



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Ανάπτυξη και Εφαρμογές Μεθοδολογιών Προσδιορισμού  
Συστατικών Πρωτογενούς Αρώματος σε Λευκούς Οίνους με  
Αεριοχρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών**

**ΜΑΡΙΑ ΜΕΤΑΦΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2014**



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Ανάπτυξη και Εφαρμογές Μεθοδολογιών Προσδιορισμού Συστατικών Πρωτογενούς Αρώματος σε Λευκούς Οίνους με Αεριοχρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών

**ΜΑΡΙΑ ΜΕΤΑΦΑ**

**A.M.: 102702**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

**Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:**

- 1. Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**
- 2. Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**
- 3. Μαρία Λιούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**
- 2. Μαρία Λιούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**
- 3. Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**
- 4. Κλεάνθης Ισραηλίδης, Ερευνητής Α΄, ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ (πρώην ΕΘΙΑΓΕ)**
- 5. Ευάγγελος Μπακέας, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ**
- 6. Σταματίνα Καλλίθρακα, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, ΓΠΑ**
- 7. Παρασκευάς Τζαναβάρας, Λέκτορας Τμήματος Χημείας, ΑΠΘ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27/02/2014**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτήν τη διατριβή, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μίας μεθοδολογίας SPE-GC/MS και χημειομετρική ανάπτυξη μίας μεθοδολογίας SPME-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 ελεύθερων και γλυκοζιτικά δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών (τερπενικών ενώσεων, C<sub>6</sub> αλκοολών, C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδών και βενζολικών παραγώγων) σε λευκούς ξηρούς οίνους.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ επτά εμπορικά διαθέσιμων SPE μικροστηλών για το διαχωρισμό και την απομόνωση των ελεύθερων και των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων με SPE. Την καλύτερη επίδοση, με κριτήριο την ανάκτηση σήματος των ελεύθερων και μετά από ενζυμική υδρόλυση το αναλυτικό σήμα των δεσμευμένων συστατικών, είχε η μικροστήλη Isolute ENV+.

Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας SPME-GC/MS, αρχικά πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ πέντε εμπορικά διαθέσιμων ινών SPME, με δειγματοληψία από την υγρή και την αέρια φάση του δείγματος. Επιλέχθηκε μικροεκχύλιση από την υγρή φάση με ίνα PDMS/DVB καθώς με αυτό το συνδυασμό παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάκτηση και η βέλτιστη αναπαραγωγιμότητα. Με εφαρμογή μερικού πειραματικού σχεδιασμού (Plackett-Burman), εξετάσθηκε η επίδραση στη μικροεκχύλιση επτά παραγόντων και επιλέχθηκαν εκείνοι με τη μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα. Στη συνέχεια, για τη βελτιστοποίηση των πέντε σημαντικότερων παραγόντων εφαρμόσθηκε τροποποιημένη μέθοδος Simplex.

Οι δύο μέθοδοι επικυρώθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 21 ελεύθερων αρωματικών συστατικών με αξιολόγηση ως προς την ειδικότητα, τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, την ανάκτηση, την αναπαραγωγιμότητα, την επαναληψιμότητα και την αβεβαιότητά. Στη συνέχεια, εφαρμόσθηκαν επιτυχώς, για την ανάλυση 20 λευκών μονοποικιλιακών οίνων από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες αμπέλου *Vitis vinifera*.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Αναλυτική χημεία

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Πρωτογενή αρωματικά συστατικά, λευκοί οίνοι, GC/MS, SPE, SPME.

## ABSTRACT

In this thesis, a SPE/GC–MS methodology and a SPME/GC–MS methodology were developed for the determination of 21 free and glycosidically-bound volatile varietal aroma compounds (terpenes, C<sub>6</sub> alcohols, C<sub>13</sub> norisoprenoids and benzene derivatives) in wines.

Initially, a critical comparison was made of seven SPE sorbents for the fractionation and isolation of the 21 free and bound target compounds. The most satisfactory extraction efficiency for both free and bound fractions was obtained with the Isolute ENV+ resin.

For the isolation/preconcentration of the target compounds with the SPME-GC/MS method, a comparison was made of five commercially available SPME fibers in the headspace (HS) and direct immersion (DI) modes. The fibre coated with PDMS/DVB in the direct immersion mode was selected, as it yielded satisfactory extraction efficiency and the best reproducibility. The statistical significance of seven microextraction variables was evaluated using a 2-level Plackett–Burman experimental design. Then the five statistically most significant factors were optimised using a modified Simplex procedure.

The two methods were fully validated (in terms of selectivity, linearity, limits of detection and quantification, recovery, repeatability, reproducibility and uncertainty for the quantitative determination of the 21 free aroma compounds and were successfully applied to the analysis of 20 monovarietal white wine samples from indigenous and international varieties of *Vitis vinifera* L. cultivated in Greece.

**SUBJECT AREA:** Analytical Chemistry

**KEYWORDS:** Primary volatile aroma compounds, white wines, GC/MS, SPE, SPME.

**Στο σύντροφό μου, Νίκο**  
**Στα παιδιά μου, Οδυσσέα και Ζωή**





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>25</b>
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΩΝ.....</b>	<b>31</b>
1.1 Γενικά για το άρωμα των οίνων.....	31
1.2 Συστατικά πρωτογενούς αρώματος .....	33
1.2.1 Τερπένια.....	34
1.2.1.1 Δομή τερπενίων.....	34
1.2.1.2 Παρουσία σε σταφύλια και οίνους .....	35
1.2.1.3 Βιοσύνθεση τερπενίων .....	40
1.2.2 C <sub>13</sub> Νορισοπρενοειδείς ενώσεις.....	42
1.2.2.1 Δομή και ιδιότητες.....	42
1.2.2.2 Παρουσία σε σταφύλια και οίνους .....	43
1.2.2.3 Η β-δαμασκηνόνη .....	43
1.2.2.4 Η β-ιονόνη .....	45
1.2.3 C <sub>6</sub> αλκοόλες.....	46
1.2.4 Βενζολικά παράγωγα .....	48
1.2.5 Γλυκοζίτες πτητικών συστατικών .....	50
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ</b>	
<b>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ .....</b>	<b>56</b>
2.1 Γενικά.....	56
2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).....	57
2.2.1 Είδη και χαρακτηριστικά πληρωτικών υλικών .....	59
2.2.1.1 Πυριτικά υλικά.....	60
2.2.1.2 Πολυμερικά υλικά .....	63

2.2.2	Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPE για προσδιορισμούς συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε σταφύλια & οίνους – Ανασκόπηση .....	67
2.2.2.1	Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPE με πυριτικά υλικά.....	68
2.2.2.2	Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPE με πολυμερικά υλικά.....	73
2.2.2.3	Σύγκριση SPE με άλλες τεχνικές .....	80
2.3	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού (SPME).....	81
2.3.1	Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPME για προσδιορισμούς συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε οίνους – Ανασκόπηση.....	85
2.3.2	Σύγκριση SPME με άλλες τεχνικές .....	94

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΛΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>99</b>	
3.1	Οινοποιήσεις και δείγματα.....	99
3.1.1	Οινοποιήσεις και δείγματα οίνων .....	99
3.1.2	«Τυφλά» δείγματα οίνων .....	102
3.2	Μεθοδολογία SPE-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους .....	102
3.2.1	Αρχή μεθόδου.....	102
3.2.2	Σύνοψη πειραματικών δοκιμών .....	103
3.2.3	Πρότυπες ουσίες, διαλύτες και αντιδραστήρια .....	104
3.2.4	Εργαστηριακός εξοπλισμός .....	105
3.2.5	Παρασκευή και έλεγχος σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων.....	106
3.2.6	Πρωτόκολλο κατεργασίας δείγματος οίνου .....	108
3.2.6.1	Προκατεργασία δείγματος.....	109
3.2.6.2	SPE .....	109
3.2.6.3	Κατεργασία πτητικού κλάσματος.....	109
3.2.6.4	Κατεργασία δεσμευμένου κλάσματος .....	110
3.2.7	Ανάλυση με GC/MS.....	111

3.2.8	Εκτίμηση ανάκτησης σήματος .....	112
3.2.9	Εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος.....	114
3.2.10	Χάραξη καμπυλών βαθμονόμησης.....	116
3.2.11	Εκτίμηση ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης .....	117
3.2.12	Εκτίμηση ακρίβειας και πιστότητας.....	117
3.2.13	Εκτίμηση αβεβαιότητας των μετρήσεων .....	118
3.3	Μεθοδολογία SPME-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους .....	119
3.3.1	Σύνοψη πειραματικών δοκιμών .....	119
3.3.2	Χημικά αντιδραστήρια.....	120
3.3.3	Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	121
3.3.4	Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου οίνων.....	121
3.3.5	Παρασκευή προσομοιωτών οίνου .....	122
3.3.6	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων και προτύπων βαθμονόμησης.....	122
3.3.7	Γενικές αναλυτικές διαδικασίες .....	123
3.3.7.1	Προετοιμασία ίνας .....	123
3.3.7.2	Διάταξη SPME.....	124
3.3.7.3	Γενική SPME κατεργασία .....	124
3.3.8	Τελικό πρωτόκολλο κατεργασίας δείγματος .....	125
3.3.8.1	Προκατεργασία δείγματος οίνου για προσδιορισμό ελεύθερων συστατικών.....	125
3.3.8.2	Προκατεργασία δείγματος οίνου για προσδιορισμούς δεσμευμένων συστατικών.....	126
3.3.8.3	Τελική κατεργασία SPME .....	127
3.3.9	Ανάλυση GC/MS.....	127
3.3.10	Συγκριτικά πειράματα επιλογής τύπου ίνας και μεθόδου δειγματοληψίας .....	128
3.3.11	Εφαρμογή μερικού παραγοντικού σχεδιασμού για εύρεση σημαντικών παραμέτρων στην SPME.....	131

3.3.12	Πειραματικός σχεδιασμός για βελτιστοποίηση σημαντικών παραμέτρων .....	134
3.3.13	Χάραξη ευθειών βαθμονόμησης της αναλυτικής διαδικασίας .....	137
3.3.14	Εκτίμηση ορίων ανίχνευσης και προσδιορισμού.....	138
3.3.15	Εκτίμηση ακρίβειας και πιστότητας.....	138
3.3.16	Εκτίμηση αβεβαιότητας.....	139
3.3.17	Πειραματικός σχεδιασμός για εκτίμηση αντοχής (ruggedness) και ανθεκτικότητας (robustness).....	139
3.3.18	Εφαρμογή μεθόδου σε δείγματα οίνων.....	142
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>		<b>144</b>
4.1	Μεθοδολογία SPE-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους .....	144
4.1.1	Συγκριτική μελέτη πληρωτικών υλικών .....	144
4.1.2	Επίδραση υποστρώματος (matrix effect).....	151
4.1.3	Επικύρωση της μεθόδου .....	157
4.1.3.1	Εκλεκτικότητα .....	158
4.1.3.2	Γραμμικότητα και ανιχνευσιμότητα .....	161
4.1.3.3	Ολική ανάκτηση.....	162
4.1.3.4	Ακρίβεια μεθόδου .....	164
4.1.3.5	Αβεβαιότητα μετρήσεων .....	165
4.1.4	Εφαρμογή σε δείγματα οίνων .....	169
4.2	Μεθοδολογία SPME-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους .....	172
4.2.1	Επιλογή ίνας και τύπου μικροεκχύλισης .....	172
4.2.2	Χημειομετρική μελέτη στατιστικά σημαντικών παραμέτρων .....	179
4.2.3	Βελτιστοποίηση σημαντικών παραμέτρων με μέθοδο Simplex.....	182
4.2.4	Επικύρωση της μεθόδου .....	184
4.2.4.1	Εκλεκτικότητα .....	184
4.2.4.2	Γραμμικότητα και ανιχνευσιμότητα .....	186

4.2.4.3	Ολική ανάκτηση.....	187
4.2.4.4	Ακρίβεια, πιστότητα και αβεβαιότητα .....	189
4.2.4.5	Ανθεκτικότητα .....	193
4.2.5	Προσδιορισμός δεσμευμένων αρωματικών συστατικών.....	196
4.2.6	Εφαρμογή σε δείγματα οίνων .....	197
4.2.7	Συγκριτικά αποτελέσματα SPME-SPE.....	200
4.2.8	Αρωματικά χαρακτηριστικά ποικιλιών.....	207
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....</b>		<b>213</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>		<b>218</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>		<b>219</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....</b>		<b>221</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....</b>		<b>228</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....</b>		<b>232</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>		<b>233</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Ρινική και οπισθορρινική ανίχνευση οργανικών πτητικών ενώσεων των οίνων από τους οσφρητικούς υποδοχείς.....	31
Σχήμα 1.2: Συντακτικοί τύποι μονοτερπενικών ενώσεων .....	35
Σχήμα 1.3: Συμπύκνωση των μορίων IPP και DMAPP για τη δημιουργία διφωσφορικού γερανυλίου GPP.....	41
Σχήμα 1.4: Συντακτικοί τύποι C <sub>13</sub> νορισοπρενοειδών ενώσεων .....	43
Σχήμα 1.5: Συντακτικοί τύποι χαρακτηριστικών C <sub>6</sub> αλκοολών των οίνων.....	46
Σχήμα 1.6: Συντακτικοί τύποι χαρακτηριστικών βενζολικών ενώσεων των οίνων .....	49
Σχήμα 1.7: Συντακτικοί τύποι γλυκοζιτών των πτητικών ενώσεων σταφυλιών και οίνων.....	52
Σχήμα 2.1: Στάδια εκχύλισης για το διαχωρισμό ελεύθερων και πτητικών αρωματικών συστατικών .....	59
Σχήμα 2.2: Πυριτικό πληρωτικό υλικό για SPE.....	61
Σχήμα 2.3: Τυπική αντίδραση σιλανοποίησης κατά την οποία οι επιφανειακές ομάδες –SiOH καθαρής πυριτίδας, αντικαθίστανται με μεγάλα αλκύλια (εδώ: δεκαοκτύλια), με αποτέλεσμα η πυριτία αυτή να καθίσταται υδρόφοβη και ως στατική φάση "μη-πολική". Η συγκεκριμένη στατική φάση συχνά αναφέρεται ως "C-18" .....	62
Σχήμα 2.4: Συντακτικοί τύποι : βινυλοβενζολίου (ή στυρολίου, S), π-διβινυλοβενζολίου (DVB) και συμπολυμερούς (co-polymer) πολυστυρολίου- διβινυλοβενζολίου, (PS -DVB). .....	64
Σχήμα 2.5: Στάδια SPME διαδικασίας (A) εκχύλισης και (B) εκρόφησης.....	81
Σχήμα 2.6: Συσκευή τεχνικής SPME και εμπορικά διαθέσιμο ανταλλακτικό ίνας SPME.....	83
Σχήμα 3.1: Συμπύκνωση με στήλη Vigreux.....	110
Σχήμα 3.2: Διάταξη SPME.....	124
Σχήμα 4.1: Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των πτητικών τερπενίων ως προς τις ανακτήσεις σήματος (E <sub>i</sub> % ή E <sub>i</sub> *%)	

	± S.D.) (n=3) των αναλυτών από υπόστρωμα οίνου, για επίπεδο εμβολιασμού 100 µg L <sup>-1</sup> .....	146
Σχήμα 4.2	Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των πτητικών C <sub>6</sub> αλκοολών, C <sub>13</sub> νορισοπρενοειδών και βενζολικών παραγώγων, ως προς τις ανακτήσεις σήματος (E <sub>i</sub> % ή E <sub>i</sub> *% ± S.D.) (n=3) των αναλυτών από υπόστρωμα οίνου, για επίπεδο εμβολιασμού 100 µg L <sup>-1</sup> .....	147
Σχήμα 4.3:	Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των δεσμευμένων τερπενίων, ως προς το σχετικό εμβαδόν ± SD (n=3) των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου .....	149
Σχήμα 4.4:	Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των δεσμευμένων C <sub>6</sub> αλκοολών, C <sub>13</sub> νορισοπρενοειδών και βενζολικών παραγώγων, ως προς το σχετικό εμβαδόν ± SD (n=3) των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου .....	150
Σχήμα 4.5:	Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των αναλυτών νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη, ως προς τις ανακτήσεις σήματος .....	152
Σχήμα 4.6:	Ανακτήσεις σήματος (E%) των συστατικών νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη, από υπόστρωμα ύδατος, προσομοιωτή οίνου ή οίνου όπου οι αναλύτες προστέθηκαν: α) πριν την κατεργασία SPE (σε στήλη C18) ή β) μετά την κατεργασία SPE (σε στήλη C18), για επίπεδο εμβολιασμού 100 µg L <sup>-1</sup> , αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης των ενώσεων σε διαλύτη. ....	154
Σχήμα 4.7:	Δύο GC-MS χρωμ/τα (μέθοδος SIM) μετά από κατεργασία SPE: (A) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου, και (B) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου εμβολιασμένου με όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά σε συγκέντρωση 50 µg L <sup>-1</sup> .....	160
Σχήμα 4.8:	Ολική ανάκτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών με τη μέθοδο SPE-GC/MS .....	163
Σχήμα 4.9:	Μέση συγκέντρωση (σε µg L <sup>-1</sup> ) ελεύθερων και δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο SPE/GC-MS σε 20 δείγματα οίνων .....	171

