



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ολικής
trans - ρεσβερατρόλης σε οίνους με χρήση
φασματοσκοπίας NMR**

**ΚΑΛΑΜΠΟΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ολικής
trans - ρεσβερατρόλης σε οίνους με χρήση
φασματοσκοπίας NMR**

**ΚΑΛΑΜΠΟΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής Μαγιάτη Προκόπιο για την καθοδήγηση, την επίβλεψη και την υποστήριξη κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων σε όλη τη διάρκεια της παρούσας μεταπτυχιακής ερευνητικής εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τη καθηγήτρια Μαρία Λιούννη για την υποστήριξη κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Οινολογίας, του τομέα Βιομηχανικής Χημείας του Χημικού Τμήματος Αθήνας, ενώ η ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής trans-ρεσβερατρόλης σε οίνους με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR και η ανάλυση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής Σχολής Αθήνας.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Ηλία Νεραντζή για την επιστημονική υποστήριξη και τις παρατηρήσεις μέσα στο διάστημα εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΑΛΑΜΠΟΚΗΣ ΕΥΑΓΕΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΑ ΠΟΤΑ»
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΛΙΟΥΝΗ ΜΑΡΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΛΙΟΥΝΗ ΜΑΡΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
Τμήμα Χημείας
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΔΑΣΕΝΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
Τμήμα Χημείας
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΜΑΓΙΑΤΗΣ ΠΡΟΚΟΠΙΟΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
Τμήμα Φαρμακευτικής
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η trans-ρεσβερατρόλη είναι μια φαινολική ένωση, που ανήκει στην οικογένεια των στιλβενίων, η οποία βρίσκεται σε διάφορα μέρη του σταφυλίου, συμπεριλαμβανομένου και του φλοιού της ράγας. Η ρεσβερατρόλη ανήκει σε μια ευρύτερη κατηγορία ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως φυτοαλεξίνες, αφού παράγονται σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες, όπως για παράδειγμα οι προσβολές από μικροοργανισμούς ή οι κακώσεις των ιστών από την υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ μεταφέρονται κατά τη διάρκεια της οиноποίησης στο γλεύκος και στον οίνο. Η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή εξουδετερώνει τις οξυγονούχες ρίζες και οξειδωτικές ενώσεις που παράγονται στους διάφορους ιστούς ή κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος και αποτρέπει την οξείδωση των μετάλλων στο σώμα. Από την άποψη αυτή η ρεσβερατρόλη διαθέτει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Επίσης σύμφωνα με νεότερες μελέτες, η ρεσβερατρόλη φαίνεται ότι προστατεύει και από την ανάπτυξη κακοηθών όγκων, εμποδίζει την εμφάνιση και την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος και έχει αντιφλεγμονώδη δράση.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια πρωτότυπη και γρήγορη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής trans-ρεσβερατρόλης (πιο συγκεκριμένα των ολικών παραγώγων trans-ρεσβερατρολοιδίων) σε οίνους με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR. Στη συνέχεια αναλύθηκαν 10 δείγματα κρασιών βιομηχανικής παραγωγής των ενδογενών (Π.Ο.Π.) ερυθρών ποικιλιών Αγιωργίτικο, Ξινόμαυρο, Φωκιανό, Λιάτικο, Κοτσιφάλι, Μαυροδάφνη, Λημνιό και Μοσχάτο Τυρνάβου και προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των ολικών ρεσβερατρολοιδίων σ' αυτά. Οι μετρήσεις αυτές έδειξαν ότι την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη είχαν το Κοτσιφάλι, το Ξινόμαυρο και το Αγιωργίτικο, δεδομένο το οποίο επαληθεύεται και από παλαιότερες επιστημονικές δημοσιεύσεις.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιομηχανική Χημεία και Αλκοολούχα Ποτά

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ρεσβερατρόλη, φαινολικές ενώσεις, κρασί, αντιοξειδωτική δράση, ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ρεσβερατρόλης σε οίνους, Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

ABSTRACT

Trans-resveratrol is a phenolic compound belonging to the family of stilbene, which is found in various parts of the grape. Resveratrol belongs to a broader class of compounds that have been identified as phytoalexins, since they are produced in living and abiotic stress conditions, such as microorganisms attacks or tissue damage from ultraviolet radiation, while being transported during the vinification to the must and the wine. Resveratrol has a strong antioxidant effect, ie neutralizes oxygenated roots and oxidative compounds produced in the various tissues or circulating in blood plasma and prevents oxidation of metals in the body. In this respect, resveratrol has cardioprotective properties. According to newer studies, resveratrol appears to protect against the development of malignant tumors, inhibit the appearance and development of skin cancer and have anti-inflammatory properties

In this study we developed a novel and rapid method of quantifying the total trans-resveratrol content (in particular of total trans-resveratrolloids) in wines using NMR spectroscopy. Subsequently, 10 samples of the local red P.O.P. varieties Agiorgitiko, Xinomavro, Fokianos, Liatiko, Kotsifali, Mavrodaphni, Limnio and Moschato were analyzed and the content of total resveratrolloids was determined. These measurements showed that the highest content of resveratrol had Kotsifali, Xinomavro and Agiorgitiko, a fact also verified in older scientific publications.

SUBJECT AREA: Industrial Chemistry and Alcoholic Beverages

KEYWORDS: Resveratrol, phenolic compounds, wine, antioxidant activity, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Development of a sensitive method for the analysis of resveratrol component of wines using NMR Spectroscopy

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Δομή του σταφυλίου.....	16
Σχήμα 2: Απεικόνιση των σταδίων στην ερυθρή οينوποίηση.....	21
Σχήμα 3: Δομή των τριών κυριότερων φλαβονολών: της καμπφερόλης, της κερκετίνης, και της μυρικετίνης.....	27
Σχήμα 4: Χημική δομή ανθοκυανών.....	29
Σχήμα 5: Χημική δομή των βενζοϊκών και κινναμωμικών οξέων.....	32
Σχήμα 6: Χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης.....	33
Σχήμα 7: Βιοσύνθεση της trans-ρεσβερατρόλης.....	36
Σχήμα 8: Προστατευτική δράση των πολυφαινολών στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας.....	36
Σχήμα 9: Σύνθεση της trans-ρεσβερατρόλης από τη p -coumaroyl-CoA.....	41
Σχήμα 10: Παράγωγα της ρεσβερατρόλης.....	42
Σχήμα 11: Μεταβολισμός της trans-ρεσβερατρόλης στον οργανισμό.....	43
Σχήμα 12: Αντιοξειδωτική δράση των ο-διυδροξυπαραγώγων και σταθεροποίηση της παραγόμενης ρίζας μέσω δομών που είναι λιγότερο δραστικές ή σταθερές κινόνες.....	45
Σχήμα 13: Σχηματισμός των ολιγομερών της ρεσβερατρόλης και των βινιφερινών στα σταφύλια.....	47
Σχήμα 14: Μαγνητικό δίπολο (αριστερά) & μεταπτωτική κίνηση με συχνότητα Larmor (δεξιά).....	54
Σχήμα 15: Ενεργειακά επίπεδα πυρήνων για $I=1/2$	55
Σχήμα 16: Κατάσταση ισορροπίας. Οι πληθυσμοί α και β είναι ισοκατανεμημένοι. Κινούνται γύρω από το B_0 χωρίς συμφωνία φάσεων και η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μηδενική.....	56
Σχήμα 17: Συμφωνία φάσεων με εφαρμογή πεδίου B_1 , η μαγνήτιση αποκτά μη μηδενική συνιστώσα στο επίπεδο xy	51
Σχήμα 18: Κίνηση του πυρήνα υπό την επίδραση του B_0 (αριστερά) και υπό την επίδραση των B_0 και B_1 (δεξιά).....	56
Σχήμα 19: Διαδικασία αποδιέγερσης. Μείωση της μαγνήτισης στους άξονες x και y και αύξηση στον z	56

Σχήμα 20: Σχηματική απεικόνιση του μαγνήτη με τα δοχεία dewars He και N ₂ , τα πηνία και τους ανιχνευτές.....	57
Σχήμα 21: Εισαγωγή του δείγματος στον ανιχνευτή με την βοήθεια του spinner.....	57
Σχήμα 22: Περιστρεφόμενο spin (αριστερά) και το αντίστοιχο επαγόμενο ρεύμα που φτάνει στο πηνίο (δεξιά).....	60
Σχήμα 23: Καταγραφή της FID.	60
Σχήμα 24: Παλμική ακολουθία (χρόνος αναμονής, εφαρμογή παλμού, συλλογή της FID)....	61
Σχήμα 25: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY με χαρακτηριστικά σήματα διαγωνίου (D) και κορυφές διασταύρωσης (D).....	64
Σχήμα 26: Χημική δομή της ρητίνης προσρόφησης XAD-4.....	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ποικιλία σταφυλιών Αγιωργίτικο.....	21
Εικόνα 2: Ποικιλία σταφυλιών Ξινόμαυρο.....	22
Εικόνα 3: Ποικιλία σταφυλιών Κοτσιφάλη.....	22
Εικόνα 4: Ποικιλία σταφυλιών Μαυροδάφνη.....	23
Εικόνα 5: Ποικιλία σταφυλιών Φωκιανό.....	23
Εικόνα 6: Ποικιλία σταφυλιών Λιάτικο.....	24
Εικόνα 7: Ποικιλία σταφυλιών Λημνιό.....	24
Εικόνα 8: Ποικιλία σταφυλιών Μοσχάτο.....	25
Εικόνα 9: Παράδειγμα κακού shimming.....	59
Εικόνα 10: Φάσμα με γραμμές τύπου απορρόφησης (αριστερά) και τύπου διασποράς (δεξιά).....	61
Εικόνα 11: Έκλουση του δείγματος από την υάλινη στήλη που είναι πληρωμένη με τη ρητίνη XAD-4.....	71
Εικόνα 12: Εξάτμιση του διαλύτη στο rotavap.....	71

Εικόνα 13: Αντλία κένου.....	71
Εικόνα 14: Μεταφορά του δείγματος στο σωληνάκι του NMR.....	71
Εικόνα 15 & 16: Προσυγκέντρωση των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της ρητίνης XAD-4.....	73
Εικόνα 17: Πρότυπη καμπύλη της trans-ρεσβερατρόλης.....	76
Εικόνα 18: Φάσμα ^1H NMR του PROT1 (MeOD, 400 MHz).....	77
Εικόνα 19: Φάσμα ^1H NMR του PROT1N (MeOD, 400 MHz).....	77
Εικόνα 20: Φάσμα ^1H NMR του PROT2 (MeOD, 400 MHz).....	78
Εικόνα 21: Φάσμα ^1H NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz).....	78
Εικόνα 22: Φάσμα ^1H NMR του PROT4 (MeOD, 400 MHz).....	79
Εικόνα 23: Φασματογράφος Spectrospin 400 MHz.....	81
Εικόνα 24: Πείραμα προσθήκης γνώστης συγκέντρωσης trans-ρεσβερατρόλης στο δείγμα NMS1.....	86
Εικόνα 25: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της trans-ρεσβερατρόλης.....	86
Εικόνα 26: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα KAKW2 (ποικιλία Φωκιανό).....	87
Εικόνα 27: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα KAKW2 (ποικιλία Φωκιανό).....	88
Εικόνα 28: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα AGIORf (ποικιλία Αγιωργίτικο).....	89
Εικόνα 29: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα AGIORf (ποικιλία Αγιωργίτικο).....	90
Εικόνα 30: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα DAFw1 (ποικιλία Λιάτικο).....	91
Εικόνα 31: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα DAFw1 (ποικιλία Λιάτικο).....	92
Εικόνα 32: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα XINs1f (ποικιλία Ξινόμαυρο).....	93
Εικόνα 33: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα XINs1f (ποικιλία Ξινόμαυρο).....	94
Εικόνα 34: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS1 (ποικιλία Κοτσιφάλη).....	95
Εικόνα 35: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα KALS1 (ποικιλία Κοτσιφάλη).....	96
Εικόνα 36: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS2 (ποικιλία Μαυροδάφνη).....	97
Εικόνα 37: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα KALS2 (ποικιλία Μαυροδάφνη).....	98
Εικόνα 38: Φασμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS3 (ποικιλία Λημνιό).....	99

Εικόνα 39: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα KALS3 (ποικιλία Λημνιό).....	100
Εικόνα 40: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS4 (ποικιλία Μοσχάτο).....	101
Εικόνα 41: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα KALS4 (ποικιλία Μοσχάτο).....	102
Εικόνα 42: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα NEMS1 (ποικιλία Αγιωργίτικο).....	103
Εικόνα 43: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY για το δείγμα NEMS1	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες της trans-ρεσβερατρόλης.....	40
Πίνακας 2: Φασματοσκοπική περιγραφή συριγγαλδεΐδης.....	75
Πίνακας 3: Χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης και χημικές μετατοπίσεις των ^1H	76
Πίνακας 4: Πίνακας με αναλυτικά στοιχεία για το κάθε δείγμα κρασιού που αναλύθηκε (κωδικός δείγματος, ετικέτα, ποικιλία, περιοχή, υψόμετρο, χαρακτηριστικά οινοποίησης, αλκοολικοί βαθμοί).....	82
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις της trans-ρεσβερατρόλης στα δείγματα ελληνικών κρασιών που αναλύθηκαν.....	101
Πίνακας 6: Προηγούμενες αναφορές συγκεντρώσεων (από τη επιστημονική βιβλιογραφία) της trans-ρεσβερατρόλης (mg/L) σε δείγματα ερυθρών οίνων.....	103

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Οίνος.....	4
1.2 Χημική σύσταση του σταφυλιού και του οίνου.....	5
1.3 Ο οίνος ως φάρμακο.....	8
1.4 Τεχνικές οινοποίησης – ερυθρή οινοποίηση.....	9
1.5 Περιγραφή των μελετώμενων καλλιεργούμενων ποικιλιών στον Ελλαδικό χώρο.....	11
2. Πολυφαινολικό περιεχόμενο του σταφυλιού και του οίνου.....	15
2.1 Κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων.....	15
2.2 Βιοσύνθεση των στυλβενίων	23
2.3 Βιολογική δράση των πολυφαινολών.....	25
2.4 Στυλβένια και ρεσβερατρόλη.....	29
2.5 Το “Γαλλικό παράδοξο”	31
2.6 Ευεργετικές ιδιότητες της ρεσβερατρόλης	33
2.7 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών.....	34
2.7.1 Αμπελουργικοί παράγοντες και ρεσβερατρόλη στα σταφύλια.....	35
2.7.2 Οινολογικοί παράγοντες και ρεσβερατρόλη στους οίνους.....	36

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	38
3.1 Εισαγωγή.....	38
3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)	39
3.2.1 Θεωρητική βάση του πειράματος.....	39
3.2.2 Οργανολογία.....	42
3.2.3 Φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης.....	45
3.2.4 Βασικές έννοιες του ποσοτικού NMR.....	48
3.2.5 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων.....	49
3.2.6 Εφαρμογές της ποσοτικής φασματοσκοπίας 2D NMR.....	51
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	52
4.1 Ερευνητικοί στόχοι της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας.....	52
4.2 Ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ολικής ρεσβερατρόλης με φασματοσκοπία NMR.....	53
4.3 Υλικά και αντιδραστήρια.....	54
4.4 Προαναλυτικές διεργασίες.....	58
4.4.1 Προκατεργασία του δείγματος.....	58
4.4.2 Ρητίνες προσρόφησης.....	60
4.4.3 Κατασκευής της πρότυπης καμπύλης.....	62
4.5 Φασματοσκοπία NMR.....	57
4.6 Επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων NMR.....	56
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
6. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	67
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

Το κρασί είναι ένα αλκοολούχο ποτό, προϊόν της ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού τους (μούστος). Σε διάφορες χώρες του κόσμου θα συναντήσουμε και ποτά παρεμφερή του κρασιού που παράγονται από άλλα φρούτα ή άνθη ή σπόρους, αλλά η ονομασία κρασί από μόνη της προσδιορίζει πάντα το κρασί από σταφύλια. Το κρασί είναι στενά συνδεδεμένο με τον άνθρωπο και στο πέρασμα των αιώνων, διακατέχει περίοπτη θέση σε πολλούς πολιτισμούς και θρησκείες.¹ Αποτελεί ένα ποτό που έχει συνδεθεί με την έννοια του μέτρου, την καλή σωματική και ψυχική κατάσταση, αλλά και με την έννοια της μακροζωίας.¹

Το κρασί είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για διάφορους λόγους. Είναι αφενός, ένα δημοφιλές ποτό που συνοδεύει και ενισχύει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων, από τις πιο απλές και παραδοσιακές ως τις πιο σύνθετες, και αφετέρου, το σταφύλι αποτελεί σημαντικό γεωργικό προϊόν που αντικατοπτρίζει την ποικιλία του εδάφους και το κλίμα ενός τόπου. Το κρασί χρησιμοποιείται επίσης σε θρησκευτικές τελετές σε πολλούς πολιτισμούς ενώ το εμπόριο κρασιού ήταν ιστορικής σπουδαιότητας για πολλές περιοχές.

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες συσχετίζουν την υιοθέτηση της μεσογειακής δίαιτας με μειωμένο επιπολασμό και επίπτωση διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης κ.α. Οι επιστήμονες αποδίδουν αυτά τα δεδομένα στην ύπαρξη τροφίμων όπως το ελαιόλαδο, τα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια και τα δημητριακά. Πολλές έρευνες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η συχνή πρόσληψη πολυφαινολών σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διάφορων χρόνιων νοσημάτων. Για το λόγο αυτό η μελέτη και η ανάλυση των τροφών που περιέχουν φαινολικά συστατικά, έχει προχωρήσει αρκετά τα τελευταία χρόνια. Τα φαινολικά συστατικά έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιαθηρωματική δράση τόσο σε *in vivo*, όσο και *in vitro* μελέτες.² Το ενδιαφέρον των διατροφολόγων και των επιστημόνων υγείας έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στα στοιχεία αυτά φέρνοντας στο φως όλο και περισσότερες μελέτες για την ευεργετική επίδραση των φαινολικών ενώσεων στην υγεία. Ο λόγος όμως που η μελέτη τους βρίσκεται σε πρωταρχικά στάδια, οφείλεται στη χημική δομή των πολυφαινολών η οποία παρουσιάζει αρκετή ποικιλία και πολυπλοκότητα.^{3,4,5,6,7,8,9}

Σύμφωνα με επιστημονικές έρευνες, έχει παρατηρηθεί ότι η μέτρια κατανάλωση του κρασιού σχετίστηκε με λιγότερο κίνδυνο για ορισμένες ασθένειες όπως είναι τα εγκεφαλικά επεισόδια, οι καρδιοπάθειες, ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του άνω πεπτικού συστήματος και με μικρότερη συχνότητα θανάτου.¹

Στο κρασί αποδίδονταν από την αρχαιότητα ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία ιδιότητες, τις οποίες η σύγχρονη επιστημονική έρευνα τεκμηριωμένα συνδέει με την

αντιοξειδωτική δράση ορισμένων συστατικών του. Ως τέτοιες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση έχουν χαρακτηριστεί οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή, το ασκορβικό οξύ, ορισμένες λιγνάνες, τα κινναμωμικά οξέα κλπ. Από τις πολλές ευεργετικές για την υγεία ιδιότητες του οίνου, η ελαττωμένη θνησιμότητα από στεφανιαίες καρδιοπάθειες που παρουσιάζουν όσοι καταναλώνουν μέτριες ποσότητες κρασιού είναι ένα επιδημιολογικό εύρημα που έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις και μελετηθεί κατά κόρον. Αντίθετα δεν έχουν παρατηρηθεί αντίστοιχα ευρήματα όταν το δείγμα του πληθυσμού αναφέρεται σε ανθρώπους που καταναλώνουν άλλα, εκτός από το κρασί, αλκοολούχα ποτά.¹

Η διαφοροποίηση αυτή μεταξύ κατανάλωσης κρασιού και άλλων οινοπνευματωδών ποτών, ήταν το έναυσμα στην πραγματοποίηση πολλών ερευνών για να διευκρινιστεί ποιες από τις ενώσεις που περιέχονται στο κρασί είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Ως αποτέλεσμα αυτών των ερευνών έχει βρεθεί ότι από τις 300 περίπου οργανικές ενώσεις που περιέχονται στα κρασιά, υπεύθυνες για την δραστηριότητα αυτή είναι κυρίως οι πολυφαινολικές ενώσεις που παρουσιάζουν τη σημαντικότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Γενικά οι πολυφαινόλες αυτές βρίσκονται κυρίως στο φλοιό των καρπών των σταφυλιών και προσδίδουν γεύση, άρωμα και χρώμα στο κρασί, ενώ η τελική συγκέντρωσή τους είναι συνάρτηση της ποικιλίας, του τρόπου και των συνθηκών καλλιέργειας, παρασκευής και ωρίμανσής του κρασιού.¹

Από τη κατηγορία αυτών των πολυφαινολικών ενώσεων, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η κερκετίνη, η ρουτίνη και η trans-ρεσβερατρόλη είναι οι πλέον δραστικές αφού αποδείχθη ότι αποτρέπουν την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας χοληστερόλης (LDL - Low Density Cholesterol) αποτελεσματικότερα και από την 2- τοκοφερόλη. Η οξείδωση αυτή της χοληστερόλης είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της αθηροσκλήρυνσης και των στεφανιαίων καρδιοπαθειών. Εκτεταμένες ιατρικές μελέτες έδειξαν ότι οι φαινόλες αυτές, σε καθαρή μορφή ή σε εκχυλίσματα κόκκινων κρασιών διευκολύνουν τη φλεβική κυκλοφορία παράγοντας οξειδία του αζώτου στο ενδοθύλιο.¹

1.2 Χημική σύσταση του σταφυλιού και του οίνου

Ο οίνος αποτελεί το προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης του μούστου. Η διαδικασία παρασκευής του αποτελεί μια φυσική διεργασία που λαμβάνει χώρα όταν ο χυμός των ώριμων σταφυλιών έρθει σε επαφή με τις ζύμες που υπάρχουν στον φλοιό τους. Ο κυρίαρχος ζυμομύκητας της αλκοολικής ζύμωσης, ο *Saccharomyces cerevisiae*, λαμβάνει τη μεταβολική του ενέργεια κυρίως από τα σάκχαρα του μούστου (γλυκόζη και φρουκτόζη).

Η χημική σύσταση του οίνου εξαρτάται κυρίως από:

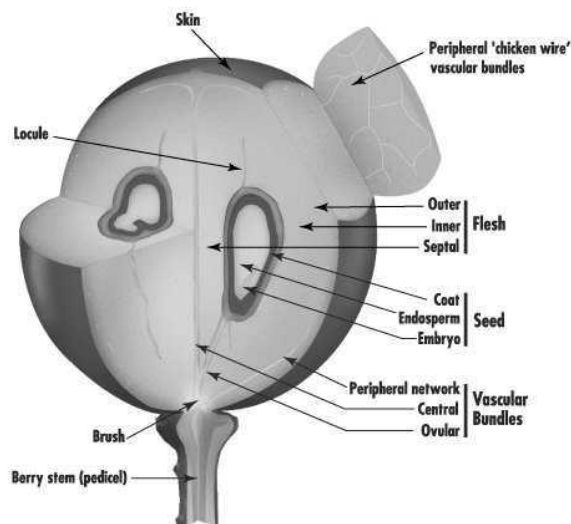
- α) Το είδος των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται για την οινοποίηση
- β) Την τεχνική της οινοποίησης

γ) Τη δράση των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

I. Χημική Σύσταση της Σάρκας:

Το γλεύκος είναι ουσιαστικά η ίδια η σάρκα της ρώγας δεδομένου ότι ο χυμός των κυττάρων αποτελεί το 99,5%, οι δε κυτταρικές μεμβράνες το 0,5%. Επομένως, η χημική σύσταση της σάρκας είναι ίδια με εκείνη του γλεύκους.

Το γλεύκος, που προκύπτει από τα ζωντανά κύτταρα του σταφυλιού, μετατρέπεται σε οίνο με την παρέμβαση των ζυμομυκήτων, αρχικά και των γαλακτικών βακτηρίων στη συνέχεια, σε ορισμένες περιπτώσεις.¹⁰ Πρόκειται για αραιό υδατικό διάλυμα που είναι πολύ σύνθετο και η σύστασή του ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία της αμπέλου, την περιοχή καλλιέργειάς της, το βαθμό ωριμότητας των σταφυλιών και την υγιεινή κατάστασή τους.



Σχήμα 1 Δομή του σταφυλιού

Συνήθως περιέχει: νερό 75-80%, ζυμώσιμα σάκχαρα 17-25%, οργανικά οξέα, αζωτούχες ενώσεις, ανόργανα άλατα, πηκτινικές ουσίες, καθώς και ελάχιστες ταννίνες, ανθοκυάνες και αρωματικές ουσίες, όμως πολύ λιγότερες από το φλοιό ή τα γίγαρτα, είναι φτωχή σε φαινολικά συστατικά και ως εκ τούτου και σε ανθοκυάνες. Τα κύρια συστατικά της σάρκας είναι τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα. Οι ουσίες αυτές, παρόλο που δεν προσδίδουν στον οίνο τις ιδιαιτερότητες που διαχωρίζουν τους οίνους από ευγενείς και κοινές ποικιλίες αμπέλου -όπως συμβαίνει με της ουσίες του φλοιού- του εξασφαλίζουν την υδροαλκοολική δομή του και τον πρωταρχικό χαρακτήρα ποιότητας.^{11, 12}

II. Χημική Σύσταση του Φλοιού:

Παρόλο που ο φλοιός αντιπροσωπεύει μικρό ποσοστό επί του βάρους της ρώγας, είναι το μέρος του σταφυλιού όπου απαντώνται οι ειδικές εκείνες οργανικές ουσίες που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ποικιλίες αμπέλου και διαμορφώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των διαφόρων κρασιών. Πρόκειται για τις κίτρινες και ερυθρές χρωστικές, τις αρωματικές ουσίες και τις ουσίες εκείνες που χαρακτηρίζονται ως πρόδρομοι των αρωματικών ουσιών του οίνου. Ο φλοιός περιέχει περισσότερες πολυφαινόλες από το βόστρυχο, είναι δε δύο φορές πιο πλούσιος στις περιπτώσεις ερυθρών ποικιλιών σε σύγκριση με τις λευκές.^{11, 12}

Συγκεκριμένα, στο φλοιό των ερυθρών σταφυλιών βρίσκονται όλες οι ανθοκυάνες¹³ (εκτός από κάποιες μη ελληνικές σπάνιες ευρωπαϊκές ποικιλίες, "βαφικές", όπως η Alicante-Bouschet όπου η σάρκα τους είναι έγχρωμη καθώς υπάρχουν ανθοκυάνες στα χυμοτόπια του ενδοκαρπίου) οι οποίες καταλαμβάνουν συνήθως 3-4 σειρές κυττάρων κάτω από την επιδερμίδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μαλβιδίνη είναι η αντιπροσωπευτική ανθοκυανιδίνη γενικώς των *V. Vinifera* ποικιλιών σταφυλιού.¹⁴ Συγκεκριμένα οι γλυκοζίτες της μαλβιδίνης Malvidin 3-O- α -D-glucoside και Malvidin 3-O-glucoside είναι αυτοί που εμφανίζονται συνηθέστερα στους φλοιούς των σταφυλιών.^{14,15,16} Οι άλλες χρωστικές (χλωροφύλλη, ξανθοφύλλη, καροτένια κ.λπ.) που υπάρχουν σε αξιόλογη ποσότητα όταν τα σταφύλια είναι πράσινα, δεν υπάρχουν παρά μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες όταν πια η ρώγα είναι ώριμη. Οι ταννίνες στους φλοιούς βρίσκονται σε μηδενική περιεκτικότητα.¹⁷ Όσο για τις αρωματικές ουσίες, ο φλοιός προμηθεύει τον οίνο περισσότερο από το ήμισυ των αρωματικών συστατικών που αποτελούν το πρωτογενές άρωμα της ρώγας.¹¹

Εκτός από τα εξειδικευμένα αυτά συστατικά, ο φλοιός:^{11,22}

- είναι πλούσιος σε κυτταρίνη, περίπου 20-25% κατά βάρους ξηρού φλοιού,
- περιέχει πολλές αδιάλυτες πηκτίνες, περίπου 10-15% κατά βάρος ξηρού προϊόντος,
- έχει μικρές ποσότητες σακχάρων και λίγα οξέα (λίγο τρυγικό, σχεδόν καθόλου μηλικό στην ωριμότητα, επικρατέστερο το κιτρικό), τα οποία βρίσκονται κυρίως εξουδετερωμένα, για αυτό το pH του χυμού των φλοιών είναι υψηλό,
- περιέχει πολλά ανόργανα συστατικά, κυρίως κάλιο.¹¹

III. Χημική Σύσταση των Γιγάρτων:

Η εκατοστιαία κατά βάρος χημική σύσταση των γιγάρτων φαίνεται παρακάτω:^{11,12}

- νερό 25-45
- σάκχαρα και πολυσακχαρίτες 34-36
- ελαιούχες ουσίες και λιπαρά οξέα 13-20

- φαινολικά παράγωγα 4-6
- αζωτούχες ενώσεις 4-6,5
- ανόργανα συστατικά 2-4

Όταν τα γίγαρτα ωριμάσουν (φυσιολογική ωριμότητα των σταφυλιών), αρχίζουν να χάνουν το άζωτο προς όφελος της σάρκας της ρώγας, μπορεί δε να χάσουν υπό μορφή αμμωνιακού αζώτου, μέχρι και το 1/5 του αζώτου που περιέχουν υπό μορφή αζωτούχων ενώσεων. Εξάλλου, από τα συστατικά των γιγάρτων, ορισμένα διαχέονται μερικώς στο ζυμούμενο γλεύκος κατά την οينوποίηση παρουσία στεμφύλων, όπως είναι τα φαινολικά παράγωγα, οι αζωτούχες ενώσεις και οι ανόργανες ουσίες, εμπλουτίζοντας το με χρήσιμα συστατικά.¹¹

Για αυτό ποικιλίες που οι ρώγες τους περιέχουν μεγάλο αριθμό γιγάρτων, όπως είναι το ξινόμαυρο, δίνουν γλεύκη πολύ πλούσια σε αζωτούχες ουσίες και αμμωνιακό άζωτο, οι δε οίνοι που παράγονται από αυτές έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε ταννοειδείς ουσίες όπως συμβαίνει με τους οίνους της Νάουσας που παράγονται από την ποικιλία ξινόμαυρο. Να αναφερθεί εδώ ότι τα γίγαρτα έχουν μηδενική περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες σε αντίθεση με την υψηλή περιεκτικότητά τους σε ταννίνες σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.^{11,13}

Αντίθετα, άλλες ουσίες και ιδιαίτερα ελαιώδεις ουσίες που απαντούν στα κύτταρα του λευκωματώδους ιστού, ευτυχώς δε διαχέονται. Για να περάσουν στο γλεύκος πρέπει να σπάσει ο κερατοειδής χιτώνας και αυτό συνέβαινε μόνο την εποχή που χρησιμοποιούνταν κακής ποιότητας γλευκοποιητικά μηχανήματα. Εάν από κακή έκθλιψη και πίεση των στεμφύλων σπάσει μέρος των γιγάρτων, τότε ελαιώδεις ουσίες, λιπαρά οξέα και κακής ποιότητας ταννίνες, περνούν στο γλεύκος και αλλοιώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες του παραγόμενου οίνου.^{11,18}

1.3 Ο οίνος ως φάρμακο

Η σύγχρονη επιστημονική έρευνα έχει καταφέρει να “ξεκλειδώσει” όλες εκείνες τις ευεργετικές ιδιότητες που αποδίδονται στο κρασί από την αρχαιότητα και να τις συσχετίσει με συγκεκριμένες χημικές ενώσεις. Στοιχεία που έχουν συγκεντρωθεί από πολλές επιστημονικές μελέτες, που έγιναν σε χιλιάδες ανθρώπους και των δύο φύλων, υποστηρίζουν την άποψη πως η μετριοπαθής κατανάλωση κρασιού έχει άμεση σχέση με την μείωση στην ολική θνησιμότητα, η οποία βασικά αποδίδεται στη μείωση του κινδύνου από καρδιαγγειακά νοσήματα.^{19,20,21,22,23,24}

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν γίνει συγκεκριμένα για τις πολυφαινόλες. Από 12 επιδημιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, όλες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η πρόσληψη φλαβονοειδών μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ σε 5 άλλες μελέτες ότι σχετίζεται με τη μείωση της

εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου. Σε προοπτικές μελέτες φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση της πρόσληψης των φλαβονοειδών και του καρκίνου πνεύμονα και του εντέρου. Επίσης τα φλαβονοειδή φαίνεται να σχετίζονται αρνητικά και με άλλα χρόνια νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης τύπου II, ο καταρράκτης και το άσθμα. Τα λιγνάνια φαίνεται να έχουν παρόμοια επίδραση αφού η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα ή στα ούρα φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με την εμφάνιση τόσο νοσημάτων του καρδιαγγειακού συστήματος, όσο και καρκίνου.^{2,3,25}

Άλλες επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η πρόσληψη κερκετίνης σε ποσότητα 16-24mg/μέρα αλλά και της ρεσβερατρόλης σχετίζεται με προστασία από την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων.³ Από την άλλη φαίνεται ότι υπάρχει μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη κερκετίνης και την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν προτείνει τα ευεργετικά αποτελέσματα των πολυφαινολών στην πρόληψη των ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση, δηλαδή αγγειακών παθήσεων, νευροεκφυλισμό, καρκίνου και συναφών φλεγμονωδών διεργασιών. Ένα από αυτά τα μόρια είναι η ρεσβερατρόλη που μέσα από κλινικές μελέτες, αλλά και μελέτες σε πειραματόζωα έχουν φανεί οι ευεργετικές της δράσεις.^{3,26}

Γενικότερα, η αλκοόλη στο κρασί φαίνεται πως μπορεί και δρα προστατευτικά σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.¹² Συγκεκριμένα:

- Έχει την τάση να μειώνει το επίπεδο της LDL-χοληστερίνης η οποία, σε όσο χαμηλότερα ποσοστά βρίσκεται στον οργανισμό, τόσο μικρότερος είναι ο κίνδυνος εμφάνισης αρτηριοσκλήρωσης, καρδιακών προσβολών αλλά και αγγειακών προσβολών.

- Μπορεί και αυξάνει τα επίπεδα της HDL-χοληστερίνης, η οποία είναι ικανή να ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων.

- Μειώνει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων.

- Μειώνει την τάση ογκογένεσης στο πλάσμα του αίματος.

- Μειώνει την τάση σχηματισμού θρόμβων στις καρδιακές αρτηρίες.

- Διαπιστώθηκε πως παίζει καταλυτικό ρόλο στη λειτουργία της πέψης.

- Είναι πηγή ενέργειας για το συκώτι.

- Διαπιστώθηκε πως η αλκοόλη μπορεί και προφυλάσσει τον άνθρωπο τόσο από το φυσικό διαβήτη όσο και από το διαβήτη που εξαρτάται από την ινσουλίνη.

- Μικρές ποσότητες αλκοόλης είναι σε θέση να αυξάνουν τους καρδιακούς παλμούς, να διευρύνουν τα αγγεία του σώματος, να έχουν επίδραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και ενισχύουν την αναπνοή.^{12,27}

1.4 Τεχνικές οινοποίησης – ερυθρή οινοποίηση

Μετά τη διαδικασία του τρύγου (συγκομιδής), ακολουθεί η γλευκοποίηση, η διαδικασία δηλαδή κατά την οποία εξάγεται το γλεύκος (ή συνήθως μούστος) από το σταφύλι. Για την έκθλιψη του μούστου χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συνηθέστερα με χρήση ειδικών μηχανημάτων που λειτουργούν συνθλίβοντας το σταφύλι ανάμεσα σε περιστρεφόμενους κυλίνδρους. Κατά τη γλευκοποίηση, επιβάλλεται η αφαίρεση των κοτσανιών (αποβοστρύχωση) του σταφυλιού, καθώς είναι επιζήμια τόσο για την γεύση του τελικού κρασιού, όσο και για την υγεία του καταναλωτή.^{11, 12}

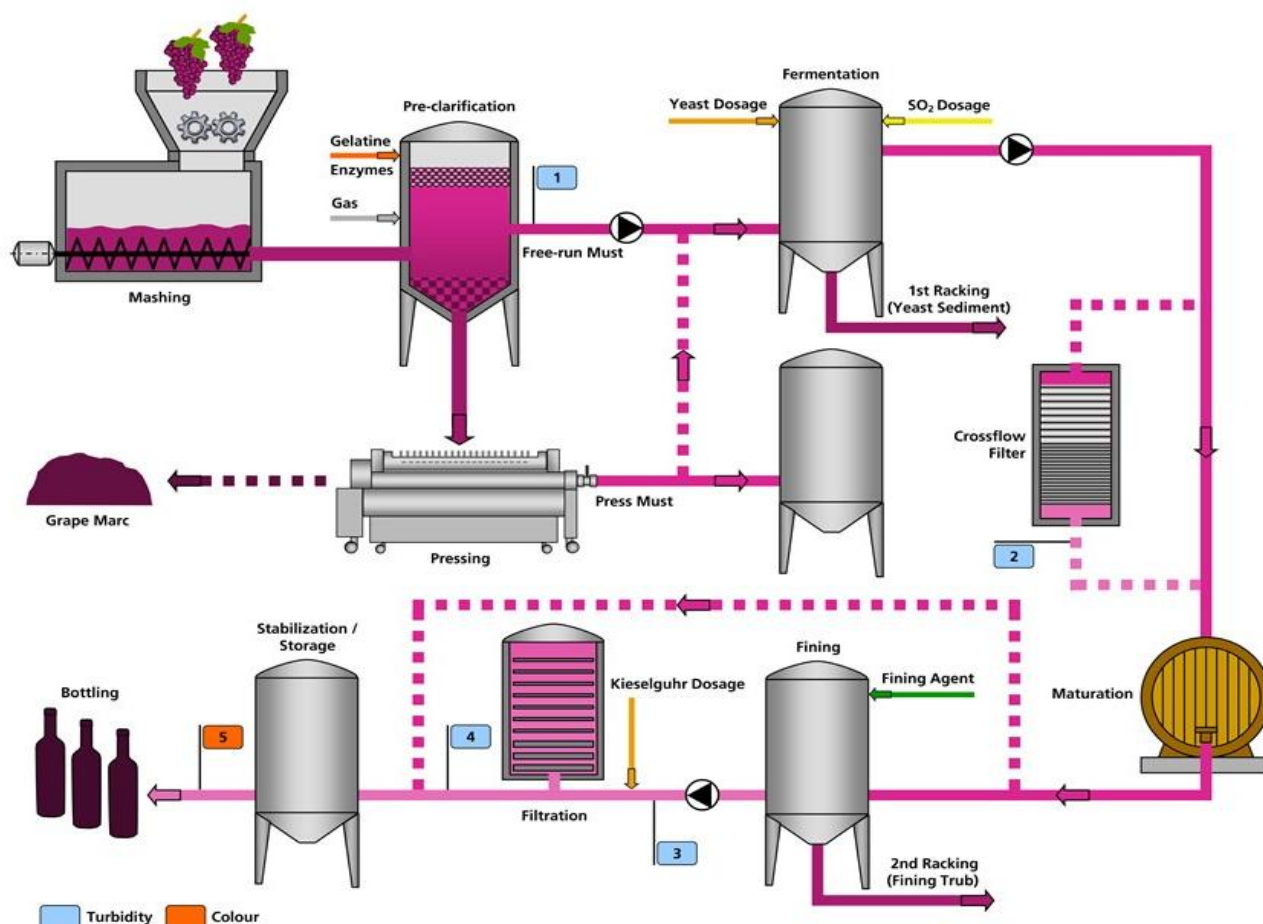
Στη συνέχεια ακολουθεί η τελική διαδικασία της ζύμωσης. Η αλκοόλη που περιέχει το κρασί παράγεται από τα σάκχαρα του μούστου με την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, που επιτελείται από ειδικά ένζυμα, τις *ζυμάσες* των ζυμομυκήτων. Οι ζυμομύκητες υπάρχουν αδρανοποιημένοι στο φλοιό των σταφυλιών και καθώς έρχονται σε επαφή με το μούστο, πολλαπλασιάζονται και επιτελούν τη ζύμωση. Εκτός από αιθυλική αλκοόλη παράγεται και διοξείδιο του άνθρακα αλλά και μια σειρά δευτερευόντων προϊόντων και ενώσεων με καθοριστική σημασία πολλές φορές για την ποιότητα του οίνου. Η διαδικασία της ζύμωσης διαρκεί συνήθως 8-25 ημέρες. Είναι σύνηθες, να παρατείνεται ή να διακόπτεται η ζύμωση με τεχνητά μέσα, κυρίως μέσω της διατήρησης της θερμοκρασίας σε χαμηλά ή υψηλά επίπεδα αντίστοιχα. Ο χρόνος της ζύμωσης είναι καθοριστικός για το κρασί που θα παραχθεί τελικά.^{11, 12}

Κλασική μέθοδος ερυθρής οινοποίησης ονομάζεται η τεχνική, κατά την οποία διεξάγονται ταυτόχρονα δύο φαινόμενα:

- η αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του γλεύκους παρουσία των στερεών μερών του σταφυλιού (φλοιοί, γίγαρτα και ενδεχομένως βόστρυχοι) και
- η εκχύλιση των συστατικών των στερεών μερών του σταφυλιού από το υδροαλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση.¹¹

Η κλασική μέθοδος ερυθρής οινοποίησης αποτελείται από έξι στάδια:

- Έκθλιψη των σταφυλιών με ή χωρίς αποβοστρύχωση.
- Μεταφορά της σταφυλόμαζας στα δοχεία οινοποίησης (δεξαμενές, βαρέλια) με ταυτόχρονη θείωση.
- Αλκοολική ζύμωση των σακχάρων του χυμού του σταφυλιού παρουσία των στερεών μερών της, οπότε πραγματοποιείται ταυτόχρονα και η εκχύλιση των συστατικών των μερών αυτών.
- Διαχωρισμός του ημιζυμωμένου ή αποζυμωμένου γλεύκους από τα στερεά μέρη (στέμφυλα) προς αναγωγή οίνου εκροής.
- Εκκένωση των δεξαμενών από τα στέμφυλα.
- Πίεση των στεμφύλων προς αναγωγή του οίνου πίεσης.
- Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και η προζυμωτική ψυχρή εκχύλιση.¹¹



Σχήμα 2: Απεικόνιση των σταδίων στην ερυθρή οινοποίηση

1.5 Περιγραφή των μελετώμενων καλλιεργούμενων ποικιλιών στον Ελλαδικό χώρο

Ι. Αγιωργίτικο

Η ποικιλία Αγιωργίτικο (γνωστή και ως Μαύρο Νεμέας, Μαυρούδι Νεμέας), είναι μία από τις πιο εκλεκτές και τις πιο πλούσιες σε χρώμα ελληνικές ερυθρές ποικιλίες σταφυλιών. Η προέλευσή της είναι από τη Νεμέα. Η ποικιλία αυτή έδινε τον Φλυάσιο οίνο των αρχαίων. Συγκαταλέγεται στους οίνους Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). Μαζί με το Ξινόμαυρο είναι οι 2 ευγενέστερες ελληνικές ερυθρές ποικιλίες. Η φυσική περιεκτικότητα



Εικόνα 1: Ποικιλία Αγιωργίτικο

του γλεύκους σε σάκχαρα πρέπει να ανέρχεται τουλάχιστον σε 188 g/L για τον ξηρό οίνο και σε 221 g/L για το γλυκό. Τρύγος από αρχές Σεπτεμβρίου έως μέσα Οκτώβρη, ανάλογα με το υψόμετρο. Πολυδυναμική ποικιλία που δίνει ροζέ, φρέσκα ή παλαιωμένα ερυθρά, ημίγλυκα, γλυκά και Nouveau κρασιά.¹⁰

Στη Νεμέα χωρίζεται σε τρεις υποπεριοχές ανάλογα με το υψόμετρο. Στη χαμηλή (έως 250μ) με χαρακτηριστικά: πρώιμη ωρίμανση, πολλά σάκχαρα, υψηλό αλκοόλ, χαμηλή οξύτητα, ημίγλυκα & γλυκά κρασιά. Στην ορεινή (700-800μ) με χαμηλό αλκοόλ, υψηλή οξύτητα, ροζέ κρασιά με πλούσιο ρουμπινί χρώμα αλλά όχι δυνατά αρώματα. Στη μεσαία (450-650μ) με πλούσιο βαθυκόκκινο χρώμα, μαλακές ταννίνες, επιδέχεται παλαίωση έως 10 χρόνια. Για την απόκτηση λεπτών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών επιβάλλεται η παλαίωση των οίνων Νεμέας σε δρύινα βαρέλια, τουλάχιστον για ένα χρόνο.

II. Ξινόμαυρο

Το όνομα του Ξινόμαυρο προέρχεται από το ξινό και το μαύρο, αν και στην πράξη, οι φλούδες των ρωγών του δεν είναι ιδιαίτερα πλούσιες σε χρωστικές. Το ξινόμαυρο όμως εκπλήσσει με τις επιδόσεις και τον πολυδύναμο χαρακτήρα του, προσφέροντας «vin de garde» ερυθρά, δυναμικά ροζέ, αρωματικά αφρώδη, ακόμα και ιδιοσυγκρασιακά γλυκά κρασιά.

Φυτεμένο σε κάθε γωνιά της κεντρικής και της Βόρειας Ελλάδας, το Ξινόμαυρο είναι αποκλειστικά υπεύθυνο ή συμμετέχει στα ερυθρά κρασιά ΠΟΠ Νάουσα, ΠΟΠ Αμύνταιο, ΠΟΠ Γουμένισσα και ΠΟΠ Ραψάνη, καθώς και στα ξηρά ήσυχα και αφρώδη κρασιά του Αμυνταίου (ΠΟΠ Αμύνταιο). «Δύστροπο» και απαιτητικό, το ξινόμαυρο χρειάζεται κατάλληλο terroir, αυξημένες καλλιεργητικές φροντίδες, χαμηλές στρεμματικές αποδόσεις και κατάλληλες καιρικές συνθήκες, για να ξεδιπλώσει το μεγαλείο του. Εύκολος τρύγος λόγω του ποώδους μίσχου αλλά με απώλειες καρπού στις ανεμόπληκτες περιοχές. Ο τρύγος γίνεται τέλη Σεπτεμβρίου.

