum)} = 0.584$ και $Q^2_{(cum)} = 0.507$. Το διάγραμμα των συντεταγμένων παρουσιάζεται παρακάτω [εικόνα 54].

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα



Εικόνα 54: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και διαχωρισμό των κλάσεων

Πράγματι επιτυγχάνεται ταξινόμηση του μελιού του θυμαριού ανάμεσα όλων των υπολοίπων. Αποτυπώνεται στο ίδιο διάγραμμα και τα 6 άγνωστα δείγματα, για την επαλήθευση της πρόβλεψης του μοντέλου [εικόνα 55].



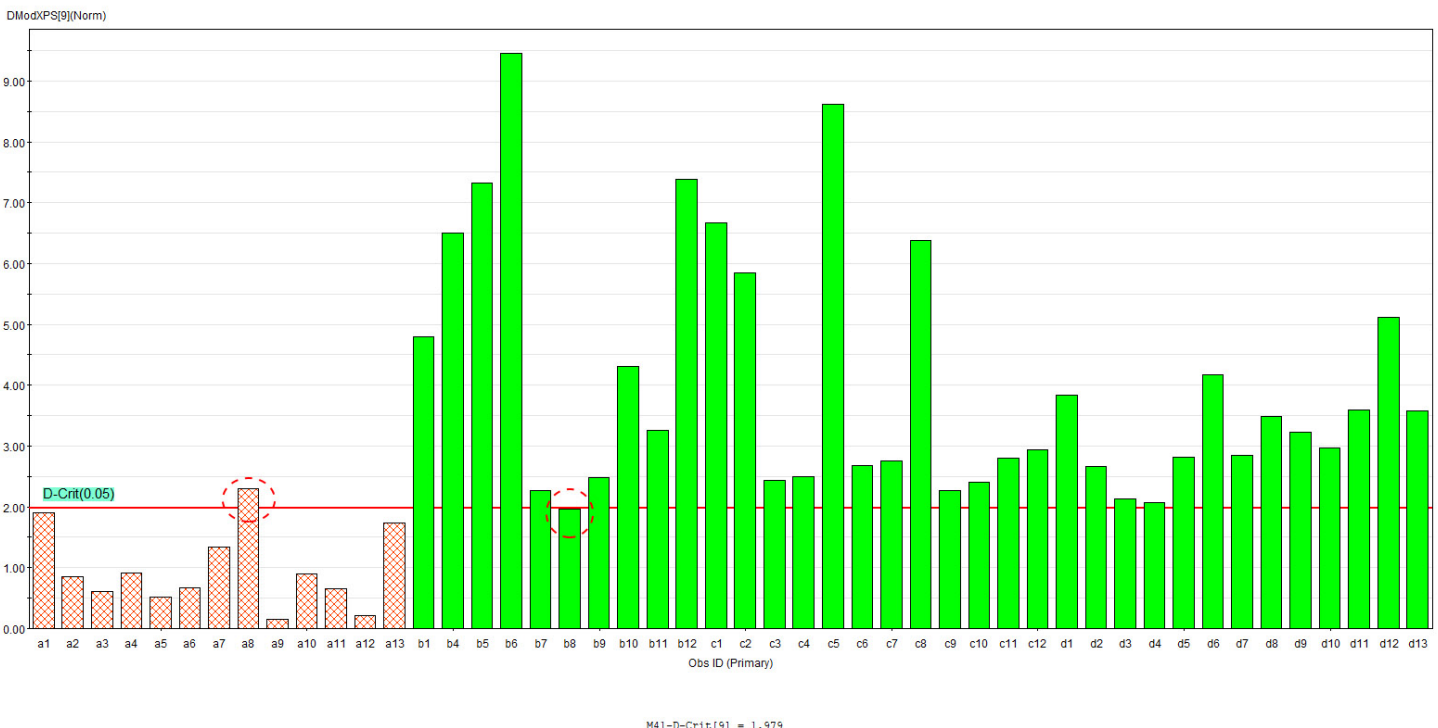
Εικόνα 55: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την κυκλική βολταμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με εμφάνιση των προβλεπόμενων άγνωστων δειγμάτων

Ακόμη και στην περίπτωση 2 κλάσεων, οι προβλέψεις είχαν παρόμοια επιτυχία με το μοντέλο των 3 κλάσεων, όπου τα 2 δείγματα θυμαριού a12 και a13 βρίσκονται στην περιοχή της κλάσης 1 και τα υπόλοιπα δείγματα στην κλάση 2, εκτός από το d13.

6.1.3.3 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class)

Ακολουθεί μοντελοποίηση μιας κλάσης, όπου μελετήθηκαν όλοι πιθανοί συνδυασμοί ενώ δόθηκε έμφαση κυρίως στα δείγματα των θυμαρίσιων μελιών στα οποία διαπιστώθηκε επιτυχής ταξινόμηση στις προηγούμενες χημειομετρικές τεχνικές.

Διαμορφώθηκε μοντέλο με γνωστή την βοτανική κατηγορία του θυμαριού, ορίζοντας ως άγνωστα τα τυχαία δείγματα [a1] και [a13] για λόγους επαλήθευσης του μοντέλου. Στο μοντέλο προέκυψαν 9 κύριες συνιστώσες με $R^2X_{(cum)} = 0.998$ και $Q^2_{(cum)} = 0.95$ και κρίσιμη τιμή $D-Crit(3) = 1.979$. Παρακάτω παρουσιάζεται το ραβδοδιάγραμμα [εικόνα 56] με τις αποστάσεις των δειγμάτων από το μοντέλο.



Εικόνα 56: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου Class Modeling για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Υπενθυμίζεται ότι οι κόκκινες κατακόρυφες ράβδοι συμβολίζουν τα δείγματα που ορίστηκαν ως κλάση 1 και θεωρούνται γνωστά και οι διακεκομμένες ελλείψεις τα σφάλματα της μεθόδου. Παρατηρείται για άλλη μια φορά μεγάλη επιτυχία στην

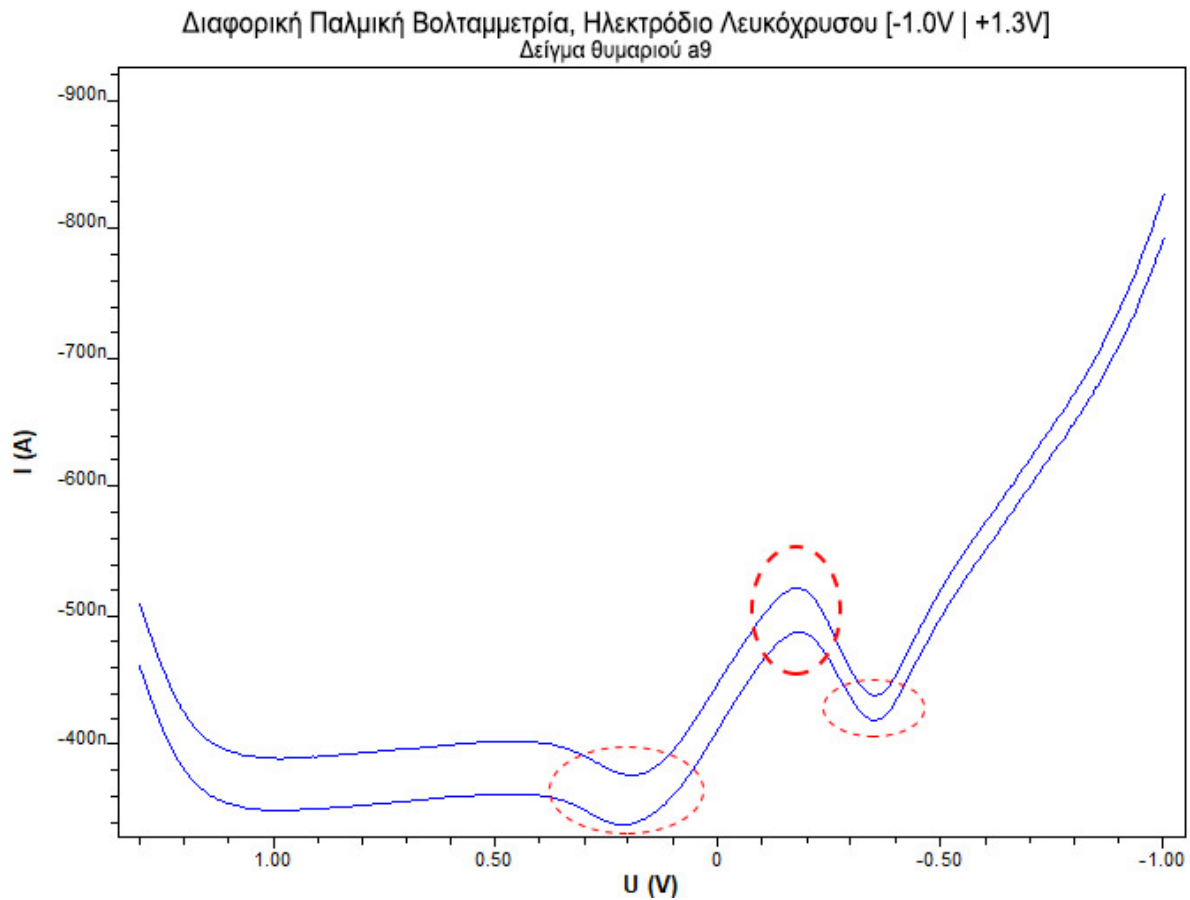
ταξινόμηση των μελιών του θυμαριού, καθώς 12 από τα 13 δείγματα έχουν τιμές μικρότερες από την κρίσιμη (εκτός από το λανθασμένο δείγμα a8) αποδίδοντας στο μοντέλο ευαισθησία $12/13 = 92.3\%$, μέσα στα οποία τα 2 άριστα δείγματα θυμαριού [a1] και [a13] βρέθηκαν επιτυχώς κάτω από την κρίσιμη τιμή. Παράλληλα, όλα τα υπόλοιπα διαφορετικά δείγματα εκτός από το λάθος ταξινομημένο δείγμα b8, είναι αληθώς αρνητικά αποδίδοντας στο μοντέλο ειδικότητα $34/35 = 97\%$.

