ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 52, No 4 (2001)

Sugar profile determination of four pure Greek honeys by gas-chromatography

A. E. TYRPENOU (Α.Ε.ΤΥΡΠΕΝΟΥ)

doi: 10.12681/jhvms.15464

Copyright © 2018, AE TYRPENOU

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

TYRPENOU (Α.Ε.ΤΥΡΠΕΝΟΥ) A. E. (2018). Sugar profile determination of four pure Greek honeys by gas-chromatography. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *52*(4), 317–324. https://doi.org/10.12681/jhvms.15464

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 24/01/2026 16:42:33

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2001, 52(4): 317-324

Προσδιορισμός του σακχαρικού φάσματος τεσσάρων αμιγών ελληνικών μελιών με αεριοχρωματογραφική μέθοδο.

Α. Ε. Τυρπένου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο μέλι τυποποιήθηκε και εφαρμόσθηκε ένας συνδυασμός δύο μεθόδων (Iverson & Bueno, 1981 και Pierce no. 16, 1990) με μικρές τροποποιήσεις. Η προτεινόμενη από την εταιρεία Pierce μέθοδος αρ. 16 έχει ειδικά τυποποιηθεί για να βοηθήσει σε επίπεδο ρουτίνας τον προσδιορισμό των σακχάρων των τροφίμων και σιροπιών. Τα σάκχαρα παρουσία υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης μετατρέπονται σε οξίμες, οι οποίες στη συνέχεια αντιδρούν με την τριμεθυλο-πυριτική ιμιδαζόλη [TMSI] για να σχηματίσουν τριμεθυλοπυριτικούς αιθέρες, οι οποίοι ανιχνεύονται αεριοχρωματογραφικά με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.[1] Η μετατροπή αυτή των σακχάρων σε οξίμες και σε παράγωγα TMS είναι εύκολη και γρήγορη, τα λαμβανόμενα αποτελέσματα είναι ποσοτικά επαναλήψιμα και οι πολλαπλές κορυφές των ταυτομερών μορφών των αναγομένων σακχάρων, που συνήθως εμφανίζονται κατά την απευθείας παραγωγοποίηση με TMS, εξαφανίζονται. Από τα δείγματα μελιού που αναλύθηκαν διαπιστώθηκε, ότι μόνο το μέλι ελάτης περιέχει τρισακχαρίτες με μεγαλύτερα ποσοστά εκείνα της μελεζιτόζης.

Λέξεις ευρετηρίασης: μέλι, σάκχαρα, αέρια χρωματογραφία

ABSTRACT. Tyrpenou A.E.. Sugar profile determination of four pure Greek honeys by gas-chromatography. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 2001, 52(4):317-324.* **Honey sugar determination was performed by using a combination of two methods (Iverson & Bueno, 1981 and Pierce no. 16, 1990) with some modifications. The proposed by Pierce method no.16, has been designed to assist in the routine determination of sugars in food products and syrups. Sugars are treated with hydroxylamine hydrochloride and the resulting oximes are converted to trimethylsilyl ethers by direct silylation with TMS. The derivatives are then determined by gas-chromatography with flame ionization detector and sugar oxime-TMS derivatives are quantitative and reproducible. This reaction is fast and simple, the results are quantitatively reproducible and multiple peaks due to the tautomeric forms of reducing sugars, which produced by direct TMS derivatization, are eliminated. From the honey samples analyzed it has been determined that only fir-tree honey contains trisaccharides with higher percentages that of melezitose.**

Key words: honey, sugars, gas-chromatography

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα χημικών ενώσεων που περιλαμβάνει σάκχαρα, άμυλα, κυτταρίνες και άλλες ενώσεις, οι οποίες σχηματίζονται κατά τη φωτοσύνθεση και αποτελούν σημαντικές πηγές ενέργειας για τους οργανισμούς. Διαιρούνται σε απλούς (μονοσακχαρίτες) και σύνθετους υδατάνθρακες (ενώσεις δύο ή περισσότερων μονοσακχαριτών).[2] Στους υδατάνθρακες ανήκουν και τα σάκχαρα, τα οποία είναι πολυυδροξυλιωμένες αλδεϋδες ή κετόνες. Ένα μοναδικό φυσικό μίγμα σακχάρων είναι το μέλι, το οποίο παράγεται από τις εργάτριες των κοινών μελισσών *Apis melifera*. Είναι ένα προϊόν το οποίο η φύση μας παρέχει έτοιμο για κατανάλωση χωρίς καμιά προηγούμενη επεξεργασία από τον άνθρωπο. Η σύνθεσή του δεν είναι σταθερή και διαφέρει ανάλογα με το νέκταρ των φυτών και το είδος των μελισσών.[3] Τα σάκχαρα που απαντούν σε μεγαλύτερα ποσοστά στο μέλι είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Τα υπόλοιπα σάκχαρα απαντούν σε μικρή αναλογία, ενώ μερικά βρίσκονται σε ίχνη. Αυτά είναι η σακχαρόζη, η κεστόζη, η μελεζιτόζη και η ραφινόζη. Αντίθετα, η μαλτόζη, η ισομαλτόζη, η ερλόζη και η δεξτραντριόζη αποτελούν προϊόντα της ενζυμικής δράσης των μελισσών.[4] Αποτελούν σημαντικό συστατικό των περισ-

[1] *Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Αθηνών -Ι.Κ.Ε.Α.*
Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας - ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.
Νεαπόλεως 25, Αγία Παρασκευή, 153 10 Αθήνα