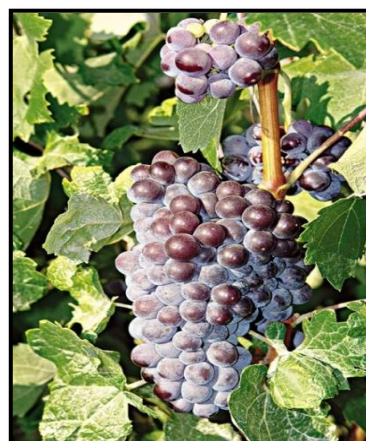


Εικόνα 2: Ποικιλία Ξινόμαυρο

Το Ξινόμαυρο είναι μια ποικιλία ζωηρή και παραγωγική. Η διαμόρφωση γινόταν παλαιότερα σε χαμηλόκορμα σχήματα. Τα τελευταία χρόνια άρχισε να διαμορφώνεται σε αμφίπλευρα γραμμοειδή. Πολυδυναμική ποικιλία. Στα χαμηλά έως μέσα υψόμετρα δίνει κόκκινα και στα μεγάλα υψόμετρα (Αμύνταιο) ροζέ (με νότες ροζ βιολέτας) και αφρώδη κρασιά. Επίσης, οиноποιείται blanc de noir. Ευχάριστο χρώμα, ρουμπινί μέχρι και πορφυρό όσο παλαιώνει. Για την παρασκευή των τυπικών αυτών οίνων δεν επιτρέπονται στρεμματικές αποδόσεις μεγαλύτερες από 1000 kg σταφύλια, ενώ η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα πρέπει να είναι πάνω από 179 g/L.¹⁰

III. Κοτσιφάλι

Ρώγες με χρώμα μαύρο σαν του κότσουφα, από όπου έχει πάρει και το όνομα του. Το Κοτσιφάλι θεωρείται εκλεκτή ποικιλία, η οποία όμως έχει ένα αδύνατο σημείο, την έλλειψη σταθερότητας χρώματος. Παρουσιάζει μέτρια αντοχή στην ξηρασία, ευαισθησία στον περονόσπορο και τον βοτρυτή. Συμμετέχει στους οίνους ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Πεζά (ερυθρό) και ΠΟΠ (ΟΠΑΠ) Αρχάνες. Τρύγος τέλος Αυγούστου, αρχές Σεπτεμβρίου. Υψηλό αλκοόλ (μέχρι και 14-15% vol αν ωριμάσει καλά), μικρή οξύτητα. Γεύση, άρωμα αλλά ανεπαρκές και όχι σταθερό χρώμα. Για αυτό προστίθεται Μανδηλαριά και δίνει βαθύχρωμους οίνους, με σώμα και τανίνες που τους κάνουν

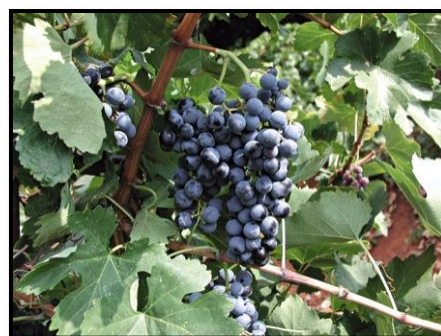


Εικόνα 3 Ποικιλία Κοτσιφάλι

επιδεκτικούς σε παλαίωση. Στα οίνους ΟΠΑΠ γίνεται ωρίμανση για ένα χρόνο σε βαρέλι. Η ποικιλία αυτή είναι ζωηρή και παραγωγική. Διαμορφώνεται σε κυπελλοειδή σχήματα αλλά κυρίως σε γραμμοειδή σχήματα μόρφωσης Royat (ιδιαίτερα μετά από τις αναμπελώσεις). Είναι μέτρια ευαίσθητη στον περονόσπορο και το ωίδιο και πολύ ευαίσθητη στον μολυσματικό εκφυλισμό.

IV. Μαυροδάφνη

Ο οίνος αυτός είναι ερυθρός και γλυκός και παρασκευάζεται από σταφύλια των ποικιλιών Μαυροδάφνη και Κορινθιακή, με του περιορισμούς ότι η ποικιλία Μαυροδάφνη πρέπει να συμμετέχει σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%, να προέρχεται από αμπελώνες που η στρεμματική τους απόδοση να μην ξεπερνά τα 1200 kg σταφυλιών και το παραγόμενο γλεύκος να περιέχει τουλάχιστον 212 g/L σακχάρων/L.¹⁰ Η Μαυροδάφνη είναι μια ποικιλία με μεγάλη παραλλακτικότητα και γενικώς παραγωγική, με ευαισθησία στην ξηρασία η Αχαϊκή, ενώ η Κεφαλονίτικη είναι πιο ανθεκτική. Είναι ευαίσθητη στον περονόσπορο, μετρίως ανθεκτική στο ωίδιο. Ανήκουν στην κατηγορία vins de liqueur και συγκαταλέγεται στους οίνους ΟΠΕ Μαυροδάφνη Κεφαλονιάς & Μαυροδάφνη Πατρών με ωρίμανση για δυο τουλάχιστον χρόνια σε δρύινο βαρέλι. Συνήθως, επιδέχεται παλαίωση μέχρι 8 χρόνια.¹⁰

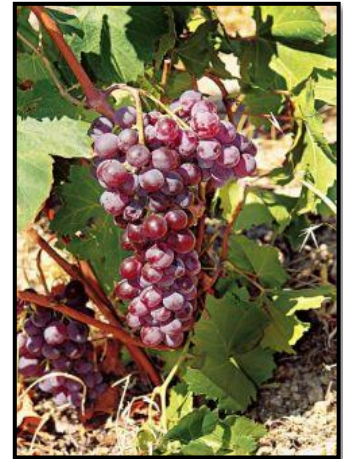


Εικόνα 4: Ποικιλία Μαυροδάφνη

Ο τρύγος γίνεται στις αρχές με μέσα Σεπτεμβρίου για την Αχαϊκή, τέλη Σεπτεμβρίου η Κεφαλονίτικη. Δίνει γλυκά κρασιά, συνήθως ωριμασμένα με ειδικό τρόπο σε βαρέλι, που έχουν αρώματα που θυμίζουν μαύρα αποξηραμένα φρούτα, σταφίδα, βανίλια, καραμέλα, σοκολάτα, καφέ κ.ά. Έχουν μεστή και πλούσια γεύση με μέτρια οξύτητα και καλή, μακρά επίγευση. Από την παλαίωση εμπλουτίζονται με πολυπλοκότητα. Δίνει επίσης ξηρά κρασιά (Κεφαλονιά) με βαθύ κόκκινο χρώμα που μπορεί να είναι αρκετά αξιολογήσιμα (ταννικά και στυφά με γεμάτο σώμα και ελαφρώς πικρό τελείωμα) αλλά και σπάνια.

V. Φωκιανό

Το Φωκιανό ως ποικιλία έχει συνδέσει την ύπαρξή της με το νησί της Ικαρίας και ειδικότερα με τον ξακουστό από την αρχαιότητα Πράμνιο Οίνο. Το Φωκιανό στο συγκεκριμένο νησί δίνει το μοναδικό για την εν λόγω ποικιλία Τοπικό Οίνο Ικαρίας. Με πλούσια ιστορία και αναφορές από την αρχαιότητα έχει συνδέσει την ύπαρξή του με τα νησιά του Αιγαίου και κυρίως με τη Σάμο, την Ικαρία, τα Δωδεκάνησα και τις Κυκλάδες. Καλλιεργείται επίσης στη Μεσσηνία και στην Αιτωλοακαρνανία.

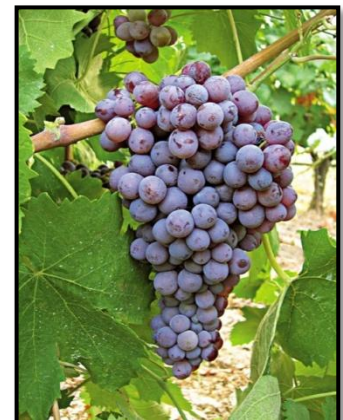


Εικόνα 5: Ποικιλία Φωκιανό

Από αρχαίους συγγραφείς αναφέρεται ότι ο Πράμνιος Οίνος ήταν δώρο του θεού Διονύσου στο νησί και μάλλον είναι και ο πρώτος οίνος στην ιστορία που αναφέρεται με ονομασία προέλευσης. Καλλιεργείται κυρίως σε παραδοσιακό κυπελλοειδές, αλλά και σε γραμμικό σχήμα. Είναι ευαίσθητη στον περονόσπορο και στον βοτρυτή, ενώ παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο ωίδιο. Ανθίζει στις αρχές Μαΐου και η ωρίμασή της εξαρτάται από την περιοχή της καλλιέργειάς της: στις νησιωτικές περιοχές από τις αρχές μέχρι τα μέσα Σεπτεμβρίου, ενώ στην υπόλοιπη Ελλάδα περί τα τέλη Ιουλίου. Καλλιεργείται σε έκταση περίπου 3.500 στρεμμάτων σε περιοχές της Ικαρίας, της Σάμου, των Δωδεκάνησων, των Κυκλάδων, της Μεσσηνίας, της Αιτωλοακαρνανίας και του Αγίου Ορους. Δίνει κρασιά φρουτώδη, με χαρακτηριστική οξύτητα και λαμπερό κόκκινο χρώμα, τα οποία επιδέχονται παλαίωση.

VI. Λιάτικο

Το Λιάτικο είναι κορυφαία ποικιλία-πρεσβευτής ενός πολύ ξεχωριστού και συχνά παρεξηγημένου στυλ, ενώ παράλληλα, έχει θεσπέσια γεύση. Είναι μια ερυθρή ποικιλία αμπέλου που μπορεί να δώσει ερυθρά ξηρά κρασιά εξαιρετικής φινέτσας, αλλά φτάνει στο απόγειό της στα γλυκά κρασιά. Ωστόσο, ενώ οι περισσότερες ερυθρές ποικιλίες αμπέλου συνδυάζονται με την προσθήκη αλκοόλης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, για τη δημιουργία ενισχυμένων γλυκών κρασιών, τα γλυκά κρασιά από λιάτικο φτιάχνονται από λιαστά σταφύλια (λιαστά κρασιά).

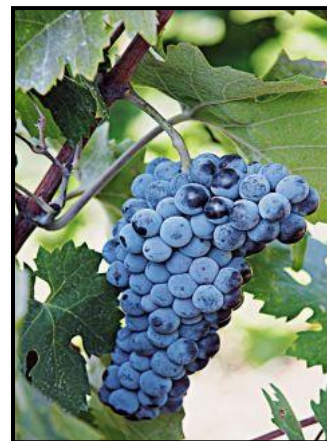


Εικόνα 6: Ποικιλία Λιατικό

Οι οίνοι αυτοί διακρίνονται σε τέσσερις τύπους: ερυθρός ξηρός, ερυθρός γλυκός, ερυθρός γλυκός φυσικός και ερυθρός φυσικώς γλυκός και οφείλουν να προέρχονται από γλεύκη με περιεκτικότητα σε σάκχαρα τουλάχιστον 188, 221, 238 και 238 g/L αντιστοίχως. Οι οίνοι που παράγονται από τα σταφύλια της ποικιλίας Λιάτικο καλλιεργούνται σε αμπελώνες 20 κοινοτήτων γύρω από την κοινότητα Δάφνες του νομού Ηρακλείου-Κρήτης.¹⁰

VII. Λημνιό

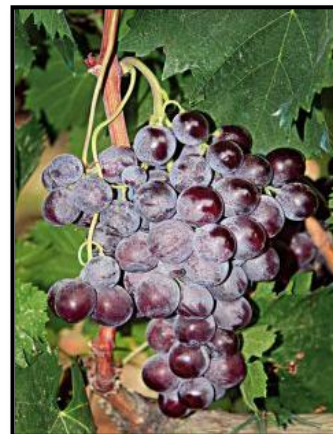
Το Λημνιό είναι μια ερυθρή γηγενής ποικιλία η οποία πιστεύεται ότι προέρχεται από τη Λημνία σταφυλή, όπως αναφέρεται από τον Ησίοδο και τον Αριστοτέλη. Θεωρείται αν όχι η αρχαιότερη, μία από τις αρχαιότερες ποικιλίες σταφυλιών στον κόσμο. Κατά μια εκδοχή, το κρασί με το οποίο μέθυσε ο πολυμήχανος Οδυσσέας τον Κύκλωπα Πολύφημο προερχόταν από την ποικιλία Λημνιό. Το Λημνιό ή Καλαμπάκι, είναι μέτρια ζωηρό και αρκετά παραγωγικό. Το Λημνιό δίνει κρασιά σχετικά υψηλόβαθμα, με ελαφρύ ιδιαίτερο άρωμα βοτάνων και κόκκινων φρούτων, μέτριας οξύτητας, μέτριων τανινών και μετρίου σώματος. Το Λημνιό συμμετέχει στην ποικιλιακή σύνθεση των ερυθρών ξηρών οίνων Ονομασίας Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας "Πλαγιές Μελίτων" μαζί με τις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Cabernet Franc, αλλά και σε μονοποικιλιακή εμφιάλωση.



Εικόνα 7: Ποικιλία Λημνιό

VIII. Μοσχάτο Αμβούργου

Το Μοσχάτο Αμβούργου είναι η ποικιλία που κυριαρχεί στην περιοχή του Τυρνάβου όπου καλλιεργείται σε 15.000 στρέμματα περίπου. Πρόκειται για ποικιλία που συναντάται σποραδικά διεθνώς, στην Ελλάδα όμως είναι ταυτισμένη με τον Τύρναβο, αφού το σύνολο σχεδόν της καλλιέργειας της βρίσκεται στην ευρύτερη περιοχή του. Η ποικιλία αρχικά δημιουργήθηκε από διασταύρωση της ιταλικής ποικιλίας Schiava Grossa (Trollinger ή Black Hamburg) και της αιγυπτιακής Μοσχάτο Αλεξανδρείας και καλλιεργήθηκε στα θερμοκήπια της Αγγλίας όπου ονομάζονταν Μαύρο Μοσχάτο Αλεξανδρείας, στη συνέχεια πέρασε σχεδόν σε όλο τον κόσμο.



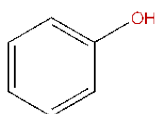
Εικόνα 8: Ποικιλία Μοσχάτο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πολυφαινολικό περιεχόμενο της σταφύλης και του οίνου

2.1 Κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων

Φαινολικές καλούνται οι ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους τη χαρακτηριστική ομάδα φαινόλης:



Ο όρος πολυφαινόλες (polyphenols, PP) χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ετερογενές σύνολο ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός ή περισσότερων

υδροξυλίων απ' ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή ετεροκυκλικούς δακτυλίους. Μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες συναρτήσει του αριθμού των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν και των δομικών στοιχείων που ενώνουν αυτούς τους δακτυλίους μεταξύ τους. Στην πλειοψηφία τους οι πολυφαινόλες εμφανίζονται σε σύζευξη με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα σάκχαρα αυτά μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Παραδείγματα τέτοιων σακχάρων είναι η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η ραμνόζη, η αραβινόζη κ.α.^{28,3,11}

Οι ενώσεις αυτές ως συστατικά του σταφυλιού και του οίνου περιέχουν ένα σύνολο ενώσεων, οι οποίες για μεγάλο χρονικό διάστημα, λόγω της μη ακριβούς γνώσης της δομής τους, ονομάζονταν γενικά και αόριστα “ταννινοειδής ύλη” ή “χρωστική ύλη” ή “οινοταννίνη”. Σήμερα όμως, κατέχουμε πολύ περισσότερη γνώση σχετικά με τη χημική δομή και σύσταση των φαινολικών ενώσεων και τις διακρίνουμε στις παρακάτω τέσσερις κύριες οικογένειες:

- Τα φαινολικά όξέα
- Τις φλαβόνες
- Τις ανθοκυάνες
- Τις ταννίνες

Σύμφωνα με άλλη κατάταξη, οι φαινολικές ουσίες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Στις πολυμοριακές φαινόλες, οι οποίες ονομάζονται **φλαβονοειδή**, στις μονομοριακές φαινόλες οι οποίες ονομάζονται **μη φλαβονοειδή** και τα **στιλβένια**: trans-ρεσβερατρόλη, cis-ρεσβερατρόλη και γλυκοζίτης της trans-ρεσβερατρόλης.^{27,29,30,31}

2.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μία μεγάλη ομάδα φυσικών μεταβολικών προϊόντων, πολύ διαδεδομένα στα ανώτερα φυτά. Επιτελούν ένα πλήθος βιολογικών λειτουργιών στα φυτά όπως προστασία από την UV ακτινοβολία, ενζυμική διαμόρφωση και προστασία από μολυντικούς παράγοντες ενώ ως μέρος της ανθρώπινης διατροφής συνεισφέρουν θετικά στην υγεία κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης και της δέσμευσης ελευθέρων ριζών.³²

Δομικά, αποτελούνται από έναν C₆-C₃-C₆ σκελετό αποτελούμενο από δύο φαινολικούς δακτυλίους (Α και Β) που ενώνονται με έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο δακτύλιο (δακτύλιος πυρανίου). Είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους. Έχουν συνεπώς μια κοινή δομή που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β), που συνδέονται μεταξύ τους με τρία άτομα άνθρακα που σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιος C).

Μπορούν να διαιρεθούν σε έξι υποκατηγορίες συναρτήσει του τύπου του ετεροκυκλικού δακτυλίου που εμπλέκεται: φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες (κατεχίνες και προανθοκυανιδίνες).^{33,34}

Σε κάθε επιμέρους κατηγορία φλαβονοειδών υπάρχει μεγάλη πολυμορφία ενώσεων που οφείλεται στις διάφορες τροποποιήσεις που μπορεί να υποστεί ο κεντρικός σκελετός και μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται:³⁵

- Η υδροξυλίωση
- Η μεθυλίωση ορισμένων φαινολικών υδροξυλίων
- Η γλυκοζυλίωση με διάφορα σάκχαρα
- Η ακυλίωση των αλκοολικών υδροξυλο-ομάδων
- Ο πολυμερισμός, ιδιαίτερα στην κατηγορία των φλαβανολών

Τα φλαβονοειδή του σταφυλίου εμφανίζουν υδροξύλια (-OH) στους C5 και C7 άνθρακες του Α-δακτύλιου και στη θέση 4' του Β-δακτύλιου. Μπορούν ακόμα να έχουν υδροξύλια (-OH) στις θέσεις 3' ή 3' και 5' και να υποκαταστήσουν το υδροξύλιο της θέσης 3 από κάποιον γλυκοζίτη ή μια αλκυλομάδα. Στο κρασί, τα πιο κοινά φλαβονοειδή αποτελούν οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες και οι ανθοκυάνες, ενώ σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυάνες).^{35,36,37}

Στις φλαβονοειδές φαινόλες ανήκουν οι φλαβονόνες, φλαβανόνες, κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες καθώς και οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες. Οι φλαβανόνες δεν είναι συστατικά των σταφυλίων, αλλά του ξύλου του βαρελιού και βρίσκονται μόνο στους οίνους που έχουν περάσει από παλαίωση σε δρύινα βαρέλια, ενώ οι φλαβονόλες είναι συστατικά των σταφυλίων και μάλιστα αποκλειστικά εντοπισμένες στο φλοιό και στα γίγαρτα. Έχουν κίτρινο χρώμα και βρίσκονται τόσο σε λευκά όσο και σε ερυθρά σταφύλια.⁴

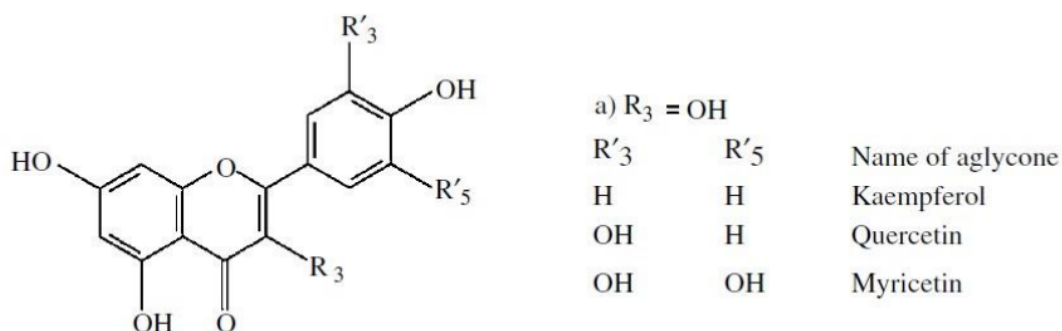
2.1.1.1 Φλαβονόλες

Οι φλαβόνες είναι μια υπο-κατηγορία των πολυ-υδροξυ-φλαβονοειδών που βασίζονται στη δομή της φλαβόνης (2-φαινυλο-χρωμόνης). Οι φλαβονόλες είναι φλαβόνες με έναν 3-υδροξυ-υποκαταστάτη.^{38,32}

Αποτελούν κίτρινες χρωστικές, οι οποίες στο σταφύλι εντοπίζονται στο φλοιό είτε ως 3-γλυκοζίτες της κερκετίνης, της καιμπφερόλης, της μυρισετίνης και της ισοραμνετίνης είτε ως τα αντίστοιχα α γλυκονικά παράγωγα, σε μικρότερες ποσότητες, που παράγονται ύστερα από υδρόλυση κατά την αλκοολική ζύμωση. Και οι 4 παραπάνω φλαβόνες έχουν εντοπιστεί στα ερυθρά κρασιά ενώ στα λευκά έχουν ανιχνευτεί μόνο η κερκετίνη και η καιμπφερόλη. Στο κρασί μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα ("copigments") με τις

ανθοκυάνες. Η βασική λειτουργία τους είναι να προστατεύουν τη σάρκα από την UV ακτινοβολία όπως έχει προαναφερθεί.^{39,40,35}

Από τα φλαβονοειδή του κρασιού, οι φλαβονόλες βρίσκονται στη μικρότερη συγκέντρωση, σε ποσοστό που ποικίλει από 1-10% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους είναι της τάξης των 100 mg/l στα ερυθρά και 1-3 mg/l στα λευκά απουσία εκχύλισης.^{41,35}



Σχήμα 3: Χημική δομή των τριών κυριότερων φλαβονολών: της καμπφερόλης, της κερκετίνης, και της μυρικετίνης

2.1.1.2 Φλαβαν-3-όλες (κατεχίνες) και προκυανιδίνες

Οι φλαβαν-3-όλες αποτελούν ενδιάμεσο παράγωγο κατά την αποσύνθεση φλαβανονών προς φλαβάνες.³⁸ Προκύπτουν με υδρογόνωση του κεντρικού ετερόκυκλου δακτυλίου της φλαβονόλης. Η πιο ευρέως διαδεδομένη φλαβαν-3-όλη είναι η κατεχίνη, από το όνομα τις οποίας έχει επικρατήσει να χαρακτηρίζονται και όλες οι φλαβαν-3-όλες ως κατεχίνες. Στο κρασί εμφανίζονται ως μονομερή, ολιγομερή και πολυμερή.⁴² Στο σταφύλι εντοπίζονται κυρίως στους φλοιούς και στα γίγαρτα, ενώ σε ίχνη έχουν εντοπιστεί και στη σάρκα. Τα βασικά μονομερή των φλαβαν-3-ολών αποτελούν η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη και ο (-)-3-γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης (epicatechin-3-gallate). Επιπλέον, έχει ανιχνευτεί γαλλο-κατεχίνη σε σταφύλια *V. Vinifera* καθώς και άλλα μονομερή σε σταφύλια που δεν προέρχονται από το γένος *Vinifera*.^{6,9,32}

Οι προανθοκυανιδίνες είναι μια ομάδα ολιγομερών φλαβαν-3-ολών που προέρχονται από τον πολυμερισμό των έντονα ευοξειδωτων κατεχινών. Η ονομασία τους οφείλεται στο ότι κατά τη θέρμανσή τους και υπό την παρουσία ανόργανων οξέων, αποσυντίθενται παράγοντας έγχρωμες ανθοκυανιδίνες. Επιπλέον, έχουν την ιδιότητα να προσδένονται στις πρωτεΐνες. Η πιο γνωστή ομάδα προανθοκυανιδινών είναι οι προκυανιδίνες, που αποτελούνται από μονομερή κατεχίνης και επικατεχίνης και με τη

σειρά τους διασπώνται παράγοντας κυανιδίνη κατά τη θέρμανσή τους υπό την παρουσία ανόργανων οξέων. Αντίστοιχα, οι προδελφινιδίνες υπό τις ίδιες συνθήκες παράγουν δελφινιδίνη.³²

Στο σταφύλι έχουν ανιχνευτεί μέχρι τετραμερείς προκυανιδίνες ενώ στο κρασί συνήθως εμφανίζονται διμερή. Οι προανθοκυανιδίνες που περιέχονται στο κρασί είναι, κατά κύριο λόγο, διμερή που ενώνονται συνήθως με έναν ομοιοπολικό δεσμό άνθρακα-άνθρακα στην θέση 8 του ενός μονομερούς με τον άνθρακα της θέσης 4 ενός γειτονικού μονομερούς (τύπου B1-B4). Εκτός αυτών, έχουν ταυτοποιηθεί και τριμερή καθώς και διμερή που προέρχονται τόσο από προκυανιδινικά όσο και από προδελφινιδινικά μονομερή.^{31,35,35}

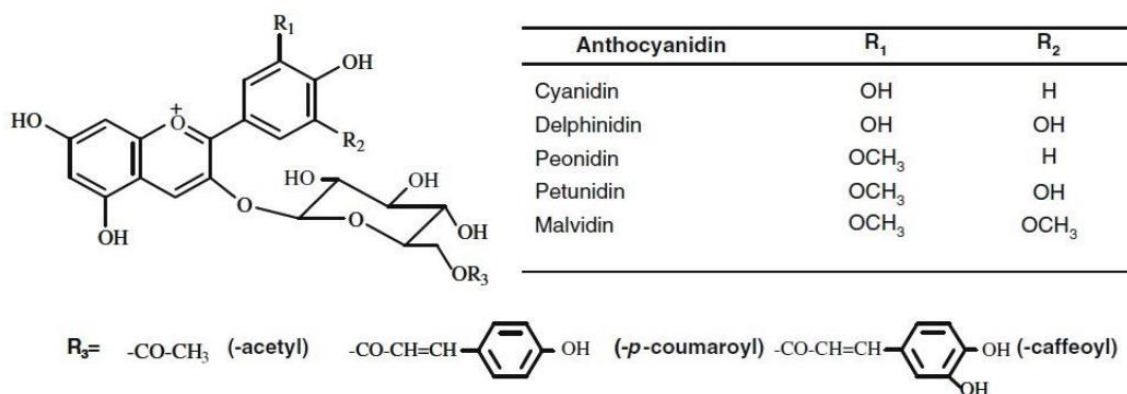
Κατά την αποθήκευση και παλαίωση των κρασιών οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν πολυμερή που αποτελούνται από 3-10 μονομερή φλαβονολών, μοριακού βάρους 2.000-3.000, που είναι γνωστά και ως συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες δεν θα πρέπει να συγχέονται με τις υδρολύσιμες ταννίνες που αναφέρθηκαν πρωτύτερα και ανήκουν στα μη φλαβονοειδή. Οι ταννίνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού.³¹

2.1.1.3 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές του σταφυλίου, οι οποίες - εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις - βρίσκονται μόνο στο φλοιό των ρωγών. Η σταθερότητα του χρώματος των οίνων είναι ανάλογη με το βαθμό πολυμερισμού ανάμεσα στις φαινολικές ενώσεις και στις ανθοκυάνες.²⁸

Οι ανθοκυάνες αποτελούν μία από τις πιο βασικές ομάδες φλαβονοειδών υπεύθυνες, στο μεγαλύτερο ποσοστό, για το ερυθρό χρώμα των κρασιών. Εντοπίζονται κυρίως στον φλοιό των σταφυλίων και σε περιορισμένες περιπτώσεις, κυρίως σε κάποιες ερυθρές ποικιλίες και στη σάρκα τους για αυτό και η μελέτη τους επικεντρώνεται στα ερυθρά κρασιά στα οποία εκχυλίζονται από τα στέμφυλα.³²

Στη φύση, οι ανθοκυάνες βρίσκονται υπό μορφή ετεροζιτών. Τα μόρια αυτά υδρολύονται εύκολα σε ένα άγλυκο τμήμα και ένα η περισσότερα μόρια σακχάρων. Το άγλυκο μέρος που προκύπτει είναι μια ανθοκυανιδίνη με σκελετό C6-C3-C6 ενώ τα σάκχαρα είναι αλδόζες, κυρίως γλυκόζη υπό την ετεροκυκλική μορφή του πυρανίου. Οι ανθοκυανιδίνες έχουν τη βασική δομή του φλαβυλίου. Το μόριο τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτύλιους (Α και Β) και ενδιάμεσα παρεμβάλεται ένας πυριλικός δακτύλιος. Ο δακτύλιος Α φέρει πάντα δύο φαινολικά υδροξύλια στις θέσεις -5' και -7' και ο δακτύλιος Β ένα φαινολικό υδροξύλιο στη θέση -4'.^{32,28}



Σχήμα 4: Χημική δομή ανθοκυανών

Στα φρέσκα κρασιά, οι ανθοκυάνες βρίσκονται σε μία δυναμική ισορροπία μεταξύ 5 μοριακών μορφών, μίας δεσμευμένης με το διοξείδιο του θείου και τεσσάρων ελεύθερων, της μορφής του φλαβυλίου (flavylium cation), μίας άχρωμης ψευδοβάσης υπό τη μορφή καρβινόλης ή αλλιώς σε ημικεταλική μορφή (carbinol pseudobase), μίας άνυδρης βάσης υπό τη μορφή κιννόνης (quinoidal base) και της χαλκόνης (D) (chalcone).³⁵

Από τις ανθοκυανιδίνες των σταφυλιών η κυανιδίνη είναι αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία μετά τον περκασμό των σταφυλιών, με τη συγκέντρωσή της να αυξάνεται για περίπου δύο βδομάδες κατά την ωρίμανση. Επειδή όμως σε συνδυασμό με την δελφινιδίνη αποτελούν τις πιο ασταθείς από τις προκυανιδίνες στη συνέχεια μετασχηματίζονται και τελικά επικρατεί σε συντριπτικό ποσοστό η μαλβιδίνη, η οποία αποτελεί τη βασική ανθοκυανιδίνη σχεδόν όλων των σταφυλιών και κρασιών. Σε ορισμένες ποικιλίες φτάνει να αντιπροσωπεύει το 90% των περιεχόμενων προκυανιδιών (*Grenache*).³⁵ Στις ελληνικές ερυθρές ποικιλίες συνήθως απαντάται ο μονογλυκοζύτης-3 της μαλβιδίνης, ακυλιωμένος είτε με οξικό είτε με π-κουμαρικό οξύ.⁴³ Στην ποικιλία Αγιωργίτικο συγκεκριμένα έχουν ταυτοποιηθεί και οι δύο ακυλιωμένες μορφές της μαλβιδίνης.^{44,32}

Η σύσταση και η συγκέντρωση σε προκυανιδίνες ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία, την ωρίμανση των σταφυλιών, τις κλιματικές συνθήκες, την εντοπιότητα, τη στρεμματική απόδοση και τις συνθήκες καλλιέργειας. Παράλληλα εξαρτώνται και από τις συνθήκες εκχύλισης και οινοποίησης. Κατά την επαφή των στεμφύλων με το γλεύκος, πραγματοποιείται η εκχύλιση των ανθοκυανών και των λοιπών φαινολικών. Η εκχύλιση αυτή μπορεί να λάβει χώρα προζυμωτικά ή κατά την αλκοολική ζύμωση είτε με θρυμματισμένα σταφύλια (κλασσική οινοποίηση) είτε με ολόκληρα σταφύλια (carbonic maceration). Αφού φτάσει σε ένα μέγιστο, η συγκέντρωση των ανθοκυανών αρχίζει να μειώνεται σαν αποτέλεσμα της ρόφησής τους στα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών, της ιζηματοποίησης τους σε μορφή κολλοειδών μαζί με τρυγικά άλατα καθώς και της διαδικασίας σταθεροποίησης και φιλτραρίσματος. Επιπλέον, αντιδράσεις υδρόλυσης καθώς και αντιδράσεις συμπύκνωσης με άλλα φαινολικά συστατικά κατά την οινοποίηση διαφοροποιούν την ανθοκυανική σύσταση.⁶

2.1.1.4 Ταννίνες

Οι ταννίνες αποτελούν μια κατηγορία φυσικών φαινολικών συστατικών υψηλού μοριακού βάρους, για τις οποίες δεν υπάρχει ένας αυστηρός ορισμός, που αποτελούνται τόσο από φλαβονοειδή όσο και από μη φλαβονοειδή μονομερή. Η κοινή ιδιότητα των ταννινών είναι η ικανότητά τους να ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες. Η ένωση αυτή πραγματοποιείται είτε με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είτε μέσω δεσμών υδρογόνου. Σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργούνται και ιοντικοί ή ομοιοπολικοί δεσμοί.^{12, 32}

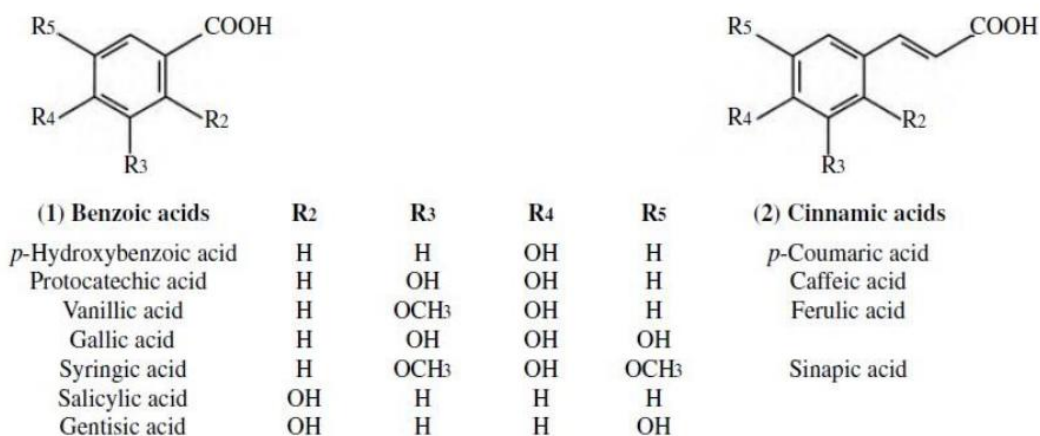
Η δομή και ο όγκος των ταννινών επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη δραστηριότητά τους με τις πρωτεΐνες. Πρέπει, από τη μία, να είναι αρκετά ογκώδεις ώστε να σχηματίζουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες ενώ, από την άλλη, ο όγκος τους δεν θα πρέπει να τις αποτρέπει από το να πλησιάζουν στα σημεία σύνδεσης με τις πρωτεΐνες. Τα μοριακά βάρη των ενεργών ταννινών εκτείνονται περίπου στο εύρος 600-3.500.^{45, 35}

2.1.1 Μη φλαβονοειδή (φαινολικά οξέα)

Στα μη φλαβονοειδή του κρασιού που δεν έχει παλαιωθεί περιλαμβάνονται κυρίως τα φαινολικά οξέα και τα παράγωγά τους - και πιο συγκεκριμένα τα υδροξυ-κινναμωμικά και υδροξυ-βενζοϊκά οξέα - καθώς και οι πτητικές φαινόλες και τα στυλβένια. Βρίσκονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας και εκχυλίζονται εύκολα κατά τη θραύση των σταφυλιών. Η δομή τους είναι πιο απλή σε σχέση με τα φλαβονοειδή καθώς αποτελούνται από μία C₃-C₆ κεντρική αλυσίδα. Βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 100-200 mg/L στα ερυθρά κρασιά και 10-20 mg/l στα λευκά. Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα σε καθαρό αλκοολικό διάλυμα αλλά μπορεί να αποκτήσουν κίτρινη απόχρωση αν οξειδωθούν. Από οργανοληπτικής πλευράς, δεν έχουν συγκεκριμένα γευστικά ή αρωματικά χαρακτηριστικά αλλά ορισμένα από τα παράγωγά τους κατά το μεταβολισμό των ζυμών αποτελούν πτητικά φαινολικά συστατικά που επηρεάζουν τον αρωματικό χαρακτήρα του κρασιού.^{32, 44}

Σε μεγαλύτερη αναλογία ποσοτικά υπάρχουν τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα και τα παράγωγά τους. Εμφανίζονται κυρίως ως εστέρες αντιδρώντας με το τρυγικό οξύ, αλλά μπορούν ακόμα να αντιδράσουν με σάκχαρα, διάφορες αλκοόλες και άλλα οργανικά οξέα. Από τις αντιδράσεις του τρυγικού οξέος με το καφταρικό, το κουταρικό και το φερταρικό οξύ προκύπτουν ως παράγωγα οι εστέρες του καφεϊκού, του p-κουμαρικού και του φερουλικού οξέος αντίστοιχα. Οι εστέρες αυτοί αποσυντίθενται στα μονομερή τους υπό την παρουσία της πηκτίνο-μεθυλο-εστεράσης ενώ ακόμα υδρολύονται αργά κατά την αλκοολική ζύμωση. Όταν τα κινναμωμικά οξέα ενώνονται με ανθοκυανικούς μονοσακχαρίτες σχηματίζουν ακυλιωμένες ανθοκυάνες μέσω εστεροποίησης του καφεϊκού και του p-κουμαρικού με τη γλυκόζη του γλυκοζίτη.^{39, 32}

Από τα βενζοϊκά οξέα, 7 έχουν ταυτοποιηθεί στο κρασί. Η μεταξύ τους διαφοροποίηση αφορά τους υποκαταστάτες του βενζολικού τους δακτυλίου. Στα σταφύλια εμφανίζονται κυρίως ως συνδυασμοί γλυκοζιτών, από τους οποίους απελευθερώνονται με υδρόλυση παρουσία οξέος, αλλά και σε εστερική μορφή, από την οποία απελευθερώνονται με αλκαλική υδρόλυση. Σε ελεύθερη μορφή εμφανίζονται κυρίως σε ερυθρά κρασιά λόγω της υδρόλυσης των γλυκοζιτών αλλά και σε αντιδράσεις θερμικής αποσύνθεσης πιο πολύπλοκων ενώσεων, ειδικά των ανθοκυανών.^{39,32,46}

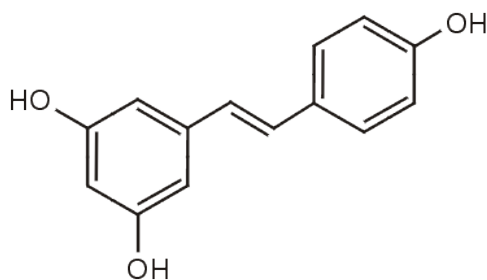


Σχήμα 5: Χημική δομή των βενζοϊκών και κινναμωμικών οξέων

Το πιο κοινό μη φλανοειδές των σταφυλιών, το καφταρικό οξύ (μια ο-διφαινόλη) δρα ως ένα από τα βασικά υποστρώματα για την οξείδωση των πολυφαινολών και για το λόγο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στο οξειδωτικό μαύρισμα του γλεύκους. Τα οξειδωμένα παράγωγα του καφταρικού και κουμαρικού οξέος συνεισφέρουν στην κιτρινωπή-χρυσή απόχρωση των λευκών κρασιών. Στα κόκκινα κρασιά, αντίθετα, η αφθονία των ανθοκυανών και των προκυανιδίων καλύπτει την παρουσία των οξειδωμένων μη φλαβονοειδών του σταφυλίου.³²

Τα κρασιά που έχουν παλαιωθεί σε δρύινα βαρέλια εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα υδροξυ-βενζοϊκού οξέος και των παραγώγων του, ειδικά του ελλαγικού οξέος, μια διλακτόνη που παράγεται από την ένωση δύο μορίων γαλλικού οξέος. Το ελλαγικό οξύ παράγεται από την υδρολυτική διάσπαση των ελλαγι-ταννινών που είναι πολυμερή του εξα-υδροδι-φενικού οξέος εστεροποιημένα με γλυκόζη. Οι γαλλο-ταννίνες είναι άλλη μια ομάδα υδρολύσιμων ταννινών που συντίθενται από μονομερή του γαλλικού οξέος αλλά αποτελούν μόνο το 5% των ολικών υδρολύσιμων ταννινών του ξύλου του βαρελιού. Ο μεταβολισμός των ζυμών μπορεί να αποδώσει κάποια μη φλαβονοειδή φαινολικά με επικρατέστερη την τυροσόλη και σε μικρότερες ποσότητες την τρυπτοφόλη.³²

Μία πολύ σημαντική κατηγορία πολυφαινολών που υπάρχουν στο κρασί είναι τα στυλβένια. Τα στυλβένια περιλαμβάνουν δύο βενζολικούς δακτυλίους και συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή μια αιθυλενική αλυσίδα. Χαρακτηριστική τέτοια ένωση είναι η ρεσβερατρόλη, η οποία προέρχεται από τους φλοιούς του σταφυλιού, εκχυλίζεται κυρίως κατά την αλκοολική ζύμωση και έχει μελετηθεί η θετική της επίδραση στην υγεία. Η trans-ρεσβερατρόλη (3,5,4 τριυδροξυ-trans-στυλβένιο) έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο καθώς πιστεύεται ότι είναι η κύρια υπεύθυνη ουσία στους ερυθρούς οίνους που ασκεί ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου.^{3,11}



Σχήμα 6: Χημική δομή της trans-ρεσβερατρόλης

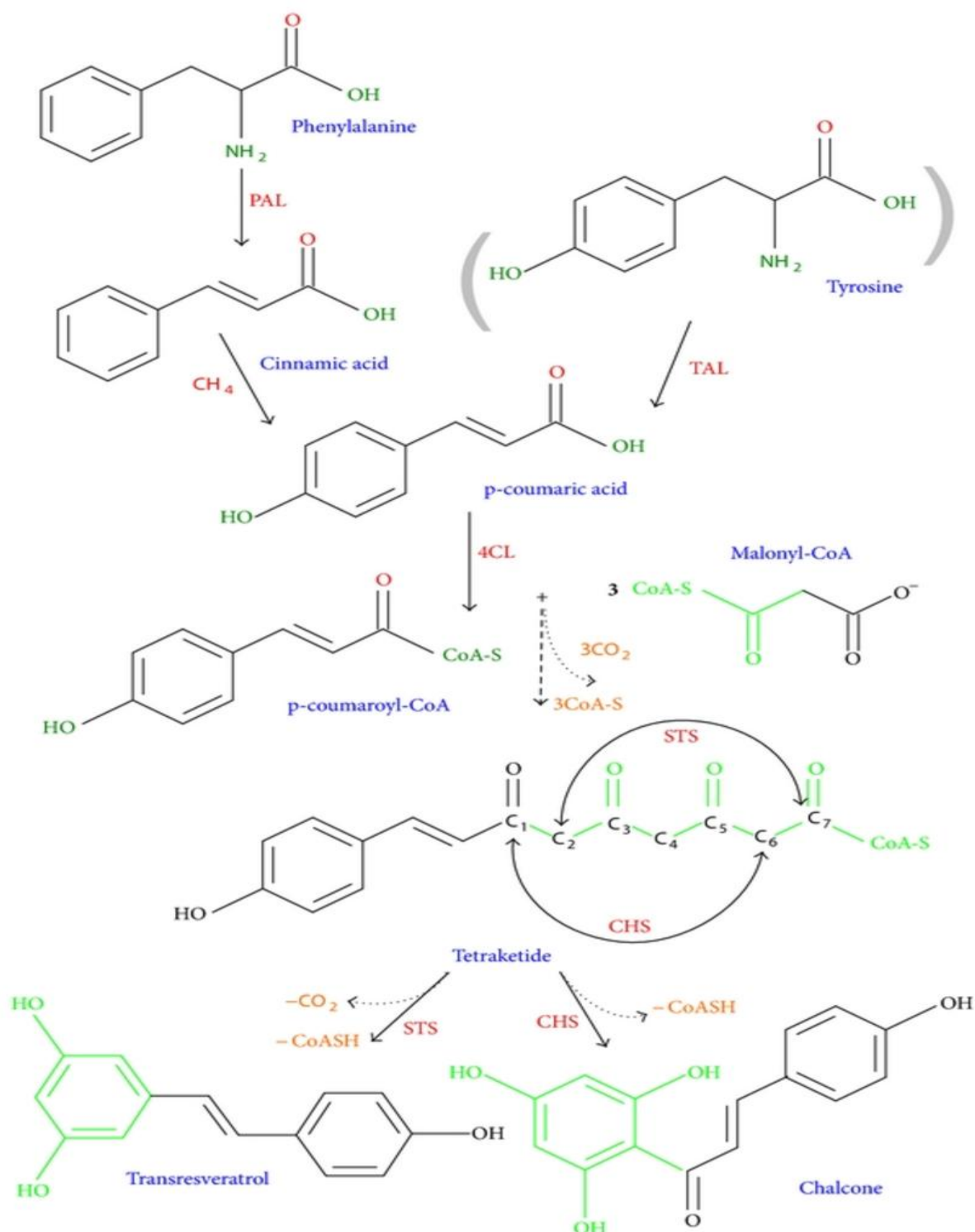
Η trans-ρεσβερατρόλη είναι μια φαινολική ένωση, που ανήκει στην οικογένεια των στυλβενίων, η οποία βρίσκεται σε διάφορα μέρη του σταφυλιού, συμπεριλαμβανομένου και του φλοιού της ράγας. Η περιεκτικότητα της trans-ρεσβερατρόλης είναι μάλλον χαμηλή την περίοδο του τρύγου λόγω του γεγονότος ότι η περιεκτικότητα της trans-ρεσβερατρόλης συσχετίζεται αντίστροφα με το βαθμό της ωριμότητας. Η ένωση αυτή βρίσκεται επίσης στους οίνους, ειδικά στους ερυθρούς.^{3,11}

Οι φαινολικές ενώσεις είναι εξίσου σπουδαίες με τα οξέα, τα σάκχαρα και τις αλκοόλες και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στην οινολογία. Τα συστατικά αυτά είναι υπεύθυνα για το χρώμα των οίνων, συμμετέχουν στη διαμόρφωση ορισμένων γευστικών χαρακτηριστικών (στυφή γεύση, τραχύτητα) αυτών, προσφέρουν στους οίνους αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή προστασία και παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην παλαίωση και στις διάφορες τεχνολογικές επεξεργασίες τους (π.χ. κολλάρισμα). Επίσης, σύμφωνα με ιατρικές έρευνες παρουσιάζουν σπουδαίο ενδιαφέρον για την προστασία της υγείας του καταναλωτή.³

Πολλοί ερευνητές θεωρούν τα φαινολικά παράγωγα ως έναν τρόπο καταπολέμησης των καρδιαγγειακών παθήσεων και της στεφανιαίας νόσου. Αφορμή γι' αυτό στάθηκε το λεγόμενο Γαλλικό παράδοξο (French Paradox), το οποίο θέλει τους Γάλλους, οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν στο καθημερινό τους διατροφολόγιο και την κατανάλωση ερυθρού οίνου, να παρουσιάζουν μειωμένες πιθανότητες εμφάνισης τέτοιου είδους παθήσεων. Επίσης, η αντιοξειδωτική ιδιότητα των φαινολικών ενώσεων, καθώς και ορισμένες ιδιότητες βιταμινών που παρουσιάζουν, ενισχύουν την ανωτέρω άποψη.