6.1.4. Ηλεκτρόδιο Λευκόχρυσου, Διαφορική Παλμική Βολταμμετρία

Η τελευταία ανάλυση που θα λαμβάνει χώρα για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και να βγει ένα γενικευμένο και διασταυρωμένο πόρισμα, είναι η τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας με την χρήση του ηλεκτροδίου λευκόχρυσου, όπως δοκιμάστηκε και με το ηλεκτρόδιο χρυσού. Το εύρος σάρωσης θα είναι πάλι το $[-1.0V \mid +1.3V]$. Συνοπτικά παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά βολταμμογραφήματα των κάθε ένα από τα 4 δείγματα διαφορετικής

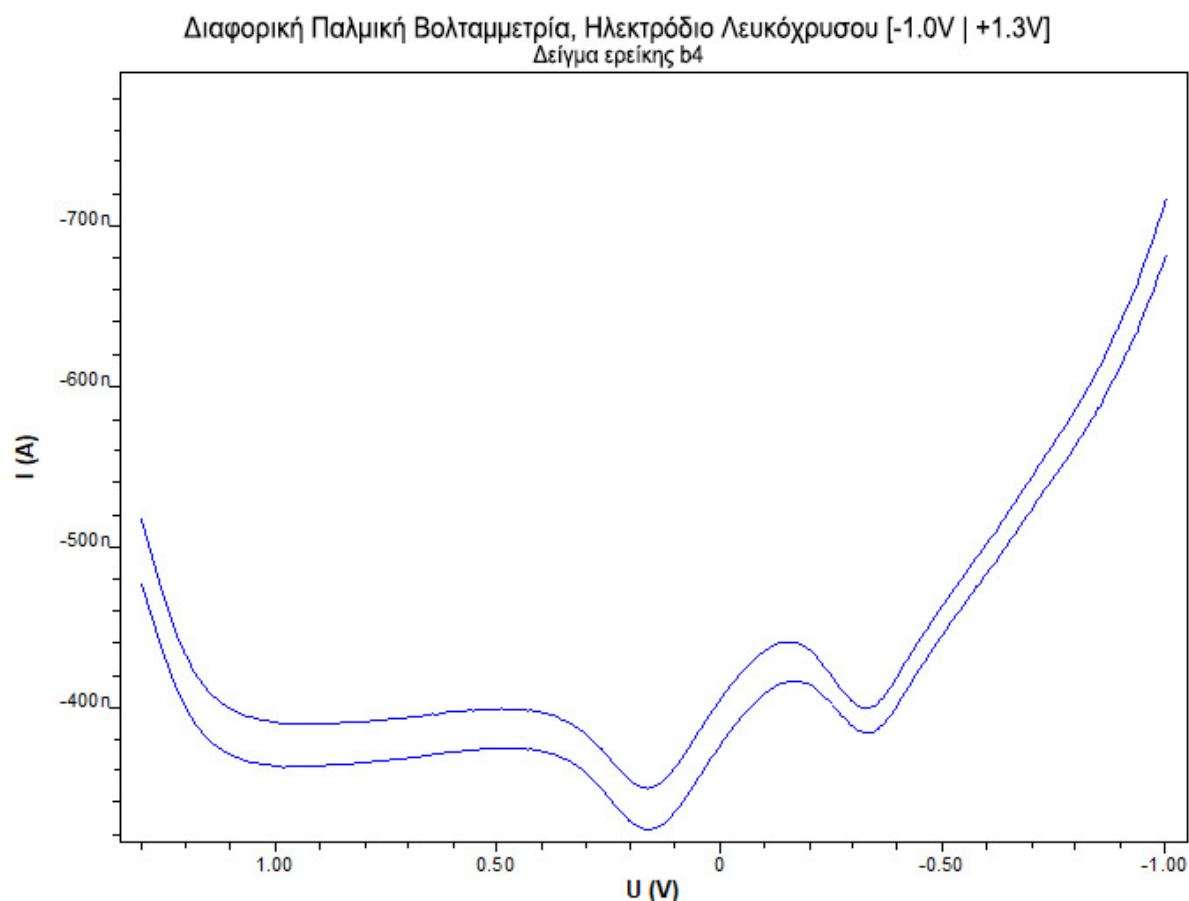
Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

βοτανικής προέλευσης, καθώς και ένα συνολικό για τον ευκολότερο οπτικό εντοπισμών των διαφοροποιήσεων τους. [εικόνες 57, 58, 59 και 60]

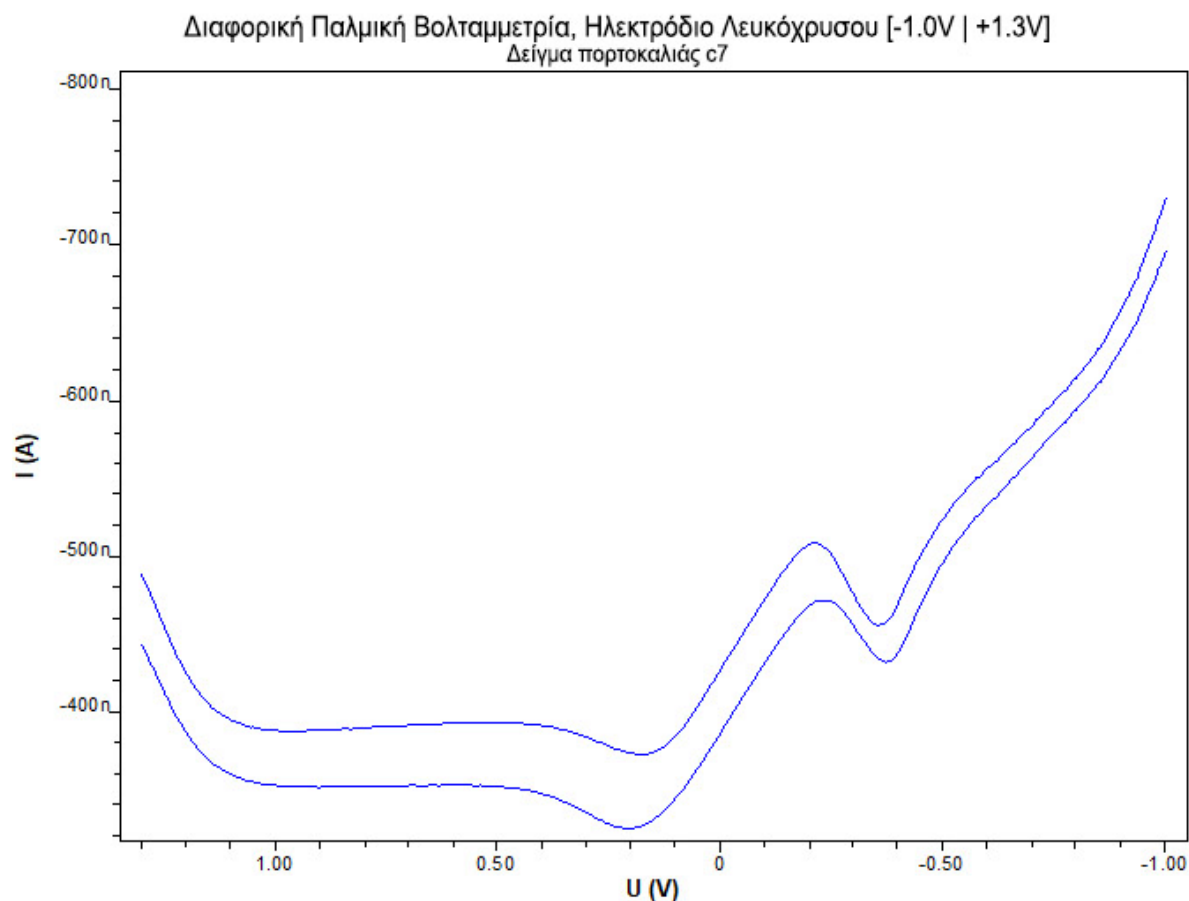


Εικόνα 57: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα θυμαρίσιου μελιού με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