Σχήμα 4.10: Σταθμισμένα εμβαδά των προσδιοριζόμενων ενώσεων και το άθροισμα $A_{tot, f}$ των σταθμισμένων εμβαδών, που απέδωσαν οι 5 ίνες SPME με δύο τύπους δειγματοληψία HS-SPME και DI-SPME .....	175
Σχήμα 4.11: Σταθμισμένα σχετικά εμβαδά των προσδιοριζόμενων ενώσεων και το άθροισμα $A_{tot,rel,f}$ των σταθμισμένων σχετικών εμβαδών, που απέδωσαν οι 5 ίνες SPME με δύο τύπους δειγματοληψία HS-SPME και DI-SPME .....	176
Σχήμα 4.12: Αναπαραγωγιμότητα των δοκιμαζόμενων ινών με τους δύο τύπους μικροεκχύλισης HS-SPME και DI-SPM .....	177
Σχήμα 4.13: Η % επίδραση που αντιστοιχεί σε κάθε παράμετρο και ο αριθμός των συστατικών για τα οποία κάθε παράμετρος έχει στατιστικά σημαντική επίδραση, με βάση τα σχετικά εμβαδά των προσδιοριζόμενων συστατικών.....	181
Σχήμα 4.14: Απόκριση των διαδοχικών vertex του αλγορίθμου της τροποποιημένης Simplex για τη βελτιστοποίηση 4 σημαντικών παραμέτρων.....	183
Σχήμα 4.15: Δύο χρωμ/τα GC–MS μετά από SPME: (A) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου εμβολιασμένο με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση $128 \mu\text{g L}^{-1}$ , και (B) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου εμβολιασμένο με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση $128 \mu\text{g L}^{-1}$ και με όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά σε συγκέντρωση $20 \mu\text{g L}^{-1}$ .....	185
Σχήμα 4.16: Ολική ανάκτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών.....	188
Σχήμα 4.17: Μέση συγκέντρωση (σε $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ελεύθερων και δεσμευμένων συστατικών που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο SPME/GC-MS και αριθμός δειγμάτων, από τα συνολικά 20 δείγματα οίνων στα οποία οι ενώσεις προσδιορίστηκαν .....	199
Σχήμα 4.18: Συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό: (A) των ελεύθερων-πτητικών αναλυτών και (B) των δεσμευμένων (μετά από ενζυμική υδρόλυση) 21 πρωτογενών αρωματικών συστατικών, σε 20 δείγματα οίνων με τις μεθόδους SPE-GC/MS και SPME-GC/MS.....	201



Σχήμα 4.19: Συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό (Α) των ελεύθερων και (Β) δεσμευμένων (μετά από ενζυμική υδρόλυση) τερπενικών ενώσεων, σε 20 δείγματα οίνων με τις μεθόδους SPE/GC-MS και SPME/GC-MS .....	202
Σχήμα 4.20: Συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελεύθερων (Α) και δεσμευμένων (μετά από ενζυμική υδρόλυση) C6 αλκοολών (Β), σε 20 δείγματα οίνων με τις μεθόδους SPE/GC-MS και SPME/GC-MS .....	204
Σχήμα 4.21: Σύγκριση του μέσου όρου των αναλυτικών αποτελεσμάτων για τη βενζυλική αλκοόλη και τη δεσμευμένη β-φαινυλαιθανόλη, από την ανάλυση 20 δειγμάτων οίνων με δύο μεθόδους προσδιορισμού SPE/GC-MS και SPME/GC-MS .....	206
Σχήμα 4.22: Εκατοστιαία κατανομή των αρωματικών συστατικών (Α) στο ελεύθερο κλάσμα (μη συμπεριλαμβανομένης της β-φαινυλαιθανόλης) και (Β) στο δεσμευμένο κλάσμα, σε 11 ελληνικές και 4 διεθνείς ποικιλίες (σε λογαριθμική κλίμακα) .....	209

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Κατηγοριοποίηση ορισμένων ποικιλιών με βάση την περιεκτικότητά τους σε τερπένια.....	37
Πίνακας 1.2: Συγκεντρώσεις δεσμευμένων και ελεύθερων τερπενολών σε διάφορες ποικιλίες.....	38
Πίνακας 1.3: Περιγραφή χαρακτηριστικής οσμής και κατώφλι αντίληψης ορισμένων μονοτερπενικών ενώσεων των οίνων.....	39
Πίνακας 1.4: Περιγραφή χαρακτηριστικής οσμής και κατώφλι αντίληψης ορισμένων C6 αλκοολών των οίνων.....	48
Πίνακας 1.5: Περιγραφή χαρακτηριστικής οσμής και κατώφλι αντίληψης βενζολικών παραγώγων των οίνων.....	50
Πίνακας 2.1: Εμπορικές ονομασίες και χαρακτηριστικά SPE πολυμερών πληρωτικών.....	66
Πίνακας 2.2: Ανάπτυξη και εφαρμογές μεθόδων SPE με τροποποιημένα πυριτικά πληρωτικά υλικά, για κατεργασίες οίνων και άλλων συναφών προϊόντων με σκοπό τον προσδιορισμό (αποκλειστικά ή μεταξύ άλλων) πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε ελεύθερη (FV, Free Volatiles), ή/και δεσμευμένη μορφή (PV, Potential Volatiles).....	71
Πίνακας 2.3: Ανάπτυξη και εφαρμογές μεθόδων SPE με πολυμερείς ρητίνες ως πληρωτικά υλικά για κατεργασίες οίνων και άλλων συναφών προϊόντων για τον προσδιορισμό (αποκλειστικά ή μεταξύ άλλων) πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε ελεύθερη (FV, Free Volatiles), ή/και σε δεσμευμένη μορφή (PV, Potential Volatiles).....	78
Πίνακας 2.4: Κύρια χαρακτηριστικά των εμπορικά διαθέσιμων SPME ινών.....	85
Πίνακας 2.5: Ανάπτυξη και εφαρμογές μεθόδων SPME για τον προσδιορισμό (αποκλειστικά ή μεταξύ άλλων) πρωτογενών αρωματικών σε οίνους και σταφύλια.....	92
Πίνακας 3.1: Δείγματα σταφυλιών <i>Vitis vinifera</i> , εσοδείας 2010, που οινοποιήθηκαν. Συνώνυμα και περιοχές καλλιέργειας των ελληνικών ποικιλιών.....	102
Πίνακας 3.2: Μικροστήλες SPE που μελετήθηκαν.....	105
Πίνακας 3.3: Στοιχεία μεθόδου SIM.....	112
Πίνακας 3.4: Χαρακτηριστικά των SPME ινών που δοκιμάστηκαν .....	121

Πίνακας 3.5: Στοιχεία μεθόδου SIM.....	128
Πίνακας 3.6: Πειραματικές συνθήκες για την επιλογή του τύπου ίνας και τεχνικής δειγματοληψίας.....	129
Πίνακας 3.7: Επίπεδα παραγόντων για πειραματικό σχεδιασμό Plackett-Burman.....	133
Πίνακας 3.8: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman για 7 παράγοντες .....	133
Πίνακας 3.9: Αρχική τιμή, βήμα και δεκαδικά ψηφία των υπό βελτιστοποίηση μεταβλητών.....	136
Πίνακας 3.10: Πειραματικές δοκιμές μεθόδου SIMPLEX .....	136
Πίνακας 3.11: Βελτιστοποιημένες συνθήκες για SPME .....	138
Πίνακας 3.12: Επίπεδα παραγόντων για έλεγχο ανθεκτικότητας της μεθόδου με πειραματικό σχεδιασμό Plackett-Burman .....	139
Πίνακας 3.13: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman 7 παραγόντων για έλεγχο ανθεκτικότητας της μεθόδου .....	140
Πίνακας 3.14: Δείγματα οίνων, περιεκτικότητα σε EtOH, όγκος δείγματος (mL) που αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και οι συντελεστές διόρθωσης των αποτελεσμάτων.....	142
Πίνακας 4.1: Παράμετροι βαθμονόμησης και όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου.....	161
Πίνακας 4.2: Μέσες % ανακτήσεις, R %, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, RSDM %, επαναληψιμότητα οργάνου, RSDr %, τιμές δείκτη “Horrat” H, και εκατοστιαία διευρυμένη αβεβαιότητα U <sub>exp</sub> %, της μεθόδου SPE-GC/MS σε 4 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα οίνου .....	167
Πίνακας 4.3 Στατιστικά δεδομένα για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις από τις αναλύσεις 20 λευκών οίνων με τη μέθοδο SPE-GC/MS .....	170
Πίνακας 4.4: Παράμετροι βαθμονόμησης και όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου.....	187
Πίνακας 4.5: Μέσες % ανακτήσεις R %, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα RSDM %, τιμές δείκτη “Horrat” H, και εκατοστιαία διευρυμένη αβεβαιότητα U <sub>exp</sub> %, της μεθόδου SPME-GC/MS σε 4 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα οίνου.....	191
Πίνακας 4.6: Στοιχεία για την ανθεκτικότητα της μεθόδου για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση.....	194
Πίνακας 4.7: Στατιστικά δεδομένα για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις από τις αναλύσεις 20 λευκών οίνων με τη μέθοδο SPME/GC-MS. ....	198



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Ινστιτούτο Οίνου Αθηνών, του ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ (πρώην ΕΘΙΑΓΕ) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ.

Καταρχήν, νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της ερευνητικής αυτής εργασίας, κ. Αναστάσιο Οικονόμου, Αναπληρωτή Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, που μου έδωσε την ευκαιρία να εργασθώ στον τομέα της Αναλυτικής Χημείας, με την ανάθεση του θέματος. Χωρίς την πολύπλευρη και ουσιαστική επιστημονική του καθοδήγηση και αρωγή δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Με υπομονή και καλοσύνη, πνεύμα αλληλεγγύης και πραγματική διάθεση προσφοράς μου προσέφερε αδιαλείπτως ανεκτίμητη βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια. Κατά τη διάρκεια της διατριβής ευτύχησα επίσης να έχω στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή τον καταξιωμένο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Μιχαήλ Κουππάρη. Τον ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη και τις πάντα εύστοχες υποδείξεις και συμβουλές του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Μαρία Λιούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας για την ευγενική της συνεισφορά σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Κλεάνθη Ισραηλίδη, Ερευνητή Α΄ του ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ, κα Σταματίνα Καλλίθρακα, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ, κ. Ευάγγελο Μπακέα, Επίκουρο Καθηγητή Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, και κ. Παρασκευά Τζαναβάρα, Λέκτορα Τμήματος Χημείας του ΑΠΘ, για τη συμμετοχή τους στην Εξεταστική Επιτροπή και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Θεωρώ ακόμη, υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω ξεχωριστά, το διευθυντή του Ινστιτούτου Οίνου, Δρ. Κλεάνθη Ισραηλίδη, για το πνεύμα κατανόησης που επέδειξε κατά το διάστημα της πειραματικής έρευνας, όπως επίσης και όλο το

προσωπικό του Ινστιτούτου Οίνου. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Ιωάννη Μαρμαρά, κα Γαρυφαλλιά Καραπέτρου, κ. Νίκο Σπανουδάκη και κ. Παναγιώτη Χατζηελευθερίου για την πραγματοποίηση των οινοποιήσεων και τις Δρ. Σταματίνα Καλλίθρακα (τ. ερευνήτρια Β΄ του ΕΘΙΑΓΕ) και Δρ. Παρασκευή Πραματευτάκη για τις εποικοδομητικές μας συζητήσεις.

Η εκπόνηση μίας διδακτορικής διατριβής είναι μία προσωπική, χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία. Δε θα μπορούσε όμως να ολοκληρωθεί χωρίς την ουσιαστική συμμετοχή, βοήθεια και συμπαράσταση ορισμένων ανθρώπων σε προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα λοιπόν, καταρχήν, να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη προς τη μητέρα μου Ευτυχία Μετάφα, για την αδιάκοπη συμπαράσταση και την ουσιαστική της βοήθεια, ιδιαίτερα κατά το τελευταίο διάστημα της συγγραφής της διατριβής. Ακόμη, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα Αναστασία Κουτσιβίτου, καθώς με τη συνεχή της ενθάρρυνση και συμπαράσταση αποτέλεσε για μένα ένα σημαντικό στήριγμα κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής.

Πάνω απ' όλα όμως, είναι η ώρα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη προς το σύντροφό μου Νίκο Κυριακό, που βρίσκεται πάντα στο πλευρό μου, θερμός υποστηρικτής, κάθε μου προσπάθειας για προσωπική και επαγγελματική εξέλιξη, και προς τα αγαπημένα μου παιδιά, Οδυσσέα και Ζωή, που έδειχναν κατανόηση και έκαναν υπομονή όλα αυτά τα χρόνια. Ελπίζω κάποτε, όταν καταλάβουν γιατί η μαμά τους έπρεπε να διαβάσει τόσο πολύ, ετούτη η εργασία να αποτελέσει γι' αυτά ένα παράδειγμα, που θα τα βοηθήσει να θέσουν αργότερα τους δικούς τους στόχους στη ζωή, χωρίς να διστάσουν να κοπιάσουν για την πραγματοποίησή τους.

*Μά τό γλυκόπιτο τό Μάγνητα  
καί τό Θασιώτικο, πού ἔχει μήλου μοσκοβολιά,  
ἐγώ τούς ἔχω γιά καλύτερους ἀπό ὅλα τά κρασιά,  
μαζί τόν χιώτικο, τόν ἀψεγάδιαστο πού παύει τίς λύπες  
κι εἶναι κάποιος, σαπρία τόν καλοῦνε,  
πού ὅταν ανοίγουν τά σταμνιά,  
ἄρωμα εὐωδιάζει μενεξέ καί ρόδου καί γνακίνθου,  
ὁσμή θεσπέσια γεμίζει ὅλο τό σπίτι,  
νέκταρ μαζί καί ἀμβροσία.*

Ἑρμῖππος, ἀπ. 77 [Ἐπιτομή, 29ε]

5ος αἰώνας π.Χ.





## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως συμβαίνει στα περισσότερα τρόφιμα και ποτά, έτσι και στους οίνους, το άρωμα είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος που καθορίζει την ποιότητα και την αξία τους. Το άρωμα διαμορφώνεται σε όλη τη διάρκεια της ζωής του οίνου. Ανάλογα με το στάδιο στο οποίο δημιουργήθηκαν, τα αρωματικά συστατικά ταξινομούνται ως πρωτογενές, δευτερογενές και τριτογενές άρωμα. Στο πρωτογενές άρωμα των οίνων ανήκουν ενώσεις που προϋπάρχουν καθώς δημιουργούνται στο σταφύλι. Αντίθετα, στο δευτερογενές και τριτογενές άρωμα ανήκουν πτητικά συστατικά που παράγονται είτε κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης από τις ζύμες (δευτερογενές άρωμα), είτε από τις κατεργασίες των οίνων κατά την παλαίωση (τριτογενές άρωμα). Η παρούσα διατριβή αφορά τα συστατικά του πρωτογενούς αρώματος.

Το πρωτογενές άρωμα είναι το λεγόμενο ποικιλιακό άρωμα που προσδίδει την τυπικότητα του οίνου. Από πλευράς χημικής δομής, σημαντική συμβολή στη διαμόρφωση του ποικιλιακού αρώματος έχουν μεταξύ άλλων ενώσεις που ανήκουν σε κατηγορίες όπως τα μονοτερπένια, οι C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδείς ενώσεις, οι βενζολικές ενώσεις και οι C<sub>6</sub> αλκοόλες. Τα μόρια αυτά είτε βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, οπότε είναι οσμηρά, είτε βρίσκονται δεσμευμένα με τη μορφή μη πτητικών γλυκοζιτών, και είναι άοσμα. Η υδρόλυση αυτών των γλυκοζιτών, στις όξινες συνθήκες της οινοποίησης ή υπό την επίδραση ενδογενών ή εξωγενών ενζύμων, μπορεί να απελευθερώσει το άγλυκο τμήμα τους αποκαλύπτοντας έτσι το δεσμευμένο ποικιλιακό άρωμα.

Η γνώση της συνολικής ποσότητας των ελεύθερων αλλά και των δεσμευμένων αρωματικών ουσιών είναι λοιπόν, απαραίτητη για τους οινολόγους/παραγωγούς τόσο ως εργαλείο αξιολόγησης των ποικιλιακών οίνων, όσο και ως ένα σημαντικό βοήθημα για την επιλογή των τεχνικών που θα εφαρμόσουν κατά τη διαδικασία της οινοποίησης όπως π.χ. ποια στελέχη ζυμών θα επιλέξουν, το εάν θα προσθέσουν ένζυμα (εξωγενείς γλυκοζιδάσες)

για την απελευθέρωση του δεσμευμένου αρωματικού δυναμικού ή άλλες τεχνικές με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων οίνων. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να υπάρχουν αξιόπιστες μέθοδοι για το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό και των δύο κλασμάτων τόσο των ελεύθερων όσο και των δεσμευμένων (πρόδρομων) αρωματικών ουσιών.

Στην έρευνα για τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών στους οίνους, η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης είναι η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS). Η πολυπλοκότητα όμως της μήτρας των οίνων, οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων συστατικών και η ανάγκη για το διαχωρισμό των δύο κλασμάτων, καθιστούν απαραίτητο να προηγείται κατεργασία του δείγματος.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) αποτελεί τεχνική με πολυάριθμες εφαρμογές στη διεθνή βιβλιογραφία για το σκοπό αυτό. Δεν έχει γίνει ωστόσο, έως σήμερα, συστηματική σύγκριση SPE στηλών που να αφορά και τα δύο κλάσματα του πρωτογενούς αρώματος, δηλαδή και τα ελεύθερα και τα δεσμευμένα αρωματικά συστατικά. Ακόμη, δεν έχει γίνει, μέχρι στιγμής, επικύρωση σχετικής αναλυτικής μεθοδολογίας, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες που περιγράφονται από επίσημους οργανισμούς.

Έτσι, αντικείμενο του πρώτου μέρους της παρούσας διατριβής αποτέλεσε:

- Η σύγκριση επτά διαφορετικών εμπορικών SPE στηλών και η επιλογή μεταξύ αυτών, με κριτήριο την ανάκτηση σήματος 21 ελεύθερων και δεσμευμένων ποικιλιακών αρωματικών ουσιών από οίνους.
- Η επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας SPE–GC/MS, βασισμένη σε κατευθυντήριες οδηγίες από επίσημους οργανισμούς.
- Η εφαρμογή της μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό ελεύθερων και δεσμευμένων συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε 20 μονοποικιλιακούς οίνους, από 11 γηγενείς και 4 διεθνείς οινοποιήσιμες ποικιλίες αμπέλου *Vitis vinifera* L. που έχουν καλλιεργηθεί στην Ελλάδα.