2.2 Βιοσύνθεση των σιλβενίων

Τα σιλβένια είναι φαινολικά παράγωγα μικρού μοριακού βάρους που προκύπτουν από τη φαινυλαλανίνη κατά τη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανίων. Το κυριότερο μέλος της οικογένειας των σιλβενίων που απαντώνται στα σταφύλια και τους οίνους είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, (3, 5, 4'-*trans*-υδροξυσιλβένιο). Η *trans*-ρεσβερατρόλη ανήκει σε μια κατηγορία ενώσεων που έχουν χαρακτηριστεί ως φυτοαλεξίνες, αφού παράγονται σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες, όπως για παράδειγμα οι προσβολές από



Σχήμα 7: Βιοσύνθεση της *trans*-ρεσβερατρόλης

μικροοργανισμούς ή οι κακώσεις των ιστών από την υπερίσθια ακτινοβολία. Η ρεσβερατρόλη παράγεται από πολύ περιορισμένο αριθμό φυτών –περίπου 31 γένη– στα οποία περιλαμβάνονται τα γένη: *Vitis*, *Arachis* and *Pinus*.^{47,48,49,50}

Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε μορφές *cis* και *trans*, αλλά και ως γλυκοζίτης (πικεΐδη, *ricoid*). Επίσης αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση μιας σειράς μορίων, όπως τα μεθυλιωμένα της παράγωγα (πτεροστιλβένια) ή τα ολιγομερή της παράγωγα (α και ε βινιφερίνη). Είναι δε χαρακτηριστικό ότι μερικά από τα μόρια αυτά εμφανίζουν υψηλότερη μυκυτοστατική δράση από την ίδια τη ρεσβερατρόλη.⁴⁶

Η γλυκοσιδίωση της ρεσβερατρόλης έχει αναφερθεί ότι λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην ενζυματική οξείδωση του μορίου, με αποτέλεσμα να επεκτείνεται ο χρόνος ημιζωής του μορίου στα κύτταρο.⁵¹ Η *trans*-ρεσβερατρόλη συντίθεται από π-κουμαροϋλοσυνένζυμο Α και τρία μόρια μαλονυλοσυνενζύμου Α. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση των στιλβενίων, ενώ όλη η διαδικασία της βιοσύνθεσης της *trans*-ρεσβερατρόλης παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.⁴⁶

2.3 Βιολογική δράση των πολυφαινολών

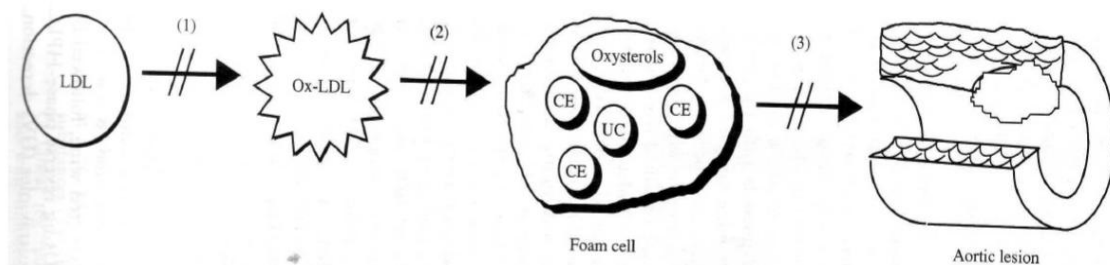
Οι βιολογικές και φαρμακολογικές ιδιότητες των πολυφαινολών έχουν διερευνηθεί σε βάθος, ειδικά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, με αποτέλεσμα να έχουν συγκεντρωθεί σημαντικά στοιχεία σχετικά με τις ευεργετικές ιδιότητες των μορίων αυτών για τον ανθρώπινο οργανισμό. Από βιολογικής πλευράς, τα μόρια αυτά παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό δράσεων όπως: αντιοξειδωτική, αντιθρομβωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντιϊκή δράση, κυτταροτοξική, ηπατοτοξική κ.ά. Αναλυτικά οι δράσεις των φαινολοξέων έχουν ως εξής:¹

I. Αντιαθηρωματική δράση

Η πρόσληψη πολυφαινολών και ειδικότερα της *trans*-ρεσβερατρόλης, μέσω της διατροφής έχει αναφερθεί ότι μειώνει τα ποσοστά εμφάνισης συμπτωμάτων των στεφανιαίων νόσων.⁵² Ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου οι φαινόλες συμβάλλουν στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων, είναι η παρεμπόδιση της οξείδωσης της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη)-χοληστερόλη.^{47, 1}

Οι επιστήμονες συνεπώς άρχισαν να αποδίδουν στα φαινολικά συστατικά τα τελευταία χρόνια κάποιες από τις ευεργετικές επιδράσεις του οίνου. Οι πολυφαινόλες που περιέχει το κόκκινο κρασί φαίνεται να μειώνουν τη θρομβωτική και αθηρογενετική διαδικασία. Οι πολυφαινόλες μπορούν να αποτρέψουν την οξείδωση των λιπιδίων της LDL, είτε μέσω της εκκαθάρισης των ελεύθερων ριζών ή της συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων, ή τέλος προστατεύοντας τα αντιοξειδωτικά συστήματα που συνδέονται με την LDL.

Επιπλέον, η παρουσία των πολυφαινολών μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες αφού είναι δυνατόν να παρεμποδίσει τη δράση των κυτταρικών οξυγενασών, ενεργοποιώντας τη δράση των κυτταρικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, όπως το σύστημα της γλουταθειόνης.^{53,54 47}



Σχήμα 8: Προστατευτική δράση των πολυφαινολών στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας (πηγή Αναστασιδη Μ.^[47]

II. Αντιοξειδωτική ικανότητα

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι η πλέον μελετημένη βιολογική τους δράση. Τα φαινολοξέα ως γνήσιοι εκπρόσωποι των φαινολικών παραγώγων εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, κάποια φαινολικά οξέα (2,3-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, 3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ) αλληλεπιδρούν με το δισθενή σίδηρο και εμποδίζουν την οξείδωση του DNA σε in vitro μελέτες.¹

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν λόγω δομής την ικανότητα να δρουν ως αντιοξειδωτικά μόρια. Ουσία με αντιοξειδωτική δράση θεωρείται κάθε ένωση η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. Με βάση τη μέθοδο ABTS την υψηλότερη τιμή έχουν το κόκκινο κρασί (13,28μmol/mL) και οι φράουλες (11,9μmol/g), ενώ ακολουθεί το σπανάκι (8,49μmol/g) και παρόμοιες τιμές έχουν η αγκινάρα, το κρεμμύδι και η τομάτα.^{6,55,56}

III. Αντικαρκινική δράση

Σε πλήθος επιδημιολογικών μελετών οι επιστήμονες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι πολυφαινόλες έχουν προστατευτική δράση στην πρόληψη διαφόρων μορφών καρκίνου.⁵⁷ Σε μια μεγάλη πληθυσμιακή έρευνα στη Φιλανδία, η οποία διήρκεσε 25 χρόνια και περιελάμβανε άτομα 25-90 ετών (τα οποία αρχικά δεν είχαν καρκίνο) βρέθηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη φαινολών μέσω της διατροφής ήταν αντιστρόφως ανάλογη με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, και άλλων κακοήθων όγκων, σε σύγκριση με τα

άτομα που το διαιτολόγιό τους ήταν φτωχό σε πολυφαινόλες.⁵⁸ Η κυτταροστατική δράση συμπεριλαμβάνεται στις ιδιότητες των φαινολοξέων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από άλλες επιδημιολογικές μελέτες που συγκλίνουν στα ίδια συμπεράσματα, όπως για παράδειγμα ότι οι εστέρες πολλών φαινολικών οξέων έχουν εμφανίσει κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές κυττάρων της γλώσσας, με αποτέλεσμα να θεωρείται πιθανή η χρησιμότητά τους σε θεραπευτικά σχήματα για την καταπολέμηση στοματικών καρκίνων.^{47, 59,60, 611}

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες της trans-ρεσβερατρώλης έχουν μελετηθεί σε βάθος. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με χορήγηση 1-25μM trans-ρεσβερατρώλης παρεμπόδισε την έναρξη και την εξάπλωση καρκίνων του δέρματος και του μαστού σε ποντίκια.⁶² Επίσης σε αρκετές in vitro και in vivo μελέτες καταδεικνύεται ότι η trans-ρεσβερατρώλη διαθέτει ιδιαίτερα αποτελεσματικές αντικαρκινικές ιδιότητες σε ποικίλα σημεία της διαδικασίας για την ανάπτυξη νεοπλασιών.⁶³ Η εξήγηση της ιδιαίτερης δραστηριότητας της trans-ρεσβερατρώλης σχετίζεται πιθανότατα με τη διαπιστωμένη ιδιότητά της να ενεργοποιεί σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<1 μM), μηχανισμούς που σχετίζονται είτε με την απόπτωση ή με το σύστημα των υποδοχέων των άρυλο-υδρογονανθράκων, ενός μηχανισμού που επάγει την πρόληψη της καρκινογένεσης.^{64,65}

Τέλος, η trans-ρεσβερατρώλη εμποδίζει τη μετάσταση των πρώιμων όγκων σε ποντίκια μέσω παρεμπόδισης της αγγειογένεσης, ενός μηχανισμού που επάγει την εξάπλωση των αιμοφόρων αγγείων στους καρκινικούς ιστούς, αποκόπτοντας έτσι τα μεταλλαγμένα κύτταρα από μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών.⁶⁶

IV. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η αντιφλεγμονώδης δράση συμπεριλαμβάνεται εξίσου στις ιδιότητες των φαινολοξέων.

V. Αντιμικροβιακή δράση

Πολλά φαινολοξέα εμφανίζουν αντιμικροβιακή (αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική) και αντιϊκή δράση. Εξάλλου, επιλεγμένα φαινολοξέα όπως, το χλωρογενικό, το καφεϊκό, το π-κουμαρικό και το φερουλικό έχουν επιδείξει δράση έναντι του μικροβίου *Listeria monocytogenes*, δρώντας άλλα ως βακτηριοστατικά και άλλα ως βακτηριοκτόνα.¹

VI. Αντιική δράση

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ερευνητική προσπάθεια για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των φλαβονοειδών, ιδιαίτερα κατά των ιών που καταστέλλουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως για παράδειγμα ο HIV, και ιδιαίτερα το στέλεχος

HIV-1 και τα ένζυμά του. Επίσης έχει δείχτεί ότι τα φλαβανοειδή επιδεικνύουν προστατευτική δράση και έναντι άλλων ιών.⁴⁷

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικότατο ρόλο στη διαμόρφωση του χρώματος, καθώς και της γευστικής ομαλότητάς των οίνων, επηρεάζουν δηλαδή τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, ενώ ταυτόχρονα επιδεικνύουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητές τους. Αντίθετα, στην περίπτωση των λευκών οίνων, τα φαινολικά παράγωγα συνεισφέρουν τόσο στη δημιουργία του αρωματικού δυναμικού τους, χωρίς ωστόσο να είναι οι κύριοι υπεύθυνοι, όσο και στη σταθερότητά τους στις διάφορες ασθένειες, όπως είναι τα διάφορα είδη οξείδωσης. Τα φαινολικά παράγωγα είναι συνεπώς κύριοι υπεύθυνοι για τις θετικές ή αρνητικές μεταβολές της οινικής ποιότητας κατά τη συντήρηση και παλαίωση. Ωστόσο, το φαινολικό περιεχόμενο διαφέρει μεταξύ των κρασιών και εξαρτάται από πολλές μεταβλητές, όπως:

- τύπος ζύμης που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση,
- τύπος σταφυλιού,
- μέθοδος οινοποίησης,
- παρουσία ή όχι στερεών σωμάτων ,
- καιρικές συνθήκες,
- τύπος εδάφους,
- χρήση λιπασμάτων.

Οι καιρικές συνθήκες είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς η ανεπάρκεια νερού μειώνει το ποσό των φλαβονολών και αυξάνει το ποσοστό απώλειας κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.¹

Σε φαινολικές ουσίες οφείλεται και η φυτική και χορταρώδης μυρωδιά των κρασιών που προέρχονται από όχι καλά ώριμο σταφύλι. Όλες αυτές οι φαινολικές ουσίες προέρχονται από τα στερεά μέρη του φλοιού της ρόγας, το τσαμπί και τα κουκούτσια, και είναι υπεύθυνες για τη διαφορά της γευστικής ποιότητας μεταξύ των κρασιών και ιδίως των ερυθρών. Οι πολυφαινόλες που προέρχονται από τα στερεά συστατικά (η περιεκτικότητά τους στη φλούδα των κόκκινων σταφυλιών είναι 50-100 μg/g), είναι υπεύθυνες για την πίκρα, τη στιφάδα, και το χρώμα του κρασιού και χρησιμεύουν ως το συντηρητικό του καθώς ενεργούν ως αντιοξειδωτικά. Κατά την παρασκευή του κόκκινου κρασιού η φλούδα, οι σπόροι και τα κοτσάνια έρχονται σε επαφή με το μούστο, ενώ αντίθετα για την παρασκευή των λευκών κρασιών ο μούστος απομακρύνεται από το φλοιό και τους σπόρους, οπότε και η συγκέντρωση των πολυφαινολών είναι μεγαλύτερη στο κόκκινο κρασί σε σχέση με το λευκό. Τα συστατικά αυτά είναι ουσιαστικά οι αποκλειστικοί υπεύθυνοι όλων των διαφορών που υφίστανται μεταξύ των λευκών και των ερυθρών οίνων.¹

Το φαινολικό προφίλ του κρασιού δεν είναι ίδιο με εκείνο των φρέσκων σταφυλιών, γιατί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παραγωγής του κρασιού, στο στάδιο της σύνθλιψης των σταφυλιών αλλά και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού και της παλαίωσης-ωρίμανσης, λαμβάνουν χώρα σημαντικές αλλαγές στη φαινολική σύσταση αυτού. Επιπλέον, επειδή οι αλκοόλες είναι καλοί διαλύτες για τις πολυφαινόλες, με την παρουσία της αιθανόλης η διαδικασία εμπλουτισμού διευκολύνεται.¹

Έρευνες έδειξαν ότι κόκκινα και λευκά σταφύλια με τον ίδιο συνολικό πολυφαινολικό δείκτη παρουσίασαν μεγάλες διαφορές ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα με καλύτερα τα κόκκινα. Το αντιοξειδωτικό δυναμικό των φλοιών του σταφυλιού φαίνεται λοιπόν να μεταφέρεται από τη φλούδα του σταφυλιού στο κρασί. Η ποικιλία του σταφυλιού και η περιοχή προέλευσης φαίνεται να επηρεάζουν τόσο τη σύσταση του κόκκινου κρασιού σε πολυφαινόλες όσο και την αντιοξειδωτική του δραστηριότητα.¹

Ένα κόκκινο κρασί πλούσιο σε αντιοξειδωτικά περιέχει κατά μέσο όρο 1.8 g/L πολυφαινολών (περίπου από 1500 έως 3000 mg/L). Αντίθετα, το λευκό κρασί περιέχει μόνο 200-300 mg/L πολυφαινολών. Κατά την οινοποίηση του που λαμβάνει χώρα με συμπίεση του χυμού σταφυλιών μετά από απομάκρυνση στερεών, και στη συνέχεια αλκοολική ζύμωση, απαιτείται συνήθως μικρότερος χρόνος για την εξαγωγή των πολυφαινολών εφόσον οι φλαβονοειδείς φαινόλες βρίσκονται κυρίως στο εσωτερικό του φλοιού και στα κουκούτσια που απομακρύνονται. Γι'αυτό το πολυφαινολικό περιεχόμενο του λευκού κρασιού είναι τελικά μικρότερο, περίπου 6-8 φορές μικρότερο από το κόκκινο, με τα φλαβονοειδή -σε κανονικές συνθήκες -να αποτελούν το 85% και πλέον του συνόλου των φαινολών, στο κόκκινο κρασί, ενώ στο λευκό να αποτελούν μόλις το 20% του συνόλου των φαινολών.¹

2.4 Στιλβένια και ρεσβερατρόλη

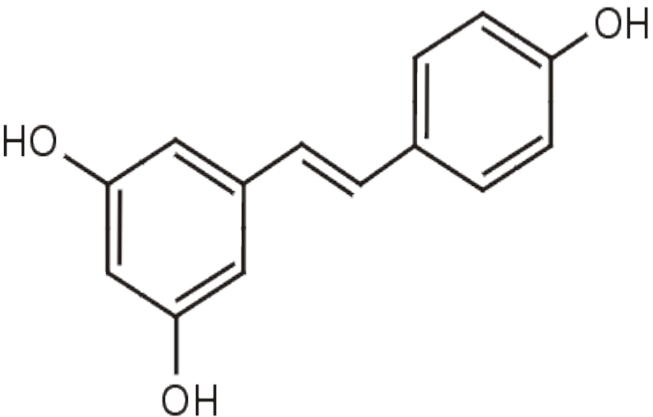
Η ένωση **ρεσβερατρόλη** (resveratrol, RVT) είναι μια φυσική ουσία της κατηγορίας των φυτοαλεξινών (phytoalexins) με βασική δομή των στιλβενίων [Στιλβένιο: 1,2-διφαινυλο-αιθυλένιο].⁶⁷ Πρόκειται για μια ουσία που οξειδώνεται εύκολα και είναι δύσκολο να παραμείνει καθαρή επί μακρό χρονικό διάστημα και για το λόγο αυτό οι κρύσταλλοί της αποκτούν ένα υποκίτρινο ή ακόμα πιο σκούρο χρώμα.

Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στη φλούδα (skin) των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων σταφυλιών, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα (mulberries, blueberries, cranberries, bilberries) και σε μικρότερες ποσότητες έχει βρεθεί σε 70 ακόμη φυτικά προϊόντα. Η περιεκτικότητα των φρέσκων στη φλούδα των κόκκινων σταφυλιών σε RVT είναι 50-100 µg/g, ενώ στο κόκκινο κρασί μπορεί να βρεθεί σε συγκεντρώσεις 1,5-3 mg/L. Η RVT, όπως και άλλες φυτο-αντιοξειδωτικές ουσίες, αποτελεί φυσικό συστατικό των φυτών με αντιβιοτική δράση για την προστασία από μύκητες και οξειδωτικές βλάβες (τα προστατεύει από οξειδώσεις και μυκητολογικές προσβολές, κυρίως από το *Botrytis cinerea*).. Το λευκό κρασί περιέχει RVT,

αλλά σε μικρότερες ποσότητες, γιατί η ζύμωση του κρασιού διεξάγεται μετά την απομάκρυνση των φλουδιών των σταφυλιών.⁶⁸

Η δομή της ρεσβερατρόλης είναι αρκετά απλή, έχει τρία υδροξύλια σε διαμετρικές θέσεις των δύο βενζολικών δακτυλίων. Οι δακτύλιοι βρίσκονται σε *trans*- δομή της αιθυλενικής ομάδας που τους ενώνει. Υπάρχει επίσης και η *cis*-ρεσβερατρόλη, αλλά δεν έχει βρεθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών. Η RVT, όπως και άλλες πολυφαινόλες (φλαβόνες, ισοφλαβόνες, κ.λπ.), προστατεύει τα φυτά από εξωτερικούς εχθρούς (έντομα, μύκητες), επιβλαβείς οξειδώσεις και χαμηλές θερμοκρασίες (γι αυτό και βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σταφύλια ψυχρών περιοχών).⁶⁹ Με την αντιοξειδωτική της δράση προστατεύει το φυτό από οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες, οξειδωτικές ενώσεις (π.χ. H_2O_2) που μέσω του μεταβολισμού προκαλούν οξειδωτικές βλάβες σε κρίσιμα βιομόρια, όπως συμβαίνει με όλους τους αερόβιους οργανισμούς που αναπτύσσονται σε περιβάλλον οξυγόνου, δηλαδή σε ατμόσφαιρα με υψηλή οξειδωτική δράση.⁷⁰

Πίνακας 1 Φυσικοχημικές ιδιότητες της *trans*-ρεσβερατρόλης

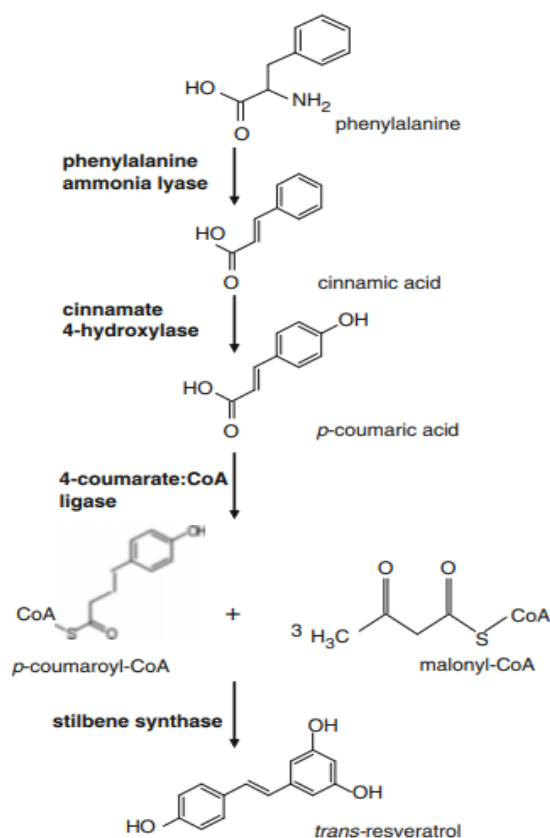
 Χημική δομή της <i>trans</i>-ρεσβερατρόλης (5-[(E)-2-(4-υδροξυφαινυλο)-αιθενυλο]βενζολο-1,3-διόλη)	Φυσικοχημικές ιδιότητες: Εμφάνιση: Άχρωμη έως υποκίτρινη κρυσταλλική ουσία (ανάλογα με την καθαρότητά της). Μοριακός τύπος: $C_{14}H_{12}O_3$ Σχετική μοριακή μάζα: 228,25 Σημείο τήξης: 108,5°C Σημείο βρασμού: 260°C Διαλυτότητα (περίπου), στους 25°C: Στο νερό: 0,03 mg/mL Σε ρυθμιστικό PBS, pH 7,0: 0,10 mg/mL (περίπου) Στην αιθανόλη: 50 mg/mL Στο DMSO: 16 mg/mL Αναφέρεται ότι σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης (10% v/v) έχει διαλυτότητα 40 mg/L. Τα διαλύματα παρακαταθήκης πρέπει παρασκευάζονται σε απαερωμένους οργανικούς διαλύτες για να αποφευχθεί η μερική οξείδωσή της.
---	---

Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί είναι εξελικτικά προικισμένοι με ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες που διατηρούν την οξειδοαναγωγική ισορροπία (ομοιόσταση) σε σχέση με τον ενδογενή μεταβολισμό και τις εξωγενείς επιδράσεις τοξικών ουσιών. Οι βιταμίνες (ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E, κ.λπ.) και μικρού μοριακού βάρους ενώσεις (όπως η RVT, οι πολυφαινόλες), ιδιαίτερα σε φυτά, συμμετέχουν ενεργά στην αντιοξειδωτική άμυνά τους και στην πρόληψη εξωγενών βλαβών λόγω συνθηκών (π.χ. χαμηλές θερμοκρασίες, έντομα, μύκητες, έκθεση σε τοξικές ουσίες, κ.λπ.). Με τον τρόπο αυτό προστατεύουν τα βασικά βιομόρια, όπως πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπίδια μεμβρανών των κυττάρων και το DNA των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες.⁷¹

Η *trans*-μορφή της ρεσβερατρόλης (*trans*-resveratrol) ή 5-[(*E*)-2-(4-υδροξυφαινυλο)-αιθενυλο]βενζολο-1,3-διόλη ή *trans*-3,5,4'-τριυδροξυστυλβένιο, ήταν το πρώτο στυλβένιο που βρέθηκε στο κρασί από τους Siemann και Creasy το 1992. Η παρουσία παραγώγων στυλβενίων στα κόκκινα κρασιά, όπως η ρεσβερατρόλη, είναι επίσης δεδομένο ότι είναι υπεύθυνη για αυτό που ονομάστηκε ως «Γαλλικό παράδοξο».¹

Επειδή η ρεσβερατρόλη δρα σαν ένα φυσικό αντιβιοτικό που παράγουν τα φυτά για την άμυνά τους φαίνεται ότι, ιδιαίτερα όταν τα φυτά προσβάλλονται από μύκητες, παράγουν αυξημένες ποσότητες ρεσβερατρόλης. Στα κρύα κλίματα τα σταφύλια προσβάλλονται περισσότερο από μύκητες και έτσι η περιεκτικότητά τους σε ρεσβερατρόλη είναι μεγαλύτερη σε περιοχές με ψυχρότερο κλίμα. Ακόμα, κρασιά που παράγονται σε ξηρό κλίμα έχουν μικρότερη ποσότητα από αυτά που παράγονται σε πιο υγρό.^{1,72}

Η περιεκτικότητα του σταφυλιού σε ρεσβερατρόλη έχει σχέση ακόμη με τη διάρκεια παρουσίας του φλοιού των σταφυλιών. Όσο περισσότερο χρόνο παραμένει ο φλοιός σε επαφή με το γλεύκος κατά την οινοποίηση, τόσο περισσότερη ρεσβερατρόλη θα περιέχουν τα κρασιά. Η περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη ενός κόκκινου κρασιού κατά μέσο όρο μπορεί να φτάσει τα 5 mg/L. Βέβαια, ποικίλλει αρκετά, κυμαινόμενη από μερικά mg/L στα Ελβετικά κρασιά μέχρι περισσότερα από 13 mg/L στο Αυστραλιανό Pinot Noir ή ακόμα και 18mg/L σε Βραζιλιάνικο κόκκινο κρασί. Ακόμη και στα κρασιά από την ίδια ποικιλία σταφυλής, το Cabernet - Sauvignon, η ρεσβερατρόλη μπορεί να κυμαίνεται από 0.09 mg/L στην κοιλάδα Napa μέχρι 7 mg/L στο Trentino. Εκτός από το είδος του κρασιού και την ποικιλία της σταφυλής, το κλίμα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, άλλοι παράγοντες που επιδρούν στην περιεκτικότητα ενός κρασιού σε ρεσβερατρόλη μπορεί να είναι ο τρύγος, οι μέθοδοι οινοποίησης ή/ και η προσθήκη άλλου κρασιού.¹



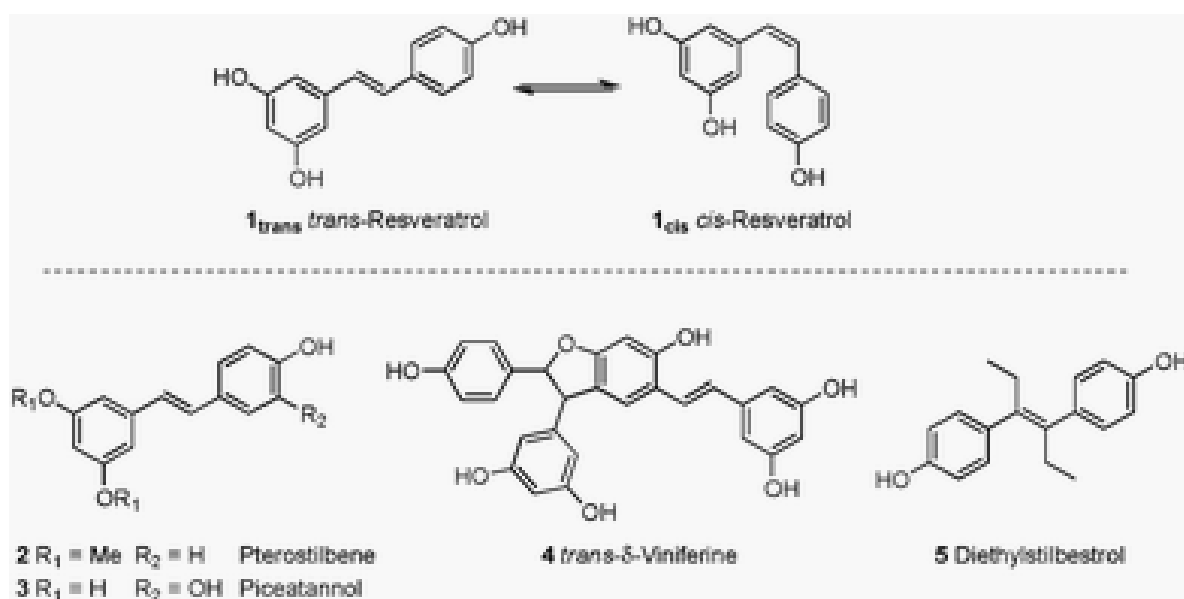
Σχήμα 9: Σύνθεση της *trans*-ρεσβερατρόλης από τη *p* -coumaroyl-CoA and malonyl-CoA από τη συνθάση του στυλβενίου⁷²

Μετά την ανακάλυψη της *cis*-ρεσβερατρόλης και των γλυκοζιτών της ρεσβερατρόλης (μόρια ρεσβερατρόλης συνδεδεμένα με μόρια γλυκόζης), τα επίπεδα στυλβενίων στο κρασί υπολογίζεται ότι μπορούν να φτάσουν γύρω στα 20 mg/L. Το 1999 έγινε γνωστή η

παρουσία της trans-astringine στο κρασί. Αυτό το μόριο είναι ίδιο με τους γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης αλλά περιέχει μια παραπάνω ομάδα OH σε έναν δακτύλιο. Παρατηρήθηκε ότι αυτή μπορεί να φτάσει τα 36 mg/L σε κάποια ερυθρά κρασιά με έναν μέσο όρο τα 10 mg/L ενώ τα επίπεδα στα λευκά κρασιά είναι τα μισά.¹

Η δράση των στυλβενίων οφείλεται κυρίως στην παρουσία του OH στη θέση 4 του βενζολικού δακτυλίου. Μελέτες έδειξαν ότι η trans-ρεσβερατρόλη είναι το πιο ενεργό μόριο λόγω της trans δομής και της απουσίας γλυκόζης συνδεδεμένης με αυτή. Η cis-ρεσβερατρόλη και οι γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης είναι σχεδόν ανενεργά. Η trans-astringine είναι πολύ πιο ενεργή από τους γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης λόγω της επιπλέον ομάδας OH. Όταν η astringine είναι απαλλαγμένη από το μόριο γλυκόζης, γνωστή ως astringinine ή piceatannol έχει παρόμοια δράση με τη trans-ρεσβερατρόλη.¹

Άλλες τροφές πλούσιες σε ρεσβερατρόλη -σε trans- ρεσβερατρόλη- είναι ο χυμός από βατόμουρα (0,2 mg/L), τα μούρα (0,59 mg/kg), ο χυμός κόκκινων σταφυλιών (0,5 mg/L), τα σταφύλια (0,1–3,54 mg/kg), τα φιστίκια (0,02-5,1 mg/kg) και το φυσιτικοβούτυρο (0,65 mg/kg). Η βιβλιογραφία (28, 89, 118, 234) αναφέρει ότι το κόκκινο κρασί έχει 0,1-14,3 mg/L ρεσβερατρόλης και αντίστοιχα το λευκό 0,1-2,1 mg/L.¹



Σχήμα 10: Παράγωγα της ρεσβερατρόλης

Οι γνωστές ποικιλίες των κρασιών που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη είναι το Ξινόμαυρο, το Pinot noir, το Αγιωργίτικο, το Κοτσιφάλι και η Μανδηλαριά, ενώ τα Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot περιέχουν τη μισή ποσότητα. Σε έρευνα που διεξήγαγαν επιστήμονες από όλο τον κόσμο στην οποία ερεύνησαν πόση ρεσβερατρόλη περιέχουν τα κόκκινα κρασιά που πωλούνται στα ράφια των σούπερ μάρκετ, βρέθηκε ότι η ποικιλία με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παγκοσμίως ήταν το Pinot noir.¹

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι άλλες μελέτες είχαν δείξει ότι τα κρασιά ποικιλίας Tannat περιέχουν, από τα υψηλότερα επίπεδα φαινολικών ενώσεων, που αναφέρθηκαν για τις ποικιλίες σταφυλιών *vinifera*. Η μέτρηση της περιεκτικότητας σε ρεσβερατρόλη στα κρασιά αυτά βρέθηκε κατά μέσο όρο 2,7 mg/L, σε υψηλότερη τιμή από ό,τι αναφέρεται για το Pinot Noir, το Merlot και το Cabernet. Το προφίλ ανθοκυανινών των σταφυλιών, των νέων και παλαιωμένων οίνων έχει συγκριθεί με άλλες ποικιλίες σταφυλιών. Πιο πρόσφατα, τα προφίλ διαφορετικών ομάδων πολυφαινόλων που υπάρχουν στα σταφύλια Tannat (σε φλοιούς και σπόρους) και στα κρασιά Tannat προσδιορίστηκαν καθ'όλη τη διαδικασία ωρίμανσης των σταφυλιών στους αμπελώνες της Ουρουγουάης.

Οι ερευνητές έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη του κρασιού Tannat έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση για το ανθρώπινο σώμα.¹

2.5 Το “Γαλλικό Παράδοξο”

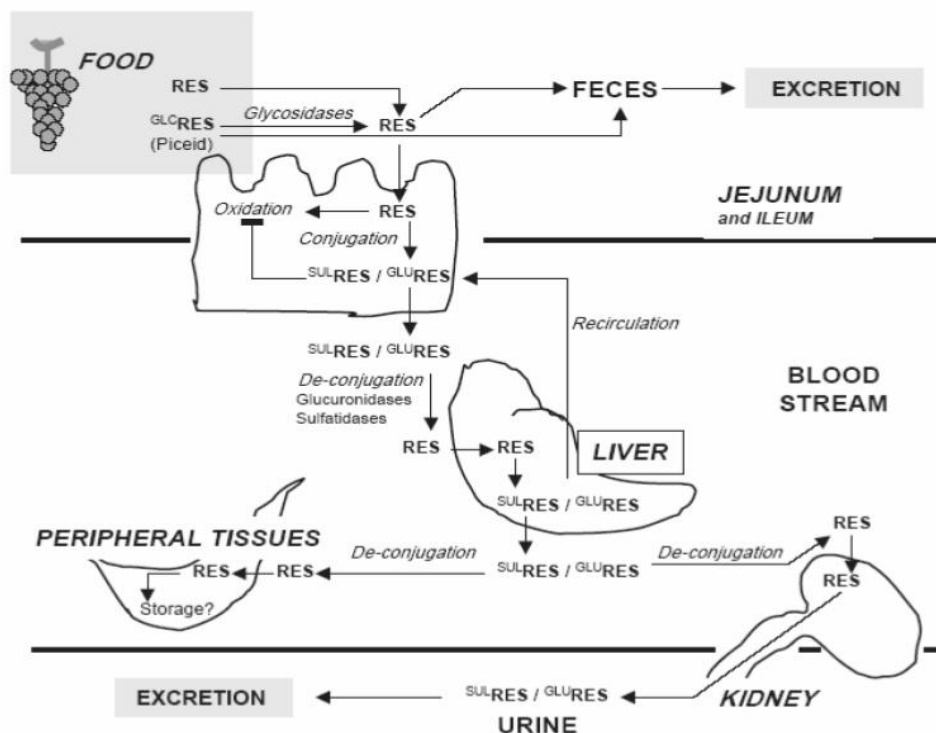
Αρχική ένδειξη της ευεργετικής δράσης της ρεσβερατρόλης ήταν η παρατήρηση ότι άνθρωποι που κατανάλωναν κόκκινο κρασί είχαν μειωμένη συχνότητα καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η μείωση του κινδύνου οφείλονταν βασικά στην αλκοόλη, η οποία σε μικρές ποσότητες δρα ως αιμοστατικός παράγοντας, εμποδίζει την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και αυξάνει την κυκλοφορία της υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (High Density Lipoproteins, HDL), ωστόσο οι πολυφαινόλες του λευκού και κόκκινου κρασιού παίζουν επίσης σημαντικό αντιοξειδωτικό ρόλο.^{73,74,75,76}

Το 1992 οι γιατροί Renaud και De Lorgeril καθιέρωσαν με μία εργασία τους στο Lancet τον όρο "Γαλλικό παράδοξο" ("French Paradox"). Το «Γαλλικό παράδοξο» μπορεί να οριστεί ως ο μικρότερος - από τον αναμενόμενο- δείκτης θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα σε μία χώρα όπου οι συνήθειες παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών είναι το ίδιο συχνοί με τις άλλες βιομηχανοποιημένες χώρες και όπου η διατροφή ήταν ανέκαθεν πλούσια σε κορεσμένα ζωικά λίπη.

Από στατιστικές έρευνες είχε διαπιστωθεί ότι οι Γάλλοι διέτρεχαν μικρότερο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (ισχαιμικά επεισόδια) σε σχέση με άλλους Βορειοευρωπαίους, αν και κατανάλωναν περισσότερο κρέας και λιπαρές ύλες κατά κεφαλήν.⁷⁷ Η διαπίστωση αναφερόταν για πολλά χρόνια σε εφημερίδες και περιοδικά.

Το παράδοξο αυτό έμοιαζε να αιτιολογείται από την υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού, το οποίο είναι πλούσιο σε αντιοξειδωτικά και μ' αυτό τον τρόπο αντισταθμιζόταν η βλαβερή επίδραση των κορεσμένων λιπών στον οργανισμό. Εκτός από τους κύριους παράγοντες κινδύνου τους σχετικούς με τον τρόπο ζωής (το κάπνισμα, την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και την άσκηση), η μέτρια κατανάλωση οινοπνεύματος (3 ή περισσότερες φορές εβδομαδιαίως) φάνηκε να παρέχει την προστασία ενάντια στο έμφραγμα του μυοκαρδίου ειδικά στις γυναίκες. Τα ευεργετικά αποτελέσματα καταγράφηκαν κυρίως στους πληθυσμούς που πίνουν το κρασί τακτικά, όπως εκείνοι που

ζουν στις μεσογειακές χώρες. Επιπλέον, φαίνεται να έχουν περισσότερες πιθανότητες για μια αίσια εξέλιξη μετά την εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου.¹



Σχήμα 11: Μεταβολισμός της trans-ρεσβερατρώλης στον οργανισμό

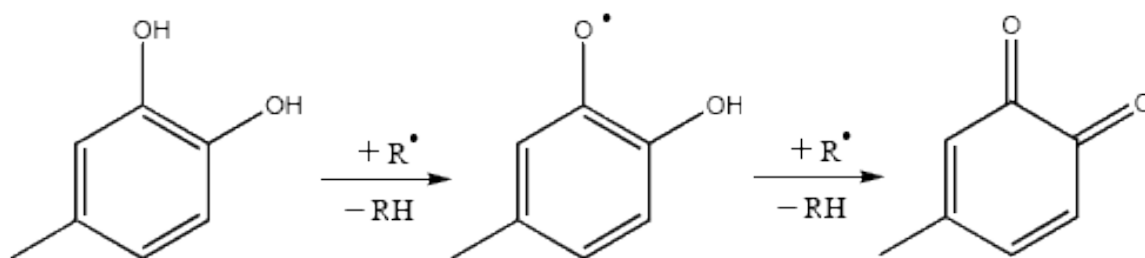
Ως αποτέλεσμα των δημοσιεύσεων σχετικά με το «Γαλλικό Παράδοξο», οι πωλήσεις κόκκινου κρασιού αυξήθηκαν δραματικά σε σχέση με το λευκό κρασί, ενώ συγχρόνως δημιουργήθηκε η μάλλον αφέλης εντύπωση ότι "όσο πιο πολύ κόκκινο κρασί τόσο το καλύτερο", που μπορεί να οδηγήσει στον αλκοολισμό με αρκετά οδυνηρές συνέπειες. Τελικά, λεπτομερέστερες έρευνες και κλινικές έρευνες έδειξαν ότι δεν είναι μόνο το κρασί αλλά και μία σειρά διατροφικών συνηθειών και άσκησης σε καθημερινή βάση που δημιουργεί τις προϋποθέσεις για μικρότερο κίνδυνο καρδιαγγειακών.^{78,79}

2.6 Ευεργετικές ιδιότητες της ρεσβερατρώλης

Σκευάσματα που περιείχαν ρεσβερατρώλη παρασκευάζονταν από τις ρίζες του *Polygonum cuspidatum* στην Κίνα και Ιαπωνία και αποτελούσαν παραδοσιακό φάρμακο της Ανατολικής (Κινέζικης) ιατρικής (Kojohkon) για ασθένειες των αρτηριών, της καρδιάς και του ήπατος. Επίσης, τα στέμφυλα (αφού παραληφθεί ο μούστος) των σταφυλιών και το κόκκινο κρασί χρησιμοποιούνταν και ως "φάρμακα" για καρδιαγγειακές ασθένειες εδώ και πολλούς αιώνες.⁸⁰

Η "κλασική" ή παραδοσιακή ιατρική έχει ανακαλύψει μεγάλο αριθμό φυτών και φυτικών εκχυλισμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Η σύγχρονη συνθετική Χημεία έχει ασχοληθεί επί μακρόν με τις θεραπευτικές ιδιότητες πολλών παλαιών και παραδοσιακών φαρμάκων, αλλά με σκοπό να ταυτοποιήσει το δραστικό συστατικό, να μελετήσει τη φαρμακολογική δράση του, τις πιθανές τοξικές του ιδιότητες και σε πολλές περιπτώσεις να το συνθέσει σε καθαρή μορφή για φαρμακευτικά σκευάσματα. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η ανθρωπίνη ινσουλίνη, η οποία όταν άρχισε να παράγεται με βιοτεχνολογικές μεθόδους, το κόστος της μειώθηκε δραστικά. Αυτό είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της συμβολής της επιστήμης στην υπηρεσία του ανθρώπου.⁷⁹

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών παραγώγων γενικά συνδέεται με την καταπολέμηση του οξειδωτικού stress, το οποίο είναι πιθανότατα το γενεσιουργό αίτιο πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή εξουδετερώνει οξυγονούχες ρίζες και οξειδωτικές ενώσεις που παράγονται στους διάφορους ιστούς ή κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος και αποτρέπει την οξείδωση των μετάλλων στο σώμα. Από την άποψη αυτή η ρεσβερατρόλη διαθέτει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες.¹



Σχήμα 12: Αντιοξειδωτική δράση των ο-διυδροξυπαραγώγων και σταθεροποίηση της παραγόμενης ρίζας μέσω δομών που είναι λιγότερο δραστικές ή σταθερές κινόνες.