Ημερομηνία υποβολής: 27.12.2000
Ημερομηνία εγκρίσεως: 14.11.2001

σοτέρων τροφίμων και ποτών και για τον προσδιορισμό τους οι μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι η αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας [GC-FID] μετά τη μετατροπή τους σε πτητικά παράγωγα, η υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή δείκτη διαθλάσεως [HPLC-RI] ή με ανιχνευτή υπεριώδους [HPLC-UV] και η υγρή χρωματογραφία σε υψηλό pH με αμπερομετρικό ανιχνευτή [HPAE-PAD].[5] Ειδικά για το μέλι, ο προσδιορισμός της φαινομένης περιεκτικότητας σε ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένης σε ιμβερτοσάκχαρο και της φαινομένης περιεκτικότητας σε σακχαρόζη, όπως αυτό προβλέπεται και στο Π.Δ.498/83,[6] γίνεται με την εφαρμογή της μεθόδου Lane-Eynon.[7] Όμως, στην περίπτωση των μελιών ελάτης, το αποτέλεσμα της ανάλυσης εμφανίζει πολλές φορές τα μέλια αυτά εκτός των νομοθετημένων ορίων, γεγονός το οποίο οφείλεται στην αυξημένη περιεκτικότητα των μελιών αυτών σε τρισακχαρίτες. Στην έρευνα αυτή εφαρμόσθηκε ο κλασικός τρόπος προσδιορισμού των σακχάρων με την αέρια χρωματογραφία και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, ύστερα από τη μετατροπή τους σε οξίμες και πτητικά παράγωγα TMS. Η χημική αντίδραση της αντικατάστασης του καρβονυλικού οξυγόνου από τη ρίζα =NOH της υδροξυλαμίνης και ο σχηματισμός οξίμης φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 1.

$$>C = O + H_2N\text{-}OH \rightarrow >C = N\text{-}OH + H_2O$$

Εικόνα 1. Χημική αντίδραση του σχηματισμού οξιμών
Figure 1. Chemical reaction for oxime formation

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των σακχάρων στο μέλι, είναι η με αριθμό 16 μέθοδος που είναι μια από τις προτεινόμενες από την εταιρεία Pierce τεχνικές. Η μέθοδος αυτή έχει αναπτυχθεί ειδικά για να βοηθήσει τα εργαστήρια ελέγχου τροφίμων στον προσδιορισμό των σακχάρων τροφίμων και σιροπιών σε επίπεδο ρουτίνας. Τα σάκχαρα που προσδιορίσθηκαν διακρίνονται σε μονοσακχαρίτες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, σε δισακχαρίτες όπως η σακχαρόζη, η τρεαλόζη, η μαλτόζη, η γεντιοβιόζη και η μελιβιόζη και σε τρισακχαρίτες όπως η ραφινόζη και η ερλόζη σε μικρά ποσοστά με μικρή διαχωριστική ικανότητα και σε μεγαλύτερα ποσοστά η μελεζιτόζη. Με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας διαπιστώθηκε η παρουσία στα ελληνικά μέλια ελάτης, αυξημένων ποσοτήτων τρισακχαριτών και ειδικότερα της μελεζιτόζης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Δειγματοληψία

Τα δείγματα μελιού που εξετάσθηκαν προέρχονταν από περιοχές του Έβρου, της Τρίπολης [Βυτίνα], της Κω, της Κρήτης, του Άργους και ήσαν αμιγή μέλια ηλίανθου, ελάτης, θυμαριού και πορτοκαλιάς. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ύστερα από συνεννόηση με τους μελισσοκόμους των περιοχών αυτών, η δε κατάταξή τους έγινε με βάση την εμπειρία των μελισσοκόμων, τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες και τα γυρεοσκοπικά τους χαρακτηριστικά.

Αντιδραστήρια

- D-φρουκτόζη [μ.β.=180,2] Serva
- β-D(+)-γλυκόζη [μ.β.=180,2] "
- Σακχαρόζη [μ.β.=342,3] "
- D-τρεαλόζη.$2H_2O$ [μ.β.=378,3] "
- D-μαλτόζη [μ.β.=360,3] "
- D- γεντιοβιόζη μ.β.=342,3] "
- α-D-μελιβιόζη.H_2O [μ.β.=360,3] "
- α-D-ραφινόζη.$5H_2O$ μ.β.=594,5] "
- α-D-μελεζιτόζη.$2H_2O$ μ.β.=540,5] "
- Πρότυπο μίγμα σακχάρων [Sugar Standard Calibration Mixture Group I], Pierce

Διάλυμα πυριδίνης 10 mL που περιέχει 5 mg/0.5 mL φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη. Χρησιμοποιούμε 0.5 mL του διαλύματος για τον προσδιορισμό των συντελεστών αντίδρασης του ανιχνευτή [RFs-response factors].

- αιθυλική αλκοόλη p.a. Merck
- διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 80% με αποσταγμένο νερό
- STOX™ Reagent in 50 mL Hypo-Vial Storage Vial, Pierce

Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των οξιμών των σακχάρων πριν από την παραγωγοποίηση. Το αντιδραστήριο STOX™ είναι ένα διάλυμα υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης σε πυριδίνη [25 mg/mL], και περιέχει 6 mg/mL phenyl-β-D-glucopyranoside ως εσωτερικό πρότυπο.

- N-Trimethylsilylimidazole-TMSI, Pierce
- Silyl-8™ GC Column Conditioner, Pierce

Προστασία: επειδή το αντιδραστήριο TMSI είναι εύφλεκτο, διαβρωτικό και απελευθερώνει υδροχλωρικό οξύ, θα πρέπει να χειρίζεται με προστατευτικά γάντια, γυαλιά και πάντα σε απαγωγό αερίων.