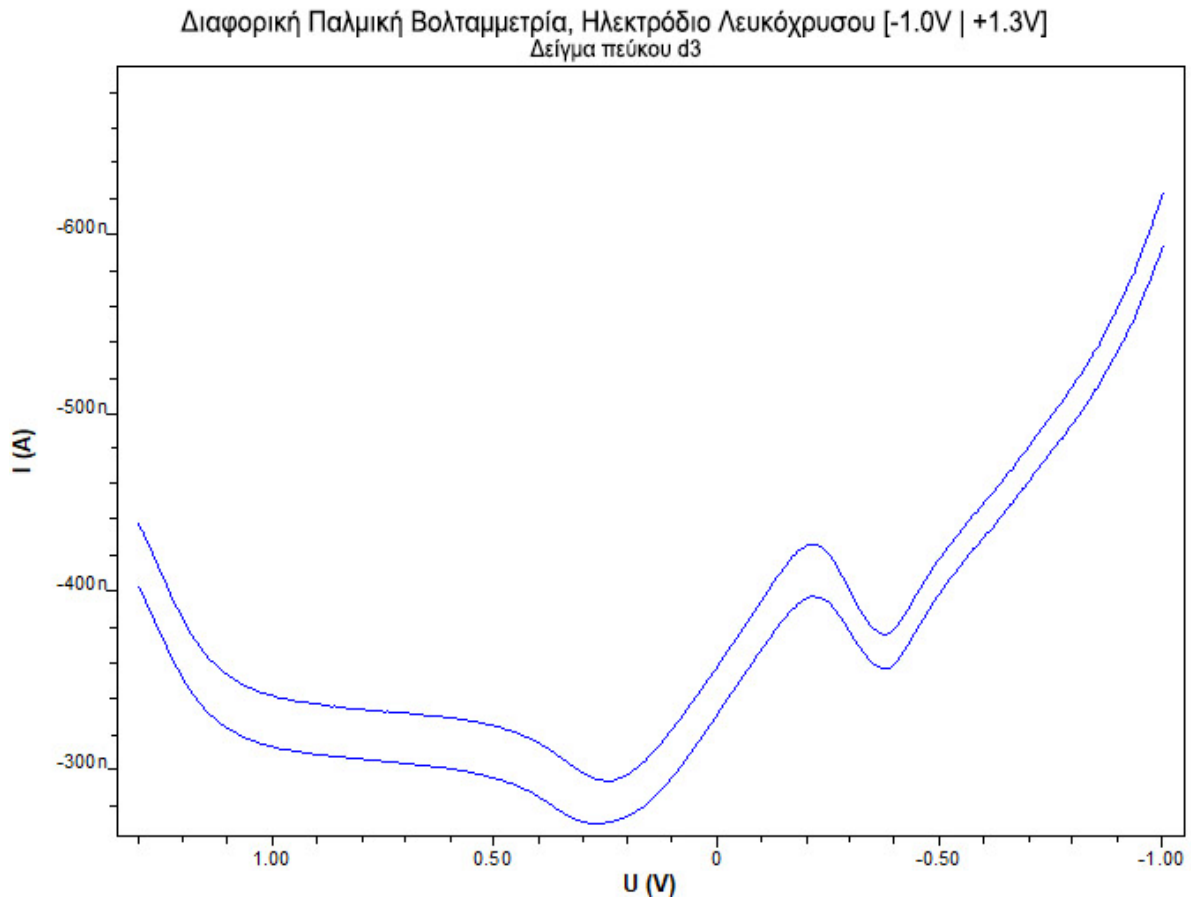


Εικόνα 58: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού ερείκης με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

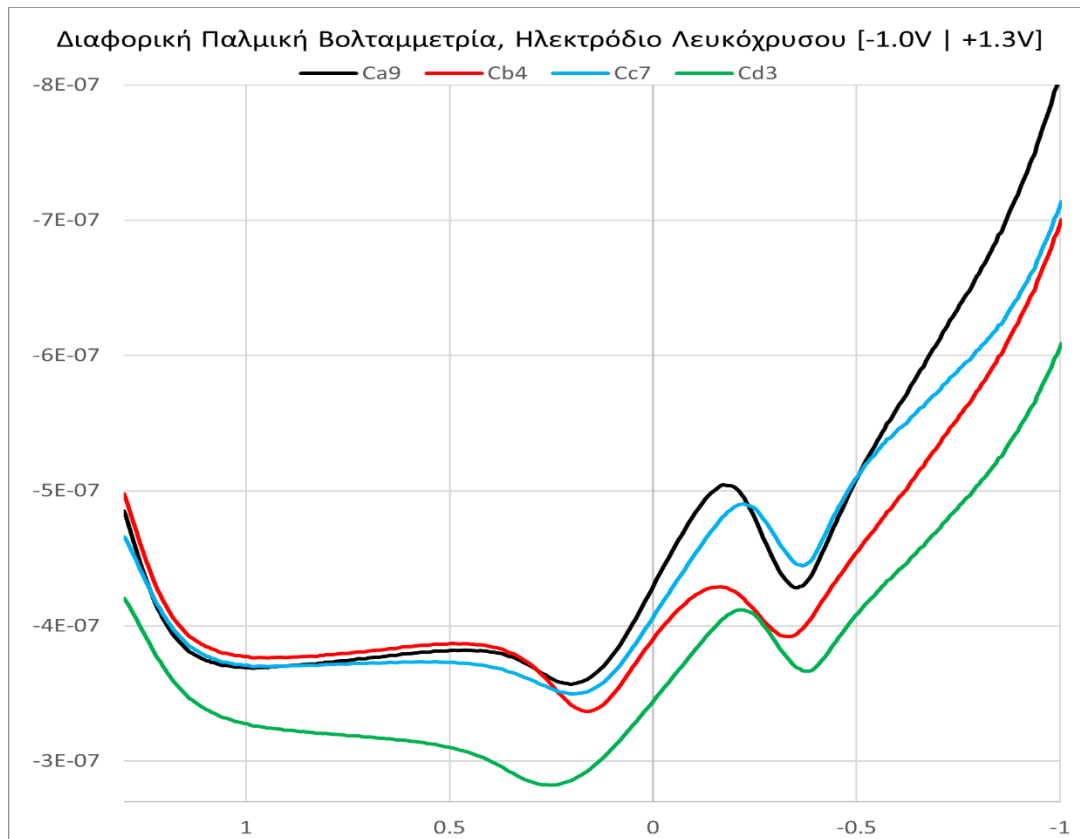


Εικόνα 59: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πορτοκαλιάς με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα



Εικόνα 60: Διαφορικό παλμικό βολταμμογράφημα μελιού πεύκου με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου



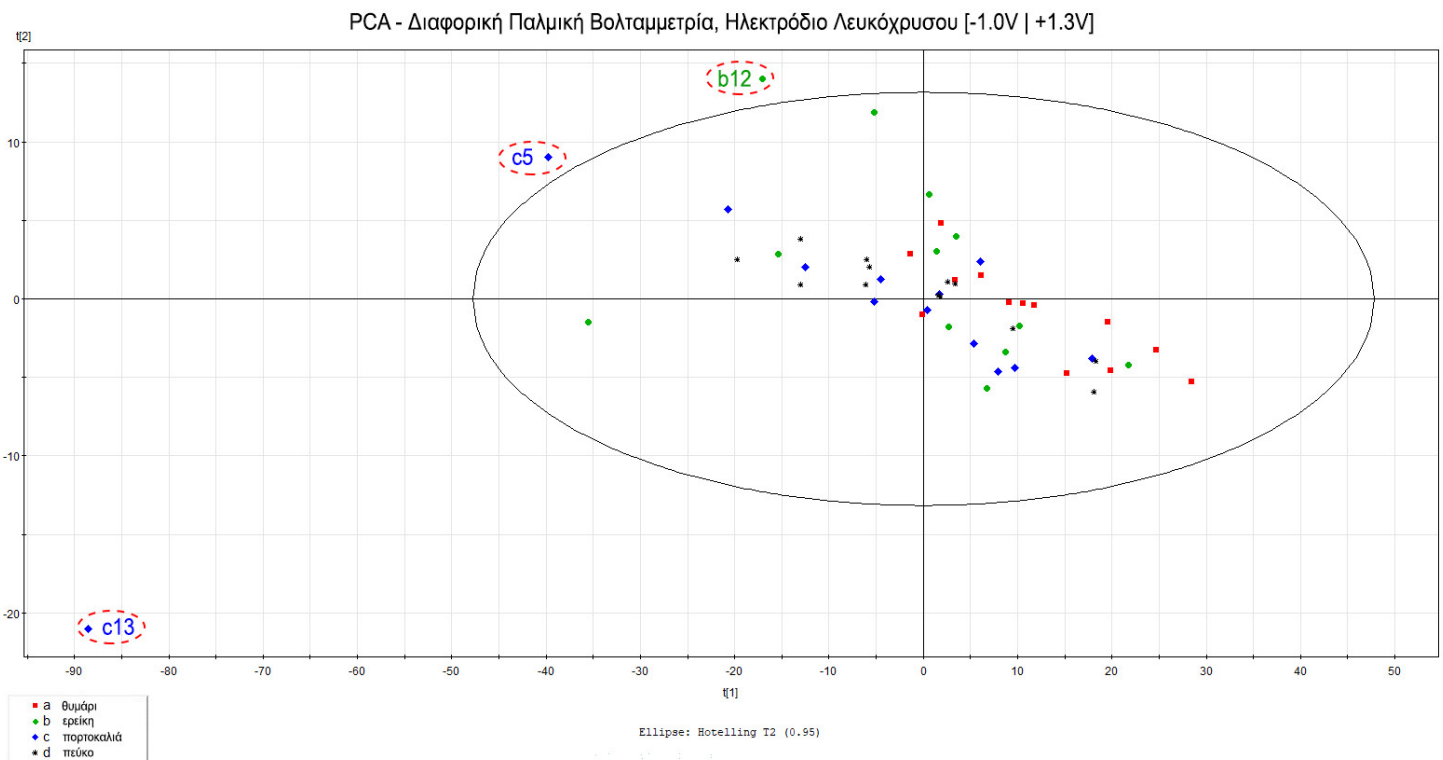
Εικόνα 61: Διαφορικό παλμικό βολταμμογραφήματα και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών με κοινούς άξονες με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Παρατηρείται ότι ως προς το σχήμα όλα τα διαγράμματα είναι σχεδόν πανομοιότυπα και παρουσιάζουν ίδιες κορυφές όπως φαίνεται στις μαρκαρισμένες περιοχές του βολταμμογραφήματος του θυμαρίσιου μελιού, αλλά σε κοινούς άξονες διακρίνεται ότι αυτές είναι ελαφρά μετατοπισμένες στον οριζόντιο και στον κατακόρυφο άξονα. Ενώ η τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας εμφανίζει όχι και τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε πρώτο στάδιο, στην παρακάτω χημειομετρική ανάλυση θα απαντηθεί αν τελικώς επιτυγχάνεται κάποια ταξινόμηση.