Πολυάριθμες είναι οι μελέτες στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι η ρεσβερατρόλη είναι μια ισχυρά καρδιοπροστατευτική ένωση. Σε σχετικά χαμηλές δόσεις 2.5-5.0 mg/kg/ημέρα, η ρεσβερατρόλη καθιστούσε την καρδιά ανθεκτική σε ισχαιμικό επεισόδιο, όπως αποδείχθηκε από την κοιλιακή αποκατάσταση, μείωνε το μέγεθος της βλάβης στο μυοκάρδιο και μείωνε τον αριθμό των αποπτωτικών καρδιομυοκυττάρων (ως μηχανισμός αναφέρεται η ενεργοποίηση του γονιδίου p38, και η ενεργοποίηση του NF-κB). Σύμφωνα με τον Dr. Soleas, βιοχημικό που ειδικεύεται στην οινοποιία και δραστηριοποιείται στο Οντάριο του Καναδά, σε έρευνες στις οποίες ανιχνεύθηκε ρεσβερατρόλη στο κόκκινο κρασί (και όχι μόνο στον μίσχο των κληματαριών), βρέθηκε ότι η ουσία αποτρέπει την καταστροφή του DNA, διαστέλλει τις αρτηρίες και μειώνει τα ποσοστά των επικινδυνών για την υγεία ελεύθερων ριζών στον οργανισμό και της «κακής χοληστερίνης».¹

Η μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού, πλούσιου σε ρεσβερατρόλη και πολυφαινόλες, περιορίζει τη νοσηρότητα και θνησιμότητα από τον καρκίνο του πνεύμονα, τροποποιεί τους οιστρογονικούς υποδοχείς και αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, όπως τουλάχιστον έχει αποδειχτεί σε πειραματόζωα.¹

Πειράματα με χορήγηση ρεσβερατρόλης σε πειραματόζωα και με διάφορες κλινικές έρευνες έδειξαν ότι είναι ισχυρή αντικαρκινική ουσία, με σημαντικό ρόλο στην αναστολή διεργασιών στην πρώτη (οξειδωτικό stress, φλεγμονώδεις καταστάσεις) και δεύτερη φάση (προαγωγή της καρκινογένεσης με συσσώρευση μεταλλάξεων στο DNA), ακόμη και με παρέμβαση στην έκφραση γονιδίων.^{81,82,83,84}

Σύμφωνα με τις μελέτες η ρεσβερατρόλη φάνηκε ότι προστατεύει και από την ανάπτυξη κακοηθών όγκων, εμποδίζει την εμφάνιση και την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος καθώς και την εξέλιξη καρκίνου του μαστού σε ποντίκια. Επιπλέον της έχει αποδοθεί πιθανή αντιμιτογόνο δράση. Η αντικαρκινική της δράση έχει δείχθει και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, μεταξύ των οποίων κυττάρων μαστού, προστάτη, κόλου και στόματος. Οι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η ρεσβερατρόλη στρέφεται εναντίων των καρκινικών κυττάρων είναι η συμμετοχή της στην κυτταρική απόπτωση, η παρεμπόδιση της μετάστασης πρώιμων όγκων σε ποντίκια και η ικανότητά της να καταστέλλει την αύξηση του αριθμού των αιμοφόρων αγγείων μέσα στο καρκινικό ιστό. Με αυτό τον τρόπο στερεί τα κακοήγη κύτταρα από οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά.¹

Η χημειοπροστατευτική δράση της ρεσβερατρόλης είναι επίσης μία ακόμη πλευρά της πολύπλευρης δράσης της.^{85,86} Η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγει την απόπτωση, είναι αντιφλεγμονώδης και μεταβάλλει την έκφραση γονιδίων σε κυτταρικές σειρές. Ακόμη παρεμποδίζει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε κυτταρικές καλλιέργειες, αναστέλλοντας τη δράση των υποδοχέων ανδρογόνων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη και καταστέλλοντας την έκφρασή τους σε μεταγραφικό επίπεδο, επηρεάζει τις διεργασίες των 3 σταδίων καρκινογένεσης (έναρξη, προαγωγή, εξέλιξη του όγκου), καταστέλλει τη νεοαγγειογένεση-μεταστάσεις των όγκων, αλληλεπιδρά με πολλαπλούς μοριακούς στόχους που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του καρκίνου ελαχιστοποιώντας την τοξικότητα στους υγιείς ιστούς.¹

Από πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι η λήψη αντιοξειδωτικών με τη διατροφή είναι πιο αποτελεσματική και θεωρείται ότι οφείλεται στο γεγονός ότι οι τροφές περιέχουν συνδυασμό αντιοξειδωτικών ουσιών με διαφορετικό αντιοξειδωτικό δυναμικό που μπορούν να συμμετέχουν σε πολλές αντιδράσεις, απομακρύνοντας αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, η απορρόφηση μιας αντιοξειδωτικής ουσίας ενδέχεται να επηρεάζεται από την παρουσία μιας άλλης ένωσης.¹

Οι έρευνες των τελευταίων χρόνων με RVT ανέδειξαν μία ακόμη εκπληκτική ιδιότητά της, την παράταση ζωής των πειραματόζωων (διάφορων μυκήτων, νηματοειδών, και εντόμων, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*). Πρόσφατα διεξήχθησαν έρευνες και σε ποντίκια, που είναι θηλαστικά και έχουν παρόμοια φυσιολογία με τον άνθρωπο. Δείχθηκε ότι αυξημένη διατροφή, υψηλή κατανάλωση θερμίδων και η παχυσαρκία σε ποντίκια δεν είχαν αρνητικές επιπτώσεις στο μέσο όρο διάρκειας ζωής, αν μαζί με την τροφή ελάμβαναν και ποσότητες RVT. Τα αποτελέσματα

αυτά είναι εξαιρετικώς ευνοϊκά και αλλά θα πρέπει να επιβεβαιωθούν και με επιπλέον έρευνες [Αναφ. 30-32], παρ'όλα αυτά διάφορες εταιρείες διαθέτουν εδώ και καιρό RVT (ως "εκχύλισμα" πυρήνων σταφυλιών και ερυθρού οίνου) ως διατροφικό συμπλήρωμα.^{79,87,88,89}

2.7 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών

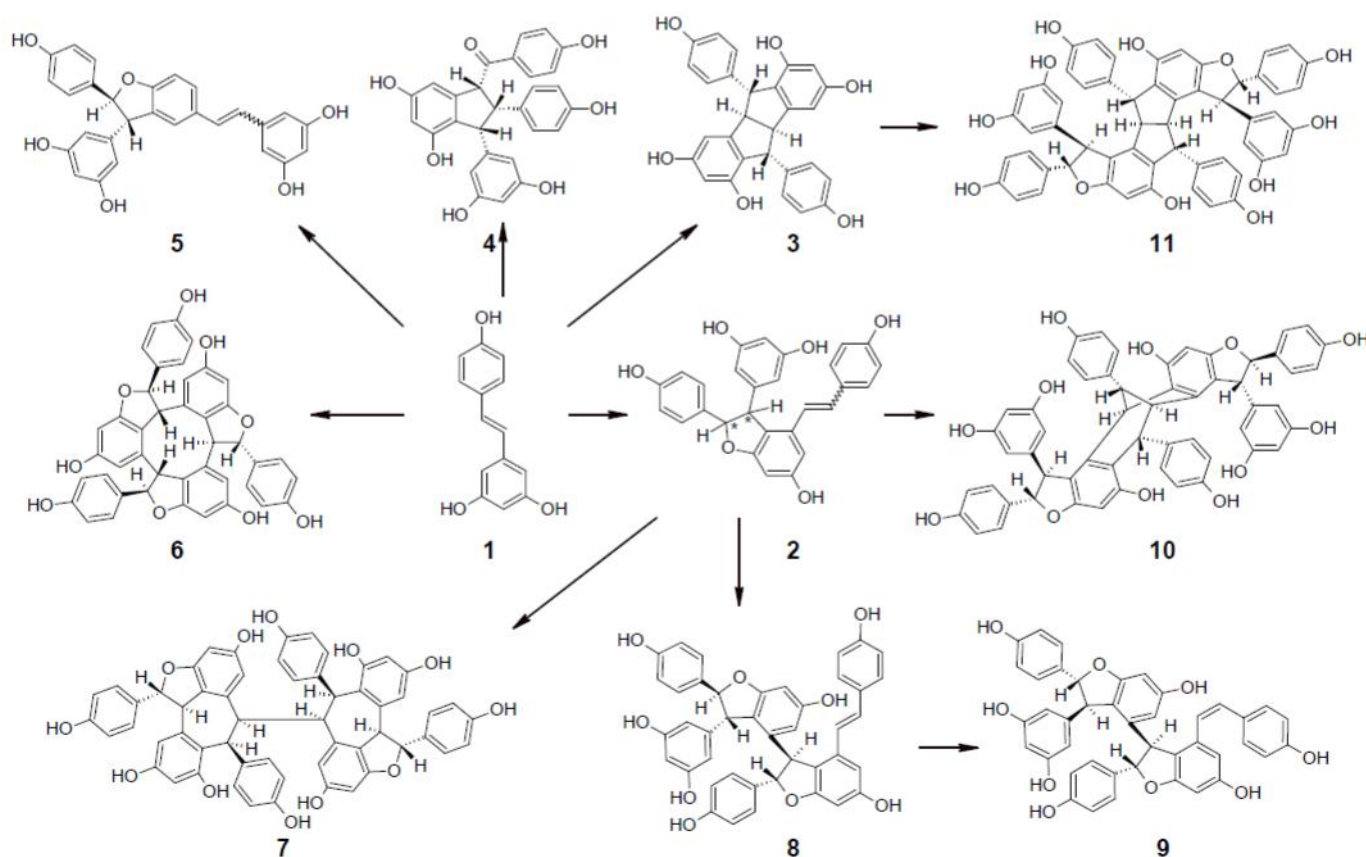
Η ικανότητα της αμπέλου να ενεργοποιεί αμυντικούς μηχανισμούς έναντι ορισμένων παθογόνων έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με τη σύνθεση ρεσβερατρόλης και άλλων στυλβενίων από το φυτό (επαγωγίμες βινιφερίνες). Μεταβολισμένες βινιφερίνες μπορούν επίσης να παραχθούν ή να τροποποιηθούν από εξωκυτταρικά ένζυμα που απελευθερώνονται από τα παθογόνα σε μια προσπάθεια εξάλειψης των ανεπιθύμητων τοξικών ενώσεων. Λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων της ρεσβερατρόλης, αυξάνεται διεθνώς το ενδιαφέρον για την παραγωγή οίνων με υψηλότερες περιεκτικότητες αυτής της ένωσης και γενικότερα υψηλότερης θρεπτικής αξίας. Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί διεγέρτες μπορούν να ενεργοποιήσουν τη σύνθεση ρεσβερατρόλης. Κάτω από την ίδια πρόκληση πίεσης, οι αμπελουργικοί και οινολογικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στο το κρασί.⁹⁰

Οι "επαγωγίμες" φυτοαλεξίνες, όπως η trans-ρεσβερατρόλη και τα ολιγομερή της (π.χ. διμερή που ονομάζονται βινιφερίνες), μπορούν να παραχθούν σε ιστούς αμπέλου ως ενεργό αμυντική στρατηγική έναντι ασθενειών. Αντιθέτως, τα "μεταβολισμένα" στυλβένια μπορούν να παραχθούν από εξωκυτταρικά ένζυμα που απελευθερώνονται από το παθογόνο σε μια προσπάθεια εξάλειψης ανεπιθύμητων τοξικών ενώσεων. Ένα σχήμα που απεικονίζει το σχηματισμό των ολιγομερών της ρεσβερατρόλης στα σταφύλια φαίνεται στο σχήμα 13.^{90, 91}

Για παράδειγμα, στα μολυσμένα με *Plasmopara viticola* φύλλα, τα ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό βινιφερνών των σταφυλιών εκφράζονται τόσο στα παθογόνα όσο και στα φυτά.⁹² Απόδειξη της ικανότητας της αμπέλου να συνθέτει αυτές τις ενώσεις είναι η παρουσία διαφορετικών στυλβενίων και στυλβενοειδών ολιγομερών σε διάφορα μέρη του φυτού, τα οποία βρέθηκαν σε μεγάλες ποσότητες σε ρίζες αμπέλου.^{93,94,95}

Η ε-βινιφερίνη βρέθηκε ως κύριο συστατικό στυλβένιο των στελεχών της αμπέλου και δύο γλυκοσίτες της δ-βινιφερίνης και η παλιδόλη (pallidol) βρέθηκαν σε κυτταρικές καλλιέργειες του *Vitis vinifera* Gamay Freaux var. Οι "επαγωγίμες" βινιφερίνες είναι δύσκολο να ανιχνευθούν σε υγιή φύλλα, αλλά έχει πατατηρηθεί η αύξηση τους σε μολυσμένα φύλλα.⁵³

Η διαδικασία με την οποία η άμπελος (το κλήμα) διεγείρεται για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών αποκαλείται διέγερση (elicitation), υποδεικνύοντας ένα εξωτερικό στρες που προκαλείται στο φυτό. Εκτός από τους βιοτικούς διεγέρτες που αναφέρθηκαν πιο πάνω, επίσης και αβιοτικοί μπορούν να προκαλέσουν τη σύνθεση στυλβενίων, όπως η UV (υπεριώδης) ακτινοβολία, το χλωριούχο αργίλιο, το fosetyl-AI, το όζον, τα σάκχαρα, η διμεθυλο-β-κυκλοδεστρίνη, το methyl-jasmonate, βενζοθειαδιαζόλη, τα chitosan ολιγομερή, σαλικυλικό οξύ, ανοξικές επεξεργασίες (anoxic treatment), αμπσκισικό οξύ (ABA), β-αμινοβουτυρικό οξύ (BABA) και η εμοδίνη.^{96,97,90, 53}



Σχήμα 13: Σχηματισμός των ολιγομερών της ρεσβερατρόλης και των βινιφερινών στα σταφύλια: (1) *trans-resveratrol* (2) (E and Z) *ε-viniferin/ω-viniferin*; (3) *pallidol*; (4) *caraphenol B*; (5) *δ-viniferin* (E and Z); (6) *α-viniferin*; (7) *isohopeaphenol*; (8) *E-miyabenol C*; (9) *Z-miyabenol C*; (10) *vaticanol C isomer*; and (11)

2.7.1 Αμπελουργικοί παράγοντες και ρεσβερατρόλη στα σταφύλια

Κάτω από τους ίδιους βιοτικούς και/ή αβιοτικούς παράγοντες διέγερσης, τα επίπεδα της ρεσβερατρόλης (και των γλυκοζιτών της-πικεΐδη) επηρεάζονται από τη ποικιλία των σταφυλιών, τον κλώνο, τις κλιματολογικές συνθήκες και τις καλλιεργητικές πρακτικές. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε ώριμα σταφύλια τόσο των ερυθρών όσο και των λευκών ποικιλιών, με υψηλότερες ωστόσο συγκεντρώσεις στα κόκκινα σταφύλια απ' ότι στα λευκά.⁹⁸ Ο κλώνος μπορεί επίσης να διαδραματίσει κάποιο ρόλο, έχει αναφερθεί σε έρευνα με διαφορετικούς κλώνους του Cabernet Sauvignon.^{99,53}

Το ψυχρότερο κλίμα, σε αντίθεση με το θερμότερο κατά τη περίοδο της ωρίμανσης, σε βάθος χρόνου, αυξάνει τις συγκεντρώσεις της ρεσβερατρόλης στα σταφύλια. Το ίδιο ισχύει και για τους αμπελώνες που βρίσκονται σε υψηλότερο υψόμετρο. Τα ασβεστολιθικά και αλκαλικά εδάφη, σε αντίθεση με το μη-ασβεστολιθικά και με ουδέτερο pH, είναι ευνοϊκά για την αύξηση της συγκέντρωσης ρεσβερατρόλης στα σταφύλια κατά τη συγκομιδή.¹⁰⁰

Η αύξηση της ποσότητας αζώτου έχει αρνητική επίδραση στα επίπεδα ρεσβερατρόλης στα σταφύλια, κάτι το οποίο εξηγεί γιατί τα αμπέλια που είναι λιπασμένα με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου είναι πιο επιρρεπή σε ασθένειες.^{101,53}

Η επίδραση της αφαίρεσης των φύλλων κατά τη περίοδο του περκασμού των σταφυλιών σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες μελετήθηκε σε ένα πείραμα πεδίου σε διάστημα τεσσάρων ετών.¹⁰² Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στα σταφύλια κατά τη συγκομιδή επηρεάστηκε με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με τον γονότυπο και τις μετεωρολογικές συνθήκες. Σε ψυχρότερα έτη (κατά τη διάρκεια του χρόνου ωρίμανσης), η απομάκρυνση των φύλλων βελτίωσε τις τιμές ρεσβερατρόλης, ενώ σε θερμότερα έτη ένα αντίθετο μοτίβο προέκυψε.⁵³

Η μείωση του μεγέθους των τσαμπιών βελτίωσε τη συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης καθώς και την αντιοξειδωτική της ικανότητα, σε οίνους Barbera από τη περιοχή παραγωγής Colli Piacentini.^{103,53}

Τόσο η σύγκριση του υψηλού φορτίου καλλιέργειας σε σχέση με το χαμηλό φορτίο καλλιέργειας, όσο και η άρδευση έναντι της μη άρδευσης μείωσαν τις συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης σε μελέτη σε οίνους από τη Σικελία.^{104 53}

Είναι δύσκολο να συγκριθούν τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στα σταφύλια και το πώς αυτή επηρεάζεται από βιοτικούς/αβιοτικούς παράγοντες διέγερσης και τις αμπελουργικούς παράγοντες λόγω των διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης και μονάδων μέτρησης.^{53,61}

2.7.2 Οινολογικοί παράγοντες και ρεσβερατρόλη στους οίνους

Η ρεσβερατρόλη περιέχεται σε σημαντικά υψηλότερες ποσότητες στα κόκκινα σε σχέση με τα λευκά κρασιά επειδή βρίσκεται κυρίως στο φλοιό του σταφυλιού, και τα λευκά κρασιά συνήθως παράγονται χωρίς ή με περιορισμένη διαβροχή με τους φλοιούς. Οι γλυκοζίτες της ρεσβερατρόλης trans- και cis-πικεΐδη που υπάρχουν στα σταφύλια και η υδρόλυσή τους, που συμβαίνει κατά τη ζύμωση, απελευθερώνει cis- και trans-ρεσβερατρόλη. Επιπλέον, ο trans-cis ισομερισμός μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία μεταξύ των δύο ισομερών της ρεσβερατρόλης στο κρασί και τα επίπεδά τους μπορούν να επηρεαστούν από το φως. Για παράδειγμα, η trans-ρεσβερατρόλη είναι σταθερή για μήνες εάν προστατεύεται από το φως. Ωστόσο, η cis-ρεσβερατρόλη είναι σταθερή μόνο κοντά σε ουδέτερο pH όταν προστατεύεται πλήρως από το φως.¹⁰⁵

Επιπλέον, η επιλογή του ζυμομύκητα μπορεί να επηρεάσει την τελική περιεκτικότητα της ρεσβερατρόλης στον οίνο, λόγω των διαφορετικών δράσεων των ενζύμων της γλυκοσιδάσης, τα οποία μετασχηματίζουν τη πικεΐδη σε ρεσβερατρόλη.^{106,53}

Σε κάποιο βαθμό, οι πρακτικές που εφαρμόζονται κατά την οινοποίηση μπορούν επίσης να επηρεάσουν την περιεκτικότητα της ρεσβερατρόλης στο κρασί. Γενικά, τα χαμηλά επίπεδα των μέσων λείανσης που προστίθενται συνήθως για τη σταθεροποίηση των ερυθρών οίνων, δεν μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της trans-ρεσβερατρόλης¹⁰⁷ και είναι μια σχετικά σταθερή ένωση που μπορεί να παραμείνει για χρόνια σε σωστά αποθηκευμένους οίνους (δηλαδή αποφεύγοντας την έκθεση σε θερμότητα καθώς και την παρουσία φυσιολογικών επιπέδων εξωγενών αντιοξειδωτικών όπως το διοξείδιο του θείου).¹⁰⁸ Από την άλλη πλευρά, μη συνηθισμένες μεθόδους οινοποίησης και παλαίωσης μπορεί να προκαλέσει σχετικές απώλειες της ρεσβερατρόλης όπως για παράδειγμα στα κρασιά Sherry, που έδειξαν μεγάλες απώλειες ρεσβερατρόλης λόγω οξειδωτικών φαινομένων.^{109,53}

Η χρήση συγκεκριμένων τεχνικών μετά τη συγκομιδή είναι επίσης ικανή να μεταβάλλει την ρεσβερατρόλη στα σταφύλια. Για παράδειγμα, η ακτινοβολία σταφυλιών με υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να είναι ιδιαίτερα ευνοϊκή για την παραγωγή κρασιών σταφίδας (raisin wines) (π.χ. Amarone della Valpolicella) και έχει αποδειχθεί ότι η βιοσύνθεση αυτή στα σταφύλια μπορεί να προκληθεί κατά τη διάρκεια των 2-3 μηνών, μετά τη συγκομιδή.¹¹⁰

Η υψηλότερη συγκέντρωση ολικής ρεσβερατρόλης στον οίνο, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι 36 mg/L.¹¹¹

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

3.1 Εισαγωγή

Το NMR είναι μία ευέλικτη σύγχρονη αναλυτική τεχνική με εξέχουσα θέση στο χαρακτηρισμό και στην ποιοτική ανάλυση τροφίμων και ποτών. Εκτενής βιβλιογραφία αναφέρει τη χρήση του Υψηλής Διαχωριστικής Ικανότητας High Resolution (HR) – NMR στην ταυτοποίηση μεταβολιτών σε χυμούς φρούτων, μπύρας, κρασιού, πράσινου τσαγιού κλπ.¹²⁹

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης NMR στην ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων όπως είναι τα τρόφιμα και τα ποτά είναι:¹³⁰

- 1) Αποτελεί μια μη καταστροφική τεχνική υπό την έννοια ότι το δείγμα μπορεί να ανακτηθεί μετά την ανάλυση.
- 2) Η παρασκευή των δειγμάτων είναι εύκολη δεδομένου ότι δεν απαιτείται κάποιος διαχωρισμός και οι χρόνοι λήψης είναι σύντομοι (συνολικά της τάξης των λεπτών) τουλάχιστον σε ότι αφορά απλά πειράματα μίας διάστασης.
- 3) Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό πολλών οργανικών συστατικών ακόμα και χαμηλής συγκέντρωσης.
- 4) Η ταυτοποίηση ενώσεων μπορεί να υποστηριχθεί από μια σειρά ενημερωμένων λογισμικών και βάσεων δεδομένων.
- 5) Η χρήση δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR, όπως πειράματα COSY, TOCSY, HSQS, HMBS, επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό νέων μεταβολιτών.

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται η χαμηλότερη ευαισθησία της σε σχέση με τις τεχνικές Φασματοσκοπίας μάζας και το υψηλό κόστος του επιστημονικού εξοπλισμού.¹³⁰

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, ενώ ορισμένοι δεν εμφανίζουν το φαινόμενο. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπιν.^{112, 129, 130}

Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR βρίσκει

εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών. Τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνικής μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και δυναμικής ενώσεων σε στερεά κατάσταση.^{112, 129, 130}

3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Η φασματοσκοπία NMR σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της πυρηνικής μαγνητικής διπολικής ροπής σε εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η πυρηνική μαγνητική διπολική ροπή (ο πυρήνας συμπεριφέρεται ως ένα μαγνητικό δίπολο) προκαλείται από την ιδιοπεριστροφή (spin) του πυρήνα. Το spin είναι θεμελιώδης ιδιότητα της ύλης, όπως το ηλεκτρικό φορτίο και η μάζα.^{112, 113, 114}

Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η ποσοτικοποίηση με την τεχνική της φασματοσκοπίας NMR είναι ότι όλες οι συχνότητες συντονισμού που παράγονται από έναν συγκεκριμένο πυρήνα έχουν ένταση ευθέως ανάλογη προς την μοριακή συγκέντρωση του αναλυτή και του αριθμού των πυρήνων που δημιουργούν αυτή τη συχνότητα.^{112, 113, 124, 125}

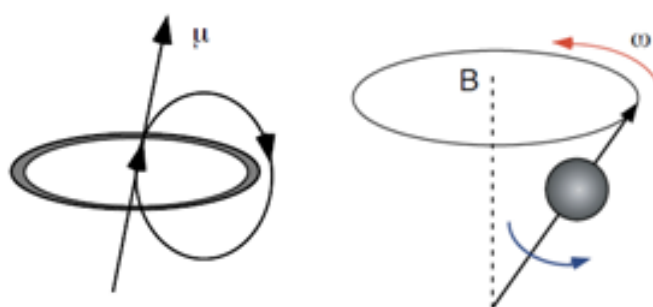
$$\frac{\text{περιοχή ολοκλήρωσης}}{\text{αριθμός πυρήνων}} \propto \text{συγκέντρωση}$$

Η τεχνική του ποσοτικού NMR είναι ευρέως διαδεδομένη για ποσοτικούς σκοπούς σε χημικές αναλύσεις που γίνονται σε τρόφιμα και ποτά. Η τεχνική που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι κυρίως η φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης. Εντούτοις σε ένα σύνθετο δείγμα, η επικάλυψη μεταξύ των κορυφών διαφόρων συστατικών δημιουργεί σοβαρό περιορισμό στη χρήση του.^{112, 113, 129, 130}

Για να ξεπεραστούν προβλήματα χαμηλής ευαισθησίας και επικαλύψεων, η ποσοτική ανάλυση με χρήση φασματοσκοπίας NMR στρέφεται προς την χρήση πειραμάτων δύο διαστάσεων. Η διάκριση δύο ή περισσότερων σημάτων τα οποία επικαλύπτονται σε ένα φάσμα ¹H-NMR καθίσταται τις περισσότερες φορές εφικτή σε φάσματα NMR που προκύπτουν από την χρήση κάποιου πειράματος δύο διαστάσεων. Η εφαρμογή αυτή ωστόσο δεν στερείται μειονεκτημάτων. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα πειράματα δύο διαστάσεων έχουν μεγαλύτερη χρονική διάρκεια και ως εκ τούτου είναι πιο ευαίσθητα στη φασματοσκοπική αστάθεια του οργάνου.^{112, 113, 129, 130}

3.2.1 Θεωρητική βάση του πειράματος

Για την περιγραφή και ερμηνεία του φαινομένου του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρέπει να ανατρέξουμε στην κβαντομηχανική ιδιότητα του spin (ή ιδιοπεριστροφή του πυρήνα). Το spin των πυρήνων προσδιορίζεται από τον κβαντικό αριθμό του spin I ο οποίος μπορεί να πάρει τιμές $0, \frac{1}{2}, 1, 1\frac{1}{2}$ κλπ. Το πρωτόνιο για παράδειγμα έχει $I = 1/2$, το ^{14}N έχει $I = 1$. Με το πυρηνικό spin συνδέεται η μαγνητική διπολική ροπή μ με τύπο, $\mu = \gamma I \hbar$, όπου γ ο γυρομαγνητικός λόγος, μία ιδιότητα χαρακτηριστική για κάθε είδος πυρήνα. Το φαινόμενο του NMR αφορά μόνο πυρήνες που εμφανίζουν στροφορμή, έχουν δηλαδή μη μηδενικό κβαντικό αριθμό spin και μπορούν έτσι να δημιουργήσουν μαγνητικά δίπολα όπως αυτό του Σχήματος 14.^{129, 130, 112, 113,}



Σχήμα 14: Μαγνητικό δίπολο (αριστερά) & μεταπτωτική κίνηση με συχνότητα Larmor (δεξιά)

Όταν το δίπολο αυτό βρεθεί σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο δεν προσανατολίζεται παράλληλα με αυτό, αλλά επιτελεί μία σύνθετη κίνηση ιδιοπεριστροφής και μετάπτωσης περί τον άξονα του πεδίου. Η συχνότητα μετάπτωσης ονομάζεται συχνότητα Larmor ω , και είναι χαρακτηριστική του είδους του πυρήνα. Η μετάπτωση αυτή περιορίζεται από την γωνία ϕ που σχηματίζει το δίπολο με το πεδίο καθώς αυτή μπορεί να λάβει μόνο συγκεκριμένες τιμές.^{129, 130}

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με πιο κατανοητό τρόπο μέσω του κβαντομηχανικού μοντέλου. Σύμφωνα με αυτό ο προσανατολισμός του διπόλου μέσα στο πεδίο παύει να είναι τυχαίος και λαμβάνει συγκεκριμένες διευθετήσεις που εξαρτώνται από τον μαγνητικό κβαντικό αριθμό του spin m_I , ο οποίος μπορεί να πάρει $2I + 1$ τιμές. Αυτές οι διευθετήσεις αντιστοιχούν σε $2I+1$ διαφορετικές ενεργειακές καταστάσεις και το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οφείλεται στην μετάπτωση μεταξύ αυτών των ενεργειακών επιπέδων. Η εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου άρει τον ενεργειακό αυτό εκφυλισμό και διαχωρίζει τις ενεργειακές στάθμες (διάσχιση Zeeman).¹²⁹

Η ενέργεια του μαγνητικού διπόλου μέσα σε πεδίο B_0 δίνεται από τη σχέση :

$$E = -\mu \cdot B_0$$

Από τις σχέσεις $\mu_z = \gamma I_z$ και $I_z = m_I \hbar$ προκύπτει ο τύπος ενέργειας $E = -\gamma \hbar m_I B_0$. Για τη μετάπτωση ανάμεσα στα ενεργειακά επίπεδα ισχύει ο κανόνας επιλογής $\Delta m = \pm 1$ οπότε η συνθήκη συντονισμού είναι:

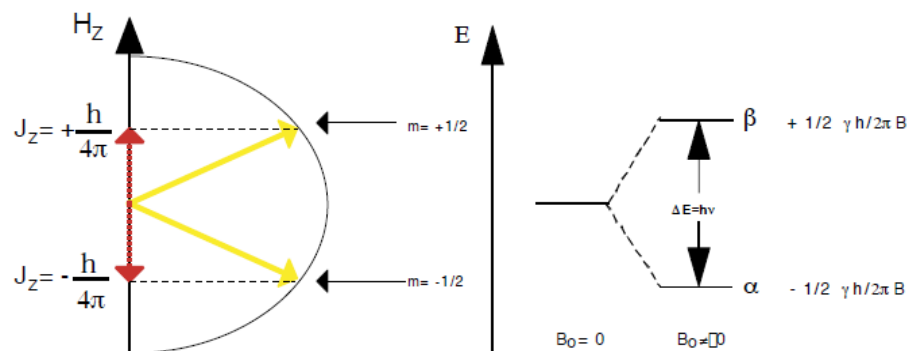
$$\Delta E = \hbar \gamma B_0$$

Σύμφωνα με την σχέση Boltzman η κατανομή των πυρήνων στα δύο ενεργειακά επίπεδα α και β δίνεται από τη σχέση:

$$N_\beta / N_\alpha = e^{-\Delta E/kT},$$

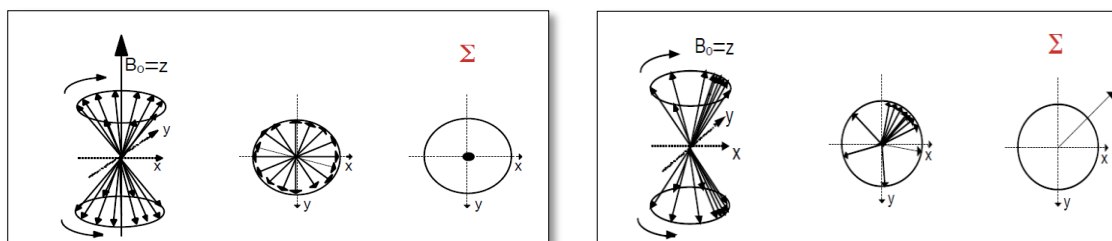
όπου k η σταθερά Boltzman.

Η διαφορά πληθυσμών ανάμεσα στα δύο ενεργειακά επίπεδα υπολογίζεται με βάση τη παραπάνω σχέση σε έναν πυρήνα στους $10^4 - 10^6$ ανάλογα με τη θερμοκρασία και το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.^{112, 113, 129, 130}



Σχήμα 15: Ενεργειακά επίπεδα πυρήνων για $I=1/2$ ¹²⁹

Στην πραγματικότητα αυτό που μετράται είναι η μαγνήτιση δηλαδή το σύνολο των μαγνητικών διπόλων που προέρχονται από ένα μεγάλο σύνολο μορίων. Σε κατάσταση ισορροπίας οι πυρήνες περιστρέφονται γύρω από το πεδίο B_0 χωρίς συμφωνία φάσεων και έτσι η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μηδενική. Ας υποθέσουμε ότι γίνεται εφαρμογή ενός πεδίου B_1 κάθετα προς το B_0 τότε δημιουργείται μία κατάσταση στην οποία υπάρχει συμφωνία φάσεων και η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μη μηδενική.^{129, 130}



Σχήμα 16: Κατάσταση ισορροπίας. Οι πληθυσμοί α και β είναι ίσοκατανεμημένοι. Κινούνται γύρω από το B_0 χωρίς συμφωνία φάσεων και η μαγνήτιση στο επίπεδο xy είναι μηδενική. **Σχήμα 17:** Συμφωνία φάσεων με εφαρμογή πεδίου B_1 , η μαγνήτιση αποκτά μη μηδενική συνιστώσα στο επίπεδο xy .¹²⁹

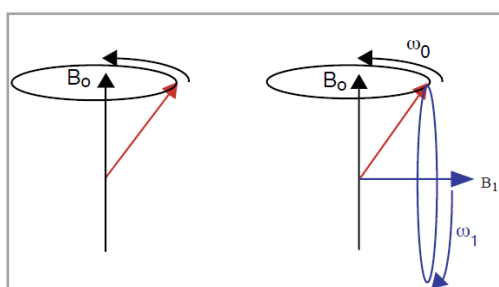
Όταν η εφαρμογή του πεδίου B_1 σταματήσει, η μαγνήτιση επιστρέφει στην κατάσταση ισορροπίας. Η διαδικασία αυτή καλείται αποδιέγερση (relaxation) και πραγματοποιείται αφενός με την αύξηση της μαγνήτισης στον άξονα z και αφετέρου με την μείωση της μαγνήτισης στο επίπεδο xy . Συγκριτικά με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές η αποδιέγερση του πυρήνα είναι πολύ αργή διαδικασία. Για να αποδιεγερθούν οι πυρήνες υποβοηθούνται είτε από το περιβάλλον του πυρήνα είτε από άλλους γειτονικούς πυρήνες.

Οι δύο αυτές διαδικασίες χαρακτηρίζονται από τις χρονικές σταθερές T_1 και T_2 . Η πρώτη σταθερά ή χρόνος αποδιέγερσης T_1 αφορά την ανταλλαγή ενέργειας με το περιβάλλον (Lattice) και τη αύξηση της μαγνήτισης στον άξονα z . Η σχέση μαγνήτισης στον άξονα z με τη σταθερά T_1 δίνεται από την εξίσωση:¹²⁹

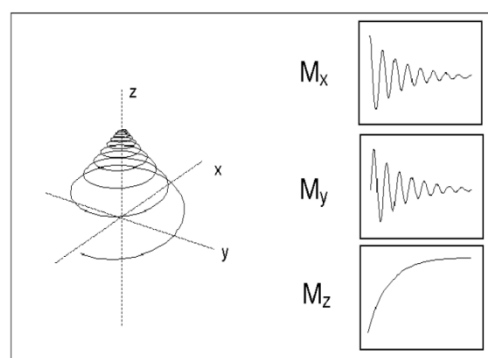
$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$$

Η δεύτερη χρονική σταθερά T_2 χαρακτηρίζει την σπιν-σπιν αποδιέγερση. Αυτή δεν έχει να κάνει με απώλεια ενέργειας αλλά με απώλεια συμφωνίας φάσεως των μαγνητίσεων στο επίπεδο xy . Η μαγνήτιση στο επίπεδο xy δίνεται από την σχέση:

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}$$



Σχήμα 18: Κίνηση του πυρήνα υπό την επίδραση του B_0 (αριστερά) και υπό την επίδραση των B_0 και B_1 (δεξιά)¹²⁹

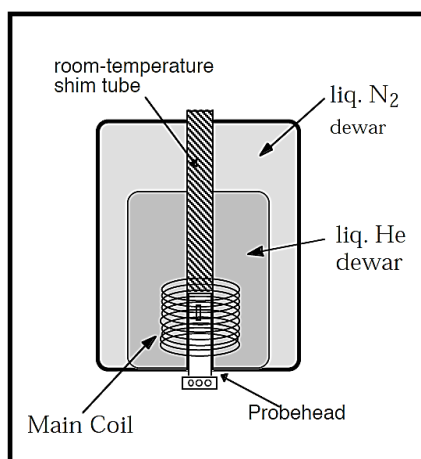


Σχήμα 19: Διαδικασία αποδιέγερσης. Μείωση της μαγνήτισης στους άξονες x και y και αύξηση στον z .¹²⁹

3.2.2 Οργανολογία

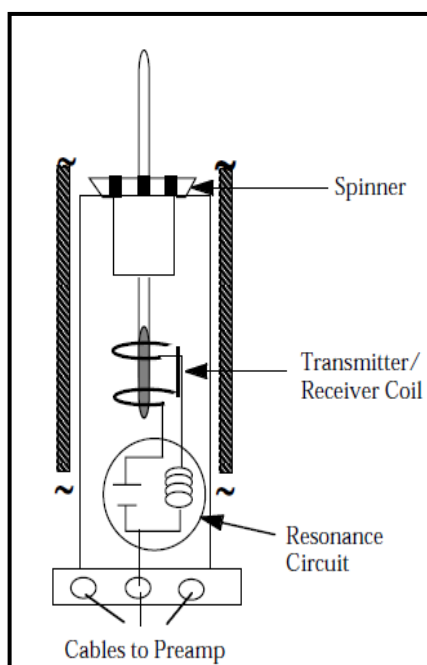
Τα κύρια συστατικά στοιχεία ενός οργάνου NMR είναι :

- ο μαγνήτης
- ανιχνευτές (probeheads)
- πηγή ραδιοσυχνοτήτων
- ενισχυτές
- μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC's)
- σύστημα lock
- σύστημα shim
- υπολογιστής



Σχήμα 20: (αριστερά)

Σχηματική απεικόνιση του μαγνήτη με τα δοχεία dewars He και N₂, τα πηνία και τους ανιχνευτές



Σχήμα 21: (δεξιά)

Εισαγωγή του δείγματος στον ανιχνευτή με την βοήθεια του spinner

Η κύρια μονάδα ενός φασματογράφου NMR είναι ο κρυομαγνήτης. Πρόκειται για ένα μαγνήτη με τη μορφή σωληνοειδούς κατασκευασμένου από υπεραγώγιμο υλικό. Ως υπεραγώγιμα χαρακτηρίζονται τα υλικά τα οποία όταν βρίσκονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη μιας κρίσιμης θερμοκρασίας T_c , παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική αντίσταση στη ροή του ρεύματος. Το κύριο πηνίο που παράγει το πεδίο περιβάλλεται από υγρό ήλιο ούτως ώστε η ηλεκτρική αντίσταση να είναι μηδέν. Υγρό άζωτο περιβάλλει τον μαγνήτη για να αποφευχθεί η απώλεια του “ακριβού” ηλίου. Επιπρόσθετα πηνία υπάρχουν προκειμένου να γίνεται διόρθωση της ομοιογένειας του πεδίου. Το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα 5mm σε spinner και εισέρχεται κάθετα στον μαγνήτη μέσα στον ανιχνευτή.^{129,130}

Ο ανιχνευτής αποτελείται από ένα ή δύο πηνία τα οποία αποτελούν το πομπό/δέκτη του ραδιοσήματος (receiver/transmitter coil). Ο ανιχνευτής αποτελείται συνήθως από δύο πηνία, ένα εσωτερικό (inner coil) περισσότερο ευαίσθητο και ένα εξωτερικό (outer coil). Ένας ανιχνευτής με υψηλή ευαισθησία σε πειράματα πρωτονίου χρησιμοποιεί το εσωτερικό πηνίο για την ανίχνευση ^1H και ^1H και το εξωτερικό για τον ^{13}C και προσφέρεται κυρίως για πειράματα HSQC και HMQC. Αντίθετα ένας ανιχνευτής ευαίσθητος στην ανίχνευση σημάτων άνθρακα χρησιμοποιεί το εσωτερικό πηνίο για την ανίχνευση ^1H και ^{13}C ενώ το εξωτερικό για την ανίχνευση ^1H και χρησιμοποιείται για πειράματα άνθρακα με αποσύζευξη πρωτονίου. Ο αισθητήρας συνδέεται σε έναν προενισχυτή ο οποίος προκαλεί μία πρώτη ενίσχυση του σήματος. Επίσης συνδέεται με μία μονάδα (wobbling unit) μέσω της οποίας γίνεται ο συντονισμός και η προσαρμογή του ανιχνευτή (tuning and matching), δηλαδή ο συντονισμός με την συχνότητα του αντίστοιχου πυρήνα και η προσαρμογή σε μία σταθερή αντίσταση ($50\ \Omega$). Η διαδικασία αυτή αυξάνει την ευαισθησία.^{129,130}

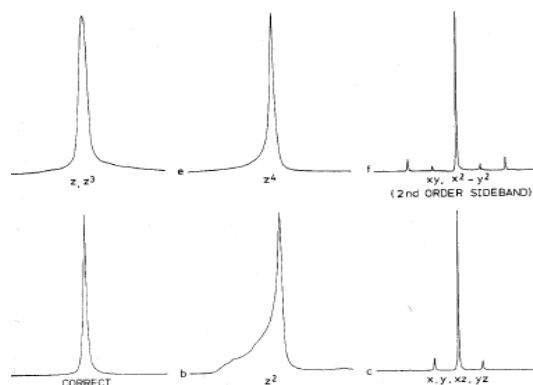
Η πηγή ραδιοσυχνοτήτων αποτελείται από ηλεκτρονικά στοιχεία τα οποία παράγουν ημιτονικά ή συνημιτονικά κύματα σε κατάλληλες συχνότητες. Επιτελούν επίσης εν μέρει διαδικασίες για την διόρθωση του σχήματος και της φάσης των κορυφών. Η διακριτική ικανότητα μεταξύ των συχνοτήτων είναι συνήθως καλύτερη από $0.1\ \text{Hz}$.¹²⁹

Τα εισερχόμενα και εξερχόμενα σήματα ενισχύονται από τους ενισχυτές (amplifiers). Το σήμα που παράγεται είναι αναλογικό και η μετατροπή του σε ψηφιακό γίνεται από τους μετατροπείς αναλογικού προς ψηφιακό σήμα (analog-digital converters, ADC's). Η μετατροπή είναι απαραίτητη προκειμένου το σήμα να είναι προσβάσιμο στον μετασχηματισμό Fourier από τον υπολογιστή. Οι ψηφιοποιητές που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως 16 ή 18 bit. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το ισχυρότερο σήμα ψηφιοποιείται σε 218, γεγονός που δημιουργεί προβλήματα στο δυναμικό εύρος καθώς σήματα με μέγεθος μικρότερο από $1/2^{18}$ δεν μπορούν να διακριθούν. Για αυτό το σκοπό η παράμετρος receiver gain (rg) δηλαδή ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας για ενίσχυση του σήματος, ρυθμίζεται έτσι ώστε η μέγιστη ένταση της FID να καλύπτει σχεδόν πλήρως τον μετατροπέα AD.¹²⁹

Η ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου σε όλο τον όγκο του δείγματος είναι απαραίτητη για την παρατήρηση μικρών διαφορών στις συχνότητες και ρυθμίζεται με το σύστημα shim. Εάν το πεδίο δεν είναι πλήρως ομογενοποιημένο οδηγεί σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως η διεύρυνση των κορυφών, καθώς πυρήνες σε διαφορετικά σημεία του δείγματος “αισθάνονται” διαφορετικό πεδίο. Το σύστημα shim αποτελείται από δύο τμήματα. Η γενική αρχή και των δύο είναι ότι αποτελούνται από έναν αριθμό πηνίων τα οποία παράγουν συμπληρωματικά μικρά πεδία τα οποία διορθώνουν τις ανομοιογένειες του κύριου πηνίου. Πολυάριθμα πηνία ποικίλης γεωμετρίας παράγουν διορθωτικά πεδία προς διάφορες κατευθύνσεις. Το ένα από τα δύο επιμέρους τμήματα ρυθμίζεται από ειδικούς κατά την διάρκεια των αρχικών ρυθμίσεων του οργάνου. Το δεύτερο τμήμα βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου και ρυθμίζεται από τον χρήστη κάθε φορά που ένα

δείγμα τοποθετείται στον μαγνήτη ή όταν αλλάζει η θερμοκρασία. Το σύστημα shim ομαδοποιείται σε δύο κατηγορίες στα shims πάνω στο άξονα (z,z2,z4...) και στα shims εκτός άξονα (x, y, xy...). Τα πρώτα διορθώνουν την ομοιογένεια στον άξονα z και συνδέονται κυρίως με τον διαλύτη και το ύψος του διαλύτη στο σωληνάκι το οποίο πρέπει να είναι σταθερό στα 550 μ L. Κακό shimming οδηγεί σε μορφές κορυφών όπως αυτή της εικόνας 9.¹²⁹

Η σταθερότητα του πεδίου επιτυγχάνεται με το σύστημα lock. Το σύστημα lock μετράει την συχνότητα του δευτεριωμένου διαλύτη και δημιουργεί διορθώσεις στην ισχύ του μαγνητικού πεδίου τέτοιες ώστε η συχνότητα του δευτεριωμένου διαλύτη να παραμένει σταθερή. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας όλες οι άλλες συχνότητες παραμένουν σταθερές. Συνήθως το σύστημα lock ενεργοποιείται αμέσως μετά την τοποθέτηση του δείγματος στον μαγνήτη για την αποφυγή της φυσικής ολίσθησης του μαγνητικού πεδίου που συμβαίνει και οδηγεί σε διεύρυνση κορυφών. Η σταθερότητα του συστήματος lock είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για τα πειράματα δύο διαστάσεων.¹²⁹



Εικόνα 9: Παραδείγματα κακού shimming. Κακή ρύθμιση των α) z, z3, z5 οδηγεί σε συμμετρική διεύρυνση κορυφών, β) z2, z4, z6 οδηγεί σε ασύμμετρες κορυφές, γ) x,y,xy,yx... σε πλευρικές κορυφές (spinning sideband).¹²⁹

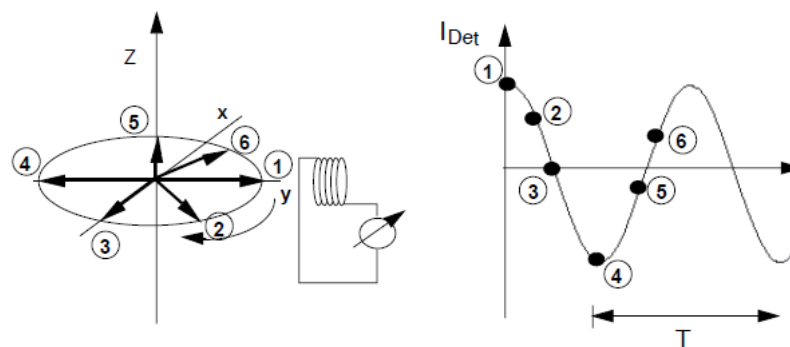
3.2.3 Φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης

Σε αυτή την ενότητα θα περιγράψουμε το πείραμα πρωτονίου μιας διάστασης (¹H NMR). Αρχικά από τον υπεραγώγιμο μαγνήτη ασκείται στο δείγμα το πεδίο B₀ το οποίο βρίσκεται στην κλίμακα εκατοντάδων MHz. Αντίθετα το B₁ είναι πολύ μικρότερο και κυμαίνεται από 1-20 KHz. Το πεδίο B₁ αποτελεί την μαγνητική συνιστώσα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκπέμπεται στο δείγμα κάθετα προς το B₀. Η συχνότητα της ακτινοβολίας που μπορεί να παράγει πεδίο τέτοιου μεγέθους ανήκει στα ραδιοκύματα (RF). Η εφαρμογή της συχνότητας ονομάζεται και παλμός. Αν και οι παλμοί έχουν κατασκευαστεί από τον πομπό με μία συγκεκριμένη συχνότητα f₁ (φέρουσα

συχνότητα) έχουν ισχύ για ένα εύρος συχνοτήτων. Ανάλογα με το χρόνο εφαρμογής του παλμού (pulse width) η μαγνήτιση εκτρέπεται με διαφορετικό τρόπο από τη θέση ισορροπίας.^{112, 113, 114, 129, 130}

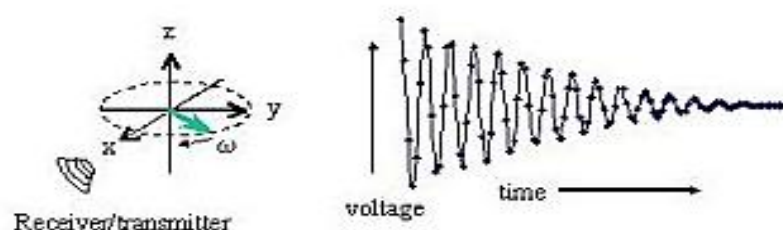
Οι παλμοί που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι αυτοί των 90° και των 180°. Ο παλμός των 90° περιστρέφει την μαγνήτιση από τον άξονα z στον άξονα y. Ως εκ τούτου εξισώνει τους δύο πληθυσμούς αφού η μαγνήτιση στον άξονα z παύει να υπάρχει ενώ μετατρέπεται σε μαγνήτιση στον άξονα y, έτσι λοιπόν ο παλμός 90° δημιουργεί συμφωνία φάσεων αφού οι μαγνητίσεις δεν κινούνται πλέον τυχαία γύρω από το B₀. Ο παλμός των 180° αναστρέφει την μαγνήτιση στον άξονα z δηλαδή προκαλεί αναστροφή πληθυσμών των δύο ενεργειακών επιπέδων $m=\pm 1/2$.^{129, 130}

Με την εφαρμογή του παλμού 90° προκύπτει μαγνήτιση στο επίπεδο xy και ως εκ τούτου σήμα στον ανιχνευτή μέσω επαγωγής ρεύματος. Όταν η περιστρεφόμενη μαγνήτιση στο επίπεδο xy προσανατολίζεται παράλληλα με το πηνίο-ανιχνευτή το επαγόμενο ρεύμα είναι μέγιστο.¹²⁹



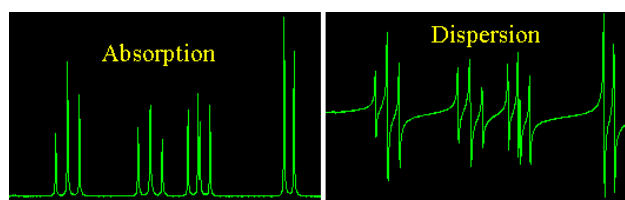
Σχήμα 22: Περιστρεφόμενο spin (αριστερά) και το αντίστοιχο επαγόμενο ρεύμα που φτάνει στο πηνίο (δεξιά)¹²⁹

Όταν ο παλμός σταματήσει, πραγματοποιείται αποδιέγερση των πυρήνων και η συνισταμένη μαγνήτιση κινείται μεταπτωτικά γύρω από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η μετάπτωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή ραδιοσημάτων που είναι γνωστά ως Free Induction Decay (FID) όπου παρατηρείται η απόσβεση του σήματος εκθετικά με το χρόνο.¹²⁹



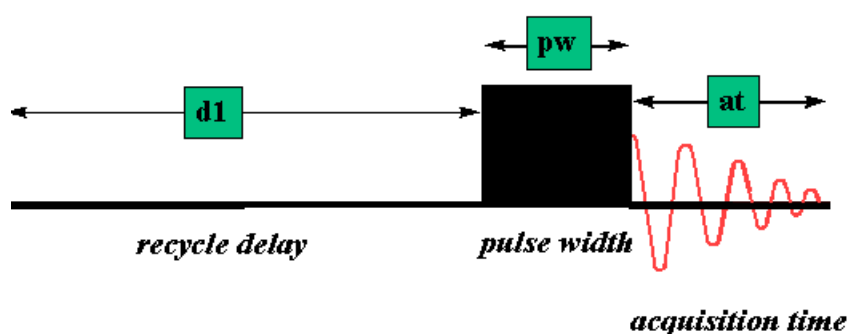
Σχήμα 23: Καταγραφή της FID. Η μαγνήτιση στο επίπεδο xy μειώνεται μέχρι να μηδενιστεί. Το σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή (ο οποίος καταγράφει σήμα στο επίπεδο xy) αποσβένει εκθετικά με το χρόνο.¹²⁹

Το σήμα συλλέγεται και καταγράφεται συνάρτησι του χρόνου. Προκειμένου να μετατραπεί σε συνάρτηση συχνοτήτων γίνεται χρήση του μετασχηματισμού Fourier ενός χρήσιμου μαθηματικού εργαλείου ούτως ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση όλων των συχνοτήτων συντονισμού. Η συνάρτηση για την μετατροπή είναι μιγαδική : $f(\omega) = \int f(t) e^{i\omega t} dt$, συνεπώς αποτελείται από φανταστικό και πραγματικό μέρος. Το φανταστικό μέρος απεικονίζεται με γραμμές τύπου διασποράς (dispersion) ενώ το πραγματικό με γραμμές τύπου απορρόφησης (absorption). Ο τελευταίος τύπος είναι και αυτός που απεικονίζεται στα φάσματα. Τα διάφορα σήματα που απεικονίζονται ενδέχεται να έχουν διαφορετική φάση σε σχέση με τη συχνότητά τους και αυτό αντικατοπτρίζεται στη σχέση φανταστικού πραγματικού μέρους με αποτέλεσμα ανάμιξη των τύπων απορρόφησης και διασποράς.¹²⁹



Εικόνα 10: Φάσμα με γραμμές τύπου απορρόφησης (αριστερά) και τύπου διασποράς (δεξιά)¹²⁹

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται n φορές προκειμένου να αυξηθεί η αναλογία σήματος προς θόρυβο (S/N). Είναι απαραίτητο πριν από κάθε επανάληψη να δίνεται ένα χρονικό διάστημα ούτως ώστε οι πυρήνες να επανέρχονται σε κατάσταση ισορροπίας (relaxation delay).¹²⁴



Σχήμα 24: Παλμική ακολουθία (χρόνος αναμονής, εφαρμογή παλμού, συλλογή της FID)¹²⁹

Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενη ενότητα, η τεχνική της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην εύρεση δομής μικρών και μακρο-μορίων. Από το φάσμα πρωτονίου μέσω των χημικών μετατοπίσεων είναι δυνατό να αντληθούν πληροφορίες για τις ποσοτικές σχέσεις μεταξύ ενδομοριακών και

διαμοριακών μετατοπίσεων. Αυτό γίνεται εφικτό μέσω ολοκλήρωσης των κορυφών στις αντίστοιχες μετατοπίσεις. Οι τιμές ολοκλήρωσης που προκύπτουν έχουν άμεση εξάρτηση από τον αριθμό των πυρήνων που συντονίζονται και από την συγκέντρωση.^{129, 130}

3.2.4 Βασικές έννοιες του ποσοτικού NMR

Η πιο σημαντική και θεμελιώδης πληροφορία για το ποσοτικό NMR είναι η άμεση αναλογία έντασης σήματος (IX) του NMR ως προς τον αριθμό των πυρήνων (NS) που είναι υπεύθυνοι για μία συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού.^{112, 113, 114, 115, 129, 130}

$$I_x \propto N_x, \quad I_x = K_s \cdot N_x$$

όπου K_s είναι μία φασματοσκοπική σταθερά, ίδια για όλες τις συχνότητες ενός φάσματος NMR. Ωστόσο επηρεάζεται από ορισμένους παράγοντες όπως ο παλμός διέγερσης, ο χρόνος εφαρμογής του, και η αποσύζευξη ευρείας ζώνης (broadband decoupling) όπου η ένταση των κορυφών αυξάνεται λόγω του φαινομένου Nuclear Overhauser (NOE).^{112, 113, 114, 116, 129, 130}

Η ποσοτικοποίηση αναλυτών με την μέθοδο αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους οι οποίοι είναι η σχετική και η απόλυτη ποσοτικοποίηση.