Εξοπλισμός

- Σύστημα μικροσκοπικής παρατήρησης model no. 66415, Carl Zeiss
- Αέριος χρωματογράφος SIGMA 2000 με ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας [FID] και γυάλινη είσοδο έγχυσης, Perkin Elmer

• Μονάδα δεδομένων και καταγραφικό, Sigma 15 Data Station & Printer Plotter, Perkin Elmer

• Φιάλη αέρα υψηλής καθαρότητας 99,999%, Air Liquid

• Φιάλη υδρογόνου υψηλής καθαρότητας, 99,999%, Air Liquid

• Φιάλη αζώτου υψηλής καθαρότητας, 99,999%, Air Liquid

* Αναλυτική στήλη 3% OV-7 + 1.5% OV-22 on Chrom.W DMCS 80-100mesh, 2M x 1/4" x 2 mm, Chrompack

• Φιαλίδια τύπου Miniature Reaction Vials των 3 mL με βιδωτό πώμα ασφαλείας, Pierce

• Φιαλίδια γυάλινα 22 mL με βιδωτό πώμα και φύλλο αλουμινίου, Chromacol

• Μηχανικός αναδευτήρας τύπου Vortex, Scientific Instruments

• Επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρος τύπου K29, Hellenic Labware

• Σιφώνια ακριβείας 0,2 mL, 1,0 mL και 5,0 mL, Gilson

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ταυτοποίηση της φυτικής προέλευσης των μελιών

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο δειγματοληψίας, η συλλογή των δειγμάτων έγινε απευθείας από το μελιτοεξαγωγέα. Για την ταξινόμηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν αφ' ενός μεν όλα τα στοιχεία που συλλέχθηκαν κατά τη δειγματοληψία, όπως το άρωμα, η γεύση, το χρώμα, η περιοχή δειγματοληψίας, αφ' ετέρου δε τα μικροσκοπικά τους χαρακτηριστικά και ειδικότερα η γυρεολογική τους σύσταση. Η εξέταση αυτή αποτελεί και τον τελικό προσδιορισμό της φυτικής τους ταυτότητας που βασίζεται στην απομόνωση και τη μικροσκοπική εξέταση ειδικά επεξεργασμένων επιχρισμάτων μελιού σε σύγκριση με πρότυπα παρασκευάσματα γυρεοκόκκων και με τους υπάρχοντες γυρεολογικούς άτλαντες. Μετά από τη μικροσκοπική παρατήρηση και την καταμέτρηση των χαρακτηριστικών για κάθε κατηγορία μελιού γυρεοκόκκων σε πέντε οπτικά πεδία μικροσκοπικής παρατήρησης, εξάγεται το αποτέλεσμα.

Εκχύλιση του δείγματος

Από το δείγμα μελιού μετά από καλή ανάμιξη, ζυγίζεται ποσότητα 1g σε φιαλίδιο των 22 mL με βιδωτό πώμα. Προσθέτονται 10 mL διαλύματος 80% αιθυλικής αλκοόλης σε νερό και το φιαλίδιο πωματίζεται στεγανά. Ακολουθεί έντονη ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα για 2 min και φυγοκέντρηση στις 2500 rpm.5 min^{-1}. Από το υπερπλέον εκχύλισμα με αυτόματο σιφώνιο ακριβείας 0,2 mL, μεταφέρεται στο ειδικό φιαλίδιο παραγωγοποίησης των 3 mL όγκος 0,070 mL και ακολουθεί εξάτμιση του δείγματος μέχρι ξηρού στους 70°C και σε ελαφρό ρεύμα αζώτου. Παράλληλα, σε φιαλίδιο παραγωγοποίησης 3 mL, ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας τα σάκχαρα σε μικροποσότητες τέτοιες, ώστε να έχουμε συνολικό βάρος περίπου 0,010 g - 0,015 g σύμφωνα με τις οδηγίες της μεθόδου, όπως φαίνεται παρακάτω:

D-φρουκτόζη	0,00386g
β-D(+)-γλυκόζη	0,00234g
Σακχαρόζη	0,00186g
D-τρεαλόζη.$2H_2O$	0,00135g
D-μαλτόζη	0,00122g
α-D-μελιβιόζη.H_2O	0,00105g
α-D-ραφινόζη.$5H_2O$	0,00128g
α-D-μελεζιτόζη.$2H_2O$	0,00115g
Σύνολο	0,01411g

Παραγωγοποίηση

• **Μετατροπή των σακχάρων σε οξίμες**

Στο δείγμα μας [τα 0,070 mL έχουν περίπου 7,0 mg σάκχαρα] και στο πρότυπο μίγμα σακχάρων προσθέτονται 0,5 mL και 1,0 mL αντίστοιχα αντιδραστηρίου STOX Oxime. Τα φιαλίδια σφραγίζονται ερμητικά, αναδεύονται στο μηχανικό αναδευτήρα μέχρι διαλύσεως του ξηρού υπολείμματος και των προτύπων σακχάρων και τοποθετούνται στην ειδική θερμαινόμενη μεταλλική μήτρα της συσκευής παραγωγοποίησης, όπου παραμένουν στους 70°-75°C για 30 min με ταυτόχρονη κατά διαστήματα ανάδευση. [κρίσιμο σημείο]

• **Μετατροπή των οξιμών σε παράγωγα TMSI**

Μετά την παραμονή των φιαλιδίων στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος μέχρι να ψυχθούν, προσθέτονται 0,5 mL αντιδραστηρίου TMSI στο άγνωστο δείγμα και 1 mL στο πρότυπο μίγμα σακχάρων, σφραγίζονται ξανά τα φιαλίδια, αναδεύονται για 30 sec και παραμένουν σε ηρεμία για 30 min.