Όσον αφορά τους αναλύτες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, αυτοί επιλέχθηκαν με τα εξής βασικά κριτήρια: α) να είναι συστατικά σημαντικά για

το άρωμα των οίνων, β) να αντιπροσωπεύουν βασικές χημικές ομάδες του πρωτογενούς αρώματος και, γ) να απαντώνται στους οίνους και με τις δύο μορφές, δηλαδή και ως ελεύθερες πτητικές ενώσεις και ως γλυκοζίτες. Έτσι, άλλες κατηγορίες ενώσεων του ποικιλιακού αρώματος, όπως οι μεθοξυπυραζίνες και οι θειούχες ενώσεις δε συμπεριλήφθησαν στην παρούσα μελέτη καθώς δεν απαντώνται σε γλυκοζυλιωμένη μορφή. Τελικά επιλέχθηκαν συνολικά 21 αναλύτες ως εξής: 12 μονοτερπένια, 3 C<sub>6</sub> αλκοόλες, 3 C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδείς ενώσεις και 3 βενζολικά παράγωγα.

Μία άλλη τεχνική, που εφαρμόζεται ευρέως τα τελευταία χρόνια για την απομόνωση πτητικών ουσιών από τους οίνους είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME). Πρόκειται για μία μέθοδο ευαίσθητη και με καλή εκλεκτικότητα. Υπάρχουν, ωστόσο, πολλές παράμετροι που επηρεάζουν σημαντικά τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των συστατικών που προσδιορίζονται. Για το λόγο αυτό, έχουν κατά καιρούς δημοσιευθεί διάφορες μελέτες βελτιστοποίησης των συνθηκών SPME. Όμως, σε ελάχιστες από αυτές έχει πραγματοποιηθεί ανάπτυξη με χημειομετρικές μεθόδους και σε πολύ μικρό αριθμό έχει πραγματοποιηθεί αξιολόγηση SPME-GC/MS μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε οίνους. Επιπλέον, και σε αυτά τα λίγα πρωτόκολλα αξιολόγησης που υπάρχουν, δεν έχουν συμπεριληφθεί, έως σήμερα, στοιχεία για την αβεβαιότητα και την ανθεκτικότητα των μεθόδων. Η ακρίβεια (ορθότητα και πιστότητα) έχει μελετηθεί για μικρό εύρος συγκεντρώσεων, ενώ η ποσοτικοποίηση και η εκτίμηση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης; έχουν βασισθεί σε βαθμονόμηση με χρήση προτύπων διαλυμάτων σε συνθετικό υπόστρωμα αντί για υπόστρωμα οίνου, παρά τις σημαντικές επιδράσεις του μητρικού υλικού που έχουν πολλές φορές επισημανθεί.

Για να καλυφθούν τα παραπάνω κενά, στο δεύτερο μέρος της παρούσας ερευνητικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε χημειομετρική ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και εκτεταμένη επικύρωση μίας αναλυτικής GC/MS-SPME μεθοδολογίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προαναφερόμενων 21 πρωτογενών αρωματικών ουσιών των οίνων. Για το σκοπό αυτό:

- Έγινε σύγκριση και επιλογή μεταξύ πέντε διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων ειδών SPME ινών και του τρόπου δειγματοληψίας (υπερκείμενου χώρου και εμβάπτισης στο δείγμα ).
- Εξετάσθηκε η επίδραση επτά παραμέτρων στο αναλυτικό σήμα με μερικό παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων (Plackett-Burman).
- Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των πέντε σημαντικότερων παραμέτρων με τη μέθοδο Simplex.
- Έγινε επικύρωση του σχήματος αναλυτικής μεθοδολογίας GC/MS–SPME βασισμένη σε κατευθυντήριες οδηγίες από επίσημους οργανισμούς.
- Εκτιμήθηκε η ανθεκτικότητά της μεθόδου, με κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων (Plackett-Burman)
- Έγινε εφαρμογή της μεθόδου για τον προσδιορισμό 21 πτητικών συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε 20 μονοποικιλιακούς οίνους από ποικιλίες αμπέλου *Vitis vinifera* που οινοποιήθηκαν, υπό ελεγχόμενες συνθήκες, σε πειραματικό οινοποιείο.

Τέλος, είναι σημαντικό, και θα πρέπει να επισημανθεί, ότι μέχρι σήμερα, στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες μελέτες σχετικές με το πρωτογενές άρωμα ελληνικών μονοποικιλιακών οίνων. Σε αυτήν τη διατριβή, εξετάσθηκαν οίνοι από 11 ελληνικές *Vitis vinifera* ποικιλίες αμπέλου, από τις οποίες σχεδόν όλες μελετούνται για πρώτη φορά, ως προς το πρωτογενές τους άρωμα. Ετσι, το πρακτικό αποτέλεσμα της εργασίας αυτής, είναι ότι παρέχονται σημαντικές πληροφορίες για το αρωματικό προφίλ αυτών των γηγενών ποικιλιών και γίνεται δυνατή η σύγκρισή τους με ευρύτατα διαδεδομένες ποικιλίες που έχουν εισαχθεί και καλλιεργούνται στη χώρα μας.

Με την ολοκλήρωση παρόμοιων μελετών, μπορεί να αναδειχθεί το αρωματικό δυναμικό εκλεκτών γηγενών ποικιλιών συντελώντας στην ανάδειξη ελληνικών οίνων υψηλής ποιότητας, μοναδικών και διαφοροποιημένων από τον παγκόσμιο ανταγωνισμό οι οποίοι θα μπορέσουν να διεκδικήσουν μια ξεχωριστή θέση στις διεθνείς αγορές προς όφελος της ελληνικής γεωργίας.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

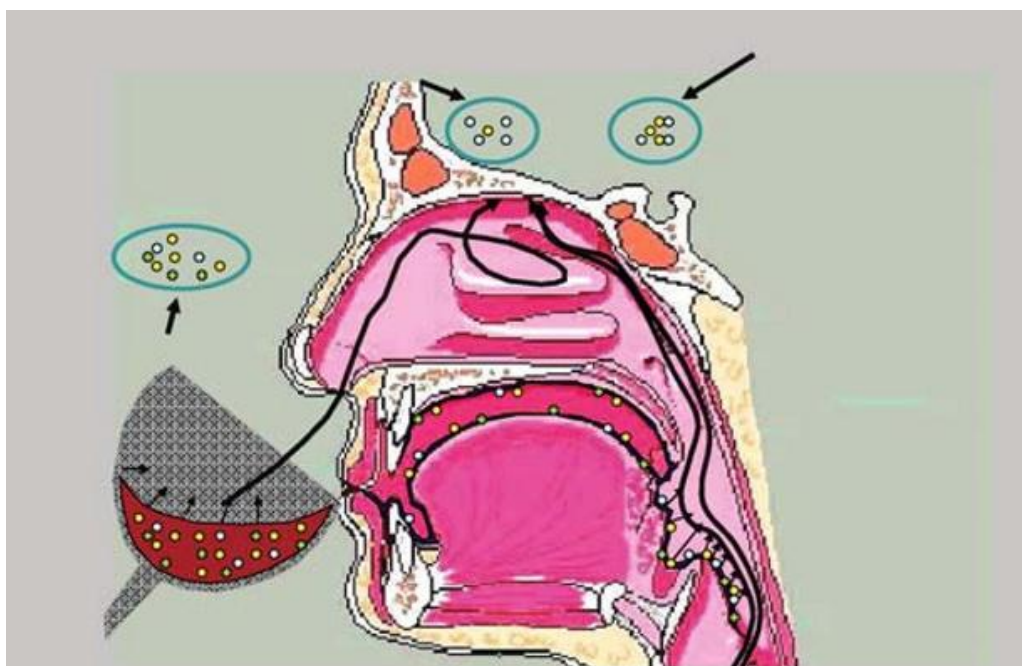


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΡΩΜΑ ΟΙΝΩΝ

### 1.1 Γενικά για το άρωμα των οίνων

Το άρωμα των οίνων είναι από τα πιο πολύπλοκα που υπάρχουν στη φύση για πολλούς λόγους. Πρώτα, επειδή υπάρχουν πολλοί οίνοι με διαφορετικά αρώματα. Κατόπιν, επειδή το άρωμα ενός οίνου μεταβάλλεται με το χρόνο καθώς φυλάσσεται σε μία φιάλη ή καθώς παραμένει στο ποτήρι έως ότου καταναλωθεί. Και τέλος, επειδή στις περισσότερες περιπτώσεις οι οίνοι δεν χαρακτηρίζονται από ένα και μοναδικό άρωμα αλλά από ένα σύνολο λεπτών οσμών που είναι δύσκολο να προσδιοριστούν και γίνονται υποκειμενικά αντιληπτές με διαφορετικό τρόπο, από διαφορετικούς ανθρώπους [1].



Σχήμα 1.1: Ρινική και οπισθορρινική ανίχνευση οργανικών πτητικών ενώσεων των οίνων από τους οσφρητικούς υποδοχείς [1]

Για την οσμή και το άρωμα του οίνου μας πληροφορεί η αίσθηση της όσφρησης. Το όργανο της όσφρησης στον άνθρωπο είναι ο οσφρητικός βλεννογόνο που περιλαμβάνει το οσφρητικό επιθήλιο, και βρίσκεται στην οροφή της ρινικής κοιλότητας.

Η αίσθηση ξεκινά όταν οργανικές πτητικές ενώσεις του οίνου εισέρχονται μέσω της ρινικής κοιλότητας (ρινική ανίχνευση, *orthonasal detection*) ή της στοματικής κοιλότητας (οπισθορινική ανίχνευση, *retronasal detection*) και διεγείρουν τους οσφρητικούς υποδοχείς [2]. Τα κύτταρα αυτά μετατρέπουν, μέσω νευρώνων, τη χημική πληροφορία σε ηλεκτρικό σήμα στον εγκέφαλο. Κάθε κύτταρο διαθέτει ένα μόνο είδος υποδοχέα και κάθε υποδοχέας έχει την ικανότητα να συνδεθεί με ένα περιορισμένο αριθμό ουσιών. Με τον τρόπο αυτό κάθε κυτταρικός υποδοχέας είναι εξειδικευμένος στην αναγνώριση ενός μικρού αριθμού οσμών.

Από την άλλη πλευρά, κάθε ουσία ενεργοποιεί ένα διαφορετικό αριθμό κυττάρων υποδοχέων [2]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορετικό κατώφλι οσφρητικής αντίληψης (*Odour Threshold*) για κάθε μία ουσία. Το άρωμά της γίνεται αντιληπτό όταν η συγκέντρωσή της ξεπερνά αυτό το όριο. Έτσι, κάποια συστατικά που βρίσκονται στους οίνους σε ίχνη, μπορεί να παίζουν πολύ πιο καθοριστικό ρόλο στο τελικό άρωμα σε σχέση με άλλα που βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες [3, 4]

Ένδειξη για το μέγεθος της επίδρασης ενός συγκεκριμένου συστατικού στο άρωμα του οίνου αποτελεί η τιμή OAV (*Odour Activity Value*). Υπολογίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης της ουσίας στον οίνο προς το όριο ανίχνευσης της οσμής αυτής [2, 5]

$$OAV = \frac{\text{συγκέντρωση} \cdot \text{ουσίας}}{\text{κατώφλι} \cdot \text{αντίληψης} \cdot \text{ουσίας}} \quad (1.1)$$

Πρέπει, ωστόσο εδώ να σημειωθεί ότι το κατώφλι αντίληψης κάθε ένωσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι: η χημική σύσταση του οίνου (η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την ποικιλία της αμπέλου και τις συνθήκες οινοποίησης), η ικανότητα ανίχνευσης των ενώσεων αυτών από τους δοκιμαστές (*degustateurs*), οι συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνει



χώρα η οργανοληπτική δοκιμασία κλπ. Αυτό άλλωστε εξηγεί και τη μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται πολλές φορές στις τιμές OAV [6]

Τα τελευταία χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί στους οίνους περισσότερες από χίλιες οσμηρές πτητικές ενώσεις σε ένα εύρος συγκεντρώσεων που κυμαίνεται από ελάχιστα  $\mu\text{g L}^{-1}$  ή και  $\text{ng L}^{-1}$  μέχρι μερικές εκατοντάδες  $\text{mg L}^{-1}$  [7, 8]. Οι ενώσεις αυτές διαφέρουν τόσο ως προς τη φύση όσο και ως προς την προέλευσή τους [9].

Ανάλογα με την προέλευση των αρωματικών συστατικών που το αποτελούν, το άρωμα του οίνου διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες [10]:

- Στο *πρωτογενές* άρωμα (primary aroma) που περιλαμβάνει τις ενώσεις που προέρχονται από το φλοιό και τη σάρκα του σταφυλιού και παραμένουν στον οίνο μετά το τέλος της οινοποίησης. Πρόκειται για μονοτερπένια, νορισοπρενοειδή, αλειφατικές αλκοόλες, βενζολικές ενώσεις, μεθοξυπυραζίνες και διάφορες θειούχες ενώσεις [11].
- Στο *δευτερογενές* άρωμα (secondary aroma) στο οποίο ανήκουν πτητικές ενώσεις όπως οι ανώτερες αλκοόλες, τα λιπαρά οξέα και οι εστέρες τους, που παράγονται από τις ζύμες, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης [11].
- Στο *τριτογενές* άρωμα (ή *μπουκέτο*) (tertiary aroma), στο οποίο ανήκουν πτητικές ενώσεις που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της παλαίωσης του οίνου είτε μέσα σε βαρέλια είτε μέσα σε φιάλες και περιλαμβάνει λακτόνες, πτητικές φαινόλες, κ.ά. [11].

## 1.2 Συστατικά πρωτογενούς αρώματος

Τα συστατικά του αρώματος του οίνου που προέρχονται από το σταφύλι αποτελούν το πρωτογενές ή “ποικιλιακό” άρωμά του [8]. Πρόκειται για ουσίες που προσδίδουν στον οίνο τους ιδιαίτερους χαρακτήρες του ή αλλιώς την αρωματική τυπικότητά του. Είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την ποικιλία [8, 12-19] και την έκφρασή της ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή [21], τις εδαφοκλιματικές συνθήκες [22-25], το στάδιο ωρίμασης [26-29] και τις καλλιεργητικές πρακτικές [22, 30] που εφαρμόζονται.

Ορισμένα συστατικά βρίσκονται σε ελεύθερη πτητική μορφή. Σε αυτή τη μορφή καταλήγουν κυρίως από τη δράση ενδογενών ενζύμων, όταν κατά τη

διαδικασία της οινοποίησης σπάνε τα κυτταρικά τοιχώματα των ραγών των σταφυλιών. Πρόκειται για μόρια μικρού μοριακού βάρους (συνήθως <300 Da) που παραμένουν αναλλοίωτα ή υφίστανται μικρές μεταβολές έως το πέρας της οινοποιητικής διαδικασίας, αποτελώντας στη συνέχεια μέρος της αρωματικής σύνθεσης του οίνου. Τέτοιες ενώσεις είναι ελεύθερα μονοτερπένια, νορισοπρενοειδείς ενώσεις, μεθοξυπυραζίνες, θειούχες ενώσεις, βενζολικά παράγωγα και αλκοόλες με 6 άτομα άνθρακα [5, 10, 11].

Σε ένα μεγάλο ποσοστό, τα παραπάνω συστατικά αντί να βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή απαντώνται δεσμευμένα ως το άγλυκο τμήμα γλυκοζιτών οι οποίοι είναι μη πτητικοί και επομένως άοσμοι. Οι γλυκοζίτες αυτοί ονομάζονται πρόδρομες αρωματικές ενώσεις καθώς έπειτα από υδρόλυση μπορούν να απελευθερώσουν τα δεσμευμένα πτητικά μόρια και να προσφέρουν άρωμα στον οίνο [16, 31-35].

Η παρουσία των γλυκοζιτών είναι πολύ σημαντική, καθώς αποτελούν ένα εν δυνάμει αρωματικό δυναμικό το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί. Η υδρόλυση των γλυκοζιτών μπορεί να επιτευχθεί είτε ενζυμικά με τη χρήση ενδογενών ή εξωγενών ενζύμων είτε χημικά λόγω του όξινου περιβάλλοντος των οίνων κατά την παλαίωσή τους [31-35].