Στη μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης, υπολογίζεται πολύ εύκολα η μοριακή αναλογία μεταξύ δύο ενώσεων X και Y από την σχέση :

$$\frac{M_X}{M_Y} = \frac{I_X}{I_Y} \cdot \frac{N_Y}{N_X}$$

Εάν πρόκειται για μείγμα περισσότερων συστατικών (Z) τότε η ποσοστιαία αναλογία ενός συστατικού A δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{M_A}{\sum_{i=1}^Z n_i} = \frac{I_A N_A}{\sum_{i=1}^Z I_i N_i} \cdot 100\%$$

Για το προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης ενός αναλύτη διακρίνονται δύο περιπτώσεις :

(α) εάν όλα τα υπόλοιπα συστατικά μπορούν να αποδοθούν δομικά και να μετρηθούν ποσοτικά, τότε η συγκέντρωση του αναλύτη μπορεί να υπολογιστεί ως μία διαφορά από το 100%.

(β) στην δεύτερη περίπτωση γίνεται χρήση μίας προτύπου ουσίας γνωστής συγκέντρωσης και η συγκέντρωση υπολογίζεται μέσω της σχέσης :

$$C_X = \frac{I_X}{I_{STD}} \cdot \frac{N_{STD}}{N_X} \cdot \frac{M_X}{M_{STD}} \cdot \frac{W_{STD}}{W} \cdot C_{STD}$$

όπου C, I, N, M, είναι αντίστοιχα η συγκέντρωση, η ένταση, ο αριθμός των πυρήνων, η μοριακή μάζα και το βάρος αναλύτη (X) και προτύπου (STD) αντίστοιχα.¹²⁹

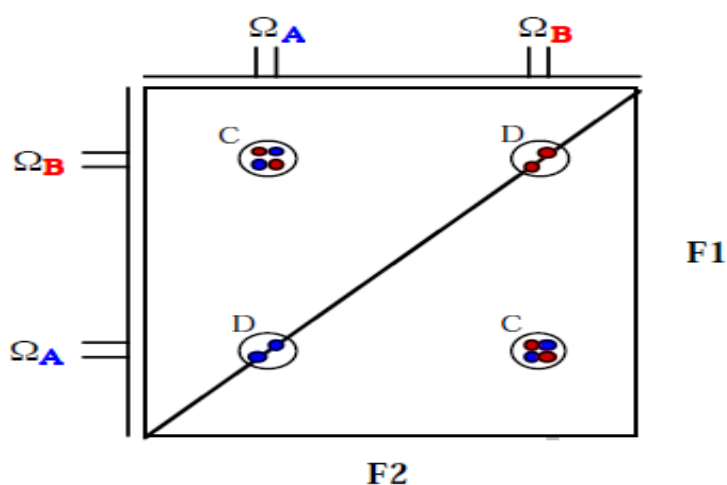
Η ποσοτική ανάλυση με την χρήση φασματοσκοπίας NMR έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Χρησιμοποιείται ευρέως στην οργανική σύνθεση για τον υπολογισμό της απόλυτης καθαρότητας των συστατικών ενός μείγματος παρέχοντας παράλληλα δομικές πληροφορίες χωρίς να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα χρησιμη τεχνική στην ανάλυση φυσικών προϊόντων και στην μεταβολομική ανάλυση. Με την χρησιμοποίηση των CryoProbes καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση φυσικών προϊόντων και βιολογικών μορίων σε κλίμακα nmol. Μία ακόμα εφαρμογή αφορά στην παρακολούθηση αντιδράσεων και στην μελέτη κινητικών διεργασιών.^{129, 130}

3.2.5 Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων παρέχει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα. Αυτά είναι η κατανομή των σημάτων σε δύο ορθογώνιες διαστάσεις με αποτέλεσμα την εξάλειψη των επικαλύψεων, και η αναγνώριση των συσχετίσεων μεταξύ πυρήνων που συζεύγγονται.^{112, 113, 129}

Ένα φάσμα δύο διαστάσεων αποτελείται από δύο άξονες συχνότητων που καλούνται άμεσος (F2) και έμμεσος (F1). Στον άμεσο άξονα οι συχνότητες των σημάτων προκύπτουν απευθείας από τον ανιχνευτή ενώ στον έμμεσο προκύπτουν από δεύτερο μετασχηματισμό Fourier.¹²⁹

Τα πειράματα δύο διαστάσεων διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στα φάσματα (α) ομοπυρηνικής σύζευξης (σήματα όμοιων πυρήνων και στους δύο άξονες) και (β) ετεροπυρηνικής σύζευξης (σήματα διαφορετικού πυρήνα σε κάθε άξονα).^{112, 113, 129}



Σχήμα 25: Ομοπυρηνικό φάσμα COSY με χαρακτηριστικά σήματα διαγωνίου (D) και κορυφές διασταύρωσης (D)¹²⁹

Επιπλέον, τα πειράματα δύο διαστάσεων διακρίνονται σε μικρότερες υποδιαιρέσεις (i) στα φάσματα τα οποία συσχετίζουν δύο πυρήνες μέσω της χημικής τους μετατόπισης, και (ii) στα φάσματα τα οποία συσχετίζουν την χημική μετατόπιση των πυρήνων με την σταθερά σύζευξης J (J-resolved).¹²⁹

Οι ακολουθίες παλμών οι οποίες χρησιμοποιούνται στα πειράματα δύο διαστάσεων περιέχουν τέσσερα βασικά στοιχεία.

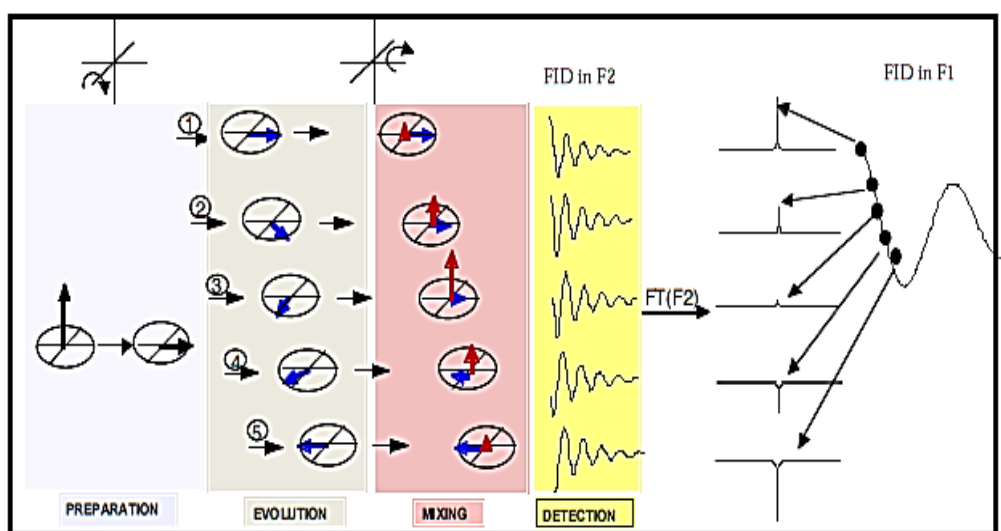
Αρχικά υπάρχει ένα χρονικό διάστημα (preparation period) κατά το οποίο επιτελείται η διέγερση του πυρήνα A. Στην περίπτωση της ομοπυρηνικής συσχέτισης μεταξύ πρωτονίων το βήμα αυτό αποτελείται από έναν παλμό 90°. Εδώ πραγματοποιείται η μεταφορά της μαγνήτισης στο επίπεδο xy.¹²⁹

Στη συνέχεια, ακολουθεί ένα χρονικό διάστημα (evolution period) στο οποίο επιτυγχάνεται η αποτύπωση του σήματος στην έμμεση διάσταση (άξονας F1). Η συλλογή και καταγραφή του σήματος γίνεται όπως και στην άμεση διάσταση. Η διαφορά έγκειται στο ότι τα σημεία πλέον συλλέγονται σε διαφορετικά 1D πειράματα. Κατά την διάρκεια του πειράματος δύο διαστάσεων, μία σειρά από φάσματα 1D καταγράφεται. Σε κάθε ένα από αυτά αλλάζει, συγκεκριμένα αυξάνεται, ο χρόνος στον οποίο επιτρέπεται στην παρατηρούμενη μαγνήτιση να περιστραφεί περί του άξονα z. Έτσι αναλόγως του χρόνου, τροποποιείται η ένταση του σήματος που τελικά ανιχνεύεται στον άξονα z. Από τις διαδοχικές FIDs που προκύπτουν αυξανόμενου του χρόνου περιστροφής, η συχνότητα στον έμμεσο άξονα δειγματοποιείται με ανάλογο τρόπο με αυτόν στον άμεσο άξονα. Τα σήματα αυτά οδηγούν στις κορυφές της διαγωνίου.

Το επόμενο βήμα αποτελεί η μεταφορά της μαγνήτισης από τον πυρήνα A στον πυρήνα B (mixing process). Τα είδη πειραμάτων δύο διαστάσεων διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ των πυρήνων. Σε ένα πείραμα ομοπυρηνικής σύζευξης πρωτονίων (COSY), στο βήμα αυτό, ένας παλμός 90° προκαλεί μεταφορά μαγνήτισης μεταξύ πυρήνων οι οποίοι εμφανίζουν μεταξύ τους σύζευξη.¹²⁴ Τέλος επιτελείται καταγραφή της FID (detection period). Οι παραπάνω διεργασίες συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα.¹²⁹

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων για ποσοτικούς σκοπούς πλεονεκτεί έναντι της φασματοσκοπίας μίας διάστασης λόγω της δυνατότητας διάκρισης σημάτων τα οποία στην τελευταία επικαλύπτονται.¹²⁹

Η ποσοτικοποίηση με χρήση της φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων επιτυγχάνεται με τρόπο αντίστοιχο με την φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης. Ωστόσο, υπάρχει μία ουσιαστική διαφορά. Στα φάσματα NMR δύο διαστάσεων δεν υπάρχει άμεση αντιστοίχιση μεταξύ του σήματος μίας κορυφής και της ποσότητας του αναλύτη, όπως συμβαίνει στην μία διάσταση. Αυτό αιτιολογείται από την επίδραση πολλών παραγόντων στη διαμόρφωση του όγκου μίας κορυφής όπως ο τρόπος αποδιέγερσης, η πολλαπλότητα της κορυφής και το μέγεθος της σταθεράς σύζευξης. Παρόλ' αυτά ο όγκος της κορυφής διασταύρωσης παρουσιάζει γραμμική εξάρτηση από τη συγκέντρωση του αναλύτη. Έτσι για να επιτευχθεί ποσοτικοποίηση με την χρήση φασματοσκοπίας NMR δύο διαστάσεων είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την χρήση προτύπων ουσιών και εσωτερικού προτύπου. Στη συνέχεια μετρώντας την αναλογία του όγκου της κορυφής του αναλύτη ως προς τον αντίστοιχο του εσωτερικού προτύπου σε άγνωστα δείγματα, είναι δυνατή η αντιστοίχιση σε συγκεκριμένη ποσότητα αναλύτη μέσω της καμπύλης αναφοράς.



Εκτός από την ανάγκη κατασκευής καμπύλης αναφοράς υπάρχει ακόμη ένας περιορισμός στη χρήση αυτής της τεχνικής. Η εγγενής μικρή ευαισθησία της τεχνικής έχει ως συνέπεια την αύξηση του χρόνου λήψης του φάσματος (από μερικά λεπτά έως κάποιες ώρες), προκειμένου να γίνει η λήψη κατάλληλου αριθμού φασμάτων μίας διάστασης με αυξανόμενους χρόνους t_1 . Ο περιορισμός αυτός μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση σύγχρονων τεχνικών (ultrafast single-scan 2D method).¹²⁹

3.2.6 Εφαρμογές της ποσοτικής φασματοσκοπίας 2D NMR

Η ποσοτική φασματοσκοπία NMR 2D παρουσιάζει μεγάλη εφαρμοσιμότητα σε αρκετούς τομείς της αναλυτικής χημείας. Συγκριτικά με το ποσοτικό 1D NMR, είναι πιο απαιτητική τεχνική όσον αφορά σε θέματα ρύθμισης των πειραματικών παραμέτρων, επεξεργασίας του φάσματος και κόστους του χρόνου ανάλυσης. Ωστόσο ένα πείραμα NMR δύο διαστάσεων δύναται να παρέχει σημαντικά βελτιωμένη ευαισθησία ώστε να

προκύπτουν ακόμη μικρότερα όρια ανίχνευσης. Χάρη στην καλύτερη διάκριση των σημάτων επιτυγχάνεται επίσης σημαντικά βελτιωμένη γραμμικότητα και ακρίβεια. Τέλος πλεονεκτεί έναντι του 1D NMR, στην ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων και μορίων μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Έτσι ενώ το ποσοτικό NMR μίας διάστασης εξακολουθεί να παραμένει μία τεχνική ευρέως χρησιμοποιούμενη για πειράματα ρουτίνας, το 2D NMR έρχεται να παρέχει λύσεις εκεί όπου η χρήση του πρώτου είναι περιορισμένη.¹²⁹

Η φασματοσκοπία NMR 2D βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην ποσοτική ανάλυση φυσικών προϊόντων και στην μεταβολομική. Για την ανάλυση φυτικών και ζωικών μεταβολιτών έχουν χρησιμοποιηθεί τα ακόλουθα πειράματα δύο διαστάσεων: 2D J-resolved, COSY, TOCSY και HSQC.^{129, 130}

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται στην ανάλυση τροφίμων και στον έλεγχο ποιότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση πειραμάτων 2D J-resolved NMR για την ανάλυση διαφόρων τύπων μύρας και η χρήση του πειράματος HSQC στην ανάλυση οργανικών ουσιών στο γάλα.^{124, 125, 112, 113} Εκτός από την ανάλυση σχετικά μικρών μορίων, το ποσοτικό NMR δύο διαστάσεων βρίσκει επίσης εφαρμογή στην ανάλυση πολυμερών φυτικής προέλευσης όπως η λιγνίνη, με τη χρήση πειραμάτων HSQC και HETCOR.^{129, 113}

Τέλος, η ανάλυση διαφόρων τύπων λαδιών αποτελεί έναν τομέα στον οποίο η χρήση του NMR (1H-NMR, 13C-NMR) είναι διαδεδομένη. Σε μικρότερο βαθμό γίνεται χρήση της φασματοσκοπίας NMR 2D (TOCSY, 2D INEPT, HSQC).^{112, 113, 129}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Ερευνητικοί στόχοι της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική μελέτη εκπονήθηκε στα ακαδημαϊκά έτη 2017 – 2018 με τους εξής ερευνητικούς στόχους:

A. Την ανάπτυξη μιας πρωτότυπης μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής trans-ρεσβερατρόλης και πιο συγκεκριμένα των ολικών trans-ρεσβερατρολοιδών (δηλαδή των ολικών παραγώγων της trans-ρεσβερατρόλης) σε οίνους με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR.

B. Το προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης σε χαρακτηριστικές ερυθρές ποικιλίες που καλλιεργούνται στην ελληνική επικράτεια και τη σύγκριση των συγκεντρώσεων που προσδιορίστηκαν με προηγούμενες αναλύσεις που έχουν γίνει με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η προκατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Οινολογίας του τομέα Βιομηχανικής Χημείας του Χημικού Τμήματος Αθήνας, ενώ η ανάπτυξη της μεθόδου και η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στη Φαρμακευτική Σχολή Αθήνας.

4.2 Ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού ολικής ρεσβερατρόλης με φασματοσκοπία NMR

Η χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη τα τελευταία χρόνια για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε διάφορα τρόφιμα, όπως για παράδειγμα στο ελαιόλαδο. Η φασματοσκοπία NMR παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης φαινολικών συστατικών σε τρόφιμα και ποτά για τον ερευνητή καθώς είναι αρκετά σύντομη, δεν απαιτείται σημαντική προκατεργασία των δειγμάτων πριν την ανάλυση, επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση των πολυφαινολικών ενώσεων ακόμα και χαμηλής συγκέντρωσης, καθώς επίσης είναι σημαντικό ότι η ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών, μπορεί να υποστηριχθεί από μια σειρά ενημερωμένων λογισμικών και βάσεων δεδομένων. Επίσης η χρήση διδιάστατης φασματοσκοπίας NMR, όπως τα πειράματα COSY, TOCSY, HSQs, HMBS, επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό νέων μεταβολιτών.¹²⁹

Για τους λόγους αυτούς οι εφαρμογές της φασματοσκοπίας NMR έχουν επεκταθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια και μπορούν να προσφέρουν σημαντικά οφέλη σε συνδυασμό με τις παλαιότερες μεθόδους ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού πολυφαινολών σε τρόφιμα και ποτά όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Επιπρόσθετα η φασματοσκοπία NMR έχει σημαντικές εφαρμογές στην ανίχνευση της νοθείας και της γεωγραφικής προέλευσης σε τρόφιμα και ποτά. Η μέθοδος SNIF-NMR που ανακαλύφθηκε από τον Καθηγητή Gerard Martin χρησιμοποιείται ήδη για τον έλεγχο της αυθεντικότητας μεγάλου αριθμού προϊόντων ή μορίων στα οποία περιλαμβάνονται: α) οι οίνοι και τα αλκοολούχα ποτά, β) οι χυμοί των φρούτων και γ) αρωματικές και άλλες ουσίες (βαλίνη, ανιθόλη, καφεΐνη κ.α.).¹³⁰

Η φασματοσκοπία NMR έχει εφαρμοστεί για ανάλυση και ταξινόμηση σταφυλιών και οίνων σύμφωνα με τη γεωγραφική προέλευση, την ποικιλία και το τρύγο^{117,118,119} καθώς και μεταβολιτών κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.^{120,121,122} Πρόσφατα έχει αναφερθεί μια μέθοδος NMR-PCA για την ταξινόμηση των οίνων βάσει του προφίλ των πρωτευνόντων συστατικών τους (αμινοξύ και ζάχαρη κ.λπ.) χωρίς κανένα ή με ελάχιστο δείγμα παρασκευή (10, 18-20).^{123,124,125} Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η φαινολική σύνθεση των οίνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μεταβολική δακτυλικό

αποτύπωμα για την κατάταξη των οίνων ανάλογα με την ποικιλία, το τρύγο και το χρώμα (22, 23).^{102,126, 127}

Πρόσφατα προτάθηκε από τους Anastasiadi, Magiati et. al.¹⁰² μια απλή και ευαίσθητη μέθοδος ταξινόμησης των κρασιών σύμφωνα με την ποικιλία, τη γεωγραφική προέλευση και τον τρύγο (έτος συγκομιδής) με βάση την NMR μεταβολομική ανάλυση.¹²⁸ Η χημειομετρική ταξινόμηση των οίνων σύμφωνα με το φαινολικό τους προφίλ επιτρέπει διάκριση μεταξύ οίνων από διαφορετικά οινοποιεία της ίδιας οινοπαραγωγικής ζώνης και μεταξύ των διαφόρων ετών συγκομιδής για οίνους της ίδιας ποικιλίας. Η μέθοδος αυτή όπως προτάθηκε μας δείχνει τα πλεονεκτήματα της χρήσης της φασματοσκοπίας NMR στην ανάλυση πολυφαινολών σε οίνους.¹⁰²

Αν και στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν δημοσιευτεί ορισμένες μεταβολομικές μελέτες πάνω στο φαινολικό προφίλ των οίνων με εφαρμογή της φασματοσκοπίας NMR, δεν έχει αναπτυχθεί μέχρι σήμερα (από την βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε) μια μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης σε κρασιά με χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Συνεπώς βασικός στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της ολικής trans-ρεσβερατρόλης σε κρασιά με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR, και στη συνέχεια, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της trans-ρεσβερατρόλης σε χαρακτηριστικές ερυθρές ποικιλίες που καλλιεργούνται σε ελληνικούς αμπελώνες.

4.3 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα δείγματα κρασιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από 10 ετικέτες ελληνικών ερυθρών κρασιών από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Στο παρακάτω Πίνακα 3 παρατίθενται γενικά στοιχεία για το κάθε δείγμα κρασιού όπως: 1. κωδικός δείγματος, 2. Ετικέτα κρασιού, 3. Ποικιλία, 4. Περιοχή, 5. Υψόμετρο, 6. Χαρακτηριστικά οινοποίησης-παλαίωσης και 7. Αλκοολικοί βαθμοί. Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C στο σκοτάδι και αναλύθηκαν αμέσως μετά το άνοιγμα της φιάλης.

Για την προσυγκέντρωση των φαινολικών συστατικών έγινε χρήση τεχνικής προσρόφησης σε ρητίνη Amberlite XAD-4. Έγινε χρήση της τεχνικής στήλης και οι διαλύτες έκπλυσης και αναγέννησης ήταν αντίστοιχα H₂O και MeOH.

Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των πολυφαινολών ήταν της εταιρίας J. T. Baker. Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένος διαλύτης D₂O καθαρότητας 99.9 % που αγοράστηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich, ενώ το απεσταγμένο νερό παρασκευάστηκε από συσκευή απόσταξης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ρεσβερατρόλη που αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich καθαρότητας 99.9 %.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ρεσβερατρόλης επετεύχθη με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευή 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy).

4.4 Προαναλυτικές διεργασίες

4.4.1 Προκατεργασία του δείγματος

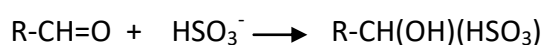
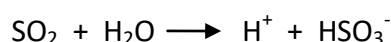
Για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος από τα δείγματα κρασιού ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

- Αρχικά πήραμε 150 mL δείγματος κρασιού και το αραιώσαμε με τον κατάλληλο όγκο απεσταγμένου νερού έτσι ώστε ο τελικός αλκοολικός βαθμός να είναι 5 % v/v. Η προκατεργασία αυτή γίνεται έτσι ώστε η αιθανόλη να μην παρασύρει τις πολυφαινολικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης της trans-ρεσβερατρόλης κατά τη διέλευση του δείγματος από τη στήλη, για να μπορέσει έτσι η ρητίνη να κατακρατήσει το φαινολικό κλάσμα.
- Στη συνέχεια το αραιωμένο διάλυμα που προέκυψε το περάσαμε μέσα από την υάλινη στήλη. Η στήλη ήταν πληρωμένη με 15g ρητίνη XAD 4. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στα 1.5 mL/min.
- Η στήλη πριν την έκλουση είχε καθαριστεί προσεκτικά με 30 mL EtOH και 30mL απεσταγμένου νερού.
- Μετά τη διέλευση του δείγματος, τοποθετήσαμε φούσκα στο πάνω μέρος της στήλης και εφαρμόσαμε ρεύμα αέρα για να παρασυρθούν και οι τελευταίες σταγόνες. Αφού έγινε η έκλουση του δείγματος, η στήλη ξεπλύθηκε με νερό προκειμένου να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και στεγνώθηκε με αέρα.
- Στη συνέχεια το φαινολικό κλάσμα συλλέχθηκε με έκλουση της στήλης με 60 mL MtOH με ρυθμό ροής 1.5 mL/min και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στους 40 °C μέχρι ξηρού στο περιστροφικό εξατμιστή (rotavap).
- Το δείγμα έπειτα τοποθετήθηκε στην αντλία κενού για περίπου 10 λεπτα, για την απομάκρυνση τυχόν υγρασίας. Η φιάλη με το φαινολικό κλάσμα

ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε στη κατάψυξη με τον κωδικό του δείγματος αφού πρώτα την πωματίσαμε με parafilm.

Προκατεργασία με ακεταλδεύδη

- Στη συνέχεια προσθέσαμε 505 μL ακεταλδεύδης σε ακετονιτρίλιο (αναλογίας 1:100) και το εξατμίσαμε στον περιστροφικό εξατμιστή (rotavap) και έπειτα το τοποθετήσαμε ξανά στην αντλία κενού για περίπου 10 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθούν η υγρασία και τυχόν υπολείμματα διαλύτη.
- Αυτό γίνεται ώστε τυχόν ποσότητες θειώδους ανυδρίτη που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα να μην αντιδράσουν με το εσωτερικό πρότυπο που είναι μια αλδεύδη αλλά αντίθετα με την ακεταλδεύδη (βλ. παρακάτω αντίδραση). Αν το εσωτερικό πρότυπο αντιδράσει με τα θειώδη, το υδρογόνο της αλδεϋδομάδας θα συντονίζεται σε διαφορετική συχνότητα και θα έχει διαφορετική χημική μετατόπιση (από τα 9.7 στα 5.5 ppm).



Εισαγωγή εσωτερικού προτύπου και μέτρηση του δείγματος

- Στη συνέχεια προσθέσαμε το εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση της trans-ρεσβερατρόλης. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήσαμε την συριγγαλδεύδη (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde). Συγκεκριμένα προσθέσαμε με τη βοήθεια μικροπιπέτας 500 μL διαλύματος συριγγαλδεύδης σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης 0.5 mg/L και έπειτα εξατμίσαμε στο περιστροφικό εξατμιστή και τέλος στην αντλία κενού για περίπου 10 min.
- Τέλος, το κάθε δείγμα διαλύθηκε σε 700 μL δευτεριωμένης μεθανόλης και μεταφέρθηκε με τη βοήθεια υάλινου σταγονόμετρου προκειμένου σε σωληνάκι NMR για να γίνει η λήψη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ και COSY-NMR με τη βοήθεια φασματογράφου NMR 400 MHz.



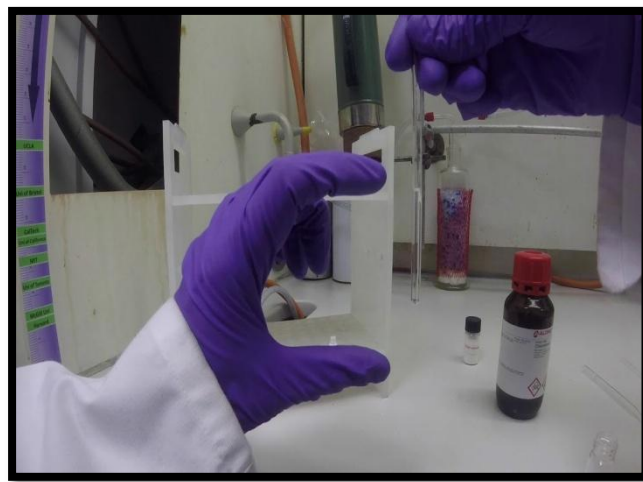
Εικόνα 11: Έκλουση του δείγματος από την υάλινη στήλη που είναι πληρωμένη με τη ρητίνη XAD-4



Εικόνα12: Εξάτμιση του διαλύτη (μεθανόλη) από το φαινολικό κλάσμα στο rotavap



Εικόνα 13: Αντλία κένου



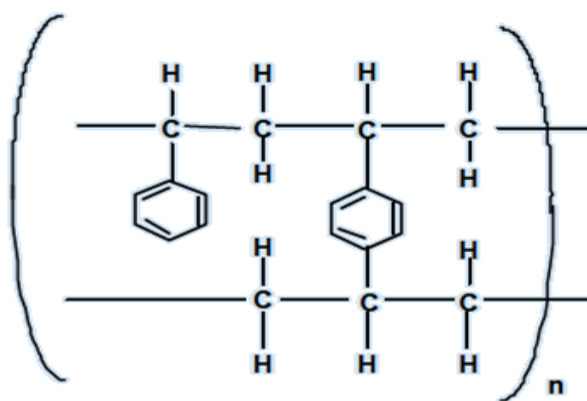
Εικόνα14: Μεταφορά του δείγματος στο σωληνάκι του NMR

4.4.2 Ρητίνες προσρόφησης

Οι ρητίνες προσρόφησης αποτελούνται από μικρά, πορώδη και αδιάλυτα στο νερό και στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες, σφαιρίδια τα οποία σχηματίζονται γενικά κατά τον συμπολυμερισμό styrolίου και διβινυλοβενζολίου. Η ύπαρξη του διβινυλοβενζολίου (συνήθως ~8%) βοηθά στην διασταυρούμενη σύνδεση, η οποία προσδίδει στα σωματίδια μηχανική σταθερότητα. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πολυμερών ρητινών οι οποίες διαφέρουν ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και έχουν την δυνατότητα προσρόφησης διαφορετικών μορίων (π.χ. XAD-4, XAD-7, XAD-16 κλπ).¹²⁹

Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η ρητίνη προσρόφησης XAD-4, η οποία έχει προταθεί σε παλαιότερη μεταβολομική μελέτη πάνω στο φαινολικό προφίλ σε οίνους (Anastasiadi M, Magiatis Pr. et. al.¹⁰²) για τα συγκριτικά της πλεονεκτήματα στην προσρόφηση των φαινολικών ενώσεων. Σύμφωνα με τη μελέτη των Anastasiadi et. al.¹⁰² τα φάσματα ¹H NMR των εκχυλισμάτων οίνου που παρασκευάστηκαν από τρεις διαφορετικούς τύπους ρητινών αποκάλυψαν ότι το δείγμα που λήφθηκε από εκχύλιση XAD-4 έδειξε μια αρωματική φασματική περιοχή με σαφώς πιο έντονες κορυφές και καλύτερη σχέση σήματος προς τον θόρυβο σε σύγκριση με τα φάσματα που ελήφθησαν με τις ρητίνες από τα XAD-7HP και XAD-16. Το χαμηλότερο πλάτος σήματος που παρατηρήθηκε για το εκχύλισμα XAD-4 είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μικρότερη επικάλυψη και καλύτερη ανάλυση.¹⁰²

Η ρητίνη XAD-4 αποτελεί έναν πολυμερικό προσροφητή, ο οποίος διατίθεται υπό την μορφή λευκών αδιάλυτων σφαιριδίων. Είναι ένα μη ιονικό, διασταυρούμενο πολυμερές το οποίο οφείλει τις προσροφητικές του ιδιότητες στην μακροδικτυωτή δομή του, στην μεγάλη επιφάνεια που διαθέτει και στην αρωματική φύση που χαρακτηρίζει την επιφάνεια του. Η δομή αυτή εξασφαλίζει εξαιρετική φυσική, χημική και θερμική σταθερότητα. Η ρητίνη XAD-4 χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την προσρόφηση οργανικών ενώσεων σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους από υδατικά διαλύματα.¹⁰³



Σχήμα 26: Χημική δομή της ρητίνης προσρόφησης XAD-4¹²⁹

Ο μηχανισμός προσρόφησης των οργανικών μορίων στην επιφάνεια της ρητίνης στηρίζεται κυρίως σε δυνάμεις Van der Waals. Η ρητίνη XAD-4 αποτελείται από τη συνεχή φάση του πολυμερούς και από μία πορώδη φάση. Ο αρωματικός και υδρόφοβος χαρακτήρας της ρητίνης προκαλεί την ανάπτυξη ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων της

και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών ενώσεων. Έτσι το υδρόφοβο τμήμα του μορίου προσροφάται στην υδρόφοβη επιφάνεια ενώ το υδρόφιλο προσανατολίζεται στην υδατική φάση. Η εκλεκτικότητα και η έκταση της προσρόφησης οργανικών ουσιών στις ρητίνες αυξάνει με την αύξηση της υδροφοβικότητας του οργανικού μορίου.¹⁰³

Η τεχνική της προσυγκέντρωσης με τη χρήση ρητίνης επιτυγχάνεται με δύο τρόπους, με την τεχνική της στήλης και την τεχνική του λουτρού. Αν και η τεχνική του λουτρού είναι πιο απλή, επιλέχθηκε η τεχνική στήλης καθώς στην περίπτωση αυτή συμβαίνουν πολυάριθμες τεχνικές λουτρού στα επάλληλα στρώματα της ρητίνης και έτσι η προσροφητική ικανότητα της ρητίνης μπορεί να καταστεί ποσοτική. Στην περίπτωση της τεχνικής στήλης τα βήματα που ακολουθούνται περιλαμβάνουν : 1) την διαβίβαση του υδατικού δείγματος μέσω της στήλης κατά την οποία πραγματοποιείται προσρόφηση των μορίων εκείνων που παρουσιάζουν συγγένεια ως προς τη ρητίνη ενώ εκείνα που δεν αλληλεπιδρούν με τη ρητίνη απομακρύνονται μαζί με το διάλυμα που διέρχεται, 2) την εκρόφηση των μορίων που έχουν προσροφηθεί με τη χρήση κάποιου ή κάποιων διαλυτών έκλουσης κατά προτίμηση τμηματικά. Το δεύτερο βήμα αποτελεί τη διαδικασία αναγέννησης της ρητίνης μετά το οποίο είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίησή της.¹⁰³



Εικόνα 15 & 16: Προσυγκέντρωση των πολυφαινολικών ενώσεων με χρήση της ρητίνης XAD

4.4.3 Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της trans-ρεσβερατρόλης

Σε αυτή την ενότητα θα περιγράψουμε τα βήματα που έγιναν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς με εξαιρετική γραμμικότητα με την χρήση φασματοσκοπίας NMR τόσο μίας όσο και δύο διαστάσεων. Πρωταρχικός στόχος ήταν τα πρότυπα διαλύματα να προσομοιάζουν φυσικοχημικά, στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό, με τα δείγματα κρασιού που αναλύθηκαν. Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων trans-ρεσβερατρόλης με συγκεντρώσεις 0.1 mg/L, 0,25 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L και 1.5 mg/L ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων trans-ρεσβερατρόλης πρώτα παρασκευάσαμε ένα αρχικό διάλυμα trans-ρεσβερατρόλης σε αιθανόλη. Αρχικά ζυγίστηκε ποσότητα 5 mg ρεσβερατρόλης και μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και διαλύθηκε σε αιθανόλη μέχρι τη χαραγή.
- Στη συνέχεια προετοιμάσαμε τα πρότυπα διαλύματα trans-ρεσβερατρόλης με συγκεντρώσεις 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 και 1.5 mg/L, με 5 % v/v περιεκτικότητα σε αιθανόλη.
- Στη συνέχεια ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία που έγινε και με τα άγνωστα δείγματα. Αρχικά, το κάθε πρότυπο διάλυμα, το περάσαμε αμέσως από την υάλινη στήλη που ήταν πληρωμένη με 15g ρητίνη XAD 4. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στα 1.5 mL/min.
- Η στήλη πριν την έκλουση είχε καθαριστεί προσεκτικά με 30 mL EtOH και 30mL απεσταγμένου νερού.
- Μετά την έκλουση του δείγματος, η στήλη ξεπλήθηκε με νερό και στεγνώθηκε με αέρα, όπως ακριβώς έγινε και κατά την προκατεργασία των δειγμάτων.
- Στη συνέχεια το φαινολικό κλάσμα συλλέχθηκε με έκλουση της στήλης με 60 mL MtOH με ρυθμό ροής 1.5 mL/min και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στους 40 °C μέχρι ξηρού στο περιστροφικό εξατμιστή (rotavap).
- Το δείγμα έπειτα τοποθετήθηκε στην αντλία κενού για περίπου 10 λεπτά, για την απομάκρυνση τυχόν υγρασίας.
- Στη συνέχεια προσθέσαμε 500 μ L ακετονιτρίλιο και έπειτα με ειδική σύριγγα 5 μ L ακεταλδεϋδη και το εξατμίσαμε μέχρι ξηρού στο περιστροφικό

εξατμιστή (rotavap) και έπειτα το τοποθετήσαμε ξανά στην αντλία κενού για περίπου 10 λεπτά.

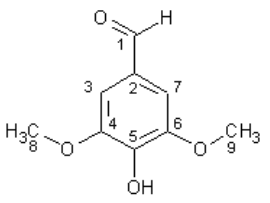
- Τέλος, το κάθε δείγμα διαλύθηκε σε 700 μL δευτεριωμένης μεθανόλης και μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση NMR.

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της ρεσβερατρόλης επετεύχθη με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε συσκευή 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy).

Ακολούθως περιγράφεται η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για τα πρότυπα διαλύματα trans-ρεσβερατρόλης με χρήση NMR δυο διαστάσεων. Για κάθε ένα από αυτά κατασκευάζεται εξίσωση παλινδρόμησης ($y=ax+b$), η οποία συσχετίζει τη μάζα (x) σε mg που χρησιμοποιήθηκε στο εκάστοτε πρότυπο διάλυμα με την αναλογία (y) σήματος αναλυτή προς το σήμα του εσωτερικού προτύπου. Συγκεκριμένα η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του εσωτερικού προτύπου λαμβάνει την τιμή ένα. Στη συνέχεια η σταθερά ολοκλήρωσης της κορυφής του αναλυτή αντιστοιχίζεται στην μάζα του αναλυτή προκειμένου να κατασκευαστεί η εξίσωση παλινδρόμησης. Έτσι σε ένα άγνωστο διάλυμα υπολογίζοντας την αναλογία αυτή γίνεται άμεσα αντιστοίχιση στη μάζα του αναλυτή μέσω της εξίσωσης παλινδρόμησης.

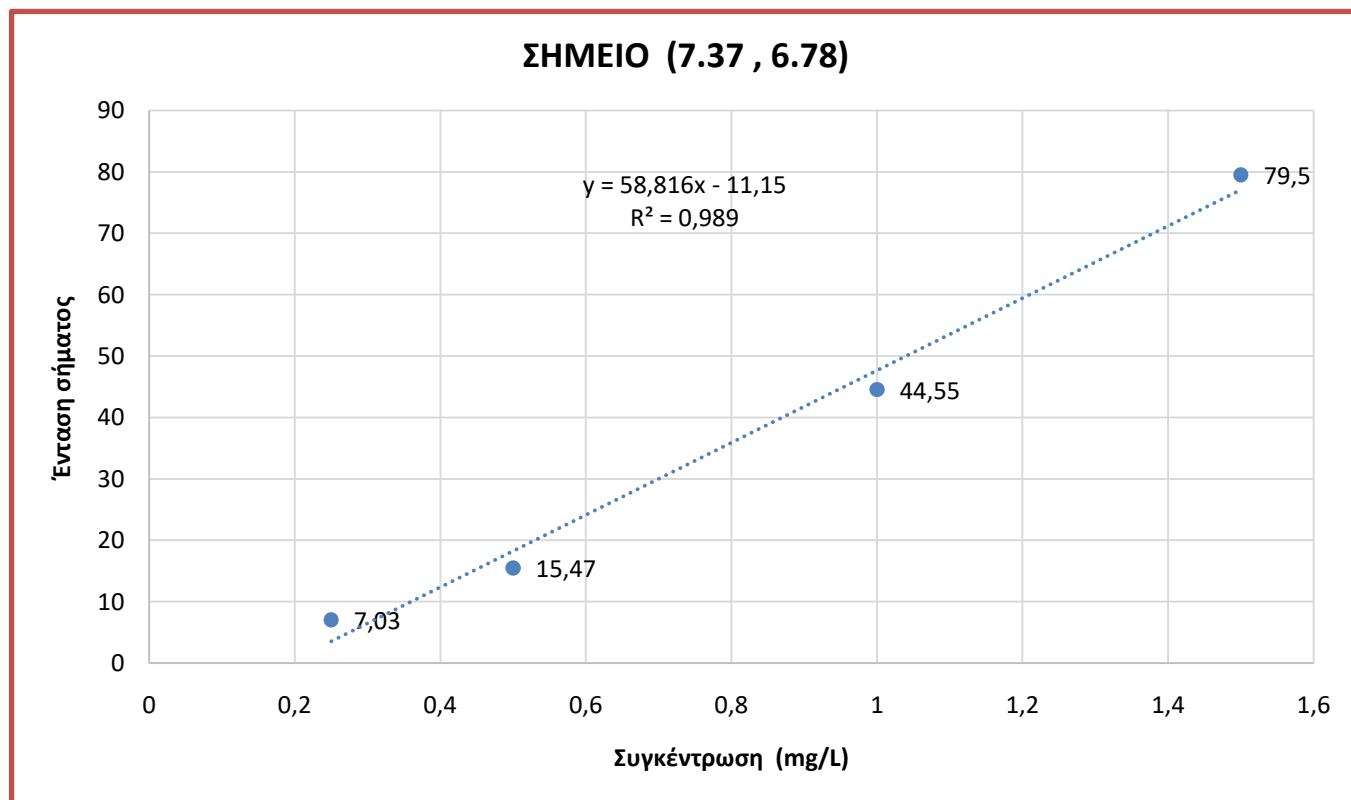
Εδώ αξίζει να σημειώσουμε από τα σημεία (7.10, 6.64) και (6.64, 7.10) μπορεί να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής cis-ρεσβερατρόλης στα άγνωστα δείγματα, εφόσον βέβαια έχουν παρασκευαστεί τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα cis-ρεσβερατρόλης και έχει φτιαχτεί καμπύλη αναφοράς. Αυτό όμως που παρατηρήσαμε είναι ότι τα φάσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν πιο πολύπλοκα και είχαμε αλληλεπικάλυψη των κορυφών της cis-ρεσβερατρόλης με κορυφές άλλων φαινολικών ενώσεων. Έτσι δε κατέστη δυνατό να διακρίνουμε τα σημεία (7.10, 6.64) και (6.64, 7.10) που αντιστοιχούν στη cis-ρεσβερατρόλη ώστε να την ποσοτικοποιήσουμε. Η ποσοτικοποίηση θα ήταν εφικτή μόνο εάν απομονώναμε την trans- και cis- ρεσβερατρόλη από τις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις.