Αεριοχρωματογραφική ανάλυση

Ενεργοποίηση της χρωματογραφικής στήλης: για καλύτερη απόδοση της χρωματογραφικής στήλης, δηλαδή βελτίωση της διαχωριστικής της ικανότητας, περιορισμό της διεύρυνσης της βάσης [tailing] των κορυφών αλλά και για μεγαλύτερη διάρκεια της ζωής της, κατά διαστήματα γίνεται έγχυση στη στήλη 10-50 μL Silyl-8, το οποίο απομακρύνει από το χρωματογραφικό σύστημα όλα τα τυχόν κατάλοιπα από την ανάλυση των δειγμάτων. Για τη διαδικασία αυτή, ρυθμίζουμε τη θερμοκρασία της στήλης στους 170°C-200°C και κάνουμε έγχυση 10-50 μL Silyl-8. Η στήλη ενεργοποιείται μέσα σε μερικά λεπτά, γεγονός το οποίο φαίνεται από την ευθεία βασική γραμμή του χρωματογραφήματος. Αν αυτό δεν γίνει, τότε μπορούμε να επα-

ναλάβουμε την έγχυση έως ότου επιτύχουμε ευθεία βασική γραμμή.

Αεριοχρωματογραφικές συνθήκες

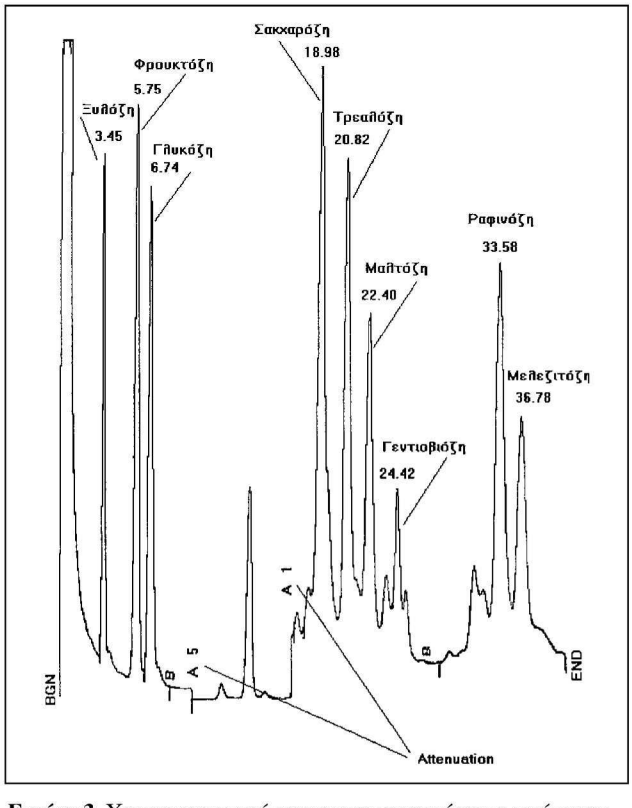
- Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα: η έκλουση και ο διαχωρισμός των κορυφών των σακχάρων έγινε με την τυποποίηση και εφαρμογή του ακόλουθου προγράμματος θερμοκρασιακής βαθμιαίας έκλουσης:
- Θερμοκρασία έναρξης 175°C για 0,5 min και στη συνέχεια βαθμιαία άνοδος της θερμοκρασίας του φούρνου ανά 4°C.min^{-1} μέχρι τη θερμοκρασία των 290°C, η οποία παραμένει σταθερή για 7 min. Επίσης εφαρμόσθηκε ενίσχυση σήματος [attenuation] 5 και 1 στα 7 και 11 min αντίστοιχα .
- Ροή αζώτου, 30 mL.min^{-1}
- Ροή υδρογόνου, 20 psi
- Ροή αέρα, 20 psi

Στην εικόνα 2 μπορούμε να δούμε το σχηματικό διάγραμμα της μεθόδου προσδιορισμού των σακχάρων και στις εικόνες 3 και 4 χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα πρότυπου μίγματος σακχάρων και δείγματος μελιού ελάτης αντίστοιχα.

1 g μέλι
+10 mL 80% αιθανόλη
ανάδευση & φυγοκέντρηση 2000 rpm.5 min^{-1}
⇓
0,070 mL
εξατμίζονται N2 & 70°C
⇓
ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ OXIMES
⇓
+0,5 mL STOX Oxime I.S.
σε reacti-vial 3 mL
⇓
θέρμανση στους 70°C - 75°C για 30 min
ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου
⇓
TMSI
+0,5 mL N-Trimethylsilylimidazole
αναδεύουμε για 30 sec
παραμονή στο περιβάλλον για 30 min
⇓
5 μL έγχυση
⇓
GLC - FID

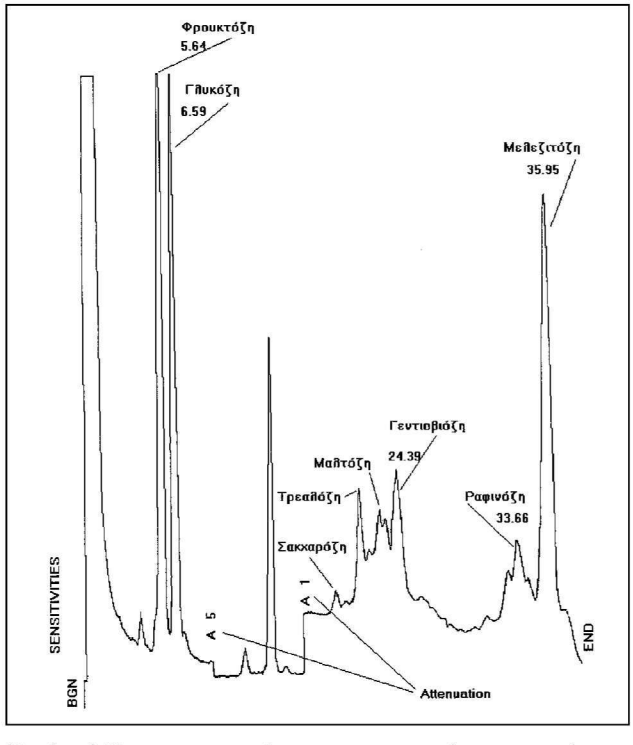
Εικόνα 2. Διάγραμμα μεθόδου προσδιορισμού των σακχάρων.