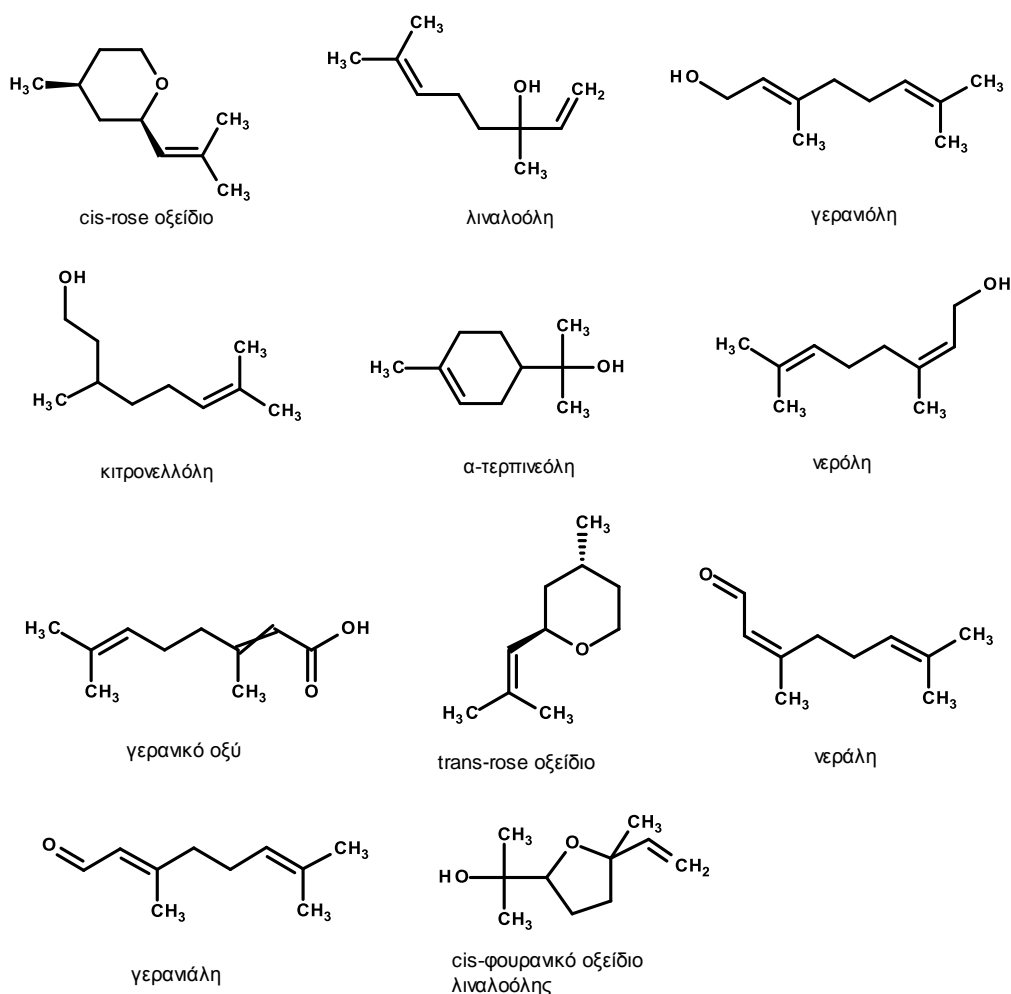
## **1.2.1 Τερπένια**

### **1.2.1.1 Δομή τερπενίων**

Τα τερπένια έχουν ως βασικό δομικό υλικό μία αλυσίδα πενταμερούς άνθρακα (C<sub>5</sub>), το ισοπρένιο (2-μεθυλ-1,3-βουταδιένιο). Ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Έτσι, τα μονοτερπένια (MT) είναι ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και συντίθενται από δύο μονάδες ισοπρενίου, τα σεσκιτερπένια έχουν 15 άτομα άνθρακα και προέρχονται από τρία μόρια ισοπρενίου κ.λ.π. [36]. Τα μονο- και τα σεσκιτερπένια είναι οσμηρά [37].

Τα μονοτερπένια μπορούν να χωριστούν στις υποκατηγορίες MT υδρογονάνθρακες (λιμονένιο, μυρκένιο, κ.λ.π.), MT αλκοόλες (λιναλοόλη, γερανιόλη, κλπ), MT οξέα (γερανικό οξύ, κλπ), MT αλδεΐδες (νεράλη, γερανιάλη, κλπ), κ.α. [37].

Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζονται οι συντακτικοί τύποι ορισμένων χαρακτηριστικών μονοτερπενικών ενώσεων.



Σχήμα 1.2: Συντακτικοί τύποι μονοτερπενικών ενώσεων

### 1.2.1.2 Παρουσία σε σταφύλια και οίνους

Η μεγάλη οικογένεια των τερπενικών ενώσεων είναι ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο [38]. Ταξινομούνται στους δευτερογενείς μεταβολίτες [39], δηλαδή η παραγωγή τους σχετίζεται με την επικοινωνία και άμυνα του φυτού. Βιολογικός τους ρόλος είναι να προσελκύουν τα έντομα–επικοινωνιστές και τους φυσικούς εχθρούς των οργανισμών που επιτίθενται στα φυτά [40, 41]. Επιπλέον, αποτελούν τοξικούς παράγοντες για φυτοφάγα έντομα [16] και προειδοποιούν τα γειτονικά φυτά για παθογόνο προσβολή [42].

Έως σήμερα, έχουν βρεθεί σε σταφύλια και οίνους, περισσότερες από 70 μονοτερπενικές ενώσεις. [43]. Μία πρόσφατη μελέτη [44] αναφέρει ότι η οικογένεια γονιδίων (gene family) των *vitis vinifera* τερπενικών συνθασών (μέσω της δράσης των οποίων πραγματοποιείται η βιοσύνθεση των τερπενίων) περιέχει το μεγαλύτερο αριθμό λειτουργικά χαρακτηρισμένων τερπενικών συνθασών από όλα τα υπόλοιπα είδη που έχουν αναφερθεί έως σήμερα.

Τα μονοτερπένια στα σταφύλια υπάρχουν σε ελεύθερη και δεσμευμένη (γλυκοζυλιωμένη μορφή). Η συγκέντρωσή τους και στις δύο μορφές αυξάνει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ράγας [45]. Οι τερπενικοί ετεροζίτες είναι άφθονοι (250-500  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  νωπής ράγας) από πολύ νωρίς, όταν η ράγα είναι ακόμη πράσινη, ενώ οι ελεύθερες τερπενόλες βρίσκονται σε μικρές ποσότητες (30-90  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  νωπής ράγας). Ορισμένες δεν είναι καν παρούσες σε αυτό το στάδιο (α-τερπινεόλη και κιτρονελλόλη) αλλά αρχίζουν να εμφανίζονται σε σημαντικές ποσότητες από τον περκασμό\* και μετά (π.χ. η λιναλοόλη) [1, 46]. Τα δεσμευμένα κλάσματα υπερτερούν των ελευθέρων σε όλη τη φάση της ωρίμασης και συνεχίζουν να αυξάνονται μετά την ωρίμαση (maturity). Τότε η αύξηση του ελεύθερου κλάσματος επιβραδύνεται και η συγκέντρωσή του μπορεί ακόμη και να μειώνεται. Οι συγκεντρώσεις κάποιων τερπενολών όπως της ελεύθερης λιναλοόλης και της α-τερπινεόλης φθίνουν με αυτόν τον τρόπο, κατά τη διάρκεια της υπερωρίμασης [46]. Η πορεία αυτή φαίνεται να υποδεικνύει ότι οι τερπενόλες αποθηκεύονται ως επί των πλείστων με τη δεσμευμένη μορφή. Όλες οι τερπενόλες παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με εξαίρεση τη λιναλοόλη της οποίας το ελεύθερο κλάσμα ορισμένες φορές παραμένει σε υψηλότερη περιεκτικότητα από το δεσμευμένο κλάσμα σε όλη τη διάρκεια της πορείας ωρίμασης [46]. Περισσότερα ωστόσο για τους ετεροζίτες των τερπενικών ενώσεων και άλλων πτητικών συστατικών των σταφυλιών και των οίνων αναφέρονται σε επόμενο τμήμα της διατριβής (παρ 1.2.5).

\*περκασμός: περίοδος που η ράγα αλλάζει χρώμα. Σηματοδοτεί την έναρξη της ωρίμασης.

Συμπέρασμα πολλών μελετών είναι ότι οι τερπενικές ενώσεις στους οίνους είναι τυπικές κάθε ποικιλίας και γι' αυτό χρησιμοποιούνται αναλυτικά για τον ποικιλιακό χαρακτηρισμό τους [13, 16, 17].

**Πίνακας 1.1: Κατηγοριοποίηση ορισμένων ποικιλιών με βάση την περιεκτικότητά τους σε τερπένια [47].**

Μοσχάτες ποικιλίες	Μη-μοσχάτες αρωματικές ποικιλίες	Ουδέτερες ποικιλίες
Canada Muscat	Traminer	Aryan
Gewürztraminer	Huxel	Bacchus
Μοσχάτο Αλεξανδρείας	Kerner	Bobal
Μοσχάτο Frontignan	Morio-Muskat	Cabernet Sauvignon
Muscato Bianco del Piemonte	Müller-Thurgau	Carignan
Μοσχάτο Αμβούργου	Riesling	Cencibel
Moscato italiano	Schonburger	Chasselas
	Siegerebe	Chenin Blanc
	Sylvaner	Cinsault
	Wurzer	Clairette
		Dattier de Bevrouth
		Doradillo
		Forta
		Merlot
		Nobling
		Rkaziteli
		Ruländer
		Sauvignon Blanc
		Semillon
		Shiraz
		Sultana
		Terret
		Trebbiano
		Verdelho
		Viognier

Σύμφωνα με τον Rapp [43], οι λευκοί οίνοι ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε 12 μονοτερπένια («τερπενικό προφίλ») μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: “τύπου Riesling”, “ τύπου Μοσχάτου ”, και “τύπου Silvaner”. Ένας άλλος γενικότερος διαχωρισμός των ποικιλιών με βάση τη

συνολική συγκέντρωση των ελεύθερων τερπενίων σύμφωνα με ανασκόπηση των Mateo & Jiménez [47] είναι: 1) αρωματικές μοσχάτες ποικιλίες, όπου οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων μονοτερπενίων φθάνουν συνολικά έως 6 mg L<sup>-1</sup>, 2) αρωματικές μη μοσχάτες ποικιλίες με ολική συγκέντρωση μονοτερπενίων 1–4 mg L<sup>-1</sup> και 3) ουδέτερες ποικιλίες (Πίνακας 1.1)

Όσον αφορά τις ελληνικές ποικιλίες, δεν υπάρχουν έως σήμερα δημοσιευμένα στοιχεία από κάποια συστηματική μελέτη για την κατηγοριοποίησή τους με βάση τον τερπενικό τους χαρακτήρα. Στο τέλος της παρούσας διατριβής (παρ. 4.2.8) παρουσιάζονται δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς αυτήν την κατεύθυνση.

**Πίνακας 1.2: Συγκεντρώσεις δεσμευμένων και ελεύθερων τερπενολών σε διάφορες ποικιλίες [50]**

Ποικιλία	Σύνολο		Γερασιόλη		Λιναλοόλη		Νερόλη		α-Τερπινεόλη		Κιτρονελλόλη	
	Δ/νες	Ελευθ	Δ/νη	Ελευθ	Δ/νη	Ελευθ	Δ/νη	Ελευθ	Δ/νη	Ελευθ	Δ/νη	Ελευθ
Μοσχάτο Αλεξανδρείας	4040	1513	1507	342	1839	1084	618	59	61	21	21	7,5
Μοσχάτο Frontignan	1398	1640	396	107	207	1409	658	74	75	26	62	24
Μοσχάτο Αμβούργου	1047	594	426	241	172	281	318	52	86	-	45	19,7
Muscat Ottonel	2873	1679	1291	172	722	1449	635	35	186	12	39	10,7
Gewürztraminer	4325	282	3356	218	22,5	5,6	617	43	183	3,2	146	12
Riesling	276	58	65	26	87	19,4	10,3	5,4	114	7,4	-	-
Cabernet Sauvignon	26	5,3	12	3,6	4,2	1,7	-	-	9,9	-	-	-
Carignane	81	7,4	40	4,8	26	2,6	14,8	-	-	-	-	-
Cinsaut	314	13	69	13	5,4	-	6,9	-	233	-	-	-
Clairette	105	2,6	34	2,6	9,5	-	4	-	57	-	-	-
Grenache	71	11,8	40	5,2	5,4	6,6	8,2	-	17,4	-	-	-
Picpoul	105	5,8	25	5,8	2,2	-	3,0	-	75	-	-	-
Syrah	36	1,7	36	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Terret	96	-	40	-	1,9	-	3,2	-	51	-	-	-
Ugni blanc	83	2,8	54	2,6	8,5	0,2	6,9	-	13,3	-	-	-

Τα αποτελέσματα δίνονται σε mg L<sup>-1</sup> γλεύκους.

Στις ποικιλίες Μοσχάτου και Riesling κυριαρχούν οι μονοτερπενικές **αλκοόλες** λιναλοόλη, γερασιόλη, νερόλη, κιτρονελλόλη και α-τερπινεόλη [47] οι οποίες έχουν ευχάριστα αρώματα ανθέων. Στην περίπτωση της Koshu, μίας

αυτόχθονης Ιαπωνικής *V. vinifera* ποικιλίας η τερπινεν-4-όλη βρέθηκε να είναι το κυρίαρχο μονοτερπενικό συστατικό [48]. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται ενδεικτικά συγκεντρώσεις ελεύθερων και δεσμευμένων μονοτερπενολών κάποιων ποικιλιών. Ανάμεσα στις μονοτερπενικές αλκοόλες οι πιο οσμηρές είναι η λιναλοόλη και η κιτρονελλόλη, γιατί το οσφρητικό κατώφλι αντίληψης των ενώσεων αυτών είναι πιο χαμηλό (Πίνακας 1.3).

**Πίνακας 1.3: Περιγραφή χαρακτηριστικής οσμής και κατώφλι αντίληψης ορισμένων μονοτερπενικών ενώσεων των οίνων.**

Ένωση	Χαρακτηριστική οσμή	Κατώφλι αντίληψης*	Αναφορά
cis-rose οξείδιο	γεράνι, λίτσι	<sup>c</sup> 0,2	[2, 4, 51]
cis φουραν. οξείδιο λιναλοόλης	γλυκό-ξύλο	<sup>d</sup> 6000	[2]
λιναλοόλη	άνθη, λεβάντα	<sup>c</sup> 15	[4, 51]
γερανιόλη	τριαντάφυλλο, γεράνι	<sup>c</sup> 30	[4, 51]
α-τερπινεόλη	πασχαλιά, ροδάκινο	<sup>a</sup> 250	[2, 56]
νερόλη	λεμόνι	<sup>d</sup> 400	[57, 58]
κιτρονελλόλη	τριαντάφυλλο	<sup>c</sup> 100	[2, 51]
νεράλη	λεμόνι	<sup>d</sup> 30	[2, 57]
γερανιάλη	κίτρο	<sup>d</sup> 32	[2, 57]

\*Συγκεντρώσεις σε  $\mu\text{g L}^{-1}$  από προσδιορισμούς σε: **a**: οίνο, **b**: συνθετικό οίνο, **c**: υδραλκοολικό δ/μα 10% (w/w), **d** : νερό

Οι τερπινεόλες, γενικά, μπορούν σε όξινο περιβάλλον να μετατραπούν σε άλλες μονοτερπενικές αλκοόλες. Η προσβολή των σταφυλιών από το φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea*, μπορεί επίσης να αλλάξει, σε σημαντικό βαθμό, την μονοτερπενική σύνθεση καθώς μετατρέπει τις μονοτερπινεόλες σε λιγότερο οσμηρές ουσίες. Η ενζυμική οξείδωση της λιναλοόλης από τον *Botrytis cinerea* παράγει 8-υδροξυλιναλοόλη, αλλά η αντίδραση αυτή συμβαίνει και φυσικά σε γλεύκη από μη προσβεβλημένα σταφύλια [49]

Περίπου δεκαπέντε **οξείδια** και **υδροξυλιωμένα παράγωγα** των μονοτερπενικών αλκοολών έχουν ανιχνευθεί σε ποικιλίες σταφυλιών με Μοσχάτο χαρακτήρα [49]. Τα οξείδια της λιναλοόλης και της νερόλης έχουν μικρή επίδραση στο άρωμα των οίνων. Το Rose οξείδιο είναι πιο οσμηρό

συστατικό και σύμφωνα με ορισμένες μελέτες είναι μερικώς υπεύθυνο για το άρωμα ανθέων των οίνων Gewürztraminer [51].

Οι μονοτερπενικές πολυόλες (δυόλες και τριόλες), βρίσκονται σε σταφύλια σε συγκεντρώσεις μέχρι  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ή και περισσότερο. Οι ενώσεις αυτές δεν είναι ιδιαίτερα οσμηρές. Μπορούν, ωστόσο, με την υδρόλυσή τους σε όξινο pH να αποτελέσουν πηγή οσμηρών μονοτερπενίων. Για παράδειγμα η όξινη υδρόλυση της 3,7-διμεθυλο-οκτα-1,5-διεν-3,7-διόλης οδηγεί στο σχηματισμό ο-τριενόλης [49].

**Αλδεΐδες** (γερανιάλη και λιναλάλη), **οξέα** (γερανικό οξύ), και **εστέρες** μονοτερπενίων (οξικός εστέρας γερανικού και νερικού οξέος) έχουν επίσης ανιχνευθεί σε σταφύλια. Οι αλδεΐδες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ανάγονται σε μονοτερπενικές αλκοόλες [27, 47, 49].

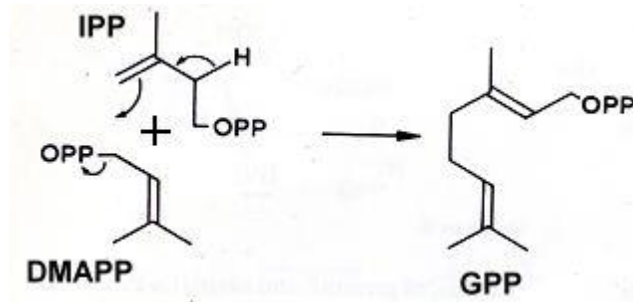
Επιπλέον, σε σταφύλια έχει ανιχνευθεί ένας αριθμός **μονο- και σεσκιτερπενικών υδρογονανθράκων** με άρωμα ρητίνης [52, 53]. Ανάμεσά τους συμπεριλαμβάνονται το λιμονένιο, α-τερπινένιο, ρ-κιμένιο και μυρκένιο καθώς και η σεσκιτερπενική αλκοόλη φαρνεσόλη. Ωστόσο, ο ρόλος των ενώσεων αυτών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως [49]. Πιο πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν ότι τα σεσκιτερπένια α-υλανγένιο (α-ylangene) και ροτουνδόνη μπορεί να είναι υπεύθυνα για το άρωμα πιπεριάς στη ποικιλία *Vitis vinifera* Shiraz [53-55].

Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται ορισμένα στοιχεία για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και το κατώφλι αντίληψης ορισμένων χαρακτηριστικών μονοτερπενικών ενώσεων που αποτελούν αντικείμενο προσδιορισμού σε αυτήν τη διατριβή.