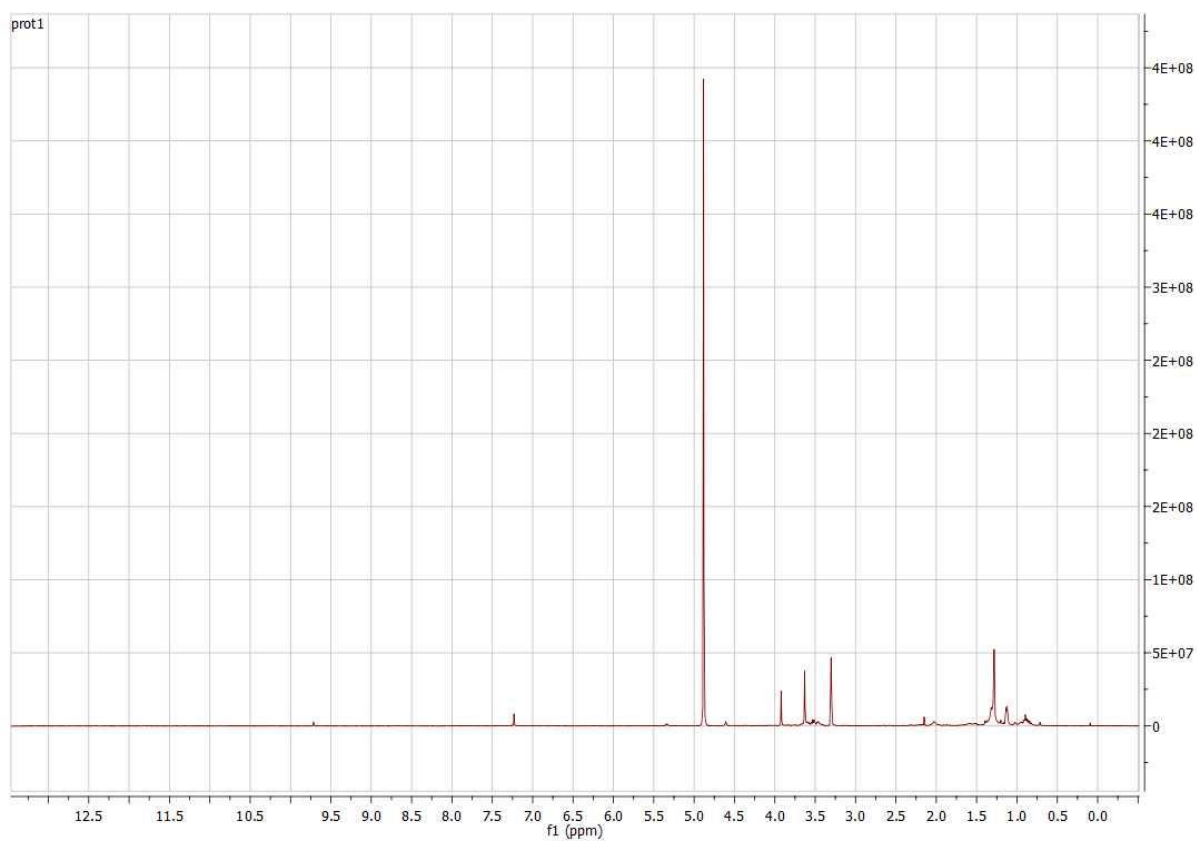
Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε για τη ποσοτικοποίηση της trans-ρεσβερατρόλης ήταν η συριγγαλδεΐδη ή (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde).

	Άτομο	¹ H-NMR (δ ppm, J Hz)
	1	9,75 (1H,s)
	3,7	7.27 (2H,s)
	8,9	3.95 (6H, s)

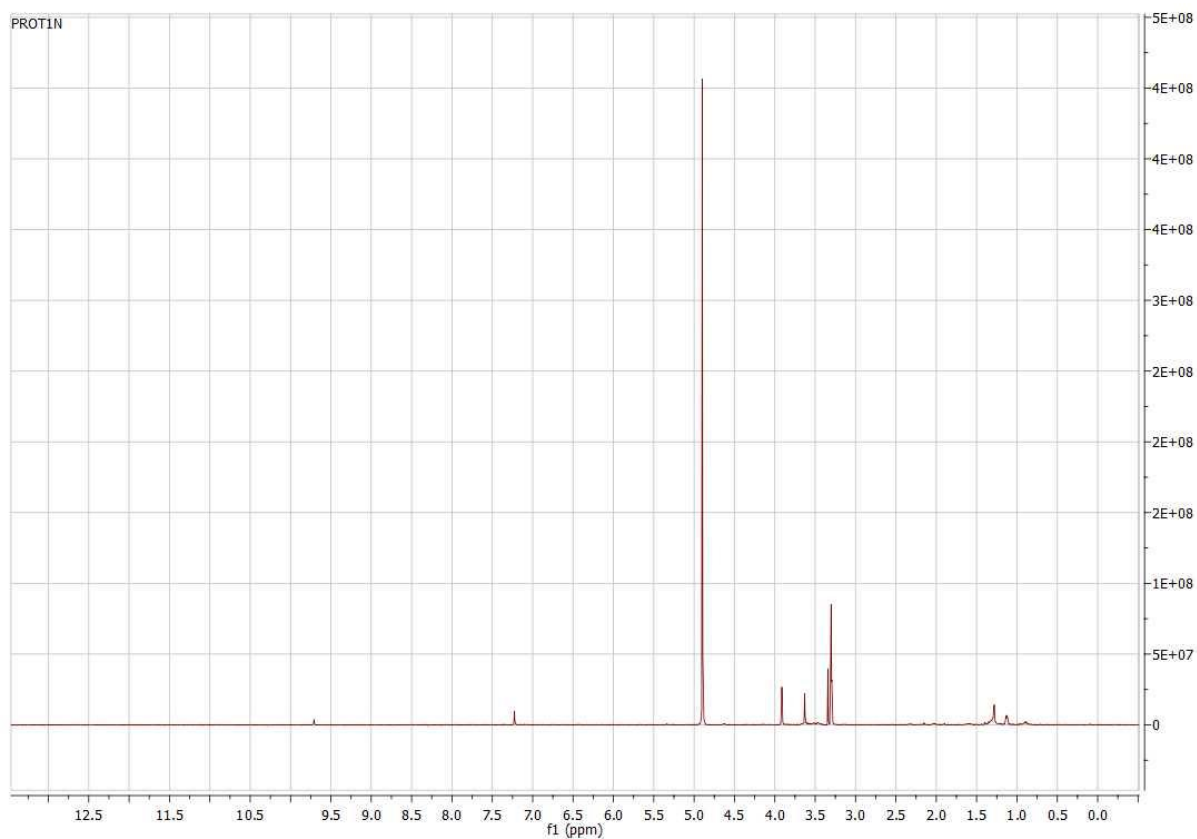
Πίνακας 2: Φασματοσκοπική περιγραφή συριγγαλδεΐδης

Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο πρότυπο ήταν η ιδιαίτερα αποθωρακισμένη χημική μετατόπιση του αλδεϋδικού πρωτονίου 1 στα 9.75 ppm. Στην αλδεϋδική περιοχή δεν υπάρχει επικάλυψη από σήματα άλλων συστατικών και έτσι καθίσταται δυνατή η χρήση του σήματος αυτού για την ποσοτικοποίηση κάθε άλλου συστατικού του μείγματος. Το διάλυμα το οποίο παρασκευάστηκε είχε συγκέντρωση 0.5 mg/mL.

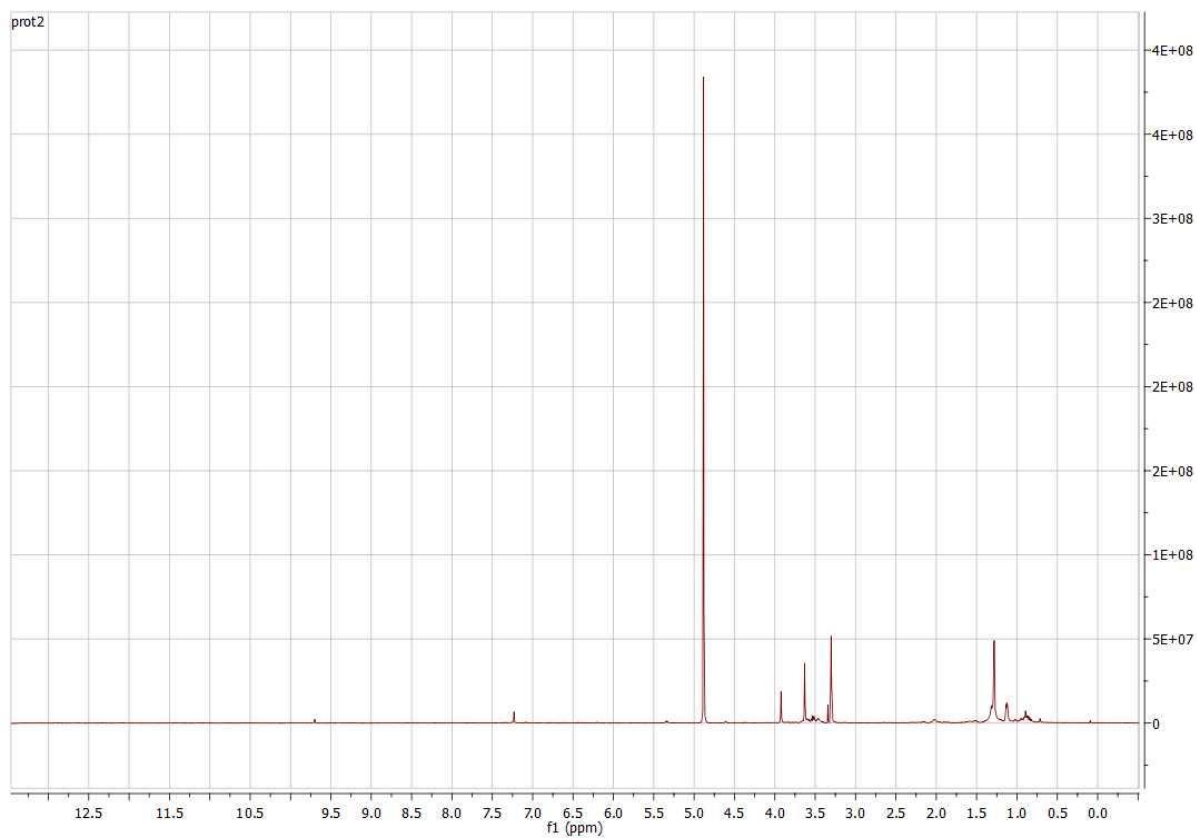




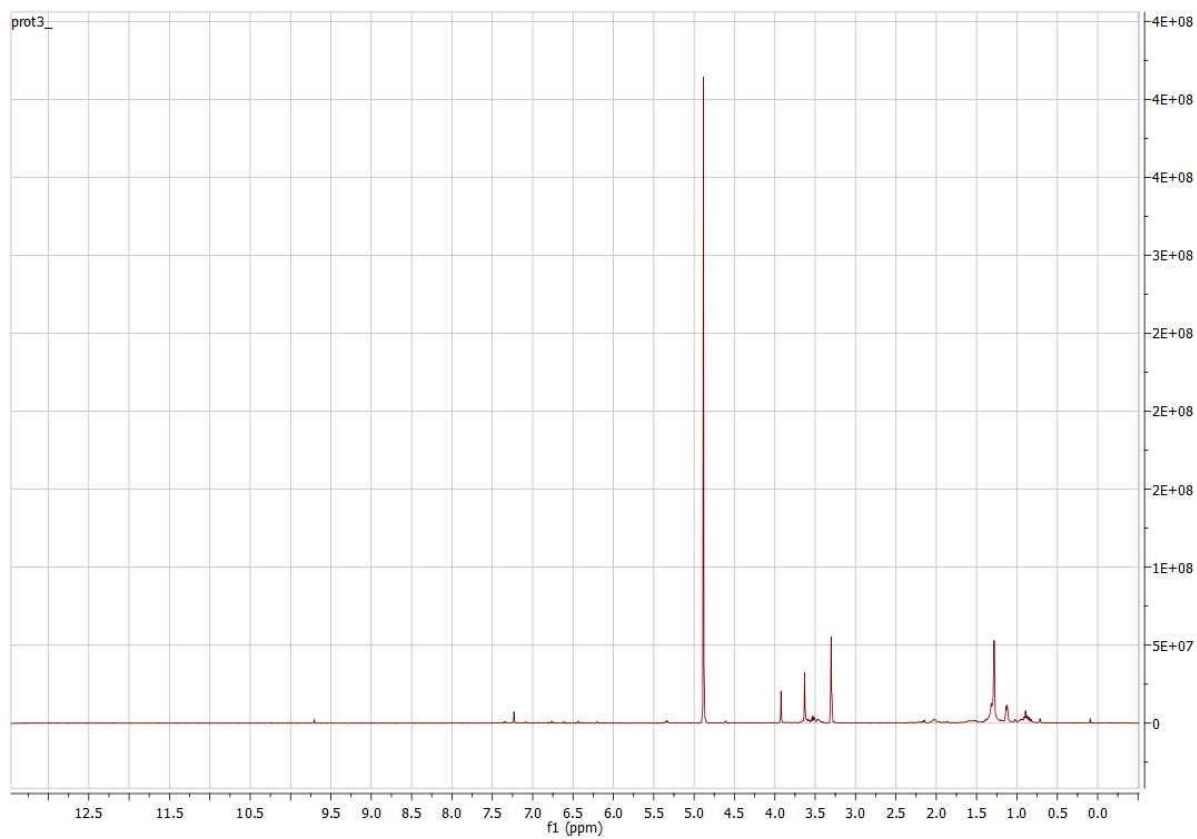
Εικόνα 18: Φάσμα ^1H NMR του PROT1 (MeOD, 400 MHz)



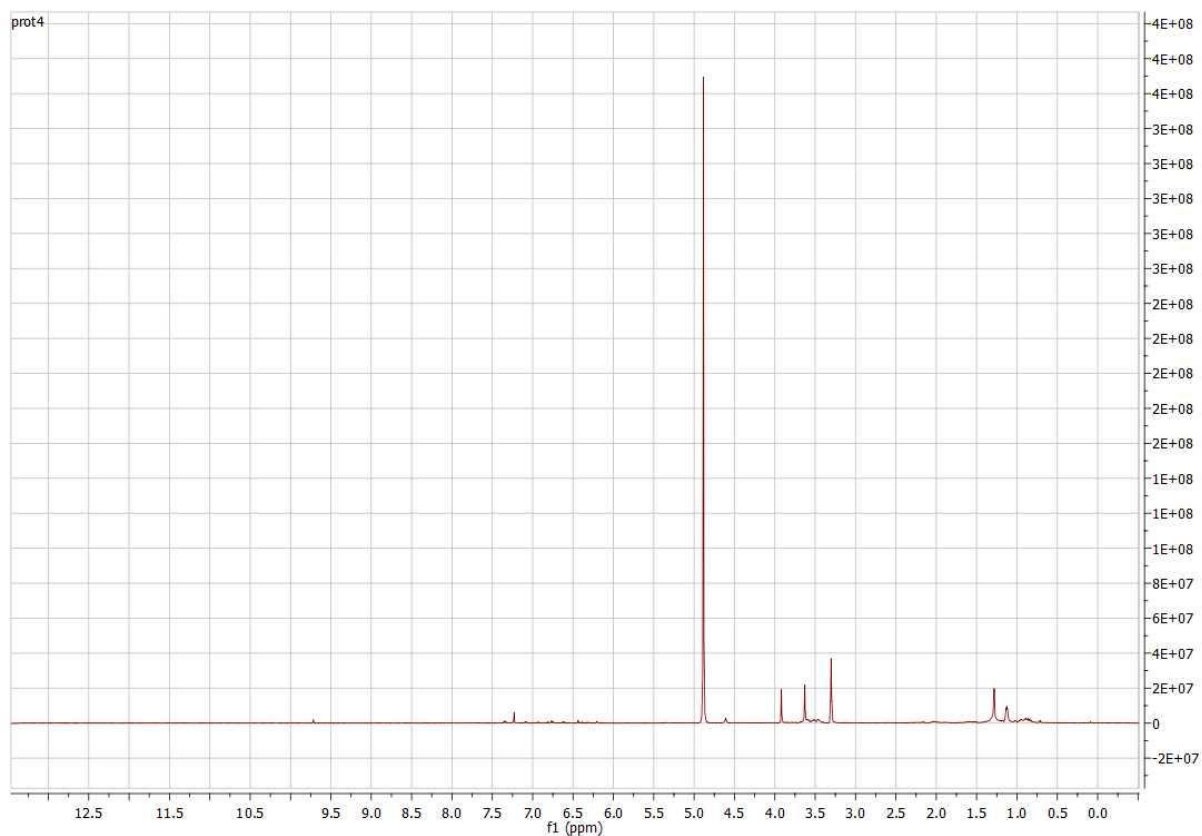
Εικόνα 19: Φάσμα ^1H NMR του PROT1N (MeOD, 400 MHz)



Εικόνα 20: Φάσμα ^1H NMR του PROT2 (MeOD, 400 MHz)



Εικόνα 21: Φάσμα ^1H NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz)



Εικόνα 22: Φάσμα ^1H NMR του PROT3 (MeOD, 400 MHz)

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετρήσεων των πρότυπων διαλυμάτων

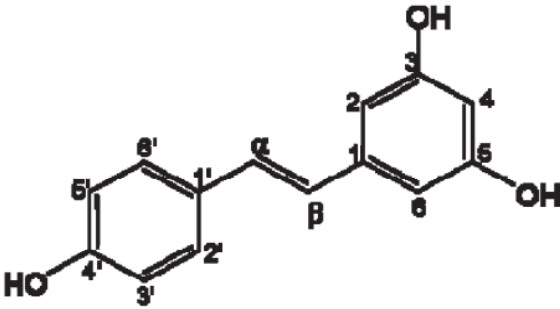
Πρότυπο διάλυμα	Συγκέντρωση trans-ρεσβερατρόλης (mg/L)	Τιμή μέτρησης trans-ρεσβερατρόλης	
		Σημείο (7.37, 6.78)	Σημείο (6.78, 7.37)
PROT 1	0.1	-	-
PROT 1N	0.25	7.03	11.68
PROT2	0.5	15.47	24.89
PROT3	1.0	44.55	65.37
PROT4	1.5	79.50	125.49

4.5 Φασματοσκοπία NMR

Τα φάσματα ^1H καθώς και τα φάσματα δυο διαστάσεων ελήφθησαν σε φασματογράφο Spectrospin 400MHz (συχνότητα συντονισμού 400 MHz) στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Φαρμακευτικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα πειράματα ελήφθησαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συλλέχθηκαν 64 σαρώσεις ενώ σε κάθε σάρωση το σήμα δειγματοληπτήθηκε με 64K σημεία. Το πειραματικό εύρος ήταν 1200 Hz ενώ χρησιμοποιήθηκε 90° -παλμός διέγερσης των πυρήνων ^1H , χρόνος εφησυχασμού 5s και χρόνος μίξης 400ms.

Τα 2D φάσματα τα οποία ελήφθησαν ήταν ομοπυρηνικά COSY. Τα σήματα που καταγράφονται σε ένα 2D φάσμα COSY συσχετίζουν συζευγμένους μέσω δεσμών πυρήνες ^1H . Οι επί της διαγωνίου κορυφές αποτελούν απλά προβολές του φάσματος πρωτονίου, ενώ οι συμμετρικές κορυφές εκτός διαγωνίου οφείλονται στη βαθμωτή σύζευξη μεταξύ των πυρήνων που συσχετίζουν. Τα ομοπυρηνικά φάσματα ελήφθησαν με 2048 πειραματικά σημεία κατά την F2-διάσταση, 256 σημεία κατά την F1-διάσταση και 8-32 σαρώσεις.

Πίνακας 4: Χημική δομή της *trans*-ρεσβερατρόλης και χημικές μετατοπίσεις των ^1H

 <i>trans-resveratrol</i>	Άτομο	$^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, J Hz)
	(d) H2'-H6'	7.35
	H3'-H5'	6.78
	(d) H2-H6	6.45
	(t) H4	6.16

4.6 Επεξεργασία των δεδομένων

Η επεξεργασία των φασμάτων ^1H και των διασδιάστατων φασμάτων NMR έγινε με το πρόγραμμα Mnova NMR (MestReNova /Mestrelab Research). Με τη χρήση του προγράμματος Mnova NMR τα φάσματα διορθώθηκαν ως προς τη φάση και τη γραμμή βάσης και κανονικοποιήθηκαν με βάση τη κορυφή συντονισμού.



Εικόνα 23: Φασματογράφος NMR Spectrospin 400 MHz

Πίνακας 5: Αναλυτικά στοιχεία για το κάθε δείγμα κρασιού που αναλύθηκε (κωδικός, ετικέτα, ποικιλία, υψόμετρο αμπελώνα, χαρακτηριστικά οινοποίησης και αλκοολικοί βαθμοί)

ΔΕΙΓΜΑ	ΕΤΙΚΕΤΑ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΥΨΟΜΕΤΡΟ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ	Αλκοολικοί βαθμοί
ΚΑΚW1	Οινοποιίο Αφ. Icarus 2013 Οίνος: Ερυθρός ξηρός, Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (Π.Γ.Ε.): Ικαρία.	Φωκιανό	Ικαρία / Ράχες	610m	Παράγεται από κλήματα που καλλιεργούνται σε πεζούλες με μικρή στρεμματική απόδοση (500 κιλά/στρέμμα), επιδέχεται παλαίωση τουλάχιστον πέντε χρόνων. Οινοποίηση: Αποβοστρύχωση, προζυμωτική κρυσταλλοποίηση και στη συνέχεια κλασική ερυθρά οινοποίηση (σε ελεγχόμενες συνθήκες και θερμοκρασία μικρότερη των 12°C). Εφαρμογή της μεθόδου πιάζ (ολοκληρωτική εμφύσηση των στέμφυλων) τέσσερις φορές την ημέρα επί 30 λεπτά. Ερυθρός ξηρός και παλαιωμένος για 12 μήνες σε δρύινα βαρέλια «Icarus black»	Αλκοόλ: 13,5 % vol
ΚΑΚW2	Οινοποιίο Αφ. Icarus 2012 Οίνος: Ερυθρός ξηρός, Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (Π.Γ.Ε.): Ικαρία.	Φωκιανό	Ικαρία / Ράχες	610m	Οινοποίηση: Αποβοστρύχωση, προζυμωτική κρυσταλλοποίηση και στη συνέχεια κλασική ερυθρά οινοποίηση (σε ελεγχόμενες συνθήκες και θερμοκρασία μικρότερη των 12°C). Εφαρμογή της μεθόδου πιάζ (ολοκληρωτική εμφύσηση των στέμφυλων) τέσσερις φορές την ημέρα επί 30 λεπτά. Ερυθρός ξηρός και παλαιωμένος για 12 μήνες σε δρύινα βαρέλια «Icarus black»	Αλκοόλ: 13,5 % vol
DAFW1	Οινοποιίο Δ., Δαφνιός, Ερυθρός 2015 Προστατευόμενη Ονομασία Προελεύσεως «ΔΑΦΝΕΣ»	Λιάτικο	Δαφνές - Ηρακλείου Κρήτης	350m	Στις Δαφνές του Ηρακλείου Κρήτης, σε υψόμετρο 350 μέτρων. Η γηγενής ποικιλία «Λιάτικο» βρίσκεται κυρίως στις Δαφνές και προσφέρει ξηρά κρασιά, αλλά και φυσικώς γλυκά λιαστά κρασιά. Κλασική ερυθρή οινοποίηση. Η αλκοολική ζύμωση ξεκινάει για 3 μέρες στους 20°C και έπειτα συνεχίζεται στους 25°C, σε ανοξείδωτες δεξαμενές. Ωρίμασε για 8 μήνες, κατά 50% σε μεγάλα βαρέλια γαλλικού δρυ και κατά 50% σε βαρέλια 225lt τρίτης ή και τέταρτης χρήσης. Υπολειμματικά σάκχαρα: 3,0 gr/lit. Ολική οξύτητα: 7 gr/lit. Ολικό θειώδες: 24 mg/lit	Αλκοόλ: 13% vol

AGIORS1	Οινοποιείο Κτήμα Ρ. Αγιωργίτικο 2016, Οίνος Ερυθρός Ξηρός, Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη Πελοπόννησος, Παλαίωση 6 μηνες σε βαρέλι, Βιολογικής καλλιέργειας	Αγιωργίτικο	Νεμέα	200-600m	Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης Νεμέα Τύπος: Ερυθρός Ξηρός Ποικιλία: Αγιωργίτικο 100% Προέλευση σταφυλιών: Επιλεγμένοι Βιολογικοί Αμπελώνες στις περιοχές Ξερόκαμπος, Ασπρόκαμπος και Αρχαία Νεμέα Παλαίωση: Σε βαρέλια, γαλλικής δρυός, για 6 μήνες.	Αλκοόλ: 12,5 % vol
XINS1	Ε.Α.Σ Αμυνταίου, Αμύνταιον 2013, Οίνος Ερυθρός Ξηρός, Προστατευόμενη Ονομασία Προελεύσεως Αμύνταιον	Ξινόμαυρο	Αμύνταιο	580-650m	Ποικιλιακή σύνθεση: Ξινόμαυρο Τα σταφύλια προέρχονται από επιλεγμένους αμπελώνες στις λοφώδεις περιοχές της ζώνης Αμυνταίου. Οινοποίηση: Ο τρύγος για το Ξινόμαυρο αρχίζει συνήθως στα τέλη του Σεπτεμβρίου. Εφαρμόζεται προζυμωτική κρυσταλλοποίηση των σταφυλοπολτών και αργή ελεγχόμενη αλκοολική ζύμωση. Το υψόμετρο κυμαίνεται από 580 έως 650 μετρά περίπου. Η έκταση που καταλαμβάνουν αυτή τη στιγμή οι αμπελώνες ανέρχεται, σε 7500 στρέμματα (750 εκτάρια). Από αυτά το 50% σχεδόν, βρίσκεται, ανάμεσα στις δυο λίμνες των Πετρών και την λίμνη Βεγορίτιδα.	Αλκοόλ: 12,5 % vol
NEMS1	Κ. Νεμέα 2015, Οίνος Ερυθρός Ξηρός	Αγιωργίτικο	Νεμέα	200-600m	Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης Νεμέα Τύπος: Ερυθρός Ξηρός Ποικιλία: Αγιωργίτικο 100%	Αλκοόλ: 13,5 % vol

KALS1	Οινοποιείο Λ., Κοτσιφάλη 2012, Οίνος Ερυθρός Ξηρός, Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη Κρήτη	Κοτσιφάλη	Αλάγνι Ηρακλείου Κρήτης	500m	Ποικιλίες: Κοτσιφάλη 100%. Προέλευση: Από ορεινούς αμπελώνες του νομού Ηρακλείου. Οινοποίηση: Στις σύγχρονες εγκαταστάσεις του οινοποιείου Λυραράκη στο Αλάγνι Ηρακλείου. Υπολειμματικά σάκχαρα: 1,96 gr/l. Ολική οξύτητα: 5,1 gr/l pH=3,58	Αλκοόλ: 13% vol
KALS2	Μαυροδάφνη Πατρών, Οίνος φυσικός γλυκός, Προστατευόμενη Ονομασία Προελεύσεως	Μαυροδάφνη	Πάτρα		Ένα από τα πιο διάσημα επιδόρπια ελληνικά κρασιά με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης και πολλές διεθνείς διακρίσεις. Παράγεται από την γνωστή ποικιλία Μαυροδάφνη, που καλλιεργείται μόνο σε συγκεκριμένες περιοχές στα όρια της πόλης της Πάτρας στην Αχαΐα. Παλαίωση σε δρύινα βαρέλια.	Αλκοόλ: 15% vol
KALS3	Λημνία Γη, Λημνιός 2013. Οινοποιείο Π.Θ. Χ.	Λημνιό	Λήμνος- Κάρπασι	0-300	Δεκαήμερη εκχύλιση των χρωστικών αρωματικών ενώσεων των στέμφυλων κατά την οινοποίηση και δωδεκάμηνη παλαίωση στη φιάλη.	Αλκοόλ: 13% vol
KALS4	Κτήμα Δ. Μ. Μοσχάτο Τυρνάβου, Οίνος Ερυθρός Ξηρός, 2014. Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη Τυρνάβου	Μοσχάτο	Παλαιός Άμπελος» του Τυρνάβου	150-300m	Πάγωμα των τρυγημένων σταφυλιών σε ψυγιοθαλάμους, συστήματα κρυσταλλοποίησης, ανοξείδωτες δεξαμενές οινοποίησης και ό,τι άλλο μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία ποιοτικών κρασιών είναι αυτά που χαρακτηρίζουν τις υποδομές του οινοποιείου. Αυτός ο άρτιος εργαστηριακός και οινολογικός εξοπλισμός δίνει στο κρασί αυτό που χρειάζεται, άρωμα, ένταση και πάνω απ' όλα διάρκεια ζωής.	Αλκοόλ: 12,5% vol

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το διάλυμα του οίνου είναι ένα πολύπλοκο διάλυμα, καθώς περιέχει μεγάλο αριθμό συστατικών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες ενώσεων, και επιπλέον σε αρκετές περιπτώσεις, οι δομές των ενώσεων αυτών είναι παρόμοιες με αποτέλεσμα να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών συντονισμού τους.¹³⁰

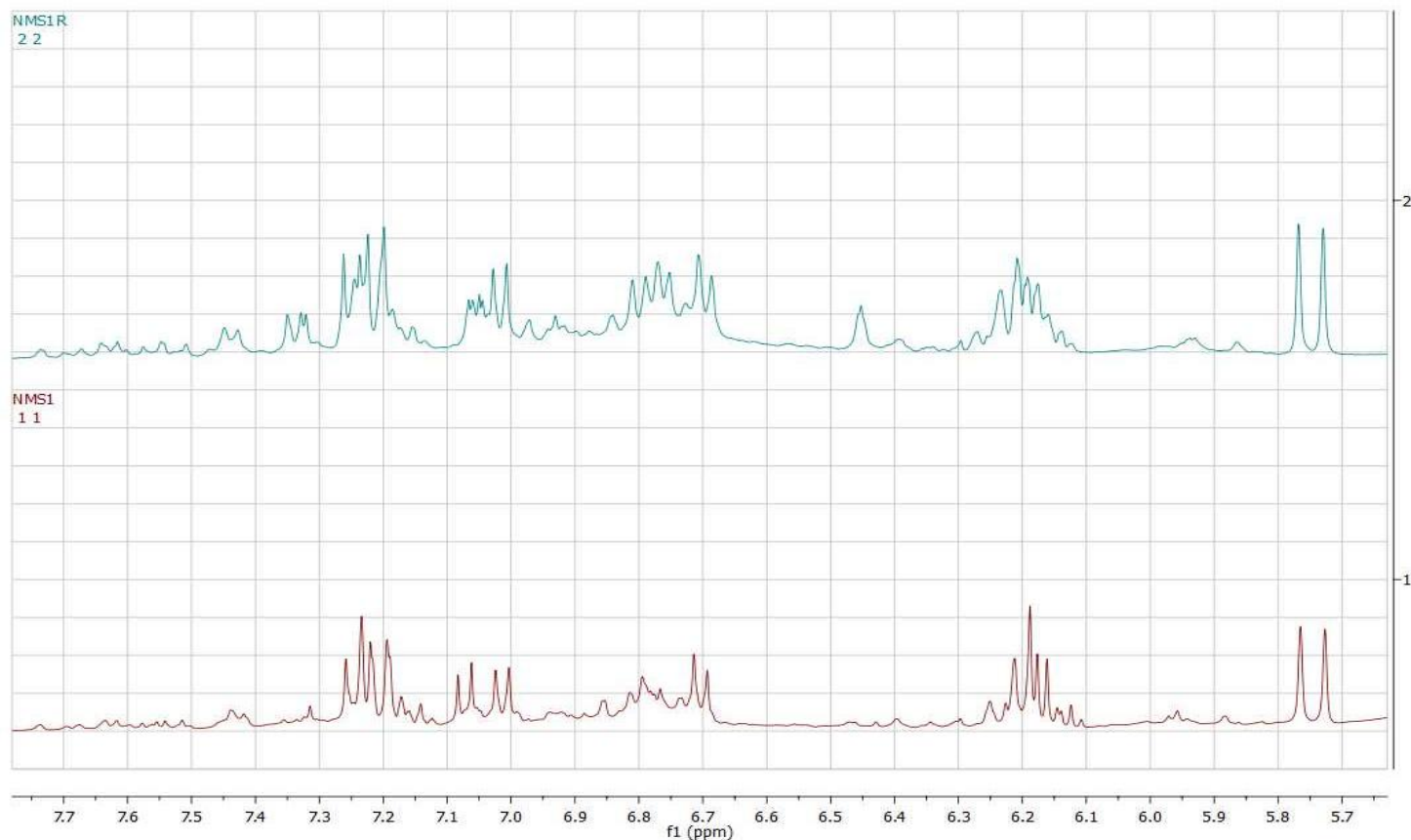
Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση της trans-ρεσβερατρόλης επιτεύχθηκε με την χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε φασματογράφο 400 MHz. Ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy). Η trans-ρεσβερατρόλη είναι από τα πλέον διαδεδομένα στυλβένια. Για την ανίχνευση της μελετήθηκε η περιοχή γύρω από τα 7ppm όπου αναμένονται τα βινυλικά πρωτόνια σταθερά σύζευξης $J=16$ Hz. Η αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR (δ 5.8-8.10) των εκχυλισμάτων οίνου παρουσιάζει χαρακτηριστικά σήματα που προκύπτουν από το φαινολικό περιεχόμενο των οίνων. Λόγω της αλληλοεπικάλυψης του σήματος, όπως αυτή φαίνεται στις Εικ. 26, 28, 30, 32, 34 και 36 (βλ. παρακάτω), η συσχέτιση των συντονισμών στα φάσματα ^1H ήταν αδύνατη.

Προκειμένου να ταυτοποιηθεί η trans-ρεσβερατρόλη από τις άλλες πολυφαινόλες που υπάρχουν στους οίνους πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσθήκης πρότυπων ουσιών αναφοράς (spiking experiments). Πιο συγκεκριμένα αφού ελήφθησαν φάσματα μίας διάστασης πρωτονίου ^1H NMR και φάσματα δυο διαστάσεων COSY, στη συνέχεια έγινε προσθήκη στα δείγματα trans-ρεσβερατρόλης (πρώτα 0.1 mg/L, στη συνέχεια 0.5 mg/L και μετά 1.0 mg/L). Στη περιοχή του φάσματος ^1H μεταξύ 7.00 – 7.40 ppm και 6.10 – 6.50 ppm το πρόβλημα της αλληλοεπικάλυψης ήταν έντονο σχεδόν σε όλα τα φάσματα ^1H που ελήφθησαν καθώς στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι κορυφές συντονισμού του trans-καφεϊκού οξέος, του p-κουμαρικού οξέος, του συριγκικού οξέος και της κατεχίνης.

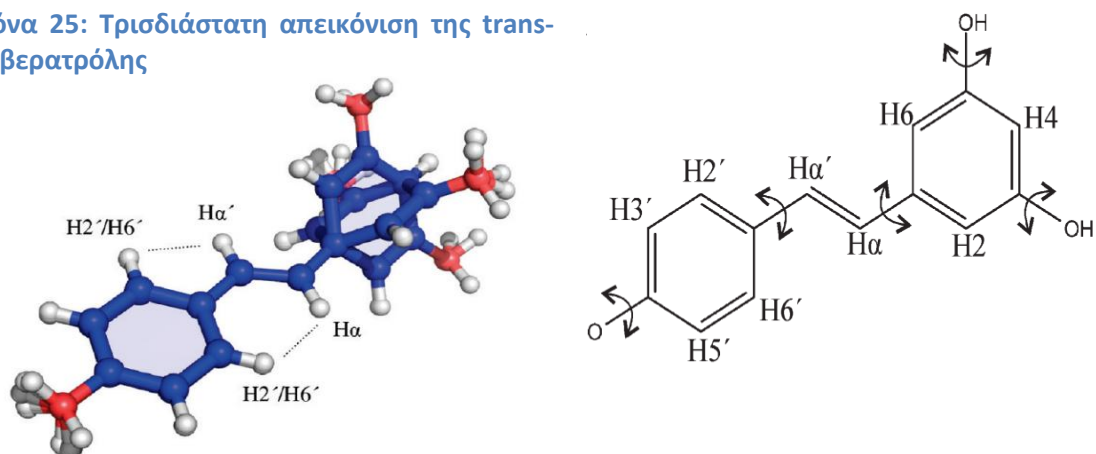
Η παρουσία της trans-ρεσβερατρόλης πιστοποιήθηκε με τη χρήση δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR και με τη συνδρομή των πειραμάτων προσθήκης γνωστής συγκέντρωσης trans-ρεσβερατρόλης. Τα φάσματα COSY που ελήφθησαν επέτρεψαν τελικώς την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση της με την κορυφή συντονισμού να εμφανίζεται στο σημείο (7.37, 6.78 ppm) όπου και αναμένονται τα βινυλικά πρωτόνια. Η κορυφή διασταύρωσης της συριγγαλδεύδης εμφανίζεται στο σημείο (9.74, 9.74). Στη παρακάτω

εικόνα φαίνεται το πείραμα προσθήκης γνωστής συγκέντρωσης trans-ρεσβερατρόλης στο δείγμα NMS1.

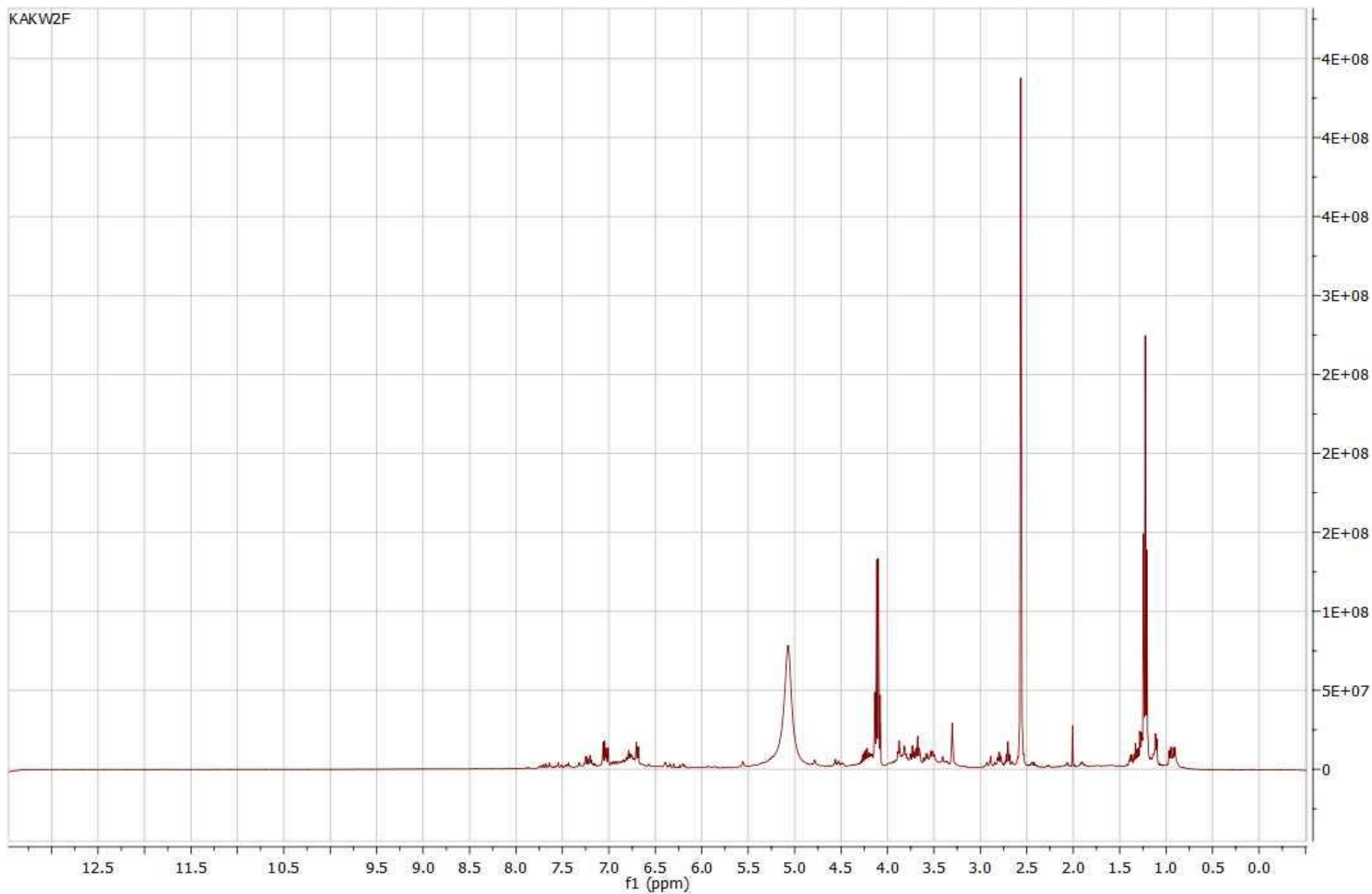
Εικόνα 24: Πείραμα προσθήκης γνώστης συγκέντρωσης trans-ρεσβερατρόλης στο δείγμα NMS1



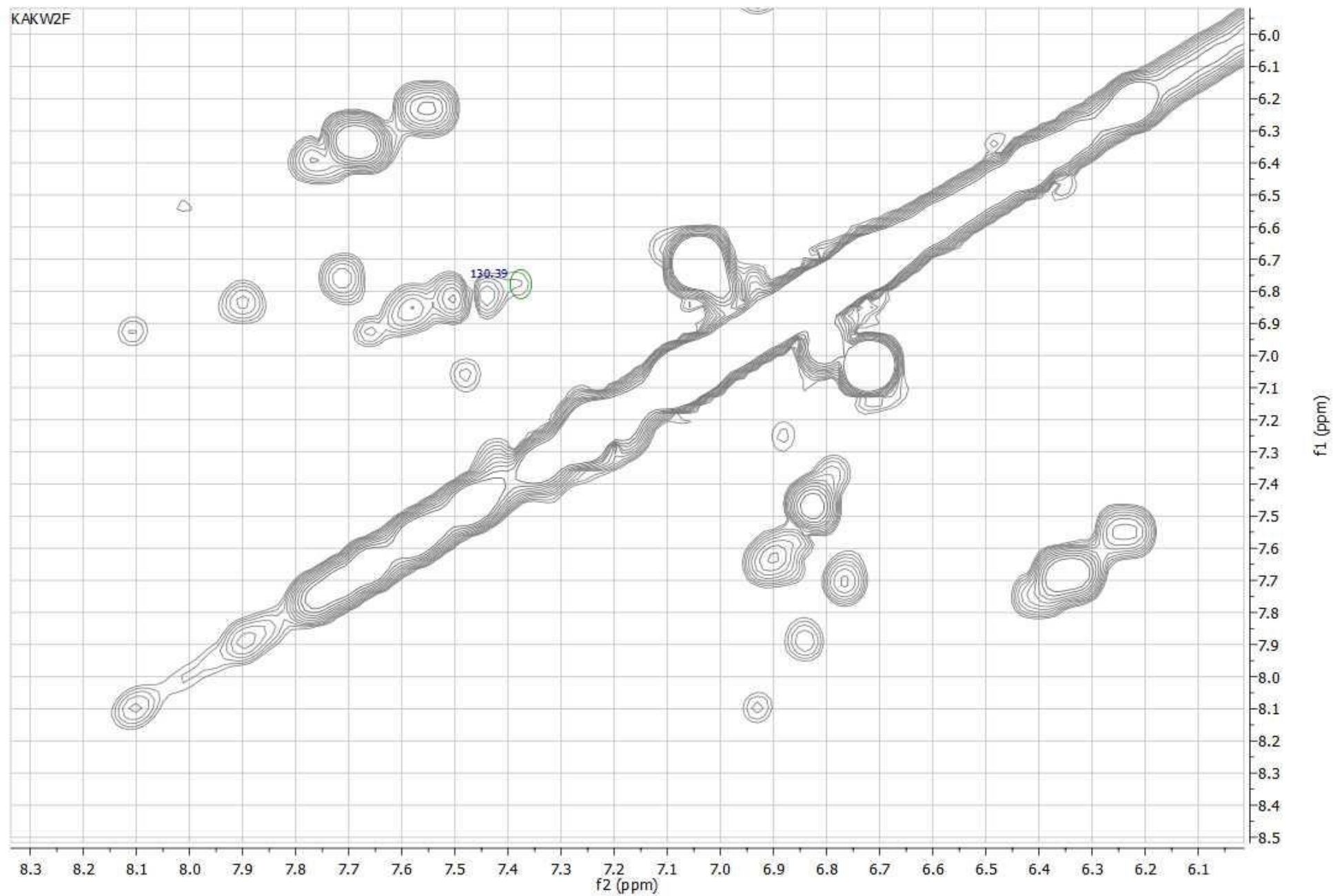
Εικόνα 25: Τρισδιάστατη απεικόνιση της trans-ρεσβερατρόλης



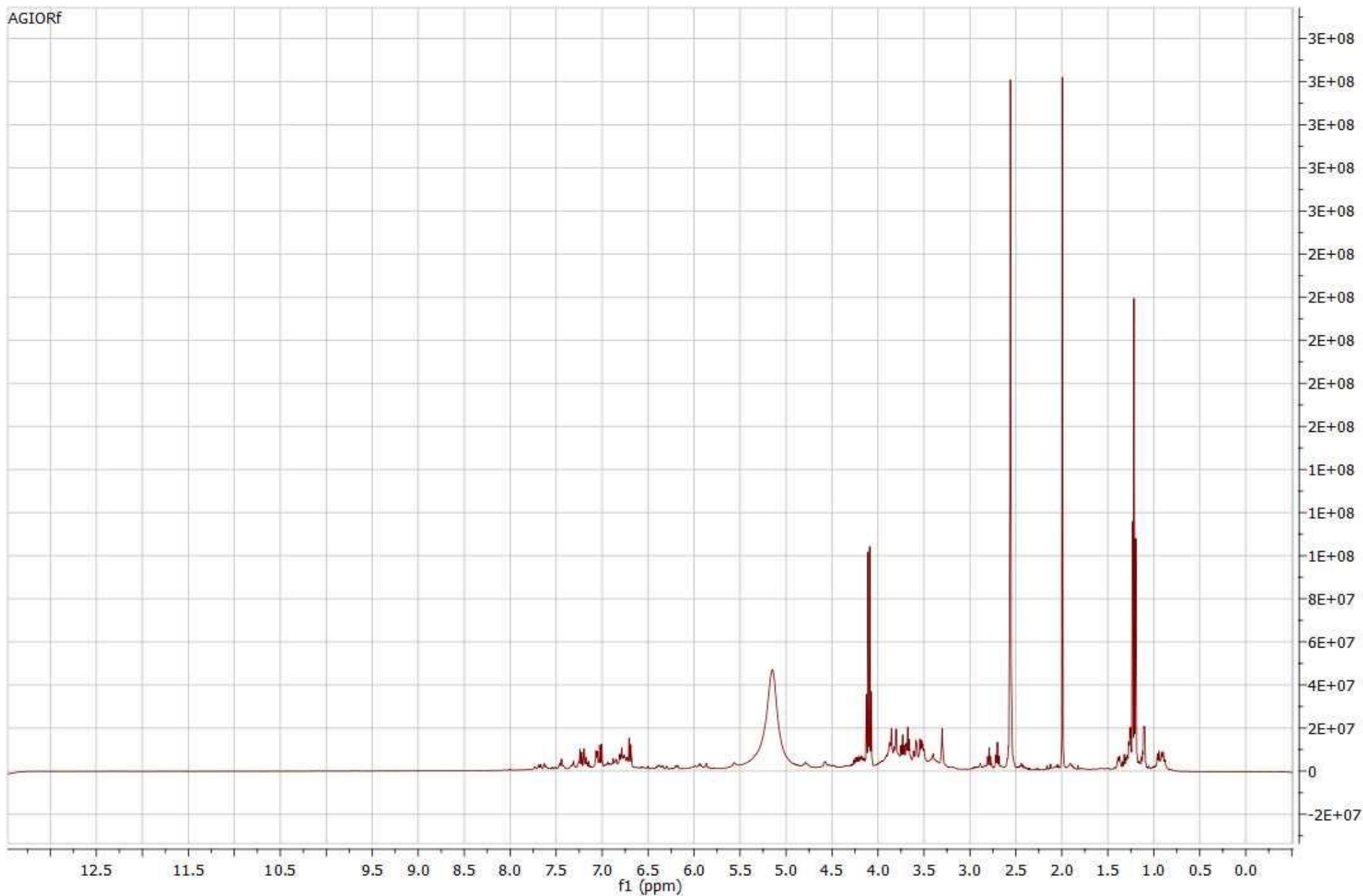
Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται τα φάσματα από τα πειράματα μίας διάστασης ^1H NMR και τα πειράματα δυο διαστάσεων COSY (Correlation spectroscopy) για το κάθε ποικιλία κρασιού που αναλύθηκε.