Figure 2. Sugars determination method flow diagram.



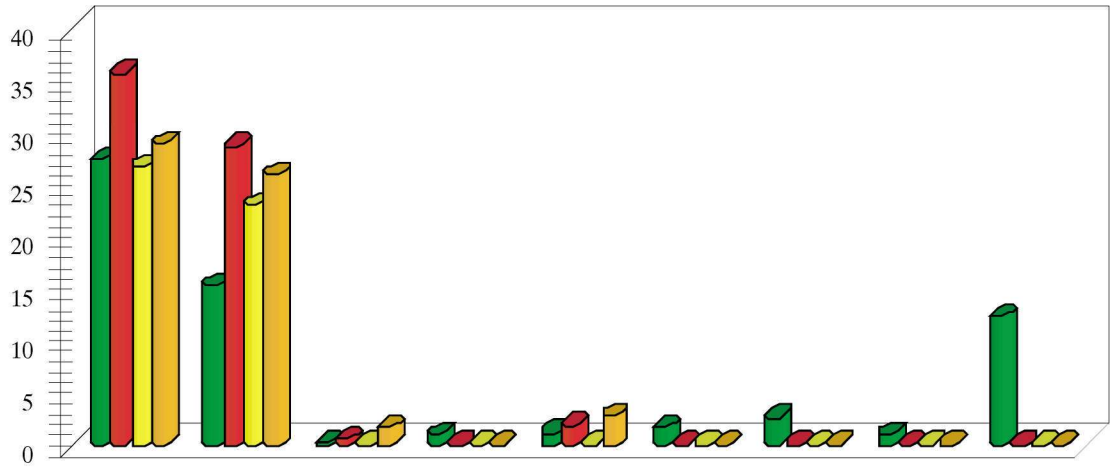
Εικόνα 3. Χαρακτηριστικό αεριοχρωματογράφημα πρότυπου μίγματος σακχάρων.

Figure 3. A characteristic chromatogram of a standard sugar mixture



Εικόνα 4. Χαρακτηριστικό αεριοχρωματογράφημα σακχάρων μελιού από έλατο.

Figure 4. A characteristic sugars chromatogram of a fir-tree honey sample.



	Φρουκτόζη	Γλυκόζη	Σακχαρόζη	Τρεαλόζη	Μαλτόζη	Γεντιοβιόζη	Μελιβιόζη	Ραφινόζη	Μελεζιτόζη
Έλατος	27,53	15,47	0,21	1,02	1,25	1,72	2,71	1,04	12,34
Θυμάρι	35,92	28,89	0,62	0,05	1,91	0	0	0	0
Ηλίανθος	26,92	23,16	0	0	0,15	0	0	0	0
Πορτοκαλιά	29,1	26,19	1,72	0	2,86	0	0	0	0

Εικόνα 5. Ιστόγραμμα του σακχαρικού φάσματος των τεσσάρων τύπων αμιγών ελληνικών μελιών [μέσες τιμές].

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Με την αεριοχρωματογραφική ανάλυση υπολογίζεται αρχικά το ύψος της κορυφής κάθε σακχάρου ή οι παράγοντες αντίδρασης [Response Factors] πραγματοποιώντας επανειλημμένες εγχύσεις [n-10] και η μέση τιμή χρησιμοποιείται από το λογισμικό πρόγραμμα του αεριοχρωματογραφικού συστήματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων του δείγματος. Στην εικόνα 5 μπορούμε να δούμε τη γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών των σακχάρων των τεσσάρων τύπων των αμιγών ελληνικών μελιών εκφρασμένων σε g σακχάρων ανά 100 g μελιού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επειδή η υγρασία διασπά τα παράγωγα TMS, δείγματα με 20-75% νερό πρέπει να συμπυκνώνονται έως ότου το νερό να είναι λιγότερο από 20 mg.[1] Στην περίπτωση του μελιού, επειδή η μέση υγρασία του γενικά κυμαίνεται <20% [τα ελληνικά μέλια συνήθως δεν ξεπερνούν κατά μέσον όρο το 17%] το αναλυτικό δείγμα ζυγίζεται αμέσως. Τα 0,070 mL εκχυλίσματος τα οποία εμπεριέχουν 7,0 mg μελιού, μετά από την απομάκρυνση του διαλυτικού μέσου και της υγρασίας στους 70°C και σε ρεύμα αζώτου, υποβάλλονται στη διαδικασία μετατροπής τους σε παράγωγα για να μειωθούν ή και να εξαφανισθούν οι δεσμοί υδρογόνου και να αυξηθεί η πτητικότητά τους. Ακόμα, τα περισσότερα σάκχαρα σε διάλυμα υφίστανται ως ισορροπημένα μίγματα των α- και β- ανομερών στον εξαμελή [πυρανόζη] και πενταμελή [φουρανόζη] δακτύλιο με αποτέλεσμα το σχηματισμό 4 παράγωγων μορφών και πολλαπλών κορυφών, φαινόμενο που είναι χαρακτηριστικό κατά τη μετατροπή τους σε τριμεθυλοπυριτικούς αιθέρες. Με την τεχνική της μετατροπής τους πρώτα σε οξίμες και μετά σε τριμεθυλοπυριτικούς αιθέρες, ο σχηματισμός των πολλαπλών κορυφών περιορίζεται δραματικά ή και εξαφανίζεται. Η αποικοδόμηση αυτή των υδατανθράκων αποτελεί μια από τις χημικές τους ιδιότητες κατά την οποία παράγονται ενώσεις που έχουν το συντακτικό τύπο $R_2C{=}NOH$.[9]