### 1.2.1.3 Βιοσύνθεση τερπενίων

Για τη σύνθεση όλων των τερπενίων χρησιμοποιούνται ως «δομικές μονάδες» το διφωσφορικό (ή πυροφωσφορικό) ισοπεντύλιο (IPP) και το ισομερές του διφωσφορικό (ή πυροφωσφορικό) διμεθυλοαλλύλιο (DMAPP). Συμπύκνωση των μορίων IPP και DMAPP ( $C_5$ ) οδηγεί στη δημιουργία διφωσφορικού γερανυλίου GPP ( $C_{10}$ ) που αποτελεί εναρκτήριο ένωση για τη σύνθεση μονοτερπενίων (Σχήμα 1.3) [38].





**Σχήμα 1.3:** Συμπύκνωση των μορίων IPP και DMAPP για τη δημιουργία διφωσφορικού γερανυλίου GPP.

Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι το IPP προέρχονταν αποκλειστικά μέσω του μεβαλονικού οξέος (μεβαλονικό ή MVA μονοπάτι) από το ακετυλο-συνένζυμο A (CoA) [46, 59]. Αμινοξέα όπως η λευκίνη και η βαλίνη μπορούσαν επίσης να αποτελούν εναρκτήριοι ενώσεις αυτής της βιοσυνθετικής οδού [31].

Πριν μία δεκαετία, εμφανίστηκαν ενδείξεις ότι το IPP μπορεί να σχηματίζεται και από διαφορετικό βιοχημικό μονοπάτι [60]. Σήμερα η ύπαρξη του μονοπατιού αυτού έχει αποδειχθεί. Ξεκινά από το πυροσταφυλικό οξύ και την 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη, και είναι ευρέως γνωστό ως «μη μεβαλονικό» ή ως «MEP» μονοπάτι, από την 4-φωσφορική-2-C-μεθυλο-D-ερυθρίτολη ή (2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate (MEP)), το πρώτο συστατικό που προορίζεται αποκλειστικά για την παραγωγή IPP και DMAPP, μέσω αυτής της βιοσυνθετικής οδού [61, 62]. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα και των δύο μονοπατιών είναι πυρηνικά. Το MVA μονοπάτι λειτουργεί στο κυτταρόπλασμα (λέγεται και κυτταροπλασματικό) ενώ το MEP μονοπάτι λειτουργεί στα πλαστίδια των φυτικών κυττάρων [63].

Οι Luan & Wust [64] σε μελέτη όπου χρησιμοποίησαν *in vivo* επισημασμένες πρόδρομες ενώσεις διαπίστωσαν ότι το νέο μονοπάτι MEP –ανεξάρτητο του μεβαλονικού οξέος– είναι η κύρια μεταβολική οδός για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων στα φύλλα και στον εξωκάρπιο και μεσοκάρπιο ιστό των ραγών των σταφυλιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, οι ράγες επιδεικνύουν αυτονομία για τη βιοσύνθεση των μονοτερπενίων κατά την πορεία ωρίμασης. Ακόμα διαπίστωσαν τη διαμερισματοποίηση του μεταβολισμού των μονοτερπενίων στους ιστούς των ραγών. Η σύνθεση της

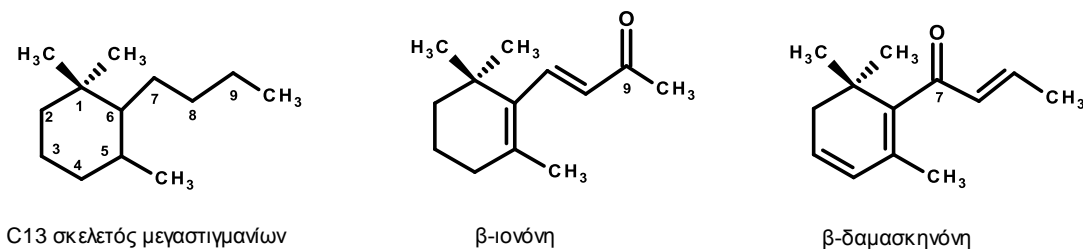
γερανιόλης βρέθηκε να περιορίζεται στον εξωκάρπιο ιστό ενώ η βιοσύνθεση της (3S)-λιναλοόλης ανιχνεύτηκε τόσο στον εξωκάρπιο όσο και στο μεσοκάρπιο ιστό. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη των Cordonnier και Bayonove [65], όπου σε σταφύλια της ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας βρέθηκε ότι η λιναλοόλη κατανέμονταν μεταξύ φλοιών και σάρκας ενώ το 95% της γερανιόλης και της νερόλης βρίσκονταν αποκλειστικά στον φλοιό των σταφυλιών.

Μικροοργανισμοί μπορούν επίσης να παράγουν τερπένια. Ο σχηματισμός των τερπενίων από ζυμομύκητες περιορίζεται σε πολύ μικρές ποσότητες από ορισμένα μη *Saccharomyces* είδη: *Kluyveromyces lactis* [66], *Torulaspora delbrueckii* [67], *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida stellata* [68] και *Ambrosiozyma monospora* [69]. Μελέτη των Hock και συνεργατών [68], για τη βιοσύνθεση τερπενίων από ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae*, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, έδειξε ότι μπορούσαν να παράγουν περίπου μόνο  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  φαρνεσόλης (σεσκιτερπενοειδής). Με το συμπέρασμα αυτό συμφωνούν και άλλοι ερευνητές, ωστόσο, σε πιο πρόσφατη μελέτη των Carrau και συνεργατών [70] διαπιστώθηκε ότι υπό μικροαεροβικές συνθήκες και αυξημένη συγκέντρωση αφομοιώσιμου αζώτου, κάποια στελέχη *S. cerevisiae* είχαν την ικανότητα για *de novo* σύνθεση μονοτερπενίων.

## 1.2.2 C<sub>13</sub> Νορισοπρενοειδείς ενώσεις

### 1.2.2.1 Δομή και ιδιότητες

Από χημικής σκοπιάς, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες. Τα μεγαστιγμάνια και τα μη-μεγαστιγμάνια. Ο σκελετός των πρώτων αποτελείται από ένα βενζολικό δακτύλιο με υποκαταστάτες στους άνθρακες 1, 5 και 6 και μία ακόρεστη αλειφατική αλυσίδα με τέσσερα άτομα άνθρακα ενωμένη στον C<sub>6</sub> (Σχήμα 1.4). Τα μεγαστιγμάνια, ανάλογα με τη θέση του οξυγόνου, διακρίνονται σε απλά μεγαστιγμάνια (χωρίς οξυγόνο), σε δαμασκόνες (το οξυγόνο ενωμένο στον άνθρακα 7) και ιονόνες (το οξυγόνο ενωμένο στον άνθρακα 9) [71] (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Συντακτικοί τύποι C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδών ενώσεων

### 1.2.2.2 Παρουσία σε σταφύλια και οίνους

Τα νορισοπρενοειδή με 13 άτομα άνθρακα (C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδή), αποτελούν μία πολύ σημαντική κατηγορία ενώσεων πρωτογενούς αρώματος.

Τα συναντάμε σε μεγαλύτερες ποσότητες σε αρωματικές ποικιλίες σταφυλιών όμως η παρουσία τους είναι αποφασιστικής σημασίας στις μη αρωματικές ποικιλίες [47, 72]. Στις τελευταίες συμπεριλαμβάνονται οι ποικιλίες Semillon, Sauvignon Blanc, Chardonnay, Merlot, Syrah, και Cabernet Sauvignon [73-77]. Στα σταφύλια βρίσκονται κυρίως με τη μορφή μη-πτητικών πρόδρομων ενώσεων (καροτενοειδή και γλυκοζίτες). Χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης και διαθέτουν ευχάριστα αρώματα όπως τσαγιού, βιολέτας, εξωτικών λουλουδιών, εξωτικών φρούτων, κομπόστας μήλου, μελιού, κ.ά.

Ανάμεσα στις C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδείς ενώσεις με εξέχουσα σημασία για το άρωμα των οίνων είναι η β-δαμασκηνόνη και η β-ιονόνη.

### 1.2.2.3 Η β-δαμασκηνόνη

Η β-δαμασκηνόνη ((8*E*)-μεγαστιγμα-3,5,8-τριεν-7-όνη), απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Demole και συνεργάτες το 1970 από αιθέριο έλαιο τριαντάφυλλου (*Rosa damascena*) [78] ενώ σε σταφύλια και οίνους αναφέρεται το 1974 από τους Schreier και Drawert [79]. Είναι μία από τις πιο αξιοσημείωτες φυσικές αρωματικές ουσίες που γνωρίζουμε και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια στην παγκόσμια βιομηχανία αρωμάτων [80]. Έχει εξαιρετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης (2 ng L<sup>-1</sup>) σε νερό [81], και σχετικά χαμηλό (50 ng L<sup>-1</sup>) σε 10% υδραλκοολικό διάλυμα [51]. Σε γλυκείς λευκούς οίνους η τιμή αυτή εκτιμάται σε 4,5 μg L<sup>-1</sup> [82], ενώ

αναφέρεται ένα μεγάλο εύρος τιμών ορίων ανίχνευσης σε ερυθρούς οίνους που εξαρτώνται από την επίδραση της μήτρας των οίνων [82].

Το άρωμά της χαρακτηρίζεται ως σύνθετο, που θυμίζει εξωτικά φρούτα και λουλούδια, με τόνους μελιού και μαγειρεμένου μήλου. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά ως ένα συστατικό με ποικίλες φυτικές προελεύσεις, αλλά παρατηρείται πιο συχνά σε αιθέρια έλαια και σε κατεργασμένα τρόφιμα και ποτά που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία ή ζύμωση ως προϊόν χημικών μετατροπών πρόδρομων ενώσεων [83]. Πρόσφατα, έχει σημειωθεί ότι η β-δαμασκηνόνη παίζει έναν εξαιρετικά σημαντικό έμμεσο ρόλο στο άρωμα των οίνων. Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, οι αλληλεπιδράσεις της β-δαμασκηνόνης με την IBMP (3-ισοβουτυλ-2-μεθοξυπυραζίνη) [82] και με άλλες πτητικές ενώσεις [84], έχουν ως αποτέλεσμα διακυμάνσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός μίγματος. Για παράδειγμα, συνδυασμός β-δαμασκηνόνης, β-ιονόνης, διμεθυλο-σουλφιδίου και εστέρων αυξάνει το φρουτώδη χαρακτήρα της ράγας [84].

Σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση των Sefton και συνεργάτες [83], η β-δαμασκηνόνη αναφέρεται σε περισσότερες από 100 δημοσιευμένες εργασίες ως συστατικό σταφυλιών και οίνων, κυρίως (αλλά όχι αποκλειστικά), από ποικιλίες *Vitis vinifera*. Στις παλαιότερες από αυτές, με ημιποσοτικούς προσδιορισμούς, εμφανίζονταν σε υψηλές συγκεντρώσεις ενώ στις πιο πρόσφατες, η συγκέντρωσή της κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , με εξαίρεση μία εργασία των Crupi και των συνεργατών του, όπου αναφέρουν ότι βρήκαν δαμασκηνόνη σε δύο οίνους Chardonnay σε συγκεντρώσεις 137 και 190  $\mu\text{g L}^{-1}$  [83, 85].

Παρά το μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων, ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τη σύνδεση της συγκέντρωσής της με την κάθε ποικιλία [83]. Η συσχέτιση γίνεται δύσκολη για διάφορους λόγους. Από το μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάζονται στις περισσότερες εργασίες, από τις διαφορετικές αναλυτικές τεχνικές που ακολουθούνται και τα μη επαρκή στοιχεία για την αξιοπιστία τους, και τέλος από τις διαφορετικές καλλιεργητικές και τεχνικές οινοποίησης που εφαρμόζουν οι ερευνητικές ομάδες. Φαίνεται ότι η συγκεκριμένη ουσία είναι παρούσα στις περισσότερες, εάν όχι σε όλες, τις

ποικιλίες, και η συγκέντρωσή της εξαρτάται από άλλους παράγοντες. Σε μία μελέτη [56] όπου το πλήθος των δειγμάτων ήταν μεγάλο (52 μονοποικιλιακοί ερυθροί οίνοι από 4 ποικιλίες) και εφαρμόστηκε η ίδια αναλυτική τεχνική, σχεδόν οι μισές αρωματικές ουσίες έδειξαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών αλλά η β-δαμασκηνόνη δεν ήταν μία από αυτές [83].

Η β-δαμασκηνόνη παράγεται στο σταφύλι από την αποικοδόμηση της νεοξανθίνης και στους οίνους με όξινη υδρόλυση από διάφορες πρόδρομες ενώσεις. [86, 87]. Σε εργασία τους οι Kotseridiis και συνεργάτες [81] αναφέρουν ότι πρόδρομες ενώσεις της β-δαμασκηνόνης είναι πολυόλες και γλυκοζίτες τους με διάφορα σάκχαρα. Η ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζιτών απελευθερώνει τις πολυόλες οι οποίες στη συνέχεια με όξινη υδρόλυση παράγουν β-δαμασκηνόνη.

Ο Guth [88] μετρώντας τη συγκέντρωσή της κατά την παραγωγή ενός οίνου Gewurtztraminer παρατήρησε σημαντική και γρήγορη αύξησή της στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Παράλληλα παρατήρησε μείωση σχεδόν κατά 75% μέσα στους επόμενους πρώτους μήνες. Οι Daniel και συνεργάτες [89] εξήγησαν αυτή τη μείωση ως αποτέλεσμα της νουκλεόφιλης δράσης διαφόρων συστατικών του οίνου και ειδικά του διοξειδίου του θείου.

Σε πρόσφατη εργασία τους οι Lloyd και συνεργάτες [90] διαπίστωσαν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης που παρατήρησε ο Guth στο τέλος της ζύμωσης μπορεί να οφείλεται σε παραγωγή της β-δαμασκηνόνης από πρόδρομες κετόνες σύμφωνα με ένα μηχανισμό όπου ρεδουκτάσες των ζυμών ανάγουν τις κετόνες σε ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία στη συνέχεια, λόγω του όξινου περιβάλλοντος, μετατρέπονται σε δαμασκηνόνη. Υπάρχει ωστόσο, αμφιβολία εάν αυτές οι πρόδρομες κετόνες υπάρχουν στην φυτική πρώτη ύλη.

#### **1.2.2.4 Η β-ιονόνη**

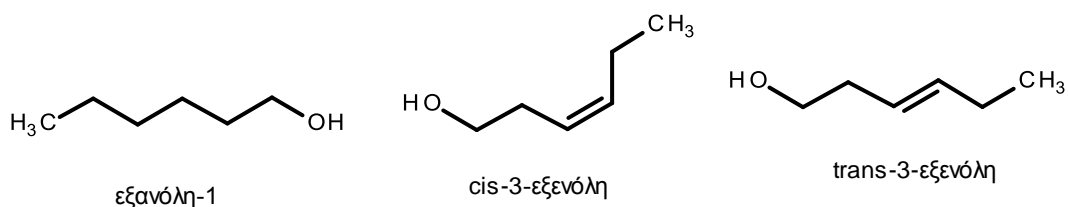
Η κετόνη β-ιονόνη απομονώθηκε το 1929, από το φυτό *Boronia megastigma*, αλλά η παρουσία της σε οίνους αναφέρεται μερικές δεκαετίες αργότερα, το 1976 από τους Schreier και συνεργάτες [91] σε οίνους από λευκές ποικιλίες. Πρόκειται για μία ουσία με χαρακτηριστική οσμή βιολέτας που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών και αρωμάτων. Έχει κατώφλι αντίληψης στο νερό  $7 \text{ ng L}^{-1}$  [10, 71] ενώ σύμφωνα με άλλους ερευνητές  $30 \text{ ng L}^{-1}$  [81] και σε μοντέλο οίνου  $90 \text{ ng L}^{-1}$  [81].

Τη συναντάμε σε φυτά, φρούτα και άνθη πλούσια σε καροτενοειδή. Παράγεται από τη θερμική ή φωτοχημική διάσπαση του β-καροτένιου. Σε πρόσφατη μελέτη, παρατηρήθηκε ότι κυτταρικές καλλιέργειες σταφυλιών είχαν την ικανότητα να μεταβολίσουν τη β-ιονόνη σε δευτερογενή νορισοπρενοειδή πτητικά παράγωγα, χωρίς ωστόσο, να έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή τη βιομετατροπή [90].

Έχει βρεθεί μεταξύ άλλων σε οίνους Cabernet Sauvignon [93], Maccabeo [94], Cabernet franc, Ξυνόμαυρο, Pinot Noir, [81] και σε οίνους από κλώνους του Merlot noir [95]. Σε εργασία τους οι Kotseridis και συνεργάτες όπου προσδιόριζαν αποκλειστικά β-ιονόνη σε σταφύλια και οίνους διαφόρων ερυθρών ποικιλιών από το Bordeaux και άλλες περιοχές, διαπίστωσαν την παρουσία της σε όλους τους οίνους που αναλύθηκαν πάνω από το κατώφλι αντίληψης, δείχνοντας τη σπουδαιότητα αυτού του συστατικού για το άρωμα των ερυθρών οίνων. Στην ίδια μελέτη, έγιναν μετρήσεις στα σταφύλια και τους οίνους κατά την πορεία ωρίμασης. Παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση των επιπέδων της κατά την ωρίμαση ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ουσίας στα σταφύλια με αυτήν στους αντίστοιχους οίνους [81].

### 1.2.3 C<sub>6</sub> αλκοόλες

Οι αλκοόλες με 6 άτομα άνθρακα (Σχήμα 1.5) προσδίδουν στους οίνους οσμές χορτώδεις ή νότες «πράσινων φύλλων» [96, 97] που είναι γενικά ανεπιθύμητες.