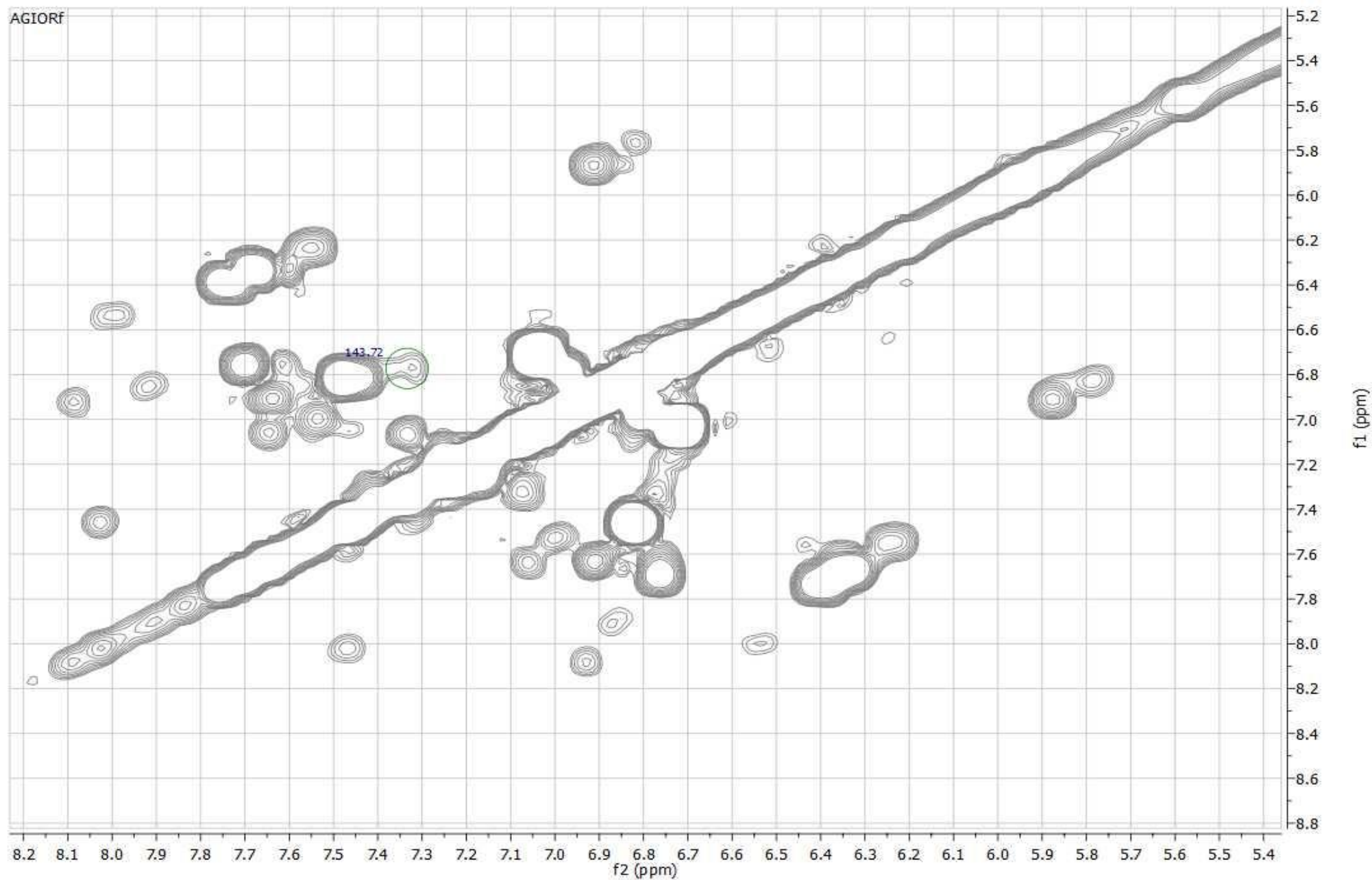
Εικόνα 26: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα KAKW2 (ποικιλία Φωκιανό) (MeOD, 400 MHz)



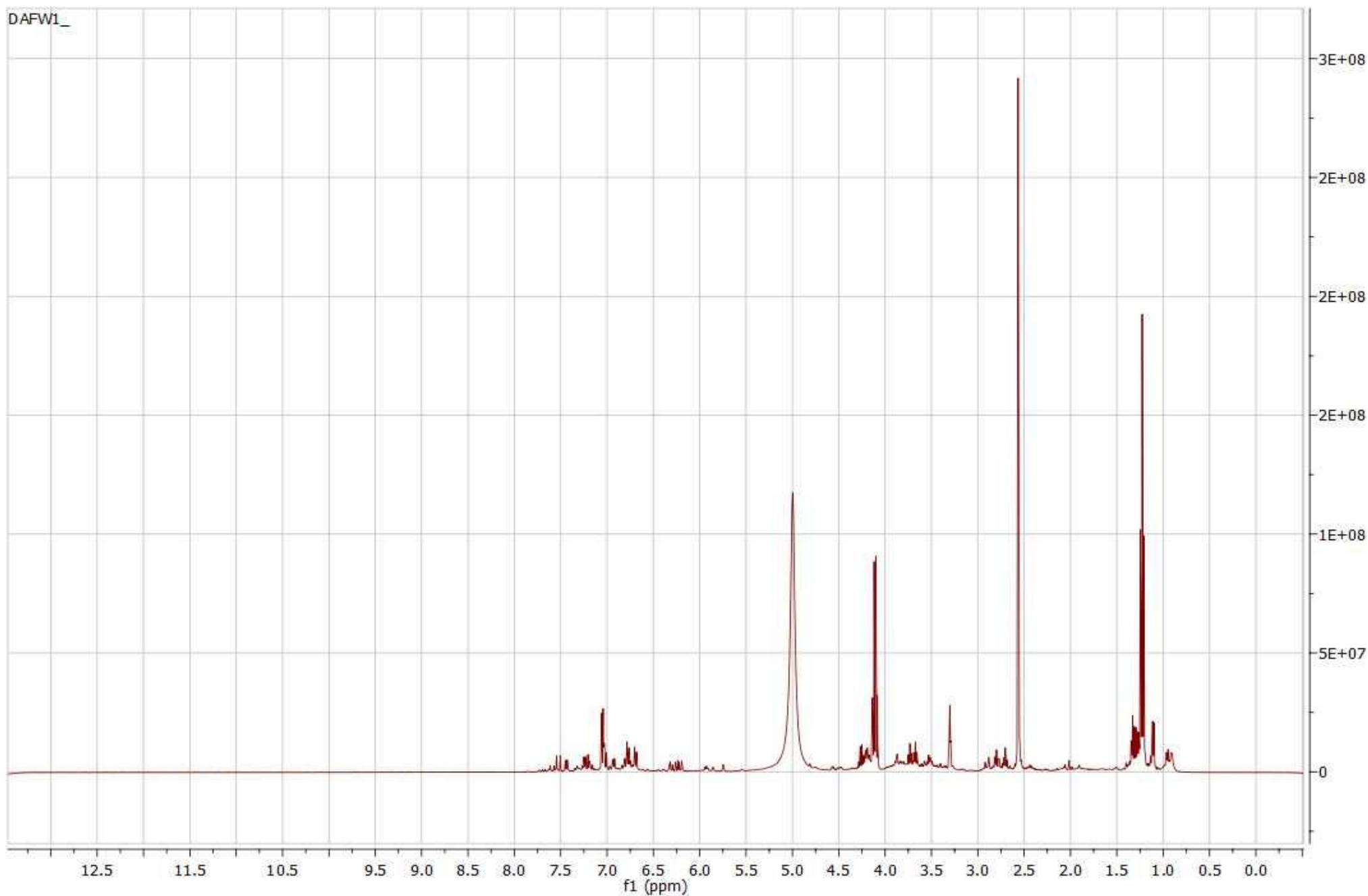
Εικόνα 27: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα KAKW2 (ποικιλία Φωκιανό) (MeOD, 400 MHz)



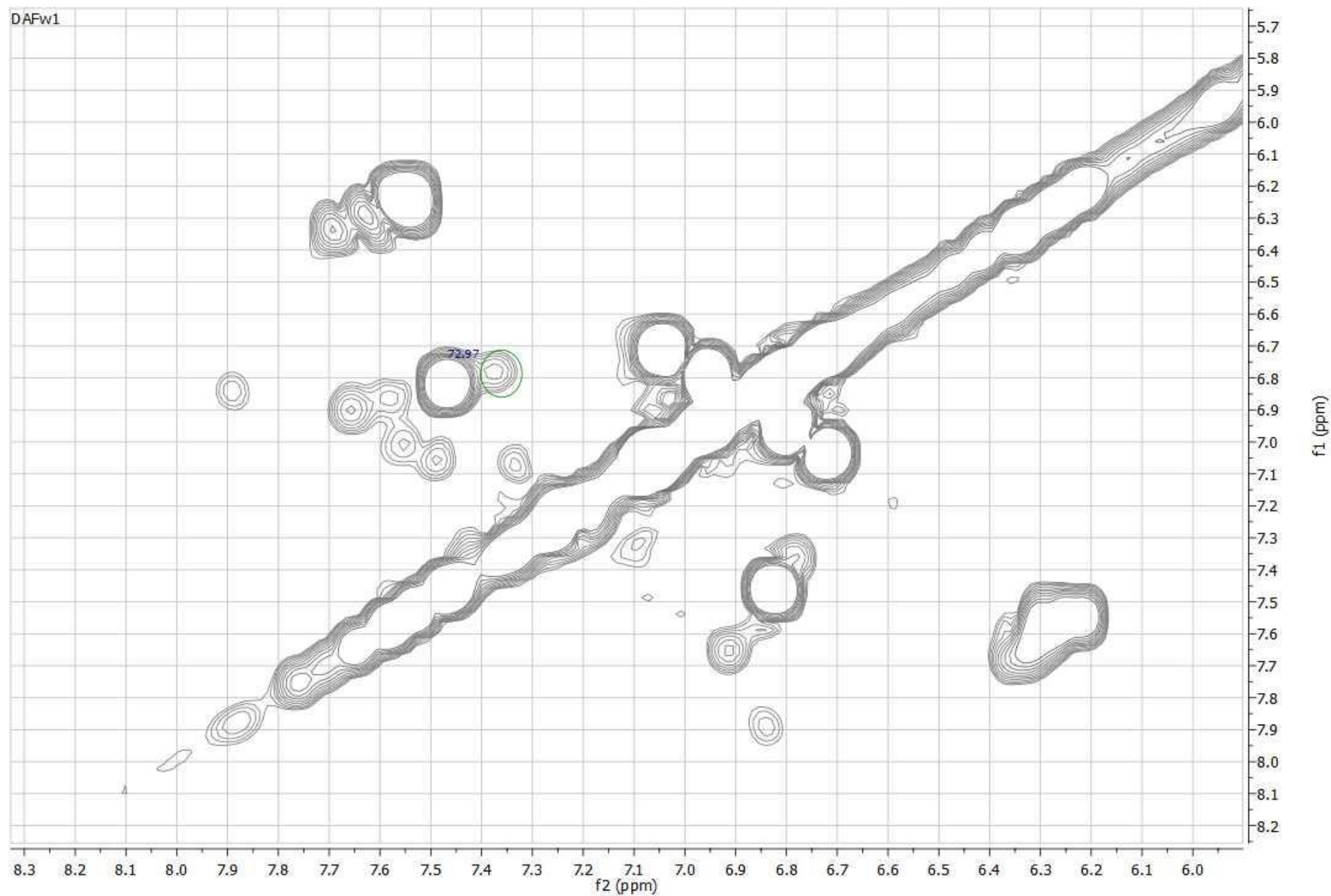
Εικόνα 28: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα AGIORf (ποικιλία Αγιωργίτικο) (MeOD, 400 MHz)



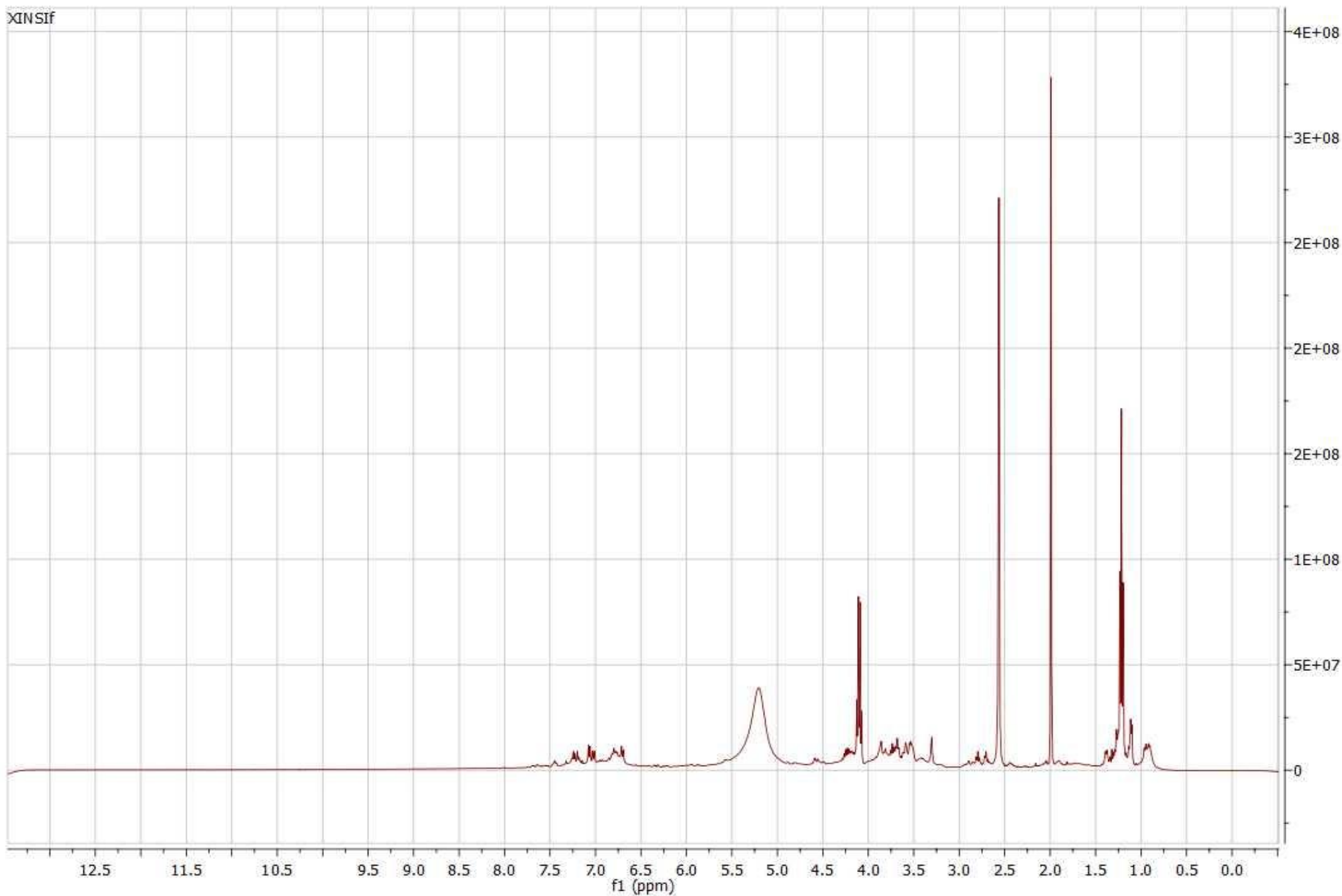
Εικόνα 29: Φάσμα COSY-NMR δείγμα AGIORf (ποικιλία Αγιωργίτικο) (MeOD, 400 MHz)



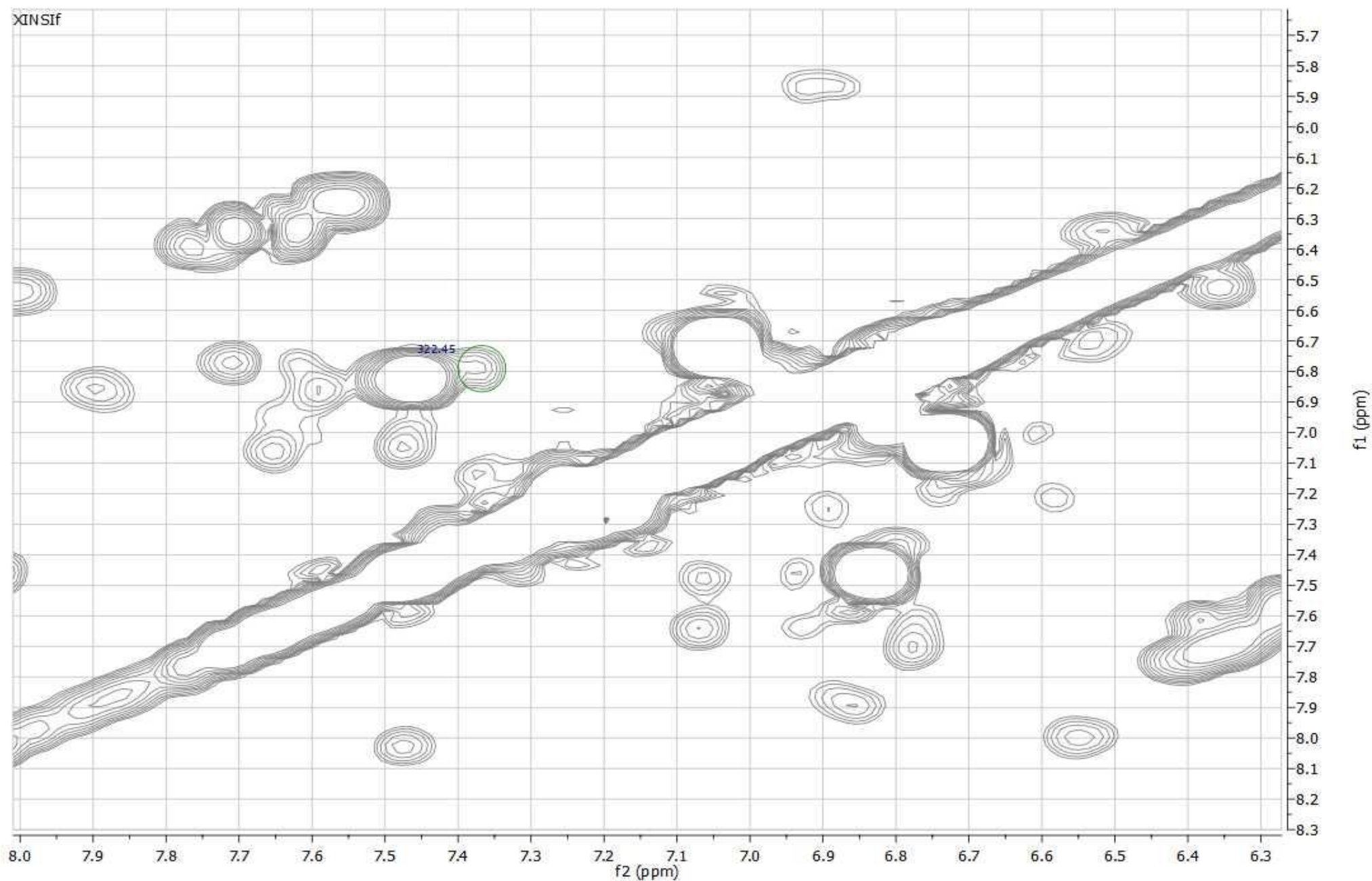
Εικόνα 30: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα DAFW1 (ποικιλία Λιάτικο) (MeOD, 400 MHz)



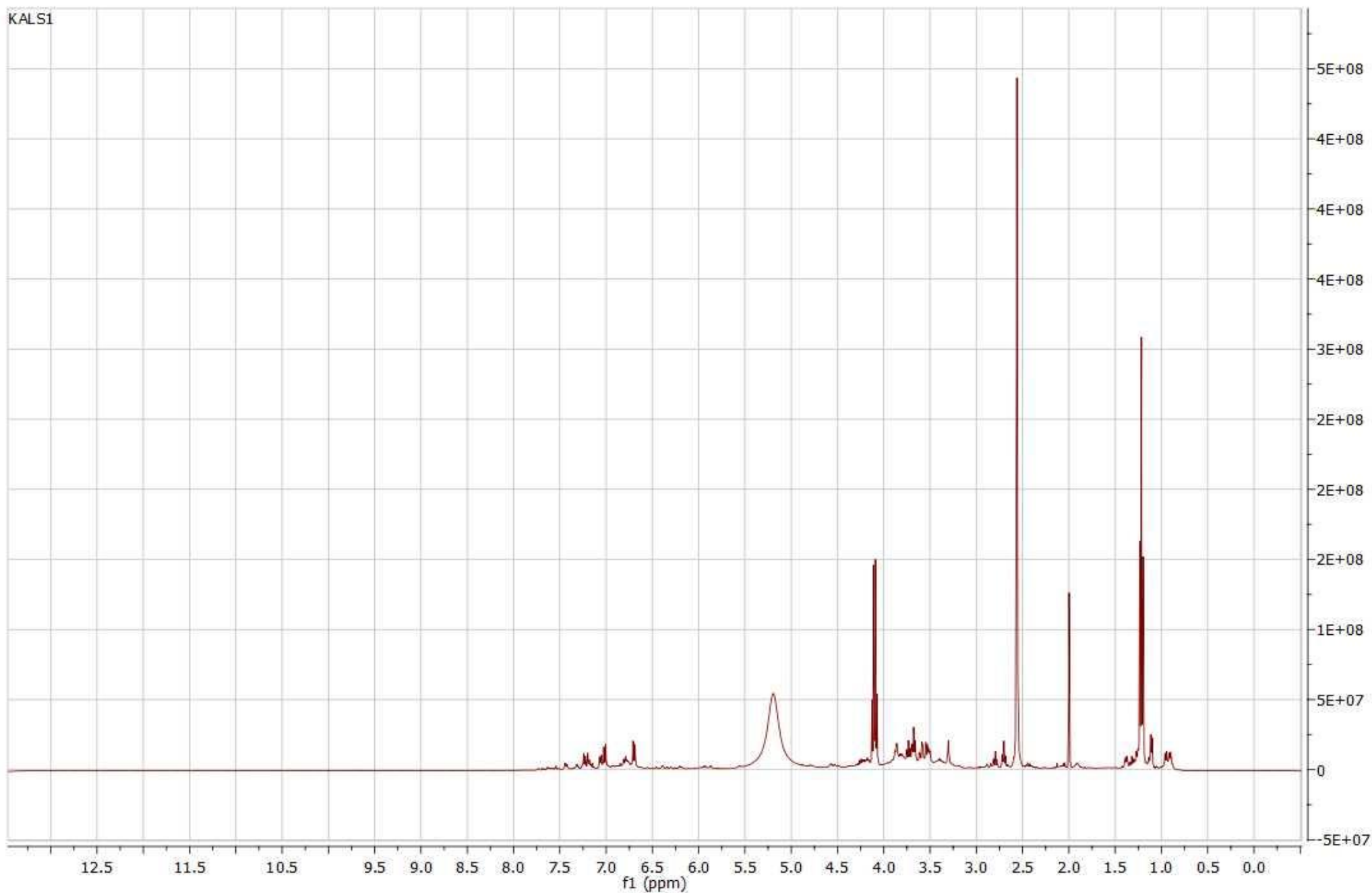
Εικόνα 31: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα DAFW1 (ποικιλία Λιάτικο) (MeOD, 400 MHz)



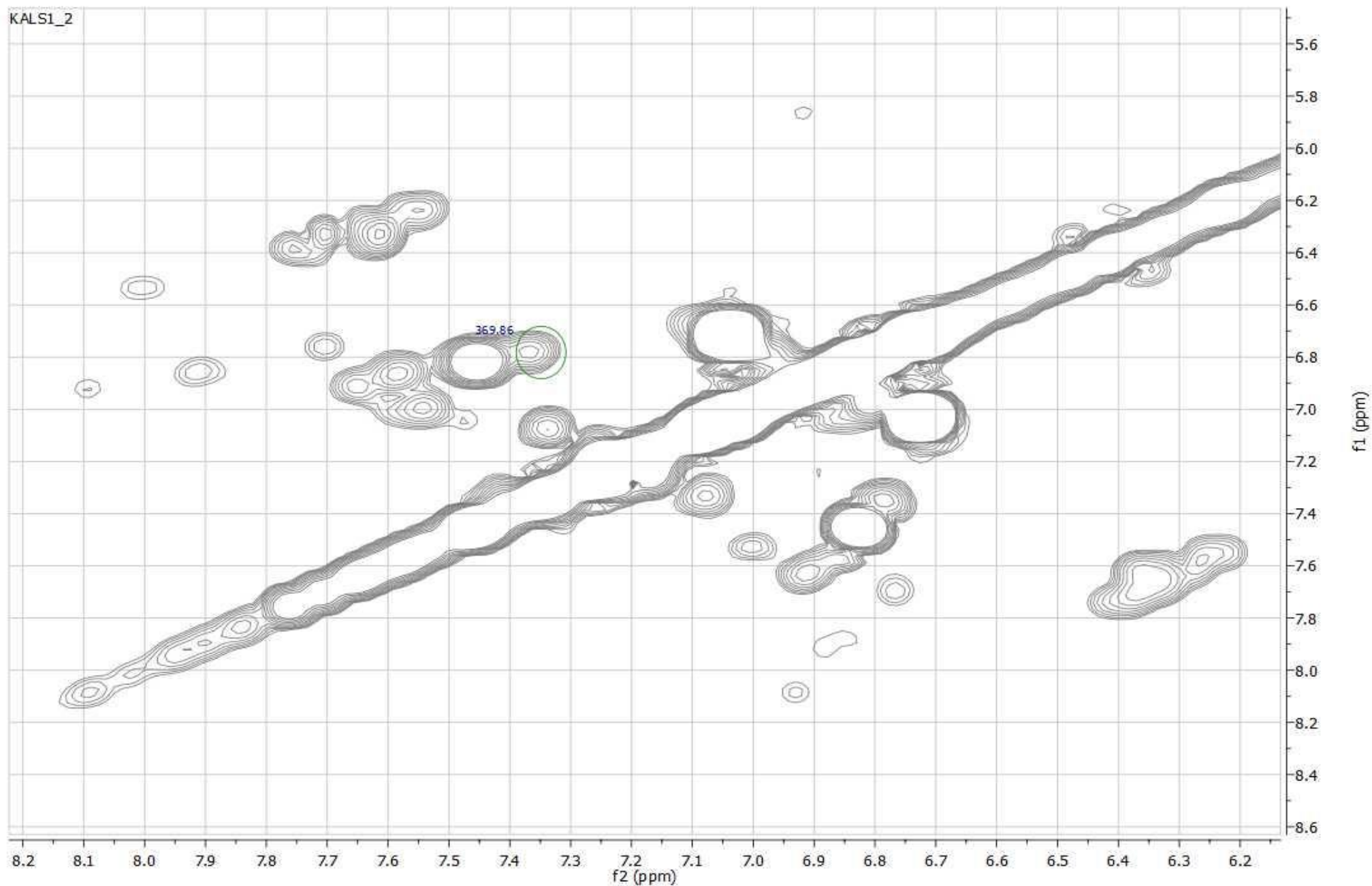
Εικόνα 32: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα XINS1f (ποικιλία Ξινόμαυρο) (MeOD, 400 MHz)



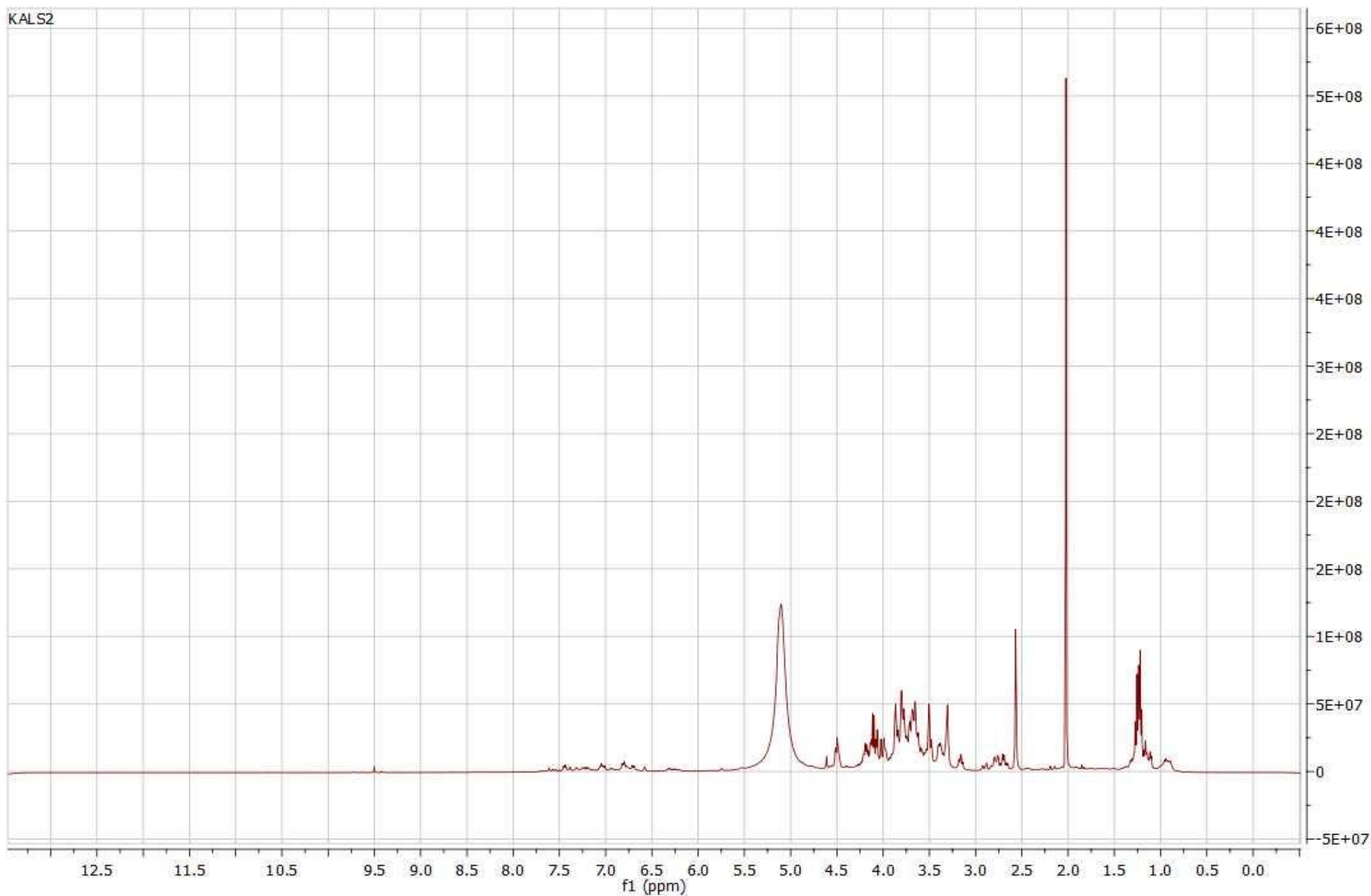
Εικόνα 33: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα XINS1f (ποικιλία Ξινόμαυρο) (MeOD, 400 MHz)



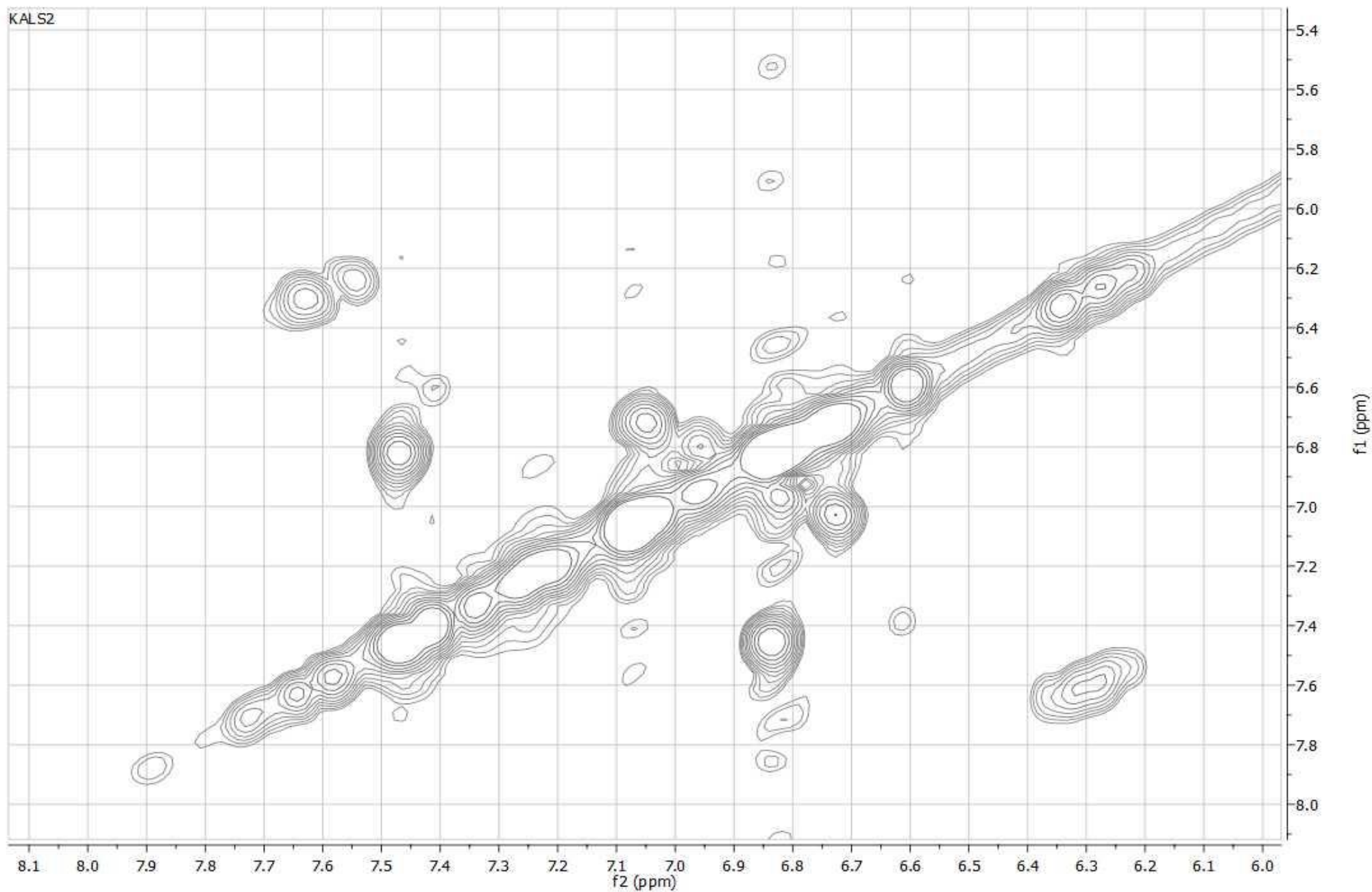
Εικόνα 34: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS1 (ποικιλία Κοτσιφάλη) (MeOD, 400 MHz)



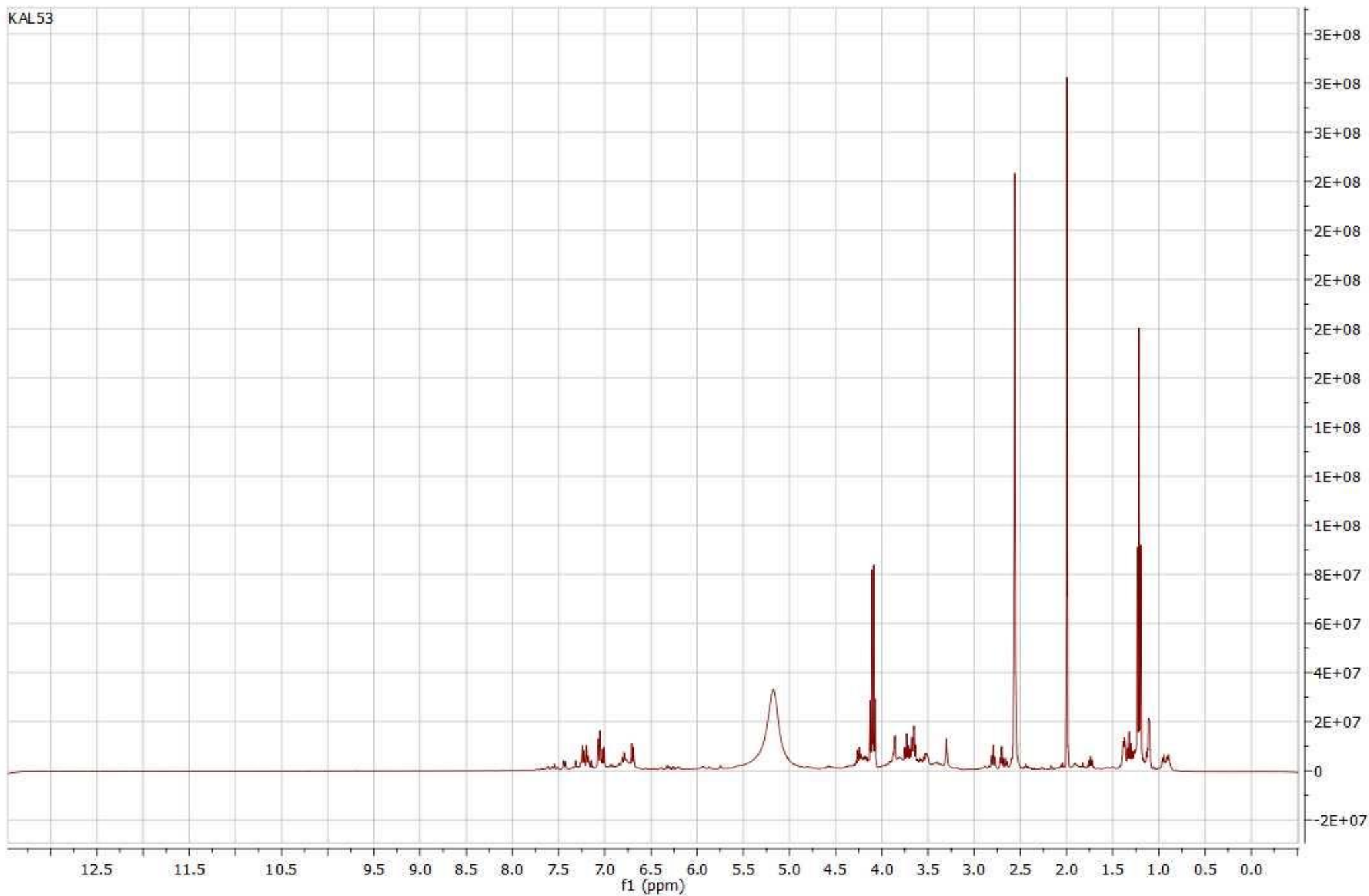
Εικόνα 35: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα KALS1 (ποικιλίας Κοτσιφάλη) (MeOD, 400 MHz)



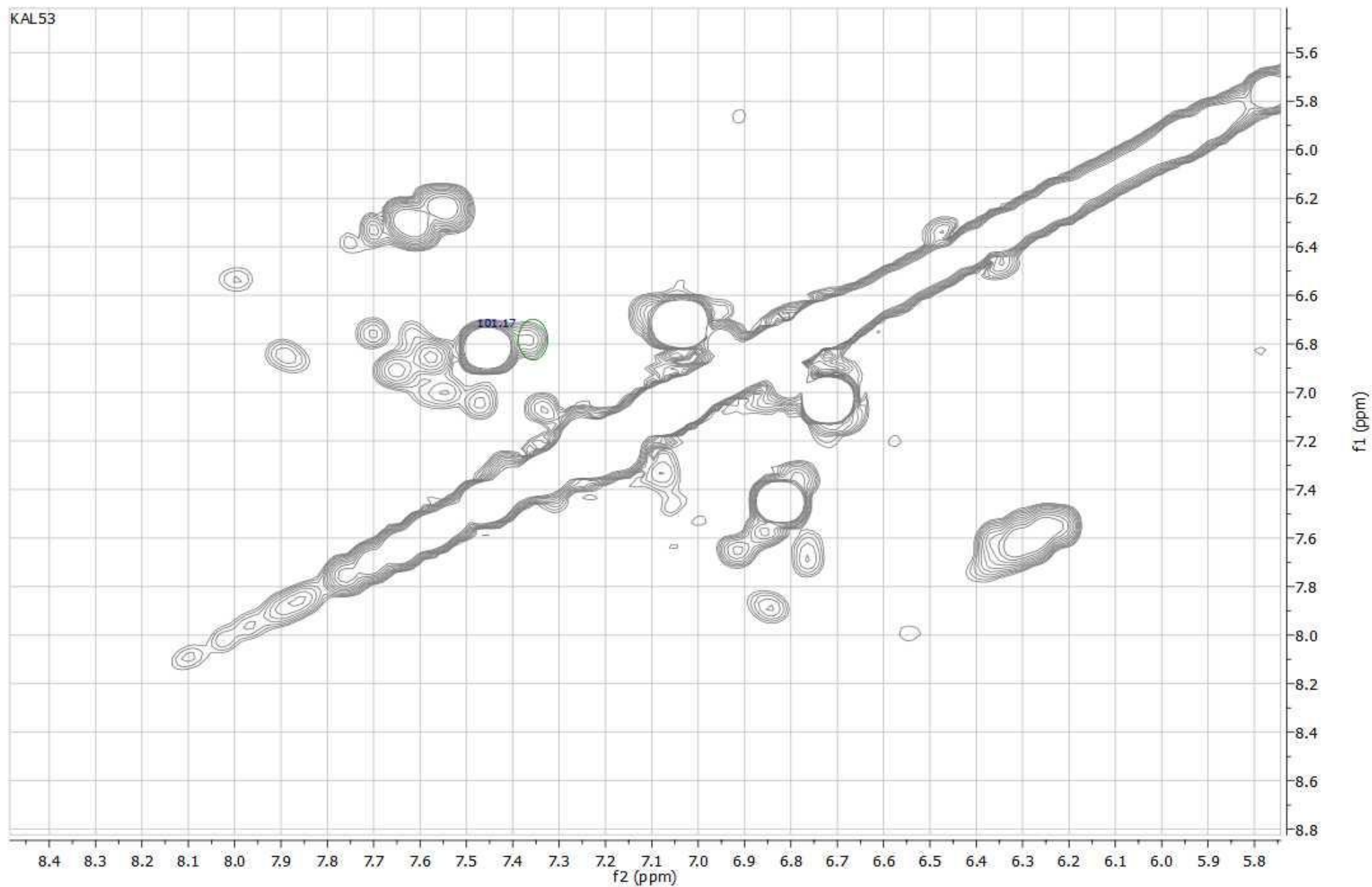
Εικόνα 36: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS2 (ποικιλία Μαυροδάφνη) (MeOD, 400 MHz)