Σύμφωνα με την Pierce, για τη μετατροπή των σακχάρων σε πτητικά παράγωγα, δύο τρόποι παραγωγοποίησης μπορούν να εφαρμοσθούν. Ο ένας γίνεται με το τριφθοροξικό οξύ [TFA], ο άλλος με τριμεθυλο-πυριτική ιμιδαζόλη [TMSI] και σε αμφότερες τις περιπτώσεις με τη χρησιμοποίηση του ειδικού αντιδραστηρίου STOX Oxime. Στην έρευνα αυτή εφαρμόσθηκε η δεύτερη περίπτωση κατά την οποία δεν δημιουργείται λευκό ίζημα όπως στην πρώτη περίπτωση και το προς έγχυση τελικό διάλυμα είναι τελείως διαυγές. Ο συνδυασμός των δύο τεχνικών που εφαρμόσθηκαν αποδείχθηκε εύκολος και γρήγορος στην εκτέλεση, ακριβής και αποτελεσματικός και απλοποίησε την ερμηνεία των λαμβανομένων αποτελεσμάτων της αερίου χρωματογραφίας, επειδή το παράγωγο κάθε σακχάρου δημιουργούσε μία κορυφή. Η ενδεχόμενη ατελής μετατροπή των σακχάρων σε οξίμες, η οποία μπορεί και να εκληφθεί ως μειονέκτημα της μεθόδου το οποίο περιορίζει τα ανιχνεύσιμα ποσοστά σακχάρων, μπορεί να συμβεί μό-

Πίνακας 1. Ποσοστά των εμπεριεχομένων σακχάρων στα δείγματα μελιού ελάτης (Βυτίνα) (g/100g)

Table 1. Sugars content percentages [%] in fir-tree honey samples (g/100g)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Φρουκτόζη	Γλυκόζη	Σακχαρόζη	Τρεαλόζη	Μαλτόζη	Γεντιοβιόζη	Μελιβιόζη	Ραφινόζη	Μελεζιτόζη
Έλατος 1	27,93	17,22	0,14	0,97	0,28	2,71	ND	0,51	8,61
Έλατος 2	21,18	12,28	0,12	0,70	0,31	2,98	ND	0,35	4,79
Έλατος 3	28,68	17,19	0,12	0,92	0,18	2,54	ND	0,49	7,92
Έλατος 4	28,65	16,36	0,19	0,04	0,10	ND	ND	0,57	13,96
Έλατος 5	25,22	14,28	0,14	0,10	0,08	ND	ND	0,50	12,26
Έλατος 6	26,81	15,71	0,15	1,24	0,47	0,77	ND	0,61	15,81
Έλατος 7	24,30	13,46	0,13	0,91	0,15	1,96	ND	0,68	18,15
Έλατος 8	28,45	16,63	0,13	0,90	0,13	2,21	MD	0,59	14,47
Έλατος 9	22,25	12,99	0,09	0,57	0,10	1,17	ND	0,49	11,32
Έλατος 10	27,68	15,58	0,12	0,54	0,10	1,10	ND	0,57	12,99
Έλατος 11	29,07	17,08	0,28	1,24	2,47	0,78	ND	1,19	8,47
Έλατος 12	31,87	21,46	0,37	1,06	3,09	ND	ND	0,93	4,24
Έλατος 13	32,87	22,92	0,28	1,51	4,70	ND	ND	1,45	5,41
Έλατος 14	30,15	20,42	0,28	2,66	3,71	0,80	ND	1,98	14,59
Έλατος 15	27,26	13,70	0,23	1,98	2,15	ND	ND	ND	12,56
Έλατος 16	28,25	12,57	0,18	1,25	0,92	ND	1,40	2,47	14,67
Έλατος 17	28,26	12,20	0,32	1,50	1,24	ND	4,20	2,05	18,66
Έλατος 18	29,19	12,67	0,32	0,30	1,30	1,86	3,68	1,89	19,43
Έλατος 19	27,31	11,90	0,33	1,50	1,24	ND	1,57	1,64	13,71
Έλατος 20	27,30	12,86	0,32	0,56	2,17	ND	ND	1,80	14,67
mean	**27,528**	**15,474**	**0,212**	**1,0225**	**1,2445**	**1,716**	**2,71**	**1,038**	**12,3345**
sd	2,766	3,229	0,091	0,631	1,376	0,829	1,435	0,707	4,48

Πίνακας 2. Ποσοστά των εμπεριεχομένων σακχάρων στα δείγματα μελιού από θυμάρι (g/100g)

Table 2. Sugars content percentages [%] in thyme honey samples (g/100g)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Φρουκτόζη	Γλυκόζη	Σακχαρόζη	Τρεαλόζη	Μαλτόζη	Γεντιοβιόζη	Μελιβιόζη	Ραφινόζη	Μελεζιτόζη
Θυμάρι 1	36,43	31,94	1,08	ND	3,14	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 2	32,30	26,78	2,96	0,18	0,45	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 3	42,32	34,97	0,26	0,05	0,59	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 4	52,61	40,18	ND	0,04	0,36	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 5	43,23	35,73	0,06	0,08	1,72	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 6	38,01	28,18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 7	43,72	34,02	ND	0,04	ND	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 8	30,91	25,58	0,83	ND	2,45	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 9	32,09	27,24	0,36	ND	2,74	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 10	32,90	25,39	2,17	ND	2,51	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 11	31,94	26,81	0,55	ND	2,92	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 12	30,70	25,78	0,46	ND	82	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 13	34,11	27,01	0,55	0,35	2,45	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 14	32,77	28,00	0,46	ND	5,01	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 15	31,94	25,58	0,55	ND	1,70	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 16	31,79	26,66	0,18	ND	1,95	ND	ND	ND	ND
Θυμάρι 17	32,79	21,28	ND	ND	1,70	ND	ND	ND	ND
Mean	**35,915**	**28,89**	**0,62**	**0,044**	**1,91**	**-**	**-**	**-**	**-**
sd	6,12	4,808	0,81	0,092	1,33	-	-	-	-