Σχήμα 1.5: Συντακτικοί τύποι χαρακτηριστικών C<sub>6</sub> αλκοολών των οίνων

Οι C<sub>6</sub> αλκοόλες αποτελούν μέλος μιας ευρύτερης οικογένειας συστατικών των σταφυλιών με 6 άτομα άνθρακα. Στα συστατικά αυτά, ανήκουν επίσης οξικοί εστέρες και αλδεΐδες, ωστόσο οι αλκοόλες κυριαρχούν κατά τα τελευταία

στάδια της ωρίμασης των σταφυλιών [96, 98]. Μάλιστα, με βάση αυτό το εύρημα, οι *Kalua και συνεργάτες* [96], έδειξαν ότι οι λόγοι των επιπέδων των C<sub>6</sub> αλκοολών προς τις συγκεντρώσεις των C<sub>6</sub> αλδευδών (στα σταφύλια), θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της σωστής χρονικής στιγμής του τρύγου, με σκοπό την αύξηση της έντασης του αρώματος στα σταφύλια και στους παραγόμενους οίνους.

Η βιοσύνθεση των C<sub>6</sub> αλκοολών μπορεί να γίνει *in situ* και *de novo* κατά τη διάρκεια των κατεργασιών των σταφυλιών πριν την αλκοολική ζύμωση (τρύγος, μεταφορά, πίεση σταφυλιών κλπ) από το σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων των ραγών [46(b)] .

Και στις δύο περιπτώσεις, η σύνθεση πραγματοποιείται μέσω του μονοπατιού της λιποξυγενάσης (LOX) [46(b), 99] από ειδικά ένζυμα που βρίσκονται καθηλωμένα πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες\* των ραγών και περιγράφεται συνοπτικά ως εξής: Σε πρώτο στάδιο, μια αλκυλοδρολάση ελευθερώνει ακόρεστα λιπαρά οξέα (λινολεϊκό οξύ C<sub>18:2</sub> και λινολενικό οξύ C<sub>18:3</sub>) από τα μεμβρανικά λιπίδια. Στη συνέχεια, μια λιποξυγενάση (lipoxygenase, LOX) καταλύει την προσθήκη οξυγόνου σε αυτά τα C<sub>18</sub> ακόρεστα λιπαρά οξέα. Σε επόμενο στάδιο, τα υπεροξειδία που παράγονται διασπώνται από ειδικό ένζυμο (hydroperoxide lyase (HPL)) σε C<sub>6</sub> αλδεύδες και ορισμένες από αυτές, στη συνέχεια, ανάγονται στις αντίστοιχες C<sub>6</sub> αλκοόλες από μια αλκαλική δευδρογονάση του σταφυλιού (alcohol dehydrogenase (ADH) [46(b), 100, 101].

Καθώς οι C<sub>6</sub> αλκοόλες έχουν, σε κάθε περίπτωση, φυτική προέλευση, υπήρξε η υπόθεση ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες της προέλευσης των οίνων [103]. Ο *Oliveira* και οι συνεργάτες του ανέλυσαν για το σκοπό αυτό 43 μονοποικιλιακούς οίνους από 6 λευκές και 3 ερυθρές ποικιλίες και υπολόγισαν τους λόγους των συγκεντρώσεων των τριών C<sub>6</sub> αλκοολών: εξανόλη-1, *cis*-3-εξενόλη και *trans*-3-εξενόλη.

\*Υποσημείωση Ως συνέπεια, κατά τη διαδικασία της οινοποίησης οι συγκεντρώσεις των C<sub>6</sub> αλδευδών τείνουν να αυξάνουν αναλογικά με το πλήθος των στερεών εκχυλιζόμενων συστατικών που βρίσκονται στο γλεύκος. Για το λόγο αυτό, και για να αποφευχθούν οι χορτώδεις οσμές στους παραγόμενους οίνους, υπάρχει η σύσταση να λαμβάνεται διαυγές γλεύκος στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα [46(b), 104].

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πράγματι, ο λόγος trans-3-εξενόλη/cis-3-εξενόλη μπόρεσε να διαχωρίσει τους οίνους μίας ποικιλίας (*Loureiro*) από τους οίνους 3 άλλων ποικιλιών (*Alvarinho*, *Avesso*, και *Trajadura*) ενώ οι λόγοι εξανόλη-1/trans-3-εξενόλη και εξανόλη-1/ cis-3-εξενόλη μπόρεσαν επίσης να διαχωρίσουν τους μονοποικιλιακούς οίνους δίνοντας τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν για ένα δεύτερο επίπεδο διαφοροποίησης

Στον Πίνακα 1.4 δίνονται στοιχεία για τα το κατώφλι αντίληψης των συγκεκριμένων ενώσεων.

**Πίνακας 1.4: Περιγραφή χαρακτηριστικής οσμής και κατώφλι αντίληψης ορισμένων C6 αλκοολών των οίνων.**

Ένωση	Χαρακτηριστική οσμή	Κατώφλι αντίληψης*	Αναφορά
εξανόλη-1	ρητίνη, κομμένο χόρτο	<sup>a</sup> 8000	[4, 51]
cis-3-εξενόλη	κομμένο χόρτο	<sup>a</sup> 400	[4, 51]
trans-3-εξενόλη	κομμένο χόρτο	<sup>b</sup> 1000	[102]

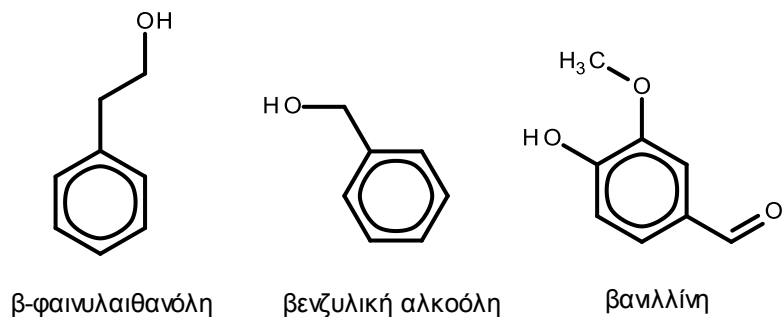
\*Συγκεντρώσεις σε  $\mu\text{g L}^{-1}$  από προσδιορισμούς **a**: σε υδραλκοολικό διάλυμα νερό/αιθανόλη (90+10 w/w) **b**: σε 14% υδραλκοολικό διάλυμα

#### 1.2.4 Βενζολικά παράγωγα

Άλλα σημαντικά πρωτογενή συστατικά που βρίσκονται σε σταφύλια και οίνους, είναι οι αρωματικές αλκοόλες β-φαινυλαιθανόλη και βενζυλική αλκοόλη καθώς και η αρωματική αλδεΐδη βανιλίνη (Σχήμα 1.6). Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην οικογένεια των βενζενοειδών και φαινυλπροπανοειδών πτητικών συστατικών των φυτών [101] και παράγονται, πρωταρχικά, από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη μέσω ειδικών βιοχημικών μονοπατιών που δεν έχουν Η β-φαινυλαιθανόλη έχει ευχάριστη οσμή τριαντάφυλλων [106] και η βενζυλική αλκοόλη προσφέρει στους οίνους άρωμα άγριων μούρων [107].

ακόμη πλήρως διευκρινισθεί [101, 105].





**Σχήμα 1.6: Συντακτικοί τύποι χαρακτηριστικών βενζολικών ενώσεων των οίνων**

Όσον αφορά την παρουσία των δύο αλκοολών στα σταφύλια, το 1983 ο Williams και οι συνεργάτες του έδειξαν πρώτοι ότι, εκτός από ελεύθερες, βρίσκονται στις ποικιλίες *Vitis vinifera* Μοσχάτο Αλεξανδρείας και Riesling με τη μορφή γλυκοζιδίων, δεσμευμένες με παρόμοιους διασακχαρίτες όπως τα μονοτερπένια [108]. Σε επόμενες μελέτες φάνηκε ότι, η βενζυλική αλκοόλη και η β-φαινυλαιθανόλη βρίσκονται σε σταφύλια πολλών ποικιλιών ως επί το πλείστον στο δεσμευμένο κλάσμα [29, 109, 110]. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η παρουσία τους υπερισχύει σε αρωματικά ουδέτερες ποικιλίες [50, 111]. Ωστόσο, σε πρόσφατη μελέτη των Fenoll και συνεργάτες [27], όπου αναλύθηκαν κατά την πορεία ωρίμασης σταφύλια της ποικιλίας Μοσχάτο Αμβούργου, διαπιστώθηκε ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις ήταν από τα κύρια αρωματικά συστατικά που προσδιορίστηκαν. Σε μελέτη ισπανών ερευνητών [112], όπου προσδιορίστηκαν ελεύθερα και δεσμευμένα πτητικά συστατικά σε φλοιούς, γλεύκη και οίνους από μοσχάτη ποικιλία (*Muscat "a petit grains"*), ο γλυκοζίτης της βενζυλικής αλκοόλης εντοπίστηκε κυρίως στο γλεύκος ( $\sim 250 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ενώ ο γλυκοζίτης της β-φαινυλαιθανόλης βρέθηκε μοιρασμένος ανάμεσα στο γλεύκος και τους φλοιούς των ραγών των σταφυλιών ( $130$  και  $170 \mu\text{g L}^{-1}$  αντίστοιχα).

Όσον αφορά την παρουσία των δύο αλκοολών στους οίνους, πλήθος αναφορών δείχνουν ότι τα επίπεδα της πτητικής β-φαινυλαιθανόλης είναι της τάξης των μερικών  $\text{mg L}^{-1}$ , πολύ υψηλότερα, δηλαδή, από τα επίπεδα άλλων πρωτογενών συστατικών [56, 88, 102, 113, 114]. Αυτό είναι απόρροια της ικανότητας των ζυμών να συνθέτουν *de novo* την ένωση, από φαινυλαλανίνη,

κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης [115]. Η βενζυλική αλκοόλη, έχει βρεθεί σε οίνους από διάφορες ποικιλίες όπου στις περισσότερες περιπτώσεις, παρουσιάζεται με υψηλότερο ποσοστό στο δεσμευμένο κλάσμα [12, 113, 116].

Η βανιλίνη (4-υδροξυ-3-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη), είναι ένα συστατικό με ευχάριστη οσμή βανίλιας, που παράγεται στα σταφύλια και μεταφέρεται στους οίνους σε ελεύθερη και δεσμευμένη ως γλυκοζίτης μορφή. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα επίπεδα της ένωσης, σε οίνους, που δεν έχουν υποστεί παλαίωση, κυμαίνονται μεταξύ 0,4 και 140  $\mu\text{g L}^{-1}$  [12, 109, 116-119]. Για οίνους που έχουν υποστεί παλαίωση, οι συγκεντρώσεις της βανιλίνης είναι πολύ μεγαλύτερες, καθώς η ένωση εκχυλίζεται από τη λιγνίνη του ξύλου των βαρελιών [120].

Στον Πίνακα 1.5 δίνονται στοιχεία για τα το κατώφλι αντίληψης των προαναφερόμενων ενώσεων.

**Πίνακας 1.5: Περιγραφή χαρακτηριστικής οσμής και κατώφλι αντίληψης βενζολικών παραγώγων των οίνων.**

Ένωση	Χαρακτηριστική οσμή	Κατώφλι αντίληψης*	Αναφορά
β-φαινυλαιθανόλη	τριαντάφυλλου	<sup>a</sup> 10000	[51]
βενζυλική αλκοόλη	βατόμουρου	620	[107]
βανιλίνη	Βανίλιας	<sup>a</sup> 200	[51]

\*Συγκεντρώσεις σε  $\mu\text{g L}^{-1}$  από προσδιορισμούς **a**: σε υδραλκοολικό διάλυμα νερό/αιθανόλη (90+10 w/w), **b**: σε 14% υδραλκοολικό διάλυμα

### 1.2.5 Γλυκοζίτες πτητικών συστατικών

Τα συστατικά του αρώματος είναι φυσικά πτητικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού που επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στο φυτικό κόσμο. Συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις τύπου φυτό–φυτό, φυτό–έντομο, φυτό–παθογόνο και πρέπει να είναι διαθέσιμα σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Επομένως, είναι απαραίτητο να αποθηκεύονται σε διάφορους φυτικούς ιστούς και ειδικά στα άνθη και τα φρούτα [101]. Ωστόσο, οι ιδιότητες των μορίων αυτών – πτητικότητα, υψηλή υδροφοβικότητα κλπ. – καθιστούν τη συσσώρευσή τους στα κύτταρα από δύσκολη έως επικίνδυνη

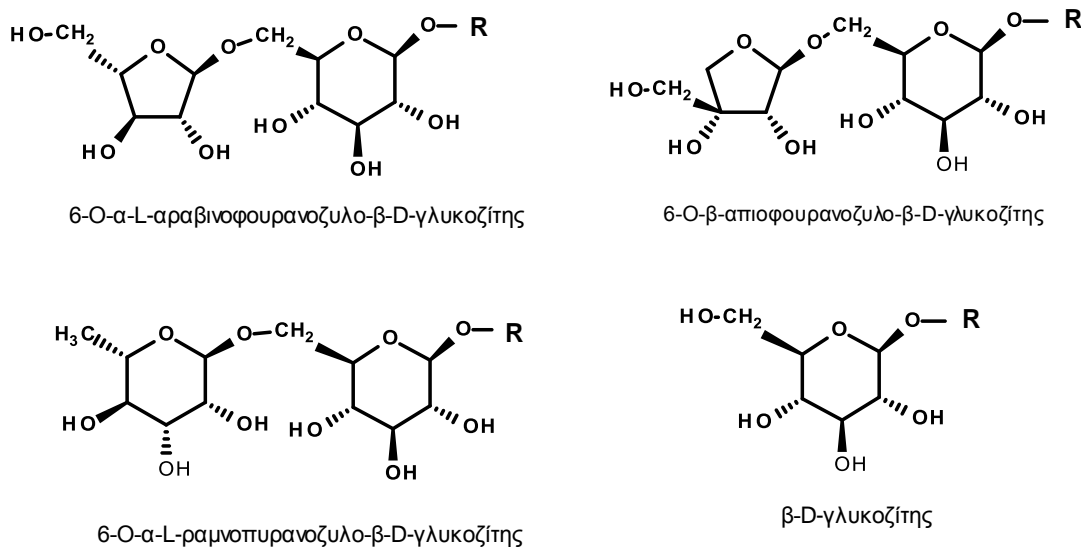
[121]. Η γλυκοζυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητά τους στο νερό, ευνοεί την αποθήκευσή τους στα χυμοτόπια [122] και παράλληλα διευκολύνει τις μετακινήσεις τους μέσα στο φυτό [123, 124].

Η παρουσία γλυκοζιτών των οσμηρών ενώσεων τεκμηριώθηκε το 1969 από τους Francis and Allock [125] σε άνθη τριανταφυλλιάς. Από τότε, έχουν ανιχνευθεί σε περίπου 170 φυτά από σχεδόν 50 οικογένειες [126] σε διάφορους φυτικούς ιστούς συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, φύλλων, ανθών, ριζών, βελόνων, ξύλινων ιστών και σπόρων [123].

Στα σταφύλια, η ύπαρξη γλυκοζιτών των μονοτερπενίων αποδείχθηκε έμμεσα το 1974 από τους Cordonnier και Bayonove, ωστόσο, η απομόνωσή τους επιτεύχθηκε αργότερα, το 1982 από τους Williams και συνεργάτες [127]. Όπως έχει προαναφερθεί, πτητικές ενώσεις των σταφυλιών που απαντούν ως γλυκοζίτες είναι μεταξύ άλλων μονοτερπενόλες, τερπενικές πολυόλες, οξειδία της λιναλοόλης, C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδείς ενώσεις, γραμμικές ή κυκλικές αλκοόλες (εξανόλη, φαινυλοαιθανόλη, βενζυλική αλκόλη), φαινολικά οξέα και πτητικές φαινόλες όπως η βανιλίνη [31].

Οι γλυκοζίτες είναι μη πτητικοί και άοσμοι, αποτελούν ωστόσο, για σταφύλια και οίνους μία μεγάλη δεξαμενή αποθηκευμένου αρωματικού δυναμικού. Σύμφωνα με τους Gunata και συνεργάτες [50] τα δεσμευμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς πτητικά συστατικά στα σταφύλια, είναι από δύο έως οκτώ φορές περισσότερα από τα ελεύθερα. Εντοπίζονται στα κύτταρα των φλοιών των ραγών και στη σάρκα. Όμως, αντίθετα, από τα ελεύθερα πτητικά αρωματικά συστατικά (που βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς) τα δύο τρίτα του συνόλου των ετεροζιτών βρίσκονται στο γλεύκος [128]. Επομένως, για την παραλαβή τους, κατά την οινοποίηση, αρκεί η πίεση των σταφυλιών, χωρίς να χρειάζονται ειδικές κατεργασίες (κρυσταλλοποίηση, κλπ) [128].

Στο μόριο των γλυκοζιτών, το τμήμα του σακχάρου καταλαμβάνει συνήθως είτε ο μονοσακχαρίτης β-D-γλυκοπυρανόζη είτε ένας δισακχαρίτης. Οι δισακχαρίτες απαρτίζονται από β-D-γλυκοπυρανόζη και συνδεδεμένο με αιθερικό δεσμό στη θέση 6 της γλυκόζης, έναν από τους παρακάτω μονοσακχαρίτες: α-L-αραβινοφουρανόζη, α-L-ραμνοπυρανόζη, και β-D-απιοφουρανόζη [129] (Σχήμα 1.7).



**Σχήμα 1.7:** Συντακτικοί τύποι γλυκοζιτών των πτητικών ενώσεων σταφυλιών και οίνων. Όπου R: μονοτερπένια, C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδείς ενώσεις, C<sub>6</sub> αλκοόλες και βενζολικά παράγωγα

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες της οικογένειας *V. vinifera* όπως οι ανθοκυάνες απαντούν αποκλειστικά ως μονο-γλυκοζίτες [130]. Αυτό κάνει δυνατή την υπόθεση ότι η γλυκοζυλίωση των πτητικών ενώσεων λαμβάνει χώρα μέσω ειδικού ξεχωριστού μονοπατιού από αυτό που γλυκοζυλιώνει τις ανθοκυάνες. Οι Günata και συνεργάτες [131] βρήκαν ότι η βιοσύνθεση των γλυκοζυλιωμένων νορισοπρενοειδών στις ποικιλίες Shiraz και Μοσχάτο Αλεξανδρείας λάμβανε χώρα στη ράγα του σταφυλιού, ανεξάρτητα από τα φύλλα. Αυτό δείχνει ότι οι πρόδρομες αρωματικές ενώσεις συντίθενται εκεί *de novo* και δεν μεταφέρονται στο φρούτο από άλλους ιστούς του φυτού.