6.1.4.1 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών PCA

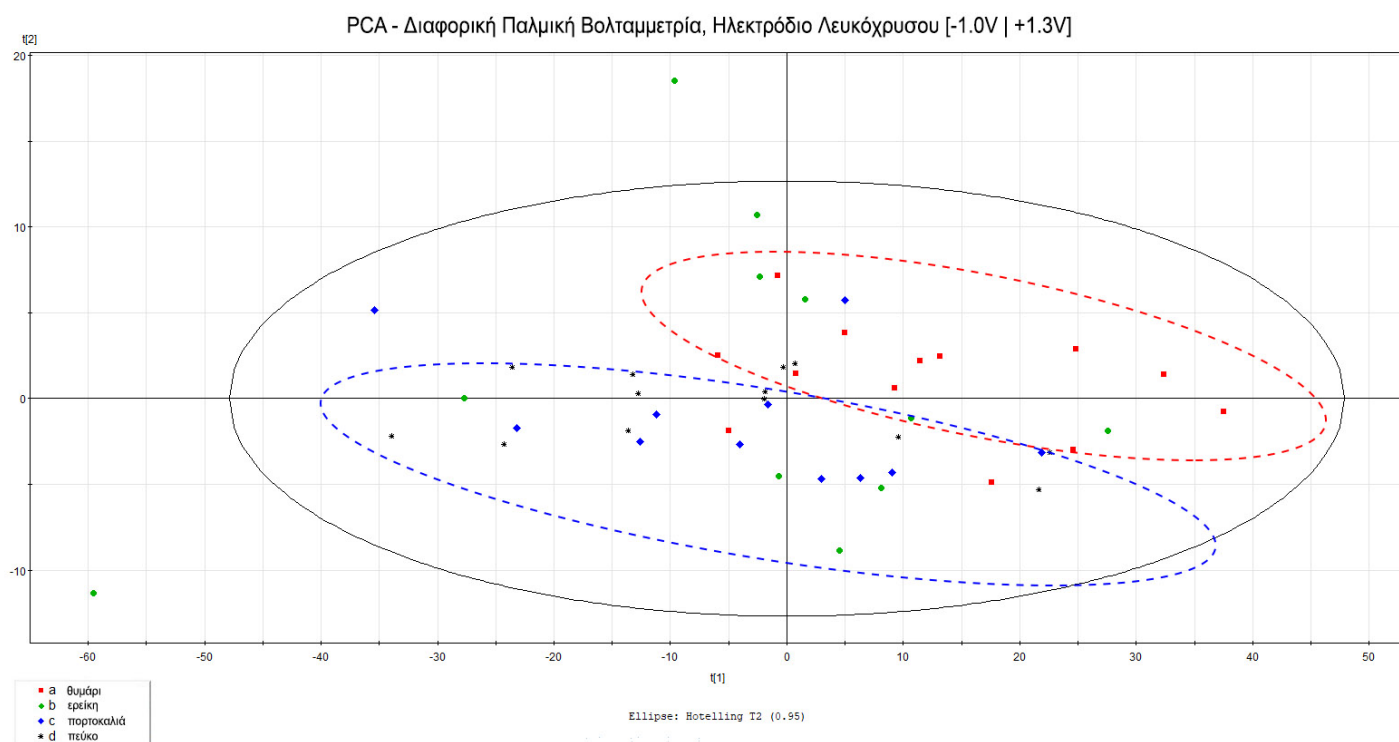
Αφού κατασκευάστηκε ο πίνακας δεδομένων X αποτελούμενος από 51 γραμμές - αντικείμενα (δείγματα προς εξέταση) και 388 στήλες - μεταβλητές (τιμές ρευμάτων), διαμορφώθηκε μοντέλο με 5 κύριες συνιστώσες (PCs), με συνολικό συντελεστή προσδιορισμού $R^2X_{(cum)} = 0.998$ και συνολικό διασταυρωμένο-επικυρωμένο συντελεστή προσδιορισμού $Q^2_{(cum)} = 0.995$. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα συντεταγμένων (score plot) στην *εικόνα 62*, όπου εμφανίζονται πάλι έκτροπες τιμές (b1, b6 και c13 όπου εμφανίστηκαν σε όλα τα πειράματα έως τώρα) οι οποίες μπορούν να αγνοηθούν και να μην συμπεριληφθούν στα επόμενα μοντέλα που θα αναπτυχθούν.



Εικόνα 62: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και επισήμανση των έκτροπων τιμών

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Κατασκευάζεται ξανά νέος πίνακας χωρίς το δείγμα c13 που παρουσιάζει αρκετή απόσταση από το μοντέλο καθώς δεν μπορεί να αμεληθεί εφόσον επηρεάζει τους υπολογισμούς σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα κατά την μοντελοποίηση και αποτυπώνεται εκ νέου το score plot. [εικόνα 63]



Εικόνα 63: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PCA για την κυκλική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου χωρίς έκτροπες τιμές και διαχωρισμό των δειγμάτων

Φαίνεται ότι σε πρώτο στάδιο πάλι επιτυγχάνεται ένας διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων θυμαριού που βρίσκονται στο άνω και δεξιά τμήμα της έλλειψης και των δειγμάτων πορτοκαλιάς και πεύκου που αποτυπώνονται στο κάτω τμήμα της.

6.1.4.2 Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA

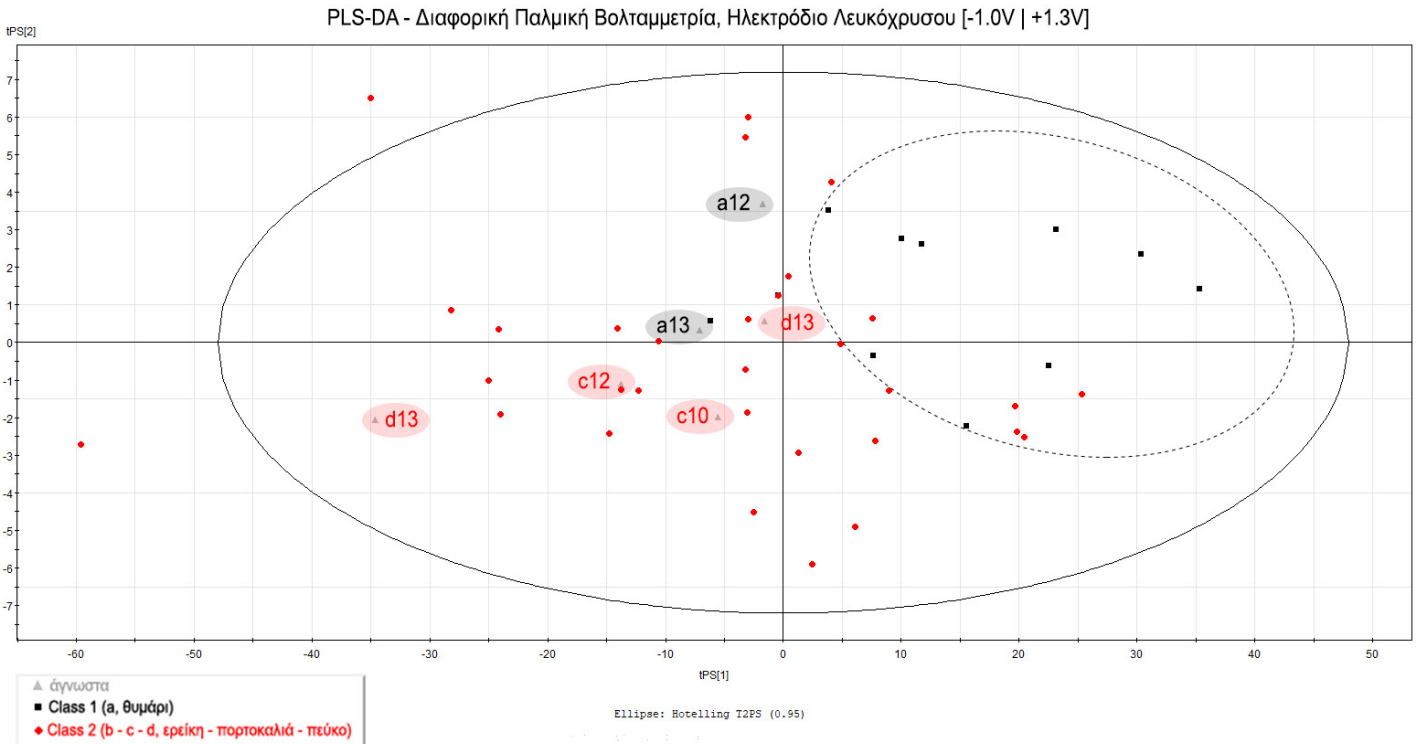
Από τους διάφορους συνδυασμούς κλάσεων που δοκιμάστηκαν σύμφωνα με τα βολταμμογραφήματα και τη PCA, το μόνο μοντέλο που παρουσίασε κάποια ταξινόμηση, είναι το μοντέλο με τις κλάσεις:

- Κλάση 1 = θυμάρι (a)
- Κλάση 2 = ερείκη + πορτοκαλιά + πεύκο (b-c-d)

και αγνώστους τα δείγματα [a12,a13] και [c10,c12,d12,d13], όπου υπολόγισε 2 κύριες συνιστώσες, $R^2X_{(cum)} = 0.941$, $R^2Y_{(cum)} = 0.283$ και $Q^2_{(cum)} = 0.17$ το οποίο είναι αρκετά

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

χαμηλό, δείχνοντας αδυναμία να πετύχει σωστή πρόβλεψη για νέα άγνωστα δείγματα. Παρακάτω παρουσιάζεται το διάγραμμα με τα χωρία ταξινόμησης και τις προβλέψεις των αγνώστων δειγμάτων μας.



Εικόνα 64: Διάγραμμα συντεταγμένων της μεθόδου PLS-DA (2 κλάσεων) για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με εμφάνιση των προβλεπόμενων αγνώστων δειγμάτων

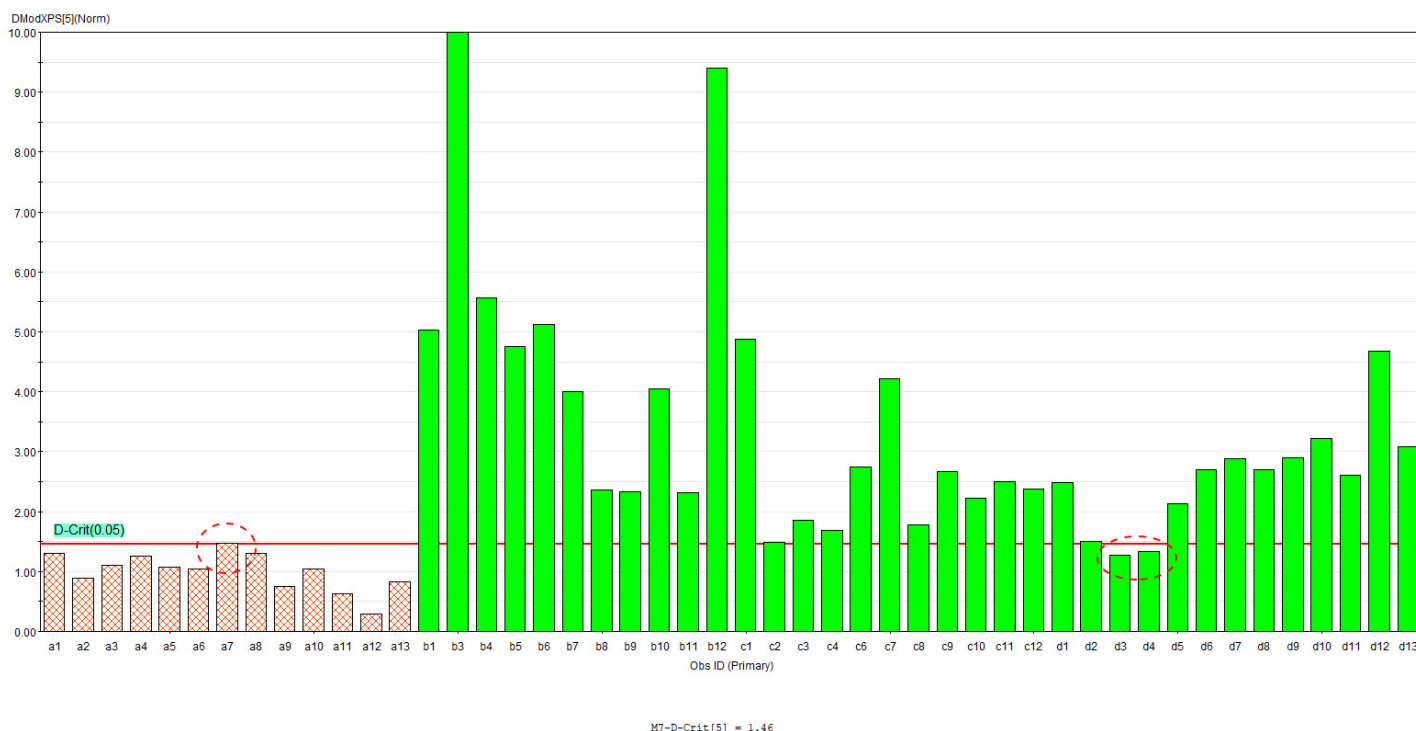
Διαπιστώνεται ότι αφενώς τα δείγματα του θυμαριού όπως και στην PCA ταξινομούνται πάνω δεξιά στην έλλειψη αφετέρου τα 2 σημεία που του ορίστηκαν ως άγνωστα για να επαλήθευση της πρόβλεψης, αποτυπώθηκαν αρκετά πιο μακριά και βρίσκονται αναμειγμένα με την κλάση 2, γεγονός το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς η τιμή $Q^2_{(cum)} = 0.17$ που υπολογίστηκε είναι χαμηλή.

6.1.4.3 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling, PCA 1-class)

Καθώς παρατηρήθηκε από τις προηγούμενες χημειομετρικές τεχνικές ότι ο μόνος διαχωρισμός που μπορεί να επιτευχθεί είναι του μελιού του θυμαριού σε σύγκριση με τα υπόλοιπα, έγινε μοντελοποίηση μιας κλάσης για τα δείγματα θυμαριού (a), με αγνώστους τα τυχαία δείγματα [a7] και [a10], όπου υπολογίστηκαν 5 κύριες συνιστώσες, με $R^2X_{(cum)} = 0.999$ και $Q^2_{(cum)} = 0.997$ και κρίσιμη τιμή $D-Crit(5) = 1.46$.

Κεφάλαιο 6 – Αποτελέσματα

Παρακάτω παρουσιάζονται το ραβδοδιάγραμμα [εικόνα 65] με τις αποστάσεις των δειγμάτων από το μοντέλο.



Εικόνα 65: Ραβδοδιάγραμμα ταξινόμησης της μεθόδου *Class Modeling* για την παλμική διαφορική βολταμμετρία με χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου

Παρατηρείται ότι για ακόμη μια φορά επιτυγχάνεται επιτυχώς η ταξινόμηση μιας κλάσεως στα μέλια του θυμαριού, καθώς μόνο ένα δείγμα, το a7, είναι οριακά άνω του ορίου αποδίδοντας στο μοντέλο ευαισθησία $12/13 = 92.3\%$. Όμως το a7 είναι και το ένα από τα 2 άγνωστα δείγματα και φαίνεται ότι το μοντέλο δεν μπόρεσε να το ταξινομήσει ορθώς μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα θυμαριού. Παράλληλα, όλα τα υπόλοιπα διαφορετικά δείγματα εκτός από τα δύο λάθος ταξινομημένα δείγματα d3 και d4, είναι αληθώς αρνητικά αποδίδοντας στο μοντέλο ειδικότητα $33/35 = 94\%$.

7.1. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα των χημειομετρικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν είναι δυνατή η κατάληξη σε μερικά ικανοποιητικά συμπεράσματα καθώς και η συνόψιση των βέλτιστων παραμέτρους ως προς τις μεθοδολογίες ή τον εξοπλισμό για την επίτευξη της μέγιστης ταξινόμησης και να προσδιοριστεί εν τέλη ποιες κατηγορίες βοτανικής προελεύσεως μπορούν να διαχωριστούν.

Αρχικά, μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές πειραματικές διαδικασίες, στις οποίες η μία μόνο (μέθοδος C, διπλή εκχύλιση/διαλυτοποίηση με ξήρανση) συγκριτικά με τις υπόλοιπες δύο (μέθοδος A - απλή διαλυτοποίηση/εκχύλιση και μέθοδος B - εκχύλιση στερεάς φάσης), πέτυχε έστω μια σχετική διαφοροποίηση μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών μελιού (a – θυμάρι, b – ερείκη, c – πορτοκαλιά, d – πεύκο), το οποίο παρατηρείται τόσο στα βολταμμογραφήματα όσο και στις χημειομετρικές τεχνικές που ακολούθησαν.