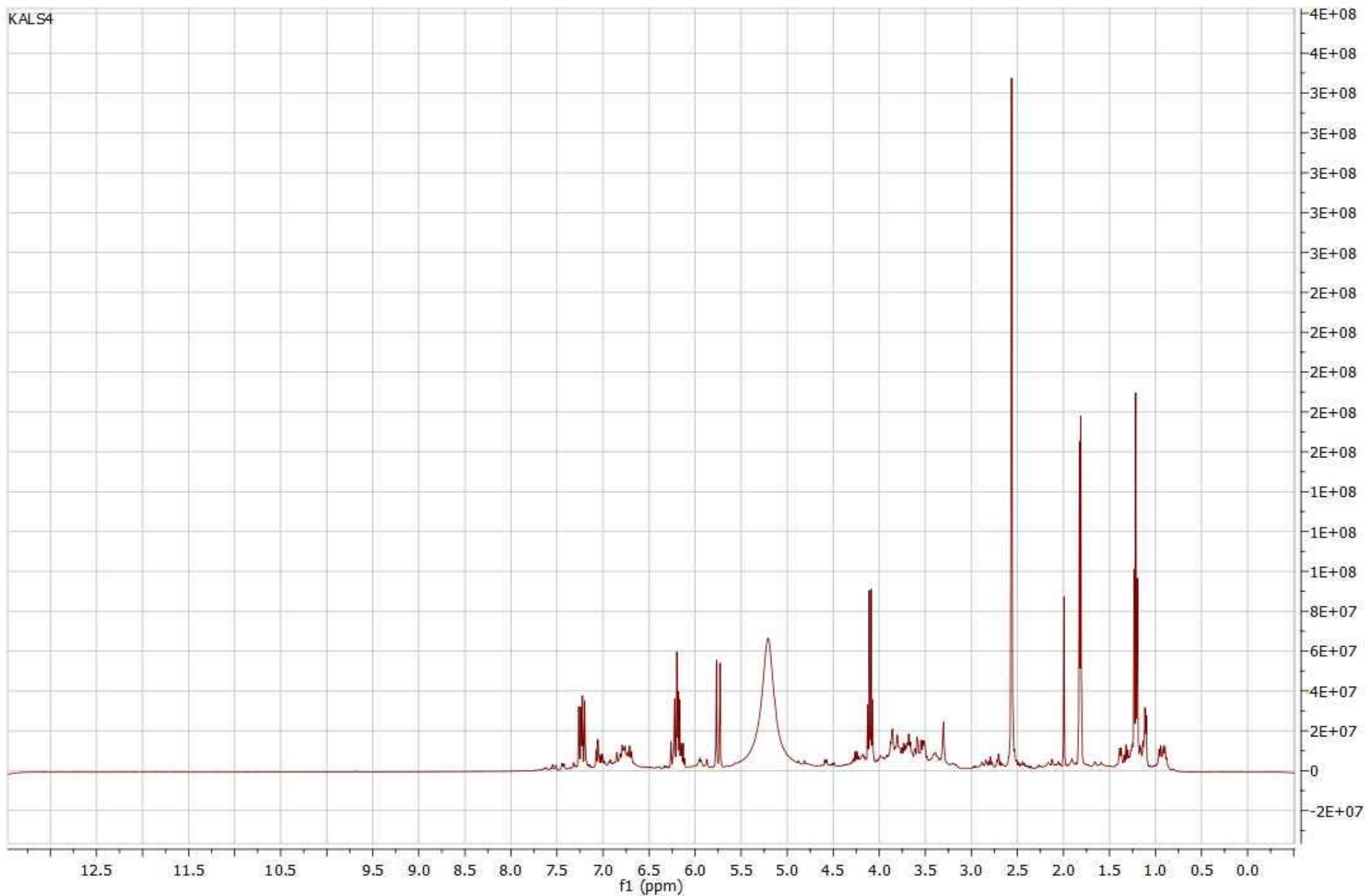
Εικόνα 37: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα KALS2 (ποικιλία Μαυροδάφνη) (MeOD, 400 MHz)



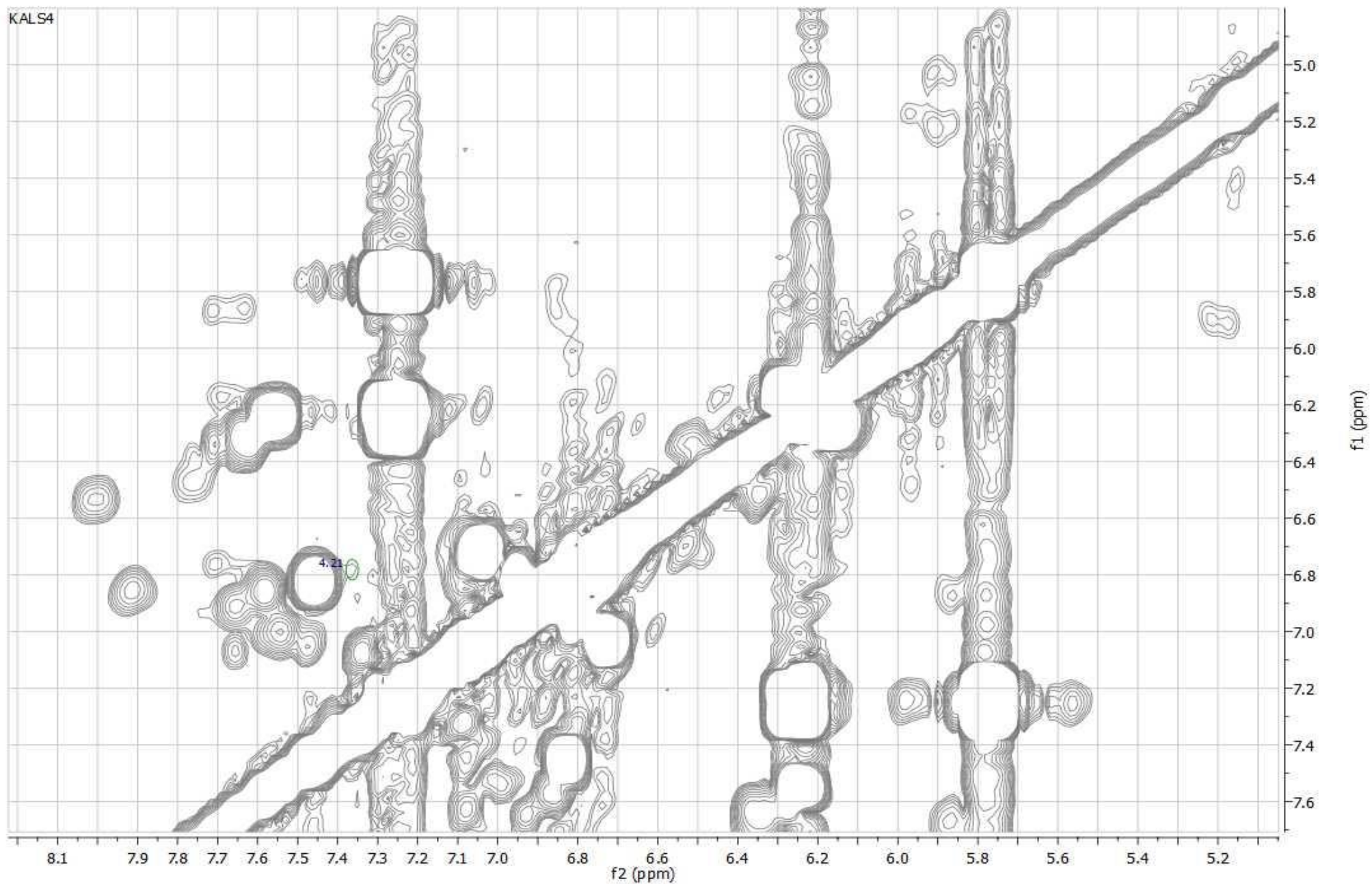
Εικόνα 38: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα KAL53 (ποικιλία Λημνιό) (MeOD, 400 MHz)



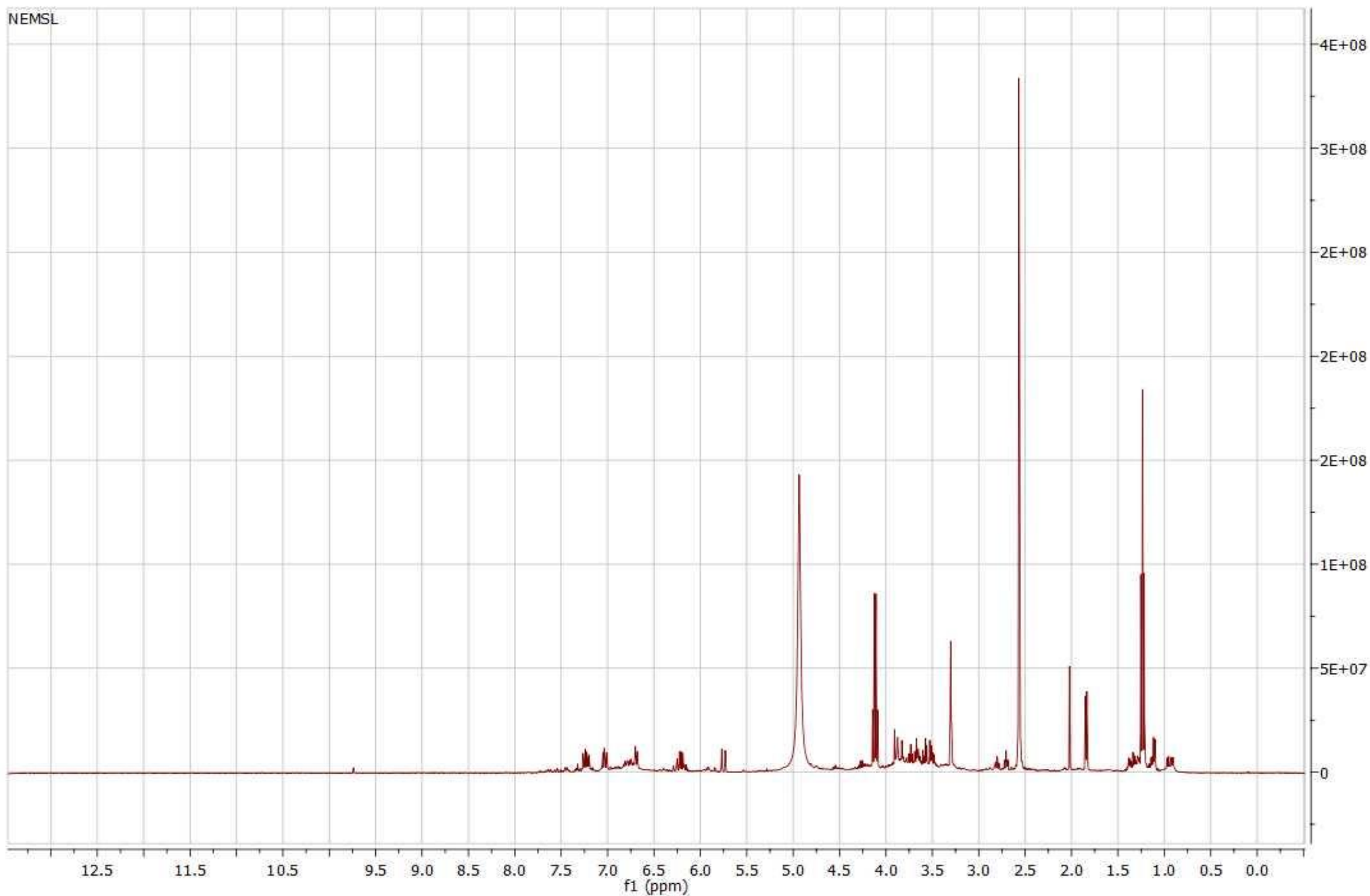
Εικόνα 39: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα KAL53 (ποικιλία Λημνιό) (MeOD, 400 MHz)



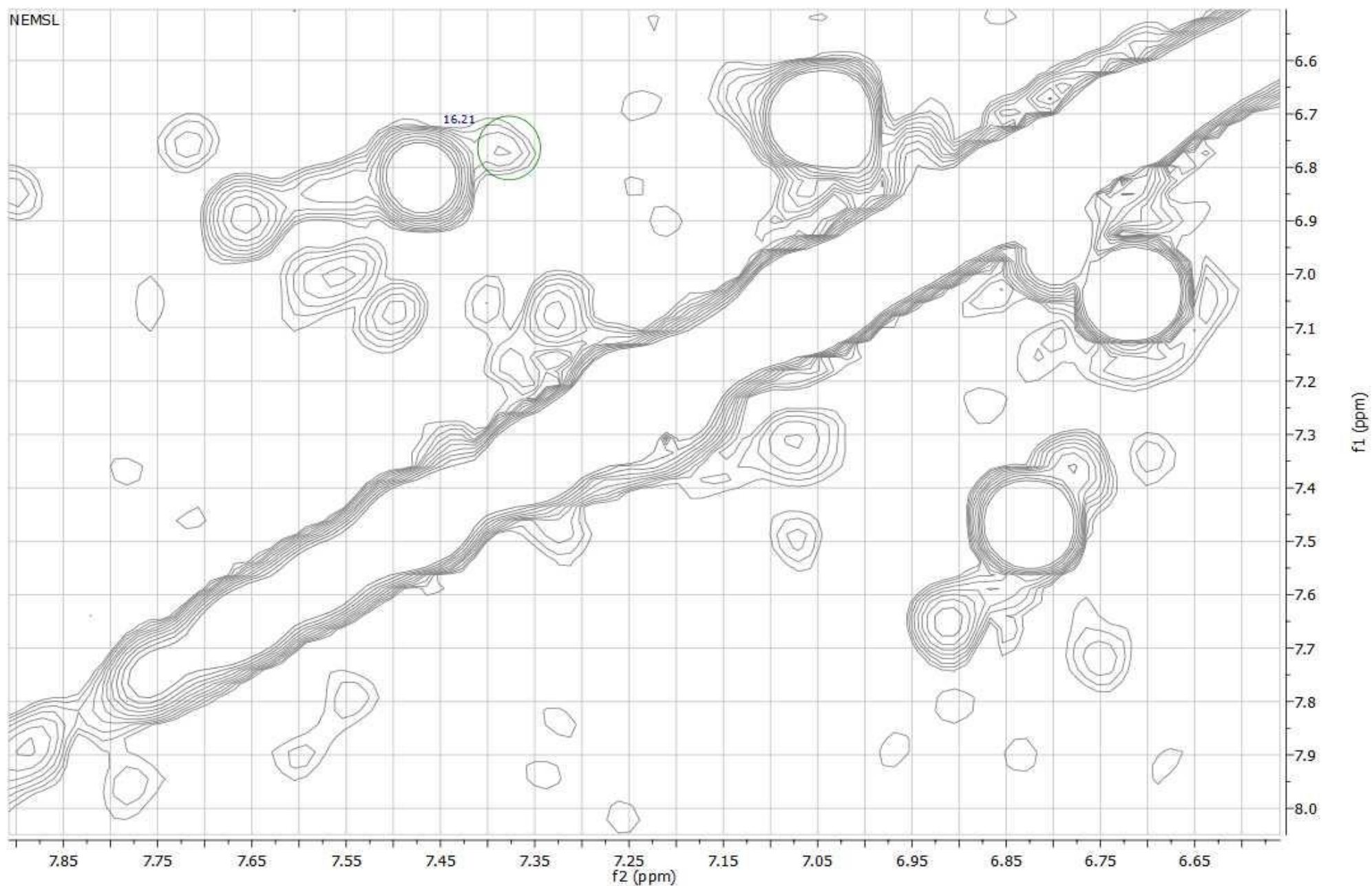
Εικόνα 40: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα KALS4 (ποικιλία Μοσχάτο Τυρνάβου) (MeOD, 400 MHz)



Εικόνα 41: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα KALS4 (ποικιλία Μοσχάτο Τυρνάβου) (MeOD, 400 MHz)



Εικόνα 42: Φάσμα ^1H -NMR για το δείγμα NEMSL (ποικιλία Αγωργίτικο) (MeOD, 400 MHz)



Εικόνα 43: Φάσμα COSY-NMR για το δείγμα NEMS1 (ποικιλία Αγιωργίτικο) (MeOD, 400 MHz)

6. Σχολιασμός αποτελεσμάτων – συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών αναλύσεων COSY-NMR στα 9 δείγματα κρασιού διαφορετικών ελληνικών ερυθρών ποικιλιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις της ολικής trans-ρεσβερατρόλης στα δείγματα ελληνικών κρασιών που αναλύθηκαν.

Ετικέτα / Σοδειά / Κωδικός Δείγματος	Ποικιλία σταφυλιού/ γεωγραφική περιοχή αμπελώνα	Αλκοολικοί Βαθμοί (vol %)	Συγκέντρωση ολικής ρεσβερατρόλης (mg/L)
Icarus 2012 KAKW2	Φωκιανό (Ικαρία)	13.5	2.40
Αγιωργίτικο 2016 AGIORS1	Αγιωργίτικο (Νεμέα)	12.5	2.62
Δαφνιός Λιάτικο 2015 DAFW1	Λιάτικο (Δάφνες Κρήτη)	13.0	1.43
Ξινόμαυρο 2013 XINS1	Ξινόμαυρο (Αμύνταιο)	12.5	5.66
Οινοποιείο Λ. Κοτσιφάλη 2012 KALS1	Κοτσιφάλη (Αλάγνι, Ηρακλείο Κρήτης)	13.0	5.53
Μαυροδάφνη Πατρών (Συνεταιρισμός Πατρών) KALS2	Μαυροδάφνη (Πάτρα)	15.0	0.22
Λημνία Γή 2013 KALS3	Λημνιό (Λήμνος)	13.0	1.91
Μοσχάτο, Οινοποιείο Δ. Μ. 2014 KALS4	Μοσχάτο (Τύρναβος)	12.5	0.26
С. Νεμέα 2015 NMS1	Αγιωργίτικο (Νεμέα)	13.5	0.46

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων πάνω στο περιεχόμενο των δειγμάτων σε ολική trans-ρεσβερατρόλη φαίνεται ότι η ρεσβερατρόλη παρουσιάζει σημαντική διακύμανση σε σχέση με την ποικιλία του σταφυλιού. Η συγκέντρωση της trans-ρεσβερατρόλης κυμάνθηκε από 0.22 έως 5.66 mg/L. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συγκρίσιμα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα από επιστημονικές δημοσιεύσεις στο περιεχόμενο της trans-ρεσβερατρόλης σε ερυθρά κρασιά (βλ. πίνακα 6). Σε αυτό το σημείο πρέπει να διευκρινίσουμε ότι με την παρούσα μέθοδο προσδιορίστηκε η ολική trans-ρεσβερατρόλη, δηλαδή των σύνολο των χημικών ενώσεων που παρουσιάζουν δομή παρεμφερή με τον δακτύλιο της trans-ρεσβερατρόλης.

Οι συγκεντρώσεις της ολικής trans-ρεσβερατρόλης που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν σχετικά μεγαλύτερες σε σχέση με παλαιότερες μελέτες που έχουν γίνει σε ελληνικά κρασιά. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς οι μελέτες αυτές έγιναν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) που διαφέρει από τη φασματοσκοπία NMR. Επίσης με την μέθοδο της HPLC γίνεται προσδιορισμός μόνο της συγκέντρωσης της trans-ρεσβερατρόλης ενώ με την παρούσα μέθοδο προσδιορισμού ρεσβερατρόλης με χρήση της φασματοσκοπίας NMR, μετράται η συγκέντρωση των ολικών παραγώγων της trans-ρεσβερατρόλης (ολικών trans-ρεσβερατρολοιδών).

Οι υψηλότερες τιμές ολικής ρεσβερατρόλης βρέθηκαν σε δείγματα της ποικιλίας Ξινόμαυρο με συγκέντρωση 5.66 mg/L και της ποικιλίας Κοτσιφάλη με συγκέντρωση 5.53 mg/L. Σχετικά υψηλή συγκέντρωση προσδιορίστηκε στο δείγμα από τη ποικιλία Αγιωργίτικο με συγκέντρωση 2.62 mg/L καθώς και στην ποικιλία Φωκιανό (2.40 mg/L) από την Ικάρια.

Η συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης στο δείγμα της ποικιλίας Λιάτικο προσδιορίστηκε στα 1.43mg/L. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα δείγματα των ποικιλιών Μαυροδάφνη με συγκέντρωση 0.22 mg/L και Μοσχάτο Τυρνάβου με συγκέντρωση 0.26 mg/L.

Από την παρούσα εργασία επιβεβαιώνεται αυτό που έχει επισημανθεί και σε παλαιότερες μελέτες, ότι δηλαδή το υψηλότερο περιεχόμενο σε ρεσβερατρόλη παρουσιάζουν οι ποικιλίες Ξινόμαυρο, Κοτσιφάλη και Αγιωργίτικο. Επίσης αξίζει να σημειωθεί η υψηλή συγκέντρωση της ποικιλίας Φωκιανό, που δεν είχε μελετηθεί μέχρι σήμερα. Στη παρούσα εργασία δεν αναλύθηκε η ποικιλία Μανδηλαριά που από τη βιβλιογραφία συγκαταλέγεται στις ελληνικές ερυθρές ποικιλίες με το υψηλότερο περιεχόμενο σε ρεσβερατρόλη.

Οι σημαντικές αποκλίσεις στις συγκεντρώσεις της trans-ρεσβερατρόλης ανάμεσα στα δείγματα που αναλύθηκαν αποδίδονται κυρίως στη διαφορετική ποικιλία σταφυλιού και συνεπώς στο διαφορετικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (δυναμικό) που μπορεί να δώσει η κάθε ποικιλία κατά την περίοδο της ωρίμανσης και του τρύγου. Αυτές οι διαφορές μπορούν επίσης να αποδοθούν στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η

υγρασία και η μυκητιακή νόσος, που είναι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή trans-- ρεσβερατρόλης στο σταφύλι.

Ωστόσο, οι Soleas et al.¹³¹ δήλωσαν ότι η διαφορά ανάμεσα στις στατιστικές παράμετρους, της προκατεργασίας του δείγματος και οι διαφορετικές μέθοδοι που εφαρμόζονται στον προσδιορισμό [χρωματογραφική μέθοδος (GC ή HPLC)] μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, οι οίνοι από την Ιταλία παρουσίασαν μέσες τιμές ρεσβερατρόλης κυμαινόμενες από 0.03 έως 8.87 mg/L.

Πίνακας 7: Προηγούμενες αναφορές συγκεντρώσεων (από τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία) της trans-ρεσβερατρόλης (mg/L) σε δείγματα ερυθρών οίνων.

Χώρα	Trans-ρεσβερατρόλη		Βιβλιογραφία
	Χαμηλότερη τιμή	Υψηλότερη τιμή	
Βραζιλία	0.82	5.75	132, 133
Ιταλία	0.03	8.87	134,135,136,137
Γαλλία	0.30	7.62	138,139,140,141
Ισπανία	0.18	8.00	142,143,144,145
Καναδάς	0.15	5.79	146,147
Κίνα	0.07	3.20	148
Πορτογαλία	0.20	5.70	149,150,142
Ελλάδα	0.37	2.53	151,152,153
Χιλή	0.80	1.57	154,155
Τσεχία	0.92	6.25	156
Σλοβενία	0.90	8.70	157
Ηπα	0.23	5.81	149,150
Κορέα	0.19	3.30	158
Ιαπωνία	0.001	2.30	159,160
Ουγγαρία	0.10	14.3	161
Αυστραλία	0.20	10.6	162,163
Σερβία	0.11	1.69	164

Βιβλιογραφία:

1. Αλέτρας Γ. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών ουσιών σε οινικά προϊόντα. Πτυχιακή Εργασία. Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων. Καλαμάτα 2011.
2. Kris-Etherton et. al., Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 2002. 113(9 SUPPL. 2): pp. 712-882.
3. Ιωάννα Χ. Βλαχογιάννη, Μελέτη της επίδρασης φαινολικών ενώσεων και παραγώγων τους στις λειτουργίες κυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Διδακτορική Διατριβή, Χαροκοπείο Πανεπιστημιο Σχολή Επιστημών Υγείας & Αγωγής Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Αθήνα 2015.
4. Renaud S. and M. de Lorgeril, Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992. 339(8808): pp. 1523-6.
5. Rimm E.B. et. al., Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *Bmj*, 1999. 319(7224): pp. 1523-8.
6. Dinnella C. et. al., Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during in vitro digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. 55(21): pp. 8423-8429.
7. Nakachi, K et. al., Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *BioFactors*, 2000. 13(1-4): pp. 49-54.
8. Hollman P.C.H. et. al., Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1999. 220(4): pp. 198-202.
9. Yang, C.S., et. al., Inhibition of carcinogenesis by tea, in *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2002. pp. 25-54.
10. Σουφλέρός Ευαγγ. Ηρ.. Οινολογία, Επιστήμη και τεχνογνωσία. Θεσσαλονίκη 2015. (Τρίτη έκδοση)
11. Μυλωνά Αικ.-Ευαγγ. Μελέτη Μεταβολών των Ποιοτικών Χαρακτηριστικών κατά τη Ζύμωση και Ωρίμανση του Οίνου. Διπλωματική Εργασία. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών. Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων. Αθήνα 2011.
12. Κουράκου-Δραγωνά Σ.. 1998. Θέματα Οινολογίας, Εκδόσεις Τροχαλία.

-
13. Garrido Jorge, Fernanda Borges. Wine and grape polyphenols-A chemical perspective, 2011. Food Research International, 44, pp. 3134-3148.
 14. Castillo-Muñoz et. al., Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (Vitis vinifera L.) grapes and red wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, pp. 7883– 7891.
 15. Ortega-Regules, A., et. al., A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability, 2006. Analytica Chimica Acta, 563, pp. 26–32.
 16. Figueiredo-González M. et. al., Pattern recognition of three Vitis vinifera L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways, 2011. Food Chemistry 130, 9–19.
 17. Kennedy James A. . 2008. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings, ien. Inv. Agr. 35(2), pp. 77-90.
 18. Kannel WB, Ellison RC, Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect Clinica Chimica Acta. 1996, 246, pp. 59-76.
 19. Βράκας Ν. Αν. Μελέτη της τροποποίησης ποιοτικών και βιολογικά δραστικών συστατικών του οίνου από την έκθεση του σε ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Δυνατότητα εισαγωγής νέων όρων διασφάλισης ποιότητας οίνων. Διδακτορική Διατριβή. Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Πιστοποίηση αγροτικών προϊόντων ποιότητας». Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας & Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Αγρίνιο 2012
 20. Soleas G.J. et. al., Wine as biological fluid: History, production and role in disease prevention, Journal of Clinical Analysis. 1997, 11, pp. 287-313.
 21. Goldberg D. M. et. al., Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. Clinica Chimica Acta. 1995, 237, pp. 155-187.
 22. Crigui M.,H., Alcohol and coronary heart disease: consistent relationship and public health implications, Clinica Chimica Acta. 1996, 246, pp. 51-57.
 23. Fuchs C. S et. al.,Alcohol consumption and mortality among women, Med. 1995, 332, pp. 1245-1250.
 24. Gronbaek M et. al., Influence of sex, age, body mass index, and smoking on alcohol intake and mortality. Br Med J; 308, 302-306, Br. Med. J. 1994, 308, pp. 302-306.
 25. Arts, I.C. and P.C. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. The American journal of clinical nutrition, 2005. 81(1 Suppl): pp. 317S-325S.

-
26. Aires, V. and D. Delmas, Common pathways in health benefit properties of RSV in cardiovascular diseases, cancers and degenerative pathologies. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015. 16(3): pp. 219-44.
27. Tuck KL et. al., The in vino fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidants phenolic constituents of olive oil after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr* 2001, 113,pp. 1993-1996.
28. Αποστολίδου Χρ. Ι. Επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών του ερυθρού οίνου και της ρεσβερατρόλης στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων σε υγιείς και ασυμπτωματικούς υπερλιπιδαιμικούς συμμετέχοντες. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Θεσσαλονίκη 2016.
29. Burns J., Gardner P.T., et. al., Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. 2001. American Chemical Society. *J. Agric Food Chem.* 49(12), pp. 5797-5808.
30. Burns J., Gardner P.T., et. al., Relationship among antioxidant activity, vasolidation capacity and phenolic content of red wines. American Chemical Society. *J. Agric Food Chem.* 48(2), pp. 220-230.
31. Σουφλέρός Ευαγγ. Ηρ.. Οίνος και αποστάγματα, Μέθοδοι ανάλυσης. Θεσσαλονίκη 2000 Εκδόσεις Σουφλέρος Ευάγγελος Η.
32. Τσελέπος Αρ. Μελετη της εξελίξης των φαινολικων συστατικων του κρασιου κατα την οينوποιηση και την αποθηκευση σε τροποποιημενη ατμοσφαιρα. Εθνικο Μετσοβιο Πολυτεχνειο, Σχολη Χημικων Μηχανικων, Τομεας IV: Συνθεσης & Αναπτυξης Βιομηχανικων Διαδικασιων, Εργαστηριο Χημειας & Τεχνολογιας τροφιμων, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα 2015
33. Ταγκούλη Δ. Βελτισποίηση παραλαβής φαινολικών-αντιοξειδωτικών ενώσεων από οινολάσπες. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Χημείας, Ειδίκευση Βιομηχανική Χημεία, Οίνος και Αλκοολούχα Ποτά, Αθήνα 2017.
34. Buckingham, J., & Munasinghe, V. (n.d.) Dictionary of flavonoids.

-
35. Τσελέπος Αρ. Μελέτη της εξέλιξης των φαινολικών συστατικών του κρασιού κατά την οиноποίηση και την αποθήκευση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας IV: Συνθέσης & Αναπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών, Εργαστήριο Χημείας & Τεχνολογίας τροφίμων, Διπλωματική Εργασία, Αθήνα 2015.
36. Cheynier, V. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. In *Flavonoids in wine*. Florida, 2006, pp. 273–299.
37. Terrier, N. et. al., 2009. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. In *Wine chemistry and biochemistry*, pp. 463-507, Springer New York.
38. Buckingham, J., & Munasinghe, V. (n.d.) *Dictionary of flavonoids*.
39. Cheynier, V. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. In *Flavonoids in wine*. Florida, 2006, pp. 273–299.
40. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D., 2006. *Handbook of Enology*. West Sussex-UK: John Wiley and Sons Ltd.
41. Jackson, R. S., *Wine science: principles and applications*, 2008, pp. 270-331, San Diego: Academic Press.
42. Terrier, N., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V., 2009, Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. In *Wine chemistry and biochemistry*, pp. 463-507, Springer New York.
43. Κουράκου–Δραγώνα, Σ., 1998, Θέματα Οινολογίας. Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα.
44. Kallithraka S., et. al., 2006, Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99, pp. 784–793.
45. Jackson, R. S., *Wine science: principles and applications*, 2008 pp. 270-331, San Diego: Academic Press.
46. Κοτσερίδης Γ., Σημειώσεις Οινολογίας II, 2006, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα.

-
47. Αναστασιάδη Μ. Μελέτη προϊόντων της ελληνικής αμπελουργίας και οινοποίησης. Προσδιορισμός βιοδραστικών συστατικών και αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα 2007.
48. Langcake P., Cornford C. A. , Pryce R. J. Identification of pterostilbene as aphytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochem.* 1979
49. Langcake P. and Pryce R.J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 1977, 33, 151
50. Dixon R.A. Natural products and plant disease resistance . *Nature* 2001.
51. Regev-Shoshani G. et.al., Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem. J.* 2003, 374, pp. 157.
52. Hertog M. G. at. al., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven country study. *Arch. Int. Medic.* 1995, 155, pp. 381-386
53. Elliott A. J et. al.,. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.* 1992, vol. 44, pp. 1603-1608.
54. Rosenbalt M. et. al., Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin, inhibits NADPH oxidase-induced cell mediated oxidation of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, pp. 13790- 13799.
55. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996. 44(11): pp. 3426-3431.
56. Klotek, Y. et. al., Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53(14): pp. 5640-5646.
57. Ren W. et. al.,. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Med. Res. Rev.* 2003, vol. 23,(4), pp. 519-534.
58. Knekt P. et. al., Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* 1997, 146, pp. 223-230.
59. Le Marchand L. et. al., Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92, pp. 154- 160.
60. De Stefani ED, et. al., Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer* 1999, 34, pp. 100-110.

-
61. De Stefani E. et. al., Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract-II. Nutrients. Oral Oncol. 1999, 35, pp. 22-26.
62. Jang M. et. al., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, Science 1997, 275, pp. 218-220.
63. Hiroyuki N. et. al., Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2001, 127, pp. 258
64. Ciolino H. P. et. al., Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. Cancer Res. 1998, 58, pp. 5707- 5712.
65. Casper R. F. et. al., Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity. Mol. Pharmacol. 1999, 56, pp. 84-90.
66. Kimura Y., Okuda H. Resveratrol Isolated from Polygonum cuspidatum Root Prevents Tumor Growth and Metastasis to Lung and Tumor-Induced Neovascularization in Lewis Lung Carcinoma-Bearing Mice. *The Journal of Nutrition*, Volume 131, Issue 6, 1 June 2001, pp. 1844–1849.
67. Soleas G.J. et. al., "Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?", Clinical Biochemistry 30, 1997, pp. 91-113.
68. McElderry MQB: "Grape Expectations: The Resveratrol Story".
69. Stivala LA, et al.: Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol", J Biol Chem 276, 2001, pp. 22586-22594,
70. Fremont L: "Biological effects of resveratrol. Minireview", Life Sciences 66:663673, 2000.
71. Βαλαβανίδης Α: "Ελεύθερες Ρίζες και ο Ρόλος τους στα Βιολογικά Συστήματα", Εκδ. ΒΗΤΑ, Αθήνα, 2006, σσ. 29-63.
72. Stuart J. A. and Robb E. L., Bioactive Polyphenols from wine grapes (book), SpringerBriefs in Cell Biology , Springer, 2013 (<https://www.researchgate.net/publication/257200029>). pp. 14.
73. Frankel, et al.: "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine", 1993, Lancet 341, pp. 454-456.
74. Ray PS, et al.: "The red wine antioxidant resveratrol protects rat hearts from ischemia reperfusion injury", 1999, Free Radic Biol Med 27, pp. 160-169.

-
75. Wollin SD, Jones PJ: "Alcohol, red wine and cardiovascular disease", J. Nutrition 131, 2001, pp. 1401-1404.
76. Rimm EB et. al., "Review on moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due beer, wine or spirits?", 1996, Br. Med J. 312, pp. 731-735.
77. Renaud S, De Lorgeril M: "Wine, alcohol, and the French paradox for coronary heart disease", Lancet 339, 1992, pp. 1523-1525.
78. Theodoropoulou S et. al., "Red wine and the "French paradox". Beneficial effects to human health. Myth or reality? A comparative study of the antioxidant potential of alcohol and polyphenols in red and white wine", 2002, Farmakeftiki 15(4): pp. 107-118.
79. Law M, Wald N: "Why heart disease mortality is low in France: the time lag explanation", 1999, Br. Med J. 318, pp. 1471-1480.
80. Βαλαβανίδης Αθ., Ευσταθίου Κ., Ρεσβερατρόλη. Άρθρο στον ιστότοπο chem.uoa.gr
81. Carbo N, et al.: "Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model", 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun 254, pp. 739-743.
82. Soleas GJ et. al., "A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols", Clin Biochem. 2002, 35, pp. 119-124.
83. Mollerup S, Ovrebo S, Haugen A: "Lung carcinogenesis: resveratrol modulates the expression of genes involved in the metabolism of PAHs in human bronchial epithelial cells", Int. J. Cancer 92, 2001, pp. 18-25.
84. Schultz J: "Resveratrol may be a powerful cancer-fighting ally", J. Natl. Cancer Inst. 96, 2004, pp. 1497-1498,
85. Jang M, et al.: "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes", Science 275, 1997, pp. 218-220.
86. Asensi M, et al.: "Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability", Free Radic. Biol. Med. 33: 2002, pp. 387-398
87. Hall S: "Longevity research. In vino vitalis? Compounds activate life-extending genes", Science 301: 2003, pp. 11-12
88. Kaeberlein M, Rabinovitch PS: "Grapes versus gluttony. A compound found in red grapes called resveratrol improves the health and lifespan of mice on a high-calorie diet", Nature 444, 2006, pp.280-281.
89. Baur JA, et al.: "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet", Nature 444: 2003, pp. 337-341.

-
90. Bavaresco L, Lucini L., Busconi M. Flamini R, De Rosso M. Wine Resveratrol: From the Ground Up. *Nutrients* 2016, 8, pp. 222.
91. Flamini, R.; et. al., Biosynthesis of stilbene oligomer phytoalexins in grape as a response to *A. carbonarius* infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2016, 93, pp. 112–118.
92. Mattivi, F. et. al., Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites accumulating in the leaves of hybrid *V. vinifera* (Merzling _ Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, pp. 5364–5375.
93. Korhammer, et. al., An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* 1995, 38, pp. 1501–1504.
94. Mattivi, F.; Reniero, F. Oligostilbenes from the roots of genus *Vitis*. *Bull. Liaison Groupe Polyphen.* 1992, 16, pp. 116–118.
95. Reniero, F. et. al., . Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *Vitis* 1996, 35, pp. 125–127.
96. Bavaresco, L. et. al., Physiology and molecular biology of grapevine stilbene: An update. In *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*, 2nd ed.; Roubelakis-Angelakis, K.A., Ed.; Springer Science + Business Media B. V: London, UK, 2009; pp. 341–364.
97. Jeandet, P. et. al., Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, pp. 2731–2741.
98. Gatto, P. et al. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, pp. 11773–11785.
99. Gatti, M. et. al., Viticultural performances of different Cabernet Sauvignon clones. *Acta Hortic.* 2014, 1046, pp. 659–664.
100. Bavaresco, L. et. al., Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime induced chlorosis. *Vitis* 2005, 44, pp. 63–65.
101. Bavaresco, L. et. al., Effect of nitrogen supply on trans-resveratrol concentration in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Vitis* 2001, 40, pp. 229–230.
102. Bavaresco, L. et. al., Effect of leaf removal on grape yield, berry composition, and stilbene concentration. *Am. J. Enol. Viticult.* 2008, 59, pp. 292–298.
103. Gatti, M.; Civardi, S.; Zamboni, M.; Ferrari, F.; Elothmani, D.; Bavaresco, L. Preliminary results on the effect of cluster thinning on stilbene concentration and antioxidant capacity of *V. vinifera* L. “Barbera” wine. *Vitis* 2011, 50, pp. 43–44.

-
104. Gebbia, N. et. al., The occurrence of the stilbene piceatannol in some wines from Sicily. *VigneVINI* 2003, 30, pp. 87–94.
105. Trela, B.C.; Waterhouse, A.L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, pp. 1253–1257.
106. Vrhovsek, U.; Wendelin, S.; Eder, R. Effects of various vinification techniques on the concentration of cis- and trans-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 1997, 48, pp. 214–219.
107. Threlfall, R.T.; Morris, J.R.; Mauromoustakos, A. Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the trans-resveratrol level of wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 1999, 50, pp. 57–64.
108. Mattivi, F.; Nicolini, G. Influence of the winemaking technique on the resveratrol content of wines. *L'Enotecnico* 1993, 29, pp. 81–88.
109. Roldan, A.; Palacios, V.; Caro, I.; Perez, L. Evolution of resveratrol and piceid contents during the industrial winemaking process of sherry wine. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, pp. 4268–4273.
110. Paronetto, L.; Mattivi, F. The resveratrol in oenology and an application of UVC rays to increase its concentration in Amarone wines. *L'Enotecnico* 1999, 35, pp. 73–81.
111. Bavaresco, L.; Morreale, G.; Flamini, R. Genetic and physiological bases of healthy attributes of grapes and wine. *Acta Hort.* 2015, 1082, pp. 263–274.
112. Μαυρομούστακος Θ., Ματσούκας Ι., NMR – Χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού: στο σχεδιασμό και στη σύνθεση Φαρμακευτικών Μορίων, στην Ιατρική, στη Χημεία Τροφίμων και Ποτών. Έκδοση: Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Οργανικής & Φαρμακευτικής Χημείας και Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας. Αθήνα 1998.
113. Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2002.
114. Ζατζηγιάννου Θ.Π., Κούππαρης Μ. Α., Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα, 2014.
115. Γεροθανάσης Ι., Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα.
116. Γεροθανάσης Ι., Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα.

-
117. Brescia, M. A. et. al., Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 458 (1), pp. 177–186.
118. Pereira, G. E. et. al., ¹H NMR metabolite fingerprints of grape berry: comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. *Anal. Chim. Acta* 2006, 563 (1-2), pp. 346–352.
119. Forveffle, L.; Vercauteren, J.; Rutledge, D. N. Multivariate statistical analysis of two-dimensional NMR data to differentiate grapevine cultivars and clones. *Food Chem.* 1996, 57 (3), pp. 441–450.
120. Son, H.-S. et. al., Metabolomic characterization of malolactic fermentation and fermentative behaviors of wine yeasts in grape wine. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, pp. 4801–4809.
121. Lee, J.-E.; Hong, Y.-S.; Lee, C.-H. Characterization of fermentative behaviors of lactic acid bacteria in grape wines through ¹H NMR and GC-based metabolic profiling. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, pp. 4810–4817.
122. Lopez-Rituerto et. al., thorough study on the use of quantitative ¹H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, pp. 2112–2118.
123. Son, H.-S. et. al., Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using ¹H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, pp. 1481–1490.
124. Son, H.-S. et. al., ¹H nuclear magnetic resonance based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, pp. 8007–8016.
125. Du, Y.-Y. et. al., Classification of wines based on combination of ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chin. J. Chem.* 2007, 25, pp. 930–936.
126. Ko_sir, I. J.; Kidri_c, J. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Anal. Chim. Acta* 2002, 458, pp. 77–84.
127. Masoum, S.; Jouan-Rimbaud Bouveresse, D.; Vercauteren, J.; Jalali- Heravi, M.; Rutledge, D. N. Discrimination of wines based on 2D NMR spectra using learning vector quantization neural networks and partial least squares discriminant analysis. *Anal. Chim. Acta* 2006, 558 (1-2), pp. 144–149.
128. Anastasiadi M. et. al., ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *J. Agric. Food Chem.*

-
129. Μουσούρη Ευγ. Ανακτηση βιοδραστικων συστατικων απο τις επιτραπεζιες ελιες και τα υδατικα αποβλητα εκπικρανσης της μεγαριτικης ποικιλιας. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ. 2013.
130. Κοκκότου Αικ. Ιχνηλάτιση του μεταβολικού αποτυπώματος ελληνικών οίνων με χρήση φασματοσκοπίας NMR και πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010.
131. Soleas G. et. al., Absorption of trans-resveratrol in rats. *Journal Methods Enzymol.* 2001, 335, pp. 145–154.
132. Vitrac X. et. al., Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines., A. et. al., *J. Agric. Food Chem.* 53 2005, pp. 5664.
133. A. A. Souto, M. C. Carneiro, M. Seferin, M. J. H. Senna, A. Conz, K. Gobbi, J. Food Compos. Anal. 14, 2001, pp. 441.
134. M. Careri, C. et. al., Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *Agric. Food Chem.* 52, 2004, pp. 6868
135. F. Buiarelli, F. et. al., Chromatographic analysis of trans resveratrol in Italian wines: comparisons between FL, UV and MS detection, *Chromatographia* 7/8, 2006, pp. 64.
- 136 Castellari M. et. al., Analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *J. Chromatogr. A* 973, 2002, pp. 221.
137. R. Lopez, P. et al.,. Determination of trans-resveratrol in wine by micro-HPLC with fluorescence detection. *Sep. Sci.* 30, 2007, pp. 669.
138. Vian M. Abert et. al., Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using chromolith columns. *Journal of Chromatography A* 1085, 2005, pp. 224.
139. Ribeiro de Lima M. T. et. al., Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1999, pp. 2666
140. X. Vitrac, J. P. Monti, J. Vercauteren, G. Deffieux, J. M. Mérillon, *Anal. Chim. Acta* 458, 2002, pp. 103.

-
141. Sakkiadi, A-V., Stavrakakis, M. N. and Haroutounian, S. A., Direct HPLC assay of five biologically interesting phenolic anti-oxidants in varietal Greek wines? *Lebensm-Wiss. u-Technol.* 2001, 34, pp. 410–413.
142. Goldberg D. M. et. al., Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct injection high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 708, 1995, pp. 89-98.
143. Rodríguez-Delgado M. A. et. al., Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Food Chemistry* 76, 2002, pp. 371.
144. Vinãs P. et. al., Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection, *Journal of Chromatography. A* 871, 2000, pp. 85-93.
145. Abril M. et. al., Preliminary study of resveratrol content in Aragón red and rosé wines *Food Chemistry* 92, 2005, pp. 729-736.
146. X. Vitrac, A. Bornet, R. Vanderlinde, J. Valls, T. Richard, J. C. Delaunay, J. M. Mérillon, P. L. Teissédre, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5664.
147. Ratola, N., Faria, J.L. & Alves, A., 2004. Analysis and quantification of trans-resveratrol in wines from Alentejo region (Portugal). *Food Technol. Biotechnol.* 42, pp. 125-130
148. J. Zhou, H. Cui, G. Wan, H. Xu, Y. Pang, C. Duan, *Food Chem.* 88 (2004) 613.
149. Ribeiro de Lima M. T. et. al., Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *Agricultural Food Chemistry* 47, 1999, pp. 2666-2670.
150. Baptista J.A.B. et. al., Comparison of polyphenols and aroma in red wine from Portuguese mainland versus Azores Island", *Food Res. Int.* 2001, 34, pp. 345-355.
151. A. V. Sakkiadi, et. al., Direct HPLC assay of five biologically interesting phenolic antioxidants in varietal greek red wines. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2001, 34, pp. 410-413
152. Dourtoglou V. G. et. al., Trans-resveratrol concentration in wines produced in Greece, *Journal of Food Composition Chemical Analysis* 12, 1999, pp. 227.
153. Kallithraka, S. et. al., The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines, 2001, *Food Chemistry*, 75, pp. 355–363.
154. D. M. Goldberg, E. Ng, A. Karumanchiri, J. Yan, E. P. Diamandis, G. J. Soleas, *Journal of Chromatography A* 708 (1995) 89.

-
155. Gu X., L. et. al., Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines., Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 1999, pp. 3223-3227.
156. Hanzlikova IK, Melzoch K, Filip V, Smidrkal J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wine. Food Chemistry 2004, 87, pp. 151–158
157. U. Vrhovsek U. et al., The occurrence of trans-resveratrol in slovenian red and white wines, Acta Alimentaria 24, 1995, pp. 203-212
158. Kim KS, Ghim SY, Seu YB, Song BH. High level of trans-resveratrol, a natural anti-cancer agent, found in Korean noul red wine.1999, Journal of Microbiol. Biotechnol. 9, pp. 691-693.
159. Sato M. et. al., Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. Biosci. Biotechol. Biochem. 61, 1997, pp. 1800.
160. T. Okuda, K. Yokotosuka, Trans-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. Am. J. Enol. Vitic. 47, 1996, pp. 93-99.
161. Mark L. et. al., A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines Chromatogr. Sci. 43, 2005, pp. 445-449.
162. Gu X. et. al., Capillary electrophoretic determination of resveratrol in wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 1999, pp. 3223-3227.
163. Vinãs P. et. al., Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. Journal of Chromatography A 871, 2000, pp. 85-93.
164. S. ĐEKIĆ `et. al., *Trans*- and *cis*-resveratrol concentration in wines produced in Serbia, Journal of the Serbian Chemical Society 73 (11), 2008, pp. 1027–1037.