Πίνακας 3. Ποσοστά των εμπεριεχομένων σακχάρων στα δείγματα μελιού από ηλίανθο (g/100g)

Table 3. Sugars content percentages [%] in sunflower honey samples (g/100g)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Φρουκτόζη	Γλυκόζη	Σακχαρόζη	Τρεαλόζη	Μαλτόζη	Γεντιοβιόζη	Μελιβιόζη	Ραφινόζη	Μελεζιτόζη
Ηλίανθος 1	27,36	24,47	0,07	0,22	0,86	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 2	27,35	24,02	ND	0,37	0,96	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 3	26,67	23,18	0,07	ND	0,19	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 4	26,78	23,18	ND	ND	0,19	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 5	25,92	22,56	ND	0,21	0,65	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 6	27,42	23,77	ND	0,07	0,19	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 7	26,65	22,93	ND	0,22	1,23	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 8	26,88	22,39	ND	0,06	0,29	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 9	26,56	22,52	ND	0,22	0,67	ND	ND	ND	ND
Ηλίανθος 10	27,42	22,57	ND	0,07	0,19	ND	ND	ND	ND
mean	**26,915**	**23,159**	**0,07**	**0,144**	**0,542**	**-**	**-**	**-**	**-**
sd	0,49	0,71	-	0,12	0,39	-	-	-	-

Πίνακας 4. Ποσοστά επί τοις εκατό [%] των εμπεριεχομένων σακχάρων στα δείγματα μελιού από πορτοκαλιά (g/100g)

Table 4. Sugars content percentages [%] in orange honey samples (g/100g)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Φρουκτόζη	Γλυκόζη	Σακχαρόζη	Τρεαλόζη	Μαλτόζη	Γεντιοβιόζη	Μελιβιόζη	Ραφινόζη	Μελεζιτόζη
Πορτοκαλιά.1	26,56	22,97	0,71	ND	1,53	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 2	32,76	30,22	1,96	ND	2,60	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 3	30,21	25,47	2,62	ND	2,48	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 4	29,38	24,71	0,91	ND	0,48	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 5	28,95	24,90	1,67	ND	1,85	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 6	32,37	27,70	3,27	ND	7,42	§ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 7	30,97	26,10	1,83	ND	2,90	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 8	31,62	27,28	2,41	ND	3,56	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 9	34,62	27,85	0,83	ND	4,53	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 10	30,94	24,74	1,13	ND	2,22	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 11	31,10	25,52	1,67	ND	2,24	ND	ND	ND	ND
Πορτοκαλιά 12	30,97	26,87	1,66	ND	2,45	ND	ND	ND	ND
mean	**29,066**	**26,19**	**1,72**	**-**	**2,86**	**-**	**-**	**-**	**-**
sd	2,52	1,91	0,77	-	1,75	-	-	-	

νο σε πολύπλοκα δείγματα οπότε και εφαρμόζεται η ανάδευση του δείγματος κατά την παραγωγοποίηση για να επιτύχουμε την ολοκλήρωση της αντίδρασης.[8] Ο ίδιος συνδυασμός των τεχνικών αυτών αναφέρεται και από το Υπουργείο Γεωργίας της Αμερικής [USDA] στον προσδιορισμό των σακχάρων στα τρόφιμα..[10]

Από την αεριοχρωματογραφική ανάλυση διαπιστώθηκε, ότι τα μέλια ελάτης εμπεριέχουν μονοσακχαρίτες [φρουκτόζη, γλυκόζη], δισακχαρίτες [σακχαρόζη, τρεαλόζη, μαλτόζη, γεντιοβιόζη, μελιβιόζη] και τρισακχαρίτες [ραφινόζη, μελεζιτόζη]. Τα μέλια θυμαριού και ηλίανθου εμπεριείχαν μονοσακχαρίτες [φρουκτόζη, γλυκόζη], δισακχαρίτες [σακχαρόζη, τρεαλόζη, μαλτόζη] και κανένα τρισακχαρίτη, ενώ τα μέλια πορτοκαλιάς είχαν μόνο φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη και μαλτόζη. Επίσης, διαπιστώθηκε η αυξημένη περιεκτικότητα των μελιών ελάτης σε τρισακχαρίτες και πιο ειδικά σε μελεζιτόζη, τα αυξημένα ποσοστά των οποίων κατά τον προσδιορισμό των σακχάρων με τη μέθοδο Lane-Eynon εμφανίζουν τα μέλια αυτά εκτός των νομοθετημένων ορίων. Τα αναλυτικά αποτελέσματα των σακχάρων που προσδιορίσθηκαν φαίνονται στους πίνακες 1, 2, 3 και 4.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής διαπιστώνεται, ότι αρκετά δείγματα μελιού δεν πληρούν

τα ποιοτικά κριτήρια του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών και της νέας οδηγίας για το μέλι όσον αφορά το άθροισμα φρουκτόζης και γλυκόζης (45% για το μέλι μελιτωμάτων και 60% για τα ανθόμελα).[12] Επομένως διαφαίνεται, ότι τα μέλια που εξετάσθηκαν ή παρουσιάζουν κάποια ιδιαιτερότητα ως προς τα ποσοστά των σακχάρων που εμπεριέχουν ή ότι η μέθοδος αυτή προκαλεί απώλειες των σακχάρων κατά την εφαρμογή της. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και από επίσημη πληροφόρηση της Pierce, δεν παρατηρείται απώλεια σακχάρων κατά την εφαρμογή της μεθόδου καθ' όσον οι συνθήκες της μεθόδου δεν είναι ούτε καταστροφικές για το δείγμα αλλά ούτε υπάρχει υγρασία, η οποία θα μπορούσε να επιφέρει υδρόλυση των σχηματιζόμενων παραγώγων.[13] Προβλήματα ατελούς παραγωγοποίησης και υδρόλυσης των σχηματιζόμενων ενδέχεται να παρατηρηθούν μόνο κατά την ανάλυση δειγμάτων πολύπλοκης σύνθεσης.[1]