Οι γλυκοζίτες των πτητικών συστατικών **στους οίνους** προέρχονται από τα σταφύλια, εξαρτώνται από την ποικιλία, και επηρεάζονται γενικά, σε μικρό βαθμό από την αλκοολική ζύμωση [31, 49]. Το άγλυκο, αρωματικό τμήμα τους μπορεί να απελευθερωθεί με ενζυμική ή όξινη υδρόλυση [132].

Η **όξινη υδρόλυση**, υπό τις συνθήκες της οινοποίησης, λαμβάνει χώρα αρκετά αργά. Ο ρυθμός της αντίδρασης εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία του μέσου καθώς και από τη δομή του άγλυκου τμήματος. Όπως έχει παρατηρηθεί, στο (όξινο) περιβάλλον των οίνων, οι γλυκοζίτες των τριτοταγών

αλκοολών όπως της λιναλοόλης, των οξειδίων της λιναλοόλης και της ατερπινεόλης υδρολύονται πιο εύκολα από εκείνους των πρωτοταγών αλκοολών όπως της γερανιόλης και της νερόλης [133]. Σε δημοσιευμένη εργασία, αναφέρεται ότι, έπειτα από παραμονή δύο ετών ενός οίνου Μοσχάτο στους 10 °C, περισσότεροι από τους μισούς γλυκοζίτες της γερανιόλης εξακολούθησαν να υφίστανται ενώ αντίθετα οι γλυκοζίτες της λιναλοόλης είχαν εξ ολοκλήρου υδρολυθεί [134].

Για την **ενζυμική** υδρόλυση των γλυκοζιτών χρειάζεται να δράσουν διαδοχικά ειδικές γλυκοζιδάσες ανάλογα με το είδος του σακχάρου που συνδέεται με τη β-D-γλυκοπυρανόζη [31]. Σε πρώτη φάση, χρειάζεται να σπάσει ο δεσμός ανάμεσα στα δύο σάκχαρα οπότε να αποδεσμευτεί ο ένας μονοσακχαρίτης και να παραμείνει η β-D-γλυκοπυρανόζη συνδεδεμένη με το άγλυκο τμήμα. Σε δεύτερη φάση, χρειάζεται δράση β-D-γλυκοζιδάσης για να καταλύσει την υδρόλυση του β-D-γλυκοπυρανοζίτη και να απελευθερωθούν η αγλυκόνη και η γλυκόζη. Ορισμένα ένζυμα ωστόσο, έχουν δραστικότητα διγλυκοζιδάσης οπότε μπορούν να κόψουν απ' ευθείας το δεσμό ανάμεσα στο δισακχαρίτη και το άγλυκο συστατικό [31].

Τα σταφύλια όπως και οι ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* διαθέτουν ενδογενείς γλυκοζιδάσες. Οι γλυκοζιδάσες των σταφυλιών εντοπίζονται στο χυμό και τη σάρκα των ραγών. Ωστόσο, τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν χαμηλή σταθερότητα στο όξινο περιβάλλον των γλευκών και των οίνων (συνήθως pH~3) και η ενεργότητά τους μειώνεται σημαντικά από τις ποσότητες της αιθυλικής αλκοόλης που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση [135, 136].

Οι γλυκοζιδάσες των ζυμών έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά. Το ενδοκυτταρικό pH (5–6) σε αυτές ευνοεί την ενζυμική σταθερότητα [137]. Αντίθετα, η δραστικότητα β-D-γλυκοσιδάσης των *S. cerevisiae* μειώνεται κατά 90% μετά από 90 λεπτά σε pH 3 [135]. Κατά τη φάση της εκθετικής ανάπτυξης των ζυμών (πρώτες 24 hrs της αλκοολικής ζύμωσης) έχει παρατηρηθεί αύξηση δραστικότητας β-γλυκοζιδάσης, α-ραμνοσιδάσης και α-αραβινοσιδάσης. Η δραστικότητα αυτή όμως μειώνεται ταχύτατα μέσα στις επόμενες 3 ημέρες [137].

Σε αντίθεση με τις γλυκοζιδάσες των σταφυλιών και των ζυμών, μελέτες δείχνουν ότι γλυκοζιδάσες από διάφορα είδη βακτηρίων (*Trichoderma*,

*Penicillium* και κυρίως *Aspergillus niger*) είναι πιο σταθερές στο pH των γλευκών, αναστέλλονται ελάχιστα από την αιθανόλη και δείχνουν μεγαλύτερη ικανότητα να δρουν στις χαμηλές θερμοκρασίες της ζύμωσης (10-20 °C ) [34, 135]. Τέτοια ένζυμα έχουν απομονωθεί, και διατίθενται σε εμπορικά σκευάσματα, έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται για την απελευθέρωση του δεσμευμένου αρωματικού δυναμικού στους οίνους [34]. Ένα βασικό τους μειονέκτημα ωστόσο, είναι ότι η δραστηριότητά τους μειώνεται δραματικά παρουσία γλυκόζης. Για το λόγο αυτό η προσθήκη τους πρέπει να γίνεται στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης σε ξηρούς οίνους [31].

Το ζήτημα της υδρόλυσης των γλυκοζιτών παρουσιάζει ενδιαφέρον και από αναλυτική σκοπιά. Μηχανισμοί για να απελευθερώνουν τις αγλυκόνες έχουν μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες [31]. Οι γνώμες για την καταλληλότερη στρατηγική είναι αντικρουόμενες.

Για ορισμένους ερευνητές η όξινη υδρόλυση αποτελεί τη μέθοδο επιλογής [19, 81, 121, 128, 138]. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι γλυκοζίτες υπόκεινται σε υδρόλυση σε υψηλές θερμοκρασίες (~100 °C) και pH~1–2.5 για περίπου 1 h. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται απελευθέρωση των δεσμευμένων συστατικών από μεγάλο εύρος πρόδρομων ενώσεων [121]. Εξαιτίας, ωστόσο, των ακραίων συνθηκών pH και θερμοκρασίας που εφαρμόζονται, βασικό μειονέκτημα της συγκεκριμένης διαδικασίας, αποτελεί ο κίνδυνος χημικής μετατροπής ορισμένων προσδιοριζόμενων συστατικών και κυρίως μονοτερπενολών σε άλλα συστατικά [47]. Παρά ταύτα, σε πρόσφατη συγκριτική μελέτη, ερευνητές έδειξαν ότι η εφαρμογή της όξινης υδρόλυσης σε πρόδρομες ενώσεις των σταφυλιών είχε καλύτερη προβλεψιμότητα του αρώματος των παραγόμενων οίνων από την ενζυμική υδρόλυση [139]. Το αποτέλεσμα αυτό, σύμφωνα με τους συγγραφείς, διακαίολογείται από το γεγονός ότι οι χημικές μετατροπές που συμβαίνουν κατά την όξινη υδρόλυση σχετίζονται περισσότερο με τις μετατροπές που συμβαίνουν στο όξινο περιβάλλον της ζύμωσης.

Η ενζυμική μέθοδος, από την άλλη, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη διαδικασία υδρόλυσης των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων σε σταφύλια και οίνους [50, 112, 140-143]. Η υδρόλυση με ένζυμα διακρίνεται για την αποτελεσματικότητά της και επιπλέον επιλέγεται ως πιο «φυσικός» τρόπος απελευθέρωσης των αγλυκονών καθώς

προσομοιάζει περισσότερο με την πραγματική διαδικασία που ακολουθείται όταν γίνεται προσθήκη εξωγενών γλυκοσιδασών σε οίνους [31].

Σε εκτεταμένη ανασκόπηση των Maicas & Mateo που έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο τεχνικών (ενζυμικής και όξινης υδρόλυσης) ως προς την αποδοτικότητά τους για την απελευθέρωση τερπενικών ενώσεων από πρόδρομες ενώσεις σταφυλιών και οίνων οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η ενζυμική υδρόλυση είναι ο ενδεδειγμένος τρόπος [31]. Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη [144] όπου συγκρίθηκαν οι δύο μέθοδοι υδρόλυσης για την αποδέσμευση πρωτογενών αρωματικών συστατικών, που ανήκαν σε διάφορες χημικές κατηγορίες (αλειφατικές αλκοόλες, μονοτερπένια, νορισοπρενοειδή, πτητικές φαινόλες κλπ) από σταφύλια *V. vinifera* 7 ποικιλιών, αποδείχθηκε ότι η ενζυμική υδρόλυση είναι η πιο αποδοτική.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ

#### 2.1 Γενικά

Ο προσδιορισμός των αρωματικών συστατικών των οίνων πραγματοποιείται με μεθόδους ενόργανης ανάλυσης και συνήθως αποτελείται από δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την προκατεργασία για την απομόνωση των αναλυτών από το δείγμα και το δεύτερο στάδιο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Η προκατεργασία των δειγμάτων αποτελεί μία δύσκολη υπόθεση, καθώς πρέπει να αντιμετωπιστεί μία σειρά από προβλήματα:

- Κατ' αρχήν, αυτό της συνύπαρξης πληθώρας ουσιών (μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 1000 ενώσεις μόνο στο πτητικό κλάσμα των οίνων) [107], με αποτέλεσμα τον αυξημένο βαθμό δυσκολίας για την απομόνωση αποκλειστικά των ενώσεων-στόχων.
- Έπειτα, αυτό των διαφορών που παρουσιάζουν οι αναλύτες μεταξύ τους ως προς τα διάφορα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, όπως πολικότητα, διαλυτότητα, πτητικότητα κ.ά. Ορισμένα συστατικά είναι αρκετά υδρόφοβα και απομακρύνονται εύκολα από το υπόστρωμα των οίνων, ενώ άλλα είναι αρκετά υδρόφιλα και απομακρύνονται με δυσκολία [1].
- Το ζήτημα ότι οι συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ενώσεων μπορεί να διαφέρουν κατά πολλές τάξεις μεγέθους. Πράγματι, ορισμένες ενώσεις βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των  $\text{ng L}^{-1}$ , ενώ άλλες βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όπως δεκάδες  $\text{mg L}^{-1}$  [11].
- Τέλος, το γεγονός ότι κάποια από τα συστατικά αυτά είναι ασταθή, είναι εύκολο δηλαδή να οξειδωθούν σε επαφή με τον αέρα, σε υψηλές θερμοκρασίες ή να υποστούν χημικές μετατροπές σε ακραία pH [145].

Για τους παραπάνω λόγους, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής προκατεργασίας δείγματος είναι αποφασιστικής σημασίας. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που παρουσιάζουν κάποια πλεονεκτήματα



και κάποια μειονεκτήματα [146, 147]. Κριτήριο για την κατηγοριοποίησή τους μπορεί να αποτελέσει η φυσικοχημική ιδιότητα στην οποία βασίζεται η απομόνωση των αναλυτών. Έτσι, σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση, υπάρχουν τεχνικές που βασίζονται στα ακόλουθα [148]:

- Την πτητικότητα των αναλυτών, όπως διαδικασίες απόσταξης και τεχνικές υπερκείμενου χώρου (Head Space Techniques).
- Τη διαλυτότητα των αναλυτών σε ορισμένους οργανικούς διαλύτες, όπως εκχύλιση Soxhlet, εκχύλιση υγρού–υγρού (Liquid–Liquid Extraction, LLE), εκχύλιση με χρήση υπερκρίσιμων ρευστών (Super Critical Fluid Extraction, SFE), εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) και εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE) .
- Την προσρόφηση ή απορρόφηση των αναλυτών σε συγκεκριμένο υλικό, όπως εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction SPME), εκχύλιση με προσρόφηση σε περιστρεφόμενη ράβδο (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE), δυναμική εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Dynamic Extraction, SPDE).

Όπως έχει προαναφερθεί, τα πρωτογενή αρωματικά συστατικά των οίνων υπάρχουν σε δύο μορφές. Στην ελεύθερη πτητική μορφή τους, όπου συμμετέχουν απευθείας στο άρωμα των οίνων, και ως άοσμοι μη πτητικοί γλυκοζίτες. Για τον προσδιορισμό και των ελεύθερων και των δεσμευμένων συστατικών απαιτείται ένα στάδιο κλασμάτωσης του δείγματος δηλ. διαχωρισμού του πτητικού (μη–πολικού) κλάσματος από το κλάσμα των υδατοδιαλυτών γλυκοζιτών (πολικό). Η μεγάλη πλειονότητα των μεθόδων κλασμάτωσης βασίζονται στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) [149].

## **2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)**

Η τεχνική SPE αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1970, ως εναλλακτική μέθοδος της εκχύλισης υγρού–υγρού, ενώ άρχισε να βρίσκει ευρύτερη απήχηση μετά το 1985 [150]. Εφαρμόζεται, γενικά, για την απομόνωση παραλαβή και συμπύκνωση συστατικών από υγρά δείγματα. Η χρήση της SPE επιτρέπει την απομόνωση διαφορετικών συστατικών, τη συμπύκνωση και καθαρισμό του δείγματος και την αλλαγή του υποστρώματος από υδατικό σε οργανικό [151]. Βασίζεται στην εκλεκτική συγκράτηση των αναλυτών σε ένα πληρωτικό υλικό

(υλικό που «πληρώνει» τη στήλη) και την επακόλουθη έκλουσή τους (elution) με τον κατάλληλο διαλύτη [150].

Συγκρινόμενη με τη LLE, η SPE μειώνει τους απαιτούμενους χρόνους, ενώ επιπλέον προσφέρει τη δυνατότητα επεξεργασίας μικρότερων όγκων δειγμάτων και αυτοματοποίησης. Ακόμη, με την SPE επιλύονται πολλά προβλήματα της εκχύλισης υγρού–υγρού, όπως π.χ. ο ατελής διαχωρισμός φάσεων, η μη ποσοτική ανάκτηση των διαχωριζόμενων ουσιών, η χρήση ακριβού και εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες), ή η χρήση και απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και κατά κανόνα εύφλεκτων ή/και τοξικών οργανικών διαλυτών [152].

Ανάλογα με το είδος της στερεάς φάσης και των χαρακτηριστικών των αναλυτών, μία σειρά από φυσικές και χημικές αλληλοεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα που επιτρέπουν στην προσδιοριζόμενη ουσία να διαχωρισθεί από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Έτσι, υπάρχει η SPE αντίστροφης φάσης (reversed phase), κανονικής φάσης (normal phase), ιονανταλλαγής (ion exchange), κ.ά. Σε κάθε περίπτωση, η εκλεκτικότητα του διαχωρισμού ρυθμίζεται από το είδος του πληρωτικού υλικού και του διαλύτη που επιλέγεται [153].

Η κατασκευή μιας στήλης SPE, μπορεί να γίνει χειρωνακτικά, με την τοποθέτηση πληρωτικού υλικού (είτε σε στερεή μορφή είτε ως αιώρημα) μέσα σε ένα σωλήνα όπως υάλινη στήλη, σύριγγα, πιπέττα Pasteur, κλπ.. Ωστόσο, σήμερα υπάρχουν πλήθος εμπορικά διαθέσιμες έτοιμες στήλες SPE με ποικίλα πληρωτικά υλικά, σε διάφορες ποσότητες. Σε αυτές, τα πληρωτικά υλικά βρίσκονται τοποθετημένα σε σωλήνες πολυπροπυλενίου μεταξύ δύο ηθμών (κατασκευασμένους από πολυαιθυλένιο, ανοξειδωτο ατσάλι, ή PTFE) [154].

Το υγρό δείγμα διέρχεται από το πληρωτικό υλικό είτε μέσω αναρρόφησης είτε με άσκηση πίεσης (βαρύτητα, με αέρα από σύριγγα, ή φυγοκέντρωση). Γενικά, η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται στην SPE, αποτελείται από τα εξής στάδια [150] :

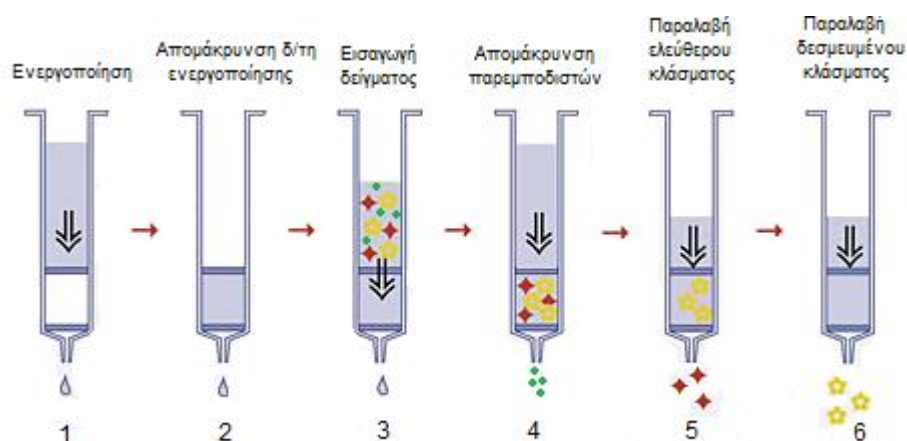
1. Ενεργοποίηση του πληρωτικού υλικού με τον κατάλληλο διαλύτη.
2. Απομάκρυνση του διαλύτη ενεργοποίησης.

3. Εισαγωγή του δείγματος. Οι αναλύτες κατακρατούνται από το πληρωτικό υλικό.
4. Απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ουσιών.
5. Έκλυση των αναλυτών.