Η μεγαλύτερη ποικιλία αποτελεσμάτων συναντάται στις τεχνικές της κυκλικής βολταμμετρίας (CV), καθώς από τα βολταμμογραφήματα και μόνο μπορεί να παρατηρηθούν διαφορετικά αποτυπώματα για την κάθε κατηγορία μελιού. Η αντίθετη περίπτωση παρατηρείται με την τεχνική της διαφορικής παλμικής βολταμμετρίας (DP) στην οποία τα σχεδιαγράμματα είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους και εμφανίζουν ελάχιστες έως και καθόλου κορυφές. Επίσης, καθώς στην κυκλική βολταμμετρία επιτυγχάνεται σάρωση και προς τις δύο κατευθύνσεις δυναμικού (από θετικά προς τα αρνητικά και το αντίθετο), είναι πιθανότερο στο εκάστοτε δείγμα να πραγματοποιηθούν διαφορετικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις αποδίδοντας διαφορετικές κορυφές στο άνω και κάτω γράφημα του.

Μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων που χρησιμοποιήθηκαν, εκτός της μεθοδολογίας της οποίας τα δεδομένα αναλύθηκαν με χημειομετρία αλλά και σε κάθε άλλη πειραματική διαδικασία που δοκιμάστηκε κατά την μελέτη της παρούσας διπλωματικής εργασίας, το ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου ανέδειξε καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με αυτό του χρυσού και του υαλώδους άνθρακα. Αυτό μας δείχνει ότι πιθανόν το μέλι αποτελείται από φαινολικές ενώσεις και άλλα χημικά είδη που μπορούν να οξειδωθούν ευχερέστερα στο ηλεκτρόδιο εργασίας λευκόχρυσου. Μάλιστα, τα βέλτιστα αποτελέσματα φάνηκαν κατά την σάρωση δυναμικών μέσω της τεχνικής της κυκλικής βολταμμετρίας έναντι της παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας, όπου και οι 3 πειραματικές δοκιμασίες οδήγησαν στην ταξινόμηση των δειγμάτων του θυμαριού.

Μια άλλη παρατήρηση που αξίζει να τονιστεί με βάση τα αποτελέσματα που προκύψανε, είναι ότι η χημειομετρική τεχνική με την οποία αντλήθηκαν περισσότερες πληροφορίες και οδήγησε έστω και σε μερικές επιτυχείς ταξινομήσεις μεταξύ των δειγμάτων μελιού, ήταν η τεχνική της μοντελοποίησης μιας κλάσης (class modeling), παρέχοντας μια ευαισθησία >90% και ειδικότητα >93%. Καθώς οι τεχνικές PCA και PLS-DA ορισμένες φορές πιθανόν να ανέδειξαν κάποιες ταξινομήσεις, κυρίως στα δείγματα του θυμαρίσιου μελιού, στην πραγματικότητα υπήρχε πολύ μεγάλη διασπορά των δειγμάτων στο διάγραμμα συντεταγμένων καθώς και ανάμειξη μεταξύ των υπολοίπων αδυνατώντας να γίνει ακριβής διαχωρισμός. Για να αποδειχθεί ότι υπάρχει κάποιο εμφανές μοτίβο ταξινόμησης στις εποπτευόμενες και μη εποπτευόμενες μεθόδους, πρέπει τα δεδομένα κάθε ξεχωριστής κατηγορίας μελιού (που αναπαρίστανται σαν σημεία στο διάγραμμα συντεταγμένων) να εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές, ώστε να εμφανίζεται όσο το δυνατό ξεκάθαρα ο διαχωρισμός τους αλλά παράλληλα να εμφανίζουν όσο το δυνατόν μικρότερη διασπορά. Αφενός δεν υπήρξε μεγάλη επιτυχία σε αυτό το κομμάτι, αφετέρου ήταν ικανό να μας δώσει μια εκτίμηση για το ποιες βοτανικές κατηγορίες δύναται να ταξινομηθούν. Έτσι, μας επιτράπηκε να αποκτήσουμε μια πρώτη εικόνα και να μπορέσουμε να το επιβεβαιώσουμε στην πιο λεπτομερή τεχνική της μοντελοποίησης μιας κλάσης, όπου και τελικώς καταφέραμε μέσω αυτής να ταξινομήσουμε έστω το δείγμα του θυμαριού.

Τέλος, συνδυάζοντας όλες τις παραπάνω βέλτιστες παραμέτρους, παρατηρήθηκε ότι τα βέλτιστα αποτελέσματα ανέδειξε η χημειομετρική τεχνική της μοντελοποίησης μιας κλάσης με την χρήση ηλεκτροδίου λευκόχρυσου και την μέθοδο της κυκλικής βολταμμετρίας, όπου όλες οι δοκιμασίες ταξινόμησαν το μέλι θυμαριού, επιτρέποντας τον διαχωρισμό του μεταξύ του μελιού ερείκης, πορτοκαλιάς και πεύκου. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι μεταξύ των δειγμάτων, μερικά από αυτά υπολογίστηκαν επανειλημμένα ως έκτροπες τιμές (outliers) και από τις τέσσερις πειραματικές δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν. Αυτές είναι:

- το c13 (σε όλες τις βολταμμετρικές τεχνικές ανεξαρτήτου ηλεκτροδίου)
- το b2 (σε όλες εκτός παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας σε ηλεκτρόδιο χρυσού)
- το b3 (σε όλες τις κυκλικές βολταμμετρικές τεχνικές)

Παρακάτω παρουσιάζεται ο συνοπτικός πίνακας των παραπάνω [πίνακας 10], με τις βέλτιστες παραμέτρους ώστε να επιτευχθεί η ταξινόμηση που παρατηρήθηκε:

Πίνακας 10: Συνοπτικός πίνακας με τις παραμέτρους που επέφεραν τα βέλτιστα αποτελέσματα

Πειραματική μέθοδος	→ Μέθοδος διπλής εκχύλισης/διαλυτοποίησης με ξήρανση
Βολταμμετρική τεχνική	→ Κυκλική βολταμμετρία
Ηλεκτρόδιο εργασίας	→ Ηλεκτρόδιο Λευκόχρυσου
Χημειομετρική τεχνική	→ Μοντελοποίηση μιας κλάσης
Βοτανική κατηγορία μελιού	→ Θυμαρί

Σύνοψη

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρόλη την δοκιμή πολλαπλών πειραματικών διαδικασιών, διαφόρων συνδυασμών μεταξύ ηλεκτροδίων, αντιδραστηρίων, παραμέτρων πολαρογράφου, συνθηκών και τεχνικών χημειομετρίας, όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως στην διπλωματική εργασία, δεν επιτεύχθηκε ο αρχικός μας στόχος της επιτυχούς ταξινόμησης και διαφοροποίησης και των τεσσάρων βοτανικών κατηγοριών μελιού που επιλέχθηκαν. Αντ' αυτού, κατάφερε να ξεχωριστεί μόνο το μέλι του θυμαριού έναντι των υπολοίπων, ενώ δεν κατορθώθηκε η εύρεση του «δαχτυλικού αποτυπώματος» των μελιών ερείκης – πορτοκαλιάς – πεύκου για τον διαχωρισμό μεταξύ τους. Το μέλι, σε αντίθεση με άλλα πιο απλοϊκά προϊόντα, αποδείχθηκε ένα δύσκολο τρόφιμο για την ανάλυση και εύρεση ενός μοναδικού χαρακτηριστικού δαχτυλικού αποτυπώματος μέσω των πράσινων ηλεκτροχημικών μεθόδων. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια πληθώρα παραμέτρων που δεν συναντώνται στα υπόλοιπα τρόφιμα. Το κυριότερο και πιο πιθανόν από αυτά είναι η αδυναμία εγγύησης ότι ένα δείγμα μελιού είναι 100% αγνό και μοναδικό, καθώς σε κάθε φυσικό περιβάλλον υπάρχει μια πληθώρα ανθών και παρόλο που μπορεί να υπερισχύει ένα είδος, δεν είναι εφικτή η γνώση για το αν το μέλι που παράχθηκε στις κυψελίδες των μελισσιών προέρχεται αποκλειστικά και μόνο από το συγκεκριμένο είδος και δεν έχει υποστεί κάποια ανάμειξη από μέλισσες που συλλέξαν νέκταρ άλλων ανθών. Μόνο από αυτή την παρατήρηση, μπορεί εύκολα να κατανοηθεί ότι ακόμα και μεταξύ των πιστοποιημένων μελιών ίδιας βοτανικής προέλευσης, στο καθένα μεμονωμένα μπορεί να εμφανίζεται μια ποικιλία και μίξη αντιοξειδωτικών, ιχνοστοιχείων και φαινολικών που είναι μοναδική, οδηγώντας σε διαφορετικές

οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με εφαρμογή ηλεκτρικής τάσεως και κατ' επέκταση σε διαφορετικά ηλεκτροχημικά αποτελέσματα.

Προτάσεις

Μέσω των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων που προκύψανε από την παρούσα διπλωματική εργασία, μπορούν να προταθούν κάποιες βελτιωτικές ενέργειες για την περεταίρω βελτιστοποίηση τεχνικών ανίχνευσης νοθείας στο μέλι.