Επειδή όμως δημιουργείται λανθασμένη εικόνα για τη σύνθεση σε σάκχαρα των αμιγών ελληνικών μελιών σε σχέση με όσα αναφέρονται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας, ότι όσον αφορά στο μέλι, ο Κώδικας βασίσθηκε σε δεδομένα μελιών που προέρχονταν από αναλύσεις μελιών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης και όχι από μέλια της ελληνικής παραγωγής. Εξ άλλου τα δεδομένα των αναλύσεων της εργασίας αυτής είναι και τα πρώτα που έγιναν στη χώρα μας με την αέριο χρωματογραφία. Επιπλέον και τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών από αναλύσεις ελληνικών μελιών, π.χ. ελάτης, παρουσιάζουν την ίδια περίπου εικόνα ως προς τη σύνθεσή τους σε σάκχαρα με μέσο όρο γλυκόζης και φρουκτόζης $25,61 \pm 2,62$ και $16,74 \pm 1,74$ αντίστοιχα και άθροισμα 42,35%.[11]

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Επειδή τα αποτελέσματα που πήραμε ενδεχόμενα να φωτογραφίζουν κάποια πιθανή ιδιομορφία των ελληνικών μελιών, για τον ακριβέστερο καθορισμό τόσο της ταυτότητάς τους όσο και της σύνθεσής τους σε σάκχαρα, επιβάλλεται η πραγματοποίηση οργανωμένων προγραμμάτων επιλογής, συλλογής, ταξινόμησης και ανάλυσης πολλών δειγμάτων χαρακτηριστικών αμιγών ελληνικών μελιών από διάφορες περιοχές της χώρας μας, σε διάφορες εποχές και για πολλά χρόνια. Έτσι, θα έχουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα των διαφόρων τύπων του προϊόντος με δυνατότητα να αποφανθούμε για την ακριβέστερη σύνθεσή του σε σάκχαρα αλλά και να υποβάλουμε προτάσεις για την τροποποίηση του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ώστε να αποφευχθούν τυχόν δικαστικές περιπέτειες των Ελλήνων παραγωγών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους μελισσοκόμους για την αποστολή των δειγμάτων μελιού αλλά και προς το προσωπικό του Τμήματος Ελέγχου Προϊόντων Κυψέλης του Ινστιτούτου Υγιεινής Τροφίμων του Υπουργείου Γεωργίας (την περίοδο εκείνη ασκούσα καθήκοντα Αναπληρωτή Προϊσταμένου), για τη συμβολή του στην πραγματοποίηση της έρευνας αυτής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pierce Handbook and General Catalogue. Method No.16, pp 164, 1990.
2. Ouellette RJ. Carbohydrates. In: Ouellette RJ [de] Introduction to General, Organic, and Biological Chemistry. Third Edition. MacMillan Publishing Company. Maxwell Macmillan, Inc., Toronto, USA pp.486-512, 1992.
3. Πανέτσος ΑΓ. Υγιεινή και Συντήρησις του Μέλιτος. Κεφάλαιον Ένατον. Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως. 4η έκδοση, Θεσσαλονίκη, 1978
4. Θρασυβούλου Α, Κομπός Α, Λαγουδάκη Ε, Μαριολέας Π, Πασαλόγλου-Κατραλή Μ, Τσιγουρή Α, Τυρπένου Α. Ποιοτικά Κριτήρια Ελέγχου του Μελιού & Νομοθετημένες Διατάξεις. ΠΡΑΚΤΙΚΑ Ημερίδας "Μελισσοκομία ΙΙ - Το Μέλι - Δυνατότητες Πληρέστερης Εκμετάλλευσης της Μέλισσας " σελ.113-119, Γερακινή Χαλκιδικής, 1992.
5. DIONEX. Carbohydrates. In : Better Solutions for Food and Beverage Analysis. Second Edition. Dionex Corporation, USA pp.18, 1997.
6. Π.Δ.498/83. Εναρμόνιση προς την Οδηγία 74/409/ΕΟΚ "περί του μέλιτος" της 22.7.1974, ΦΕΚ 186/83, τεύχος Αα., 1983.
7. Lane JH, Eynon L. Determination of reducing sugars by means of Fehling solution with methylene blue as internal indicator. J Soc Chem. Ind., 1923, 42-32.
8. Iverson JL. and Bueno MP. Evaluation of High Pressure Liquid Chromatography and Gas-Liquid Chromatography for Quantitative Determination of Sugars in Foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1981, 64:139-143
9. IUPAC. Oximes. International Union Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology. 2nd Edition, pp.1-3, 1997.
10. Li BW. Determination of sugars, starches, and total dietary fiber in selected high-consumption foods. J. Ass. Off. Anal. Chem. Intern., 1996, 79:718-723
11. Γ.Χ.Κ. Αποτελέσματα χημικής εξέτασης σακχάρων σε μέλια ελάτης. Γενικό Χημείο του Κράτους-Διεύθυνση Τροφίμων, αρ. πρωτ.3022118/2878/92-3004505/515/93,27 Μαΐου 1994.
12. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. Κεφάλαιο VII- Γλυκαντικαί ύλαι - Μέλι. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών Διαρκούς Ενημέρωσης. Επιμέλεια έκδοσης: Γ. Σ. Αλυσανδράτος, Αθήνα, 1999, σελ. 295-302.
13. Swiergiel J. Pierce Technical Mail. Reference call #396356, 2001