Μία από αυτές, είναι η δοκιμή διαφορετικών ευρών σάρωσης δυναμικού του πολαρογράφου και εν συνεχεία η εκλεκτική επιλογή αυτών που παρουσιάζουν μεγαλύτερες οπτικές διαφορές μεταξύ διαγραμμάτων διαφορετικών ειδών μελιού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με την απευθείας ρύθμιση των παραμέτρων του ίδιου του μηχανήματος ώστε να υπάρξει εξ αρχής ένα διαφορετικό βολταμμογράφημα με διαφορετικά σημεία, είτε επιλέγοντας στο βολταμμογράφημα που προέκυψε από τη σάρωση ενός μεγαλύτερου εύρους, τα τμήματα εκείνα που παρουσιάζουν κάποια κορυφή ή ιδιομορφία συγκριτικά με το υπόλοιπο διάγραμμα. Ο τρόπος αυτός αποσκοπεί στο να φτιαχτεί μια πιο διαφοροποιημένη και πιο εξειδικευμένη μήτρα δεδομένων ανά κατηγορία μελιού που θα εισαχθεί στις μοντελοποιήσεις των χημειομετρικών τεχνικών, επιτυγχάνοντας ίσως καλύτερη κατανομή και ταξινόμηση στο διάγραμμα συντεταγμένων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν κάποιες περεταίρω δοκιμές σε μικρότερα εύρη στα οποία εμφανίζονταν κορυφές στα αρχικά διαγράμματα χωρίς όμως να εμφανιστεί κάποια βελτίωση των νέων αποτελεσμάτων, εντούτοις υπάρχει η πιθανότητα σε κάποια άλλα τμήματα κορυφών να εμφανιζόταν κάποια βελτίωση. Επίσης, για την βελτίωση των χημειομετρικών αναλύσεων, σημαντικό είναι να υπάρχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός δειγμάτων μελιού προκειμένου να οδηγήσει στην κατασκευή όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστων χημειομετρικών μοντέλων.

Άλλη μια βελτίωση που θα μπορούσε να γίνει, είναι η αλλαγή των ηλεκτροδίων εργασίας εφόσον κάθε ένα λειτουργεί σε διαφορετικά δυναμικά, στα οποία παρουσιάζονται ξεχωριστές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, αποτυπώνοντας διαφορετικές κορυφές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος (screen printed electrodes) καθώς σε αυτά δεν θα υπήρχε η πιθανότητα διάβρωσης της επικάλυψης της επιφάνειας των ηλεκτροδίων αυτών από τον υδατικό

διαλύτη σε αντίθεση με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και τα οποία απαιτούσανε σχολαστικό καθαρισμό, πράγμα το οποίο μπορεί να επηρεάσει δραστικά τις κορυφές που αποτυπώνονται στα βολταμμογραφήματα. Τα εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος συνδυάζονται με φορητούς ποτενσιοστάτες που λειτουργούν με μπαταρίες και συνδέονται με φορητούς ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Με αυτό τον τρόπο, θα μπορούσε να γίνει ανάπτυξη κινητών αναλυτικών διατάξεων για την διεξαγωγή επιτόπιων αναλύσεων σε συνθήκες πεδίου (field analysis), σε χώρους παραγωγής και διακίνησης μελιού.

Τέλος, μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη στο τρόφιμο του μελιού, με τη χρήση διαφορετικών τεχνικών που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια. Για παράδειγμα, αντί για την εύρεση ενός ηλεκτροχημικού προφίλ μέσω βολταμμετρικών τεχνικών, μπορεί να πραγματοποιηθεί δοκιμή προσδιορισμού ιχνοστοιχείων με τεχνικές όπως αυτή της φασματομετρίας ατομικών μαζών σε επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) σε συνδυασμό με χημειομετρικές τεχνικές για την επεξεργασία των δεδομένων.

Βιβλιογραφία

- [1] Z. Wei and J. Wang, “Classification of monofloral honeys by voltammetric electronic tongue with chemometrics method,” *Electrochimica Acta*, vol. 56, no. 13, pp. 4907–4915, May 2011
doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.02.065>
- [2] “Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ – Μελισσοχωριό,” [online]
available: <https://melissoxorio.com/istoria-toy-meliou/> (accessed May 22, 2022).
- [3] Γ. Πίπτας, “Η ιστορία του μελιού στην Ελλάδα και η αιγυπτιακή του «καταγωγή»” [online], Feb. 12, 2017.
available: https://www.huffingtonpost.gr/yiorgos-pittas/-10000_b_14677644.html (accessed May 22, 2022).
- [4] “Η Ιστορία του Ελληνικού Μελιού,” [online]
available: <https://stiliarashoney.com/about-us/the-history-of-greek-honey/> (accessed May 28, 2022).
- [5] “Honey production in the World - knoema.com,” [online].
available: <https://knoema.com/data/agriculture-indicators-production+honey> (accessed May 28, 2022).
- [6] “Honey market worldwide,” [online].
available: <https://www.statista.com/topics/5090/honey-market-worldwide/#topicOverview> (accessed May 28, 2022).
- [7] K. Wei Se, R. A. Wahab, S. N. S. Yaaco, and S. K. Ghoshal, “Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 80, pp. 16–32, Jul. 2019,
doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.001>
- [8] “Honey Market Size & Share | Industry Report, 2019-2025,” [online].
available: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/honey-market> (accessed May 28, 2022).
- [9] “Βιολογικό μέλι VS συμβατικού. Ποιες οι διαφορές τους,” [online].
available: <https://www.bioagores.org/2018/08/07/> (accessed May 28, 2022).
- [10] “Honey; natural exports by country |2019,” [online].
available:
<https://wits.worldbank.org/trade/comtrade/en/country/All/year/2019/tradeflow/Exports/partner/WLD/product/040900> (accessed May 29, 2022).

- [11] “Η αγορά μελιού στην Ευρώπη: Γράφημα | Επικαιρότητα | Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο,” *[online]*, Feb. 28, 2018.
available: <https://www.europarl.europa.eu/news/el/headlines/economy/20180222STO98435/i-agera-meliou-stin-europi-grafima> (accessed May 29, 2022).
- [12] “Countries That Consume the Most Honey,” *[online]*.
available: <https://www.worldatlas.com/articles/countries-that-consume-the-most-honey.html>
(accessed May 29, 2022).
- [13] “Μέλι - Greek Gastronomy Guide,” *[online]*, Apr. 07, 2017.
available: <https://www.greekgastronomyguide.gr/meli-ethniko-proion/> (accessed May 29, 2022).
- [14] “Πως παράγεται το μέλι,” *[online]*.
available: <https://www.melopitharo.gr/services/pos-paragetai-to-meli/> (accessed May 30, 2022).
- [15] A. A. Machado De-Melo, L. B. de Almeida-Muradian, M. T. Sancho, and A. Pascual-Maté, “Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review,” *Journal of Apicultural Research*, vol. 57, no. 1, pp. 5–37, Jun. 2017,
doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
- [16] “Πληροφορίες για τη μελισσοκομία,” *[online]*.
available:
http://minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/MeliMelissokomia/plirofories_gia_melissokomia.pdf (accessed May 31, 2022).
- [17] “Κατηγορίες μελιού - Ευεργετικές ιδιότητες,” *[online]*, Aug. 29, 2018.
available: <https://geoponoi.gr/2018/08/29/katigories-meliou-eurgetikes-idiotites-meliou/>
(accessed Jun. 01, 2022).
- [18] “Οι βασικότερες ποικιλίες μελιού στην Ελλάδα,” *[online]*, Nov. 22, 2015.
available: <https://oreinomeli.wordpress.com/2015/11/22/> (accessed Jun. 01, 2022).
- [19] “Το ελληνικό μέλι, τα είδη του, τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητές τους,” *[online]*.
available: <https://thehealthycook.gr/το-ελληνικό-μέλι-τα-είδη-του-τα-χαρακτ/> (accessed Jun. 01, 2022).
- [20] D. A. Carter *et al.*, “Therapeutic Manuka Honey: No Longer So Alternative,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. 569, Apr. 2016,
doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00569>
- [21] S. Samarghandian, T. Farkhondeh, and F. Samini, “Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research,” *Pharmacognosy research*, vol. 9, no. 2, pp. 121–127, 2017,
doi: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.204647>
- [22] “ΟΔΗΓΙΑ 2001/110/EK ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 20ής Δεκεμβρίου 2001 για το μέλι,” *[online]*, 2002.
available: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2001/110/oj> (accessed Jun. 02, 2022).

- [23] L. A. Lestari, K. Triyana, A. K. Hanifah, and R. A. Wildiana, “The use of electronic tongue (e-tongue) as a simple and rapid method for honey authentication,” *Food Research*, vol. 5, no. 3, pp. 453–460, Jun. 2021, doi: [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(3\).615](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(3).615)
- [24] S. Amiry, M. Esmaili, and M. Alizadeh, “Classification of adulterated honeys by multivariate analysis,” *Food Chemistry*, vol. 224, pp. 390–397, Jun. 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.025>
- [25] R. Fakhlaei *et al.*, “The Toxic Impact of Honey Adulteration: A Review,” *Foods*, vol. 9, no. 11, p. 1538, Oct. 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/foods9111538>
- [26] T. Damto, “A Review on Effect of Adulteration on Honey Properties,” *papers.ssrn.com*, Mar. 2019, doi: <https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3359494>
- [27] S. E. Strayer, K. Everstine, and S. Kennedy, “Economically Motivated Adulteration of Honey: Quality Control Vulnerabilities in the International Honey Market,” [online]. available: <https://www.foodprotection.org/files/food-protection-trends/Jan-Feb-14-everstine.pdf> (accessed Jun. 02, 2022).
- [28] A. Thrasyvoulou *et al.*, “Legislation of honey criteria and standards,” *Journal of Apicultural Research*, vol. 57, no. 1, pp. 88–96, Jan. 2018, doi: <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411181>
- [29] M. J. Walker, S. Cowen, K. Gray, P. Hancock, and D. T. Burns, “Honey authenticity: the opacity of analytical reports - part 1 defining the problem,” *npj Science of Food*, vol. 6, no. 1, Feb. 2022, doi: <https://doi.org/10.1038/s41538-022-00126-6>
- [30] “Food Safety - Honey (2015-17) EU coordinated actions,” [online]. https://food.ec.europa.eu/safety/eu-agri-food-fraud-network/eu-coordinated-actions/honey-2015-17_en (accessed Jun. 02, 2022).
- [31] “Δραστηριότητες | ΕΛΓΟ - ΔΗΜΗΤΡΑ,” [online], 2023. available: https://www.elgo.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=2527:entypa-gia-ta-proionta-pefkothymaromelo-kritis-meli-elatis-mainalou-vanilia-pop&catid=188&Itemid=1259 (accessed Jun. 02, 2022).
- [32] M. Oroian and S. Ropciuc, “Romanian honey authentication using voltammetric electronic tongue. Correlation of voltammetric data with physico-chemical parameters and phenolic compounds,” *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 157, pp. 371–379, Feb. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.01.008>
- [33] A. Veloso, M. Sousa, L. Estevinho, L. Dias, and A. Peres, “Honey Evaluation Using Electronic Tongues: An Overview,” *Chemosensors*, vol. 6, no. 3, p. 28, Jul. 2018,

doi: <https://doi.org/10.3390/chemosensors6030028>

[34] K. Tiwari, B. Tudu, R. Bandyopadhyay, and A. Chatterjee, "Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue," *Journal of Food Engineering*, vol. 117, no. 2, pp. 205–210, Jul. 2013,

doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.023>

[35] N. El Alami El Hassani *et al.*, "Emerging approach for analytical characterization and geographical classification of Moroccan and French honeys by means of a voltammetric electronic tongue," *Food Chemistry*, vol. 243, pp. 36–42, Mar. 2018,

doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.067>

[36] M. Xagoraris, P.-K. Revelou, E. Alissandrakis, P. A. Tarantilis, and C. S. Pappas, "Greek Honey Authentication: Botanical Approach," *Encyclopedia*, vol. 1, no. 4, pp. 1322–1333, Dec. 2021,

doi: <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1040099>

[37] C. Corradini, A. Cavazza, and C. Bignardi, "High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications," *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, vol. 2012, p. e487564, May 2012,

doi: <https://doi.org/10.1155/2012/487564>

[38] L. Mehryar, "Honey & Honey Adulteration Detection: A Review,"

www.academia.edu,

Available:

https://www.academia.edu/29886364/Honey_and_Honey_Adulteration_Detection_A_Review

[39] M. B. Jaafar *et al.*, "A review on honey adulteration and the available detection approaches," *ResearchGate*, vol. 12, no. 2, pp. 125–131, Apr. 2022,

Available:

https://www.researchgate.net/publication/340806916_A_review_on_honey_adulteration_and_the_available_detection_approaches

[40] A. J. Siddiqui, S. G. Musharraf, M. I. Choudhary, and A. - Rahman, "Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey," *Food Chemistry*, vol. 217, pp. 687–698, Feb. 2017,

doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.001>

[41] E. Orfanakis, M. Markoulidakis, A. Philippidis, A. Zoumi, and M. Velegrakis, "Optical spectroscopy methods combined with multivariate statistical analysis for the classification of Cretan thyme, multi-floral and honeydew honey," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 101, no. 13, pp. 5337–5347, Oct. 2021,

doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11182>

[42] B. L. Batista *et al.*, "Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques," *Food Research International*, vol. 49, no. 1, pp. 209–215, Nov. 2012,

doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.015>

- [43] A. I. Cabañero, J. M. Recio, and M. Rupérez, “Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry: A New Perspective on Honey Adulteration Detection,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, no. 26, pp. 9719–9727, Nov. 2006, doi: <https://doi.org/10.1021/jf062067x>
- [44] A. Gallina, N. Stocco, and F. Mutinelli, “Karl Fischer Titration to determine moisture in honey: A new simplified approach,” *Food Control*, vol. 21, no. 6, pp. 942–944, Jun. 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.008>
- [45] L. Sobrino-Gregorio, R. Bataller, J. Soto, and I. Escriche, “Monitoring honey adulteration with sugar syrups using an automatic pulse voltammetric electronic tongue,” *Food Control*, vol. 91, pp. 254–260, Sep. 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.003>
- [46] P. Ciursa and M. Oroian, “Voltammetric E-Tongue for Honey Adulteration Detection,” *Sensors*, vol. 21, no. 15, p. 5059, Jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/s21155059>
- [47] Z. Wei and J. Wang, “Tracing floral and geographical origins of honeys by potentiometric and voltammetric electronic tongue,” *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 108, pp. 112–122, Oct. 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.07.014>
- [48] S. Wold, “Chemometrics, why, what and where to next?,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 9, no. 8, pp. 589–596, Jan. 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80183-a](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80183-a)
- [49] R. Bro, “Multivariate calibration,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 500, no. 1–2, pp. 185–194, Dec. 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/s0003-2670\(03\)00681-0](https://doi.org/10.1016/s0003-2670(03)00681-0)
- [50] A. Maćkiewicz and W. Ratajczak, “Principal components analysis (PCA),” *Computers & Geosciences*, vol. 19, no. 3, pp. 303–342, Mar. 1993, doi: [https://doi.org/10.1016/0098-3004\(93\)90090-r](https://doi.org/10.1016/0098-3004(93)90090-r)
- [51] Βιβλίο: “*Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth edition*”. J. Miller and J. Miller, Pearson Education Limited., pp. 221-250
Available: <https://www.africanfoodsafetynetwork.org/wp-content/uploads/2021/09/Statistics-and-Chemometrics-2010.pdf> (accessed June 5, 2022).
- [52] Μ. Κουπάρης and Κ. Ευσταθίου, Διαφάνειες μαθήματος: “Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα ΕΚΠΑ | Χημειομετρία - Στατιστική | Ενότητα 9: Πολυπαραμετρική ανάλυση ,” *opencourses.uoa.gr*.
available: <https://opencourses.uoa.gr/modules/units/?course=CHEM100&id=2329> (accessed Jun. 10, 2022).
- [53] H. Abdi, “Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression),” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, vol. 2, no. 1, pp. 97–106, Jan. 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/wics.51>

- [54] S. Wold, M. Sjöström, and L. Eriksson, “PLS-regression: a basic tool of chemometrics,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 58, no. 2, pp. 109–130, Oct. 2001,
doi: [https://doi.org/10.1016/s0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/s0169-7439(01)00155-1)
- [55] Β. ΒΕΡΥΚΙΟΣ , Η. ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ , Σ. ΚΩΤΣΙΑΝΤΗΣ , and Μ. ΤΖΑΓΚΑΡΑΚΗΣ , Διαφάνειες μαθήματος: “Η Επιστήμη των Δεδομένων: Βασικές Αρχές, Θεωρία & Εφαρμογές με τη Γλώσσα R,” [online], Jul. 28, 2020.
available:
<https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/ECON1332/Lectures/Lecture%203/06Regression.pdf> (accessed Jun. 10, 2022).
- [56] Βιβλίο: “*Multivariate Statistical Methods A Primer, Fourth Edition*”, P. Puynneers and J. A. N. Alberto, CRC Press, 2017, pp. 103–162. Accessed: Jun. 10, 2022. [Online].
available:
https://www.academia.edu/42319013/Multivariate_Statistical_Methods_A_Primer_Fourth_Edition
- [57] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, “Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away,” *Journal of Chemometrics*, vol. 28, no. 4, pp. 213–225, Mar. 2014,
doi: <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
- [58] A. L. Pomerantsev and O. Ye. Rodionova, “Multiclass partial least squares discriminant analysis: Taking the right way-A critical tutorial,” *Journal of Chemometrics*, vol. 32, no. 8, p. e3030, Apr. 2018,
doi: <https://doi.org/10.1002/cem.3030>
- [59] P. Oliveri, “Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues – A tutorial,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 982, pp. 9–19, Aug. 2017,
doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.013>
- [60] M. P. Derde and D. L. Massart, “Comparison of the performance of the class modelling techniques UNEQ, SIMCA, and PRIMA,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 4, no. 1, pp. 65–93, Jul. 1988,
doi: [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(88\)80013-3](https://doi.org/10.1016/0169-7439(88)80013-3)
- [61] F. Di Donato, A. Biancolillo, M. Foschi, V. Di Cecco, L. Di Martino, and A. A. D’Archivio, “Authentication of typical Italian bell pepper spices by ICP-OES multi-elemental analysis combined with SIMCA class modelling,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 115, p. 104948, Jan. 2023,
doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104948>