Στην περίπτωση των κατεργασιών οίνων, σταφυλιών και λοιπών οινολογικών προϊόντων για τον προσδιορισμό αρωματικών συστατικών, όπου επιζητείται ο διαχωρισμός των ελεύθερων πτητικών συστατικών από τα δεσμευμένα μη πτητικά συστατικά, η παραπάνω διαδικασία μετά το βήμα 4 τροποποιείται ως εξής (Σχήμα 2.1) [149]:

5. Έκλυση των ελεύθερων αναλυτών με μη πολικό διαλύτη
6. Έκλυση των μη πτητικών πολικών αναλυτών με πολικό διαλύτη

Στη συνέχεια η συλλογή των δύο κλασμάτων μας επιτρέπει την περαιτέρω ανάλυσή τους.



**Σχήμα 2.1:** Στάδια εκχύλισης για το διαχωρισμό ελεύθερων και πτητικών αρωματικών συστατικών

### 2.2.1 Είδη και χαρακτηριστικά πληρωτικών υλικών

Ανάμεσα στα διάφορα πληρωτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση αρωματικών συστατικών από τρόφιμα, μπορούμε να διακρίνουμε: την πυριτική γέλη, την ενεργοποιημένη αλουμίνα ( $Al_2O_3$ ), τον ενεργοποιημένο άνθρακα, τους ζεόλιθους και πολυμερή όπως το πολυστυρένιο, οι πολυακρυλικοί εστέρες, ή οι φαινολικές ρητίνες [155]. Γενικά, τα υλικά αυτά

μπορούν να χωρισθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: πολικά, μη-πολικά και ιονανταλλαγής [148].

Πρόκειται για πορώδη στερεά. Εκτός από τη χημική τους δομή, άλλοι σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν τις φυσικές τους ιδιότητες είναι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους, όπως το εμβαδόν της επιφάνειας, το μέγεθος και το σχήμα των κόκκων, και το μέγεθος των πόρων τους [156].

Σε γενικές γραμμές, για την εκχύλιση των οργανικών ενώσεων, τα υλικά που είναι πιο αποτελεσματικά είναι αυτά που έχουν τη μεγαλύτερη συνολική επιφάνεια [157]. Η σημασία του εμβαδού της επιφάνειας οφείλεται στο γεγονός ότι το φαινόμενο της προσρόφησης λαμβάνει χώρα εκεί. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια τόσο περισσότερα σημεία επαφής υπάρχουν [158]. Αντίθετα, το μέγεθος των πόρων δεν παίζει σημαντικό ρόλο. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μόρια των αναλυτών είναι γενικά μικρότερα από τη διάμετρο των πόρων [155].

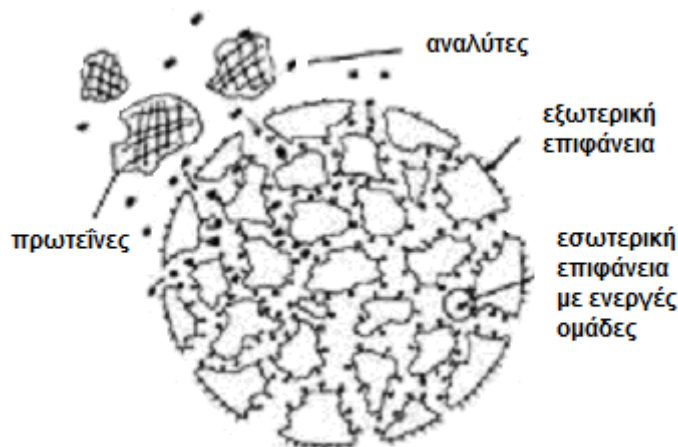
Η εκχυλιστική ικανότητα των πληρωτικών υλικών συνδέεται με τη χωρητική τους ικανότητα [151]. Μια παράμετρος που μπορεί να χαρακτηρίσει τη χωρητική ικανότητα μιας ρητίνης είναι ο όγκος διαφυγής (breakthrough volume). Ως όγκος διαφυγής, ορίζεται ο όγκος του δείγματος που μπορεί να φορτωθεί στο πληρωτικό υλικό της στήλης χωρίς να υπάρξει απώλεια αναλυτών (ανάκτηση 100%) [151].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την ανάλυση οίνων με σκοπό τον προσδιορισμό αρωματικών συστατικών, από τις προαναφερόμενες στατικές φάσεις τα πλέον χρησιμοποιούμενα πληρωτικά υλικά είναι τα τροποποιημένα πυριτικά και τα πολυμερή [148]. Τα υλικά αυτά είναι ως επί των πλείστων μη πολικά και επομένως παρουσιάζουν χημική συγγένεια με τα περισσότερα πτητικά (υδρόφοβα) αρωματικά συστατικά. Για αυτού του είδους τα πληρωτικά υλικά, ακολουθεί εκτενέστερη συζήτηση.

### **2.2.1.1 Πυριτικά υλικά**

Η πορώδης πυριτία  $\text{SiO}_2$  (silica) αποτελεί ένα κλασικό πληρωτικό υλικό. Πρόκειται για ανόργανο πολυμερές  $(\text{SiO}_2)_x$ , που αποτελείται από σκελετό σιλοξανίων με γέφυρες  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ , και ομάδες σιλανόλης  $-\text{Si}-\text{OH}$ . Διαθέτει άμεσα προσβάσιμη εξωτερική επιφάνεια και εσωτερικούς πόρους που

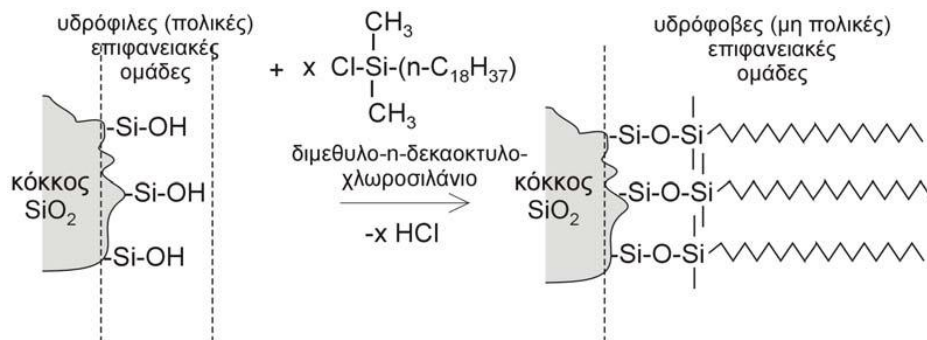
μπορούν να φθάσουν μόνο μόρια μικρότερα από 12000 Da. Οι κόκκοι πυριτίας είναι ανώμαλου σχήματος και η διαμετρός τους κυμαίνεται μεταξύ των 40 και 60  $\mu\text{m}$ . [159].



Σχήμα 2.2: Πυριτικό πληρωτικό υλικό για SPE

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μη τροποποιημένη (πολική), αλλά το συνηθέστερο είναι στην επιφάνειά της να έχουν προσδεθεί διάφορες ενεργές ομάδες, διευρύνοντας έτσι τις δυνατότητες εφαρμογών της (Σχήμα 2.2). Οι ενεργές ομάδες μπορεί να είναι μη-πολικές (π.χ.  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$ ), πολικές (π.χ.  $\text{NH}_2$ ), ιονικές ή μικτές ( $\text{C}_8/\text{cation exchange}$ ) [153]. Η πρόσδεση πραγματοποιείται με ομοιοπολικούς δεσμούς μέσω των αρχικά ελεύθερων ομάδων σιλανόλης ( $\text{Si-OH}$ ) που είναι υδρόφιλες και βρίσκονται στην επιφάνεια του πυριτικού πληρωτικού υλικού. Οι ομάδες αυτές αντιδρούν με κατάλληλα "σιλανοποιητικά" αντιδραστήρια (οργανοσιλάνια) (Σχήμα 2.3) [152].

Τα οργανοσιλάνια που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από ένα άτομο πυριτίου ενωμένο με μία οργανική ρίζα και 1 έως 3 άτομα Cl. Οι δύο συνηθισμένοι τύποι πυριτικών πληρωτικών υλικών παρασκευάζονται από μονο-λειτουργικά σιλάνια (mono-functional) όπου το σιλάνιο έχει ένα άτομο χλωρίου και τρι-λειτουργικά (tri-functional) όπου το σιλάνιο έχει τρία άτομα χλωρίου. Τα πρώτα παρουσιάζουν μικρότερη σταθερότητα σε ακραίες τιμές pH εξαιτίας της μονής σύνδεσης του σιλανίου με τους κόκκους της πυριτίας [153].



**Σχήμα 2.3:** Τυπική αντίδραση σιλανοποίησης κατά την οποία οι επιφανειακές ομάδες –SiOH καθαρής πυριτίας, αντικαθίστανται με μεγάλα αλκύλια (εδώ: δεκαοκτύλια), με αποτέλεσμα η πυριτία αυτή να καθίσταται υδρόφοβη και ως στατική φάση "μη-πολική". Η συγκεκριμένη στατική φάση συχνά αναφέρεται ως "C-18" [152].

Στις περισσότερες περιπτώσεις για τη συγκράτηση των πτητικών ουσιών των οίνων που είναι υδρόφοβες ενώσεις, χρησιμοποιούνται υποστρώματα πυριτίας με προσδεσμένες C8 ή συχνότερα C18 αλκυλοομάδες (Σχήμα 2.3). Πρόκειται για διαχωρισμό «αντίστροφης φάσης». Η κατακράτηση των οργανικών ενώσεων από το πολικό υδατικό διάλυμα του οίνου σε αυτά τα υλικά οφείλεται κυρίως στις ασθενείς ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των δεσμών C–H των αναλυτών και των αντίστοιχων δεσμών των υδρόφοβων ομάδων της σιλανοποιημένης επιφάνειας της πυριτίας. Αυτές οι ελκτικές δυνάμεις καλούνται δυνάμεις Van der Waals ή δυνάμεις διασποράς. Για την έκλυση των προσροφημένων ουσιών χρησιμοποιείται ένας μη πολικός διαλύτης τα μόρια του οποίου ανταγωνίζονται τα μόρια της προσροφημένης ουσίας και λόγω της μεγάλης περίσσειας τους την απομακρύνουν από το υπόστρωμα [152].

Όλα τα υλικά τα οποία βασίζονται στην πυριτία, μετά τη διαδικασία της σιλανοποίησης εξακολουθούν να περιέχουν έστω και μικρό ποσοστό ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου (σιλανόλης) οι οποίες δρουν ως δευτερεύουσες θέσεις αλληλεπίδρασης. Αυτές οι δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις είναι χρήσιμες για τον διαχωρισμό ή την κατακράτηση ισχυρά πολικών ουσιών ή προσμίξεων, αλλά επίσης μπορεί να προκαλέσουν

το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της μη αντιστρεπτής δέσμευσης μιας προσδιοριζόμενης ουσίας [152, 154].

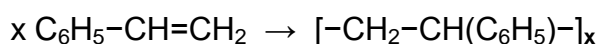
Τα πυριτικά υλικά συγκρινόμενα με τα πολυμερή εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα. Χαρακτηρίζονται γενικά από μικρότερη χωρητικότητα και μεγαλύτερη κατανάλωση χρόνου και διαλυτών [148]. Επιπλέον, απαιτείται προσοχή να μη στεγνώσουν γιατί τότε ο εγκλωβισμένος αέρας εμποδίζει τη δεσμευτική τους ικανότητα [160]. Η περιοχή τιμών pH που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι περιορισμένη και μεταξύ των τιμών 2 και 7,5. Σε τιμές εκτός αυτής της περιοχής μπορεί να παρατηρηθεί υδρόλυση της συνδεμένης φάσης ή διαλυτοποίηση του πυριτικού υποστρώματος [153]. Τέλος, σε μερικές περιπτώσεις εμφανίζουν μη αντιστρεπτή προσρόφηση και αποδόμηση ορισμένων αναλυτών [161].

#### **2.2.1.2 Πολυμερικά υλικά**

Λόγω των πλεονεκτημάτων των πολυμερών έναντι των πυριτικών υποστρωμάτων, τα πρώτα βρίσκουν γενικότερα πολλές εφαρμογές στην SPE για την απομόνωση οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα και κατ' επέκταση παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και την εφαρμογή μεθόδων που αφορούν την ανάλυση οίνων για προσδιορισμούς αρωματικών συστατικών.

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα πολυμερή είναι ρητίνες που παράγονται από πολυστυρόλιο (PS) και διβινυλοβενζόλιο (DVB). Οι ρητίνες αυτές βρίσκουν ευρεία απήχηση λόγω των αυξημένων δυνατοτήτων, της αποτελεσματικότητας και της σταθερότητας που επιδεικνύουν σε ένα ευρύ φάσμα pH [150].

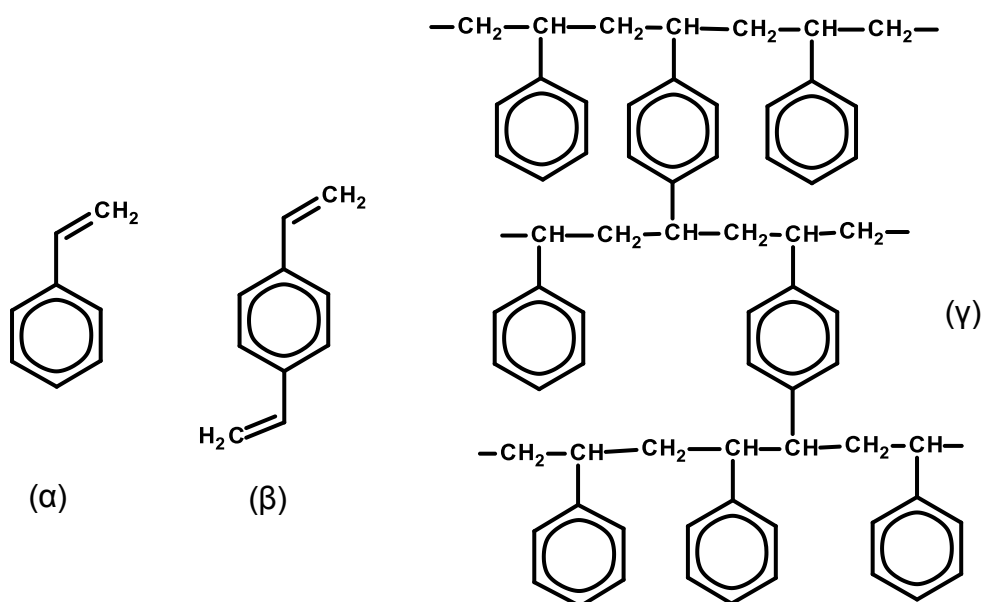
Το γραμμικό πολυστυρόλιο (PS) δημιουργείται από τον πολυμερισμό του καθαρού στυρολίου (βινυλοβενζολίου) (Σχήμα 2.4 (α)), σύμφωνα με την αντίδραση πολυμερισμού:



Όταν το στυρόλιο συμπολυμερίζεται με ποσότητες π-διβινυλοβενζολίου (DVB) (Σχήμα 2.4 (β)) προκύπτει συμπολυμερές (co(DVB) polymer) πολυστυρολίου-διβινυλοβενζολίου PS-DVB. Η δισδιάστατη δομή του συμπολυμερούς παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.4 (γ). Όσο μεγαλύτερο είναι το

ποσοστό του π-διβινυλοβενζολίου, τόσο περισσότερο αυξάνει το ποσοστό διακλαδώσεων. Σε ρητίνες με αυξημένο αριθμό διακλαδώσεων (highly crosslinked sorbents) το εμβαδόν της επιφάνειάς τους αυξάνεται και μπορεί να φθάνει έως τα  $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

Εναλλακτικά, ρητίνες με ακόμα περισσότερες διακλαδώσεις (Hypercrosslinked resins) μπορούν να έχουν εμβαδόν επιφάνειας έως  $2000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  [156]. Οι τελευταίες παρασκευάζονται με μέθοδο που εισήγαγε ο Davankon στις αρχές του 1970 όπου μέσω αντίδρασης Friedel-Crafts γίνεται προσθήκη διακλαδώσεων σε γραμμικές αλυσίδες πολυστυρολίου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένας μεγάλος αριθμός από δομικές γέφυρες μεταξύ γειτονικών φαινυλομάδων [156].



Σχήμα 2.4: Συντακτικοί τύποι: (α) βινυλοβενζολίου (ή στυρολίου, S), (β) π-διβινυλοβενζολίου (DVB), (γ) συμπολυμερούς (co-polymer) πολυστυρολίου-διβινυλοβενζολίου, (PS-DVB)

Οι ρητίνες PS-DVB έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα. Οι αναλύτες κατακρατούνται σε αυτές μέσω των ασθενών δυνάμεων Van der Waals καθώς και μέσω αλληλεπιδράσεων π-π με τους αρωματικούς δακτυλίους που αποτελούν δομικές μονάδες της κατασκευής τους.



Οι ρητίνες με τις περισσότερες διακλαδώσεις χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερους όγκους διαφυγής διότι εκτός από μεγαλύτερη επιφάνεια διαθέτουν και περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, άρα προσφέρουν περισσότερες δυνατότητες για αλληλεπιδράσεις π-π με τους αναλύτες [162]. Η αύξηση του αριθμού των διακλαδώσεων ωστόσο, συνεπάγεται αύξηση της συνεκτικότητας της ρητίνης και συνεπώς μείωση της διόγκωσής της κατά την επαφή της με το νερό, μείωση του πορώδους και της διαλυτότητάς της και μείωση της ταχύτητας ροής των διαλυτών διαμέσου αυτής [163].

Οι πρώτες συνθετικές πολυμερείς ρητίνες στυρολίου-διβινυλοβενζολίου, για χρήση στην SPE αναπτύχθηκαν από τους Rohm & Haas με την εμπορική ονομασία XAD, προς το τέλος της δεκαετίας του 1960 και αρχές του 1970 [160]. Εκείνη την εποχή, παρουσίαζαν πολλές πρακτικές δυσκολίες καθώς απαιτούνταν διάφορα στάδια κατεργασίας πριν από τη χρήση τους. Στις μέρες μας, υπάρχουν διαθέσιμες στο εμπόριο ρητίνες αυτού του τύπου, σε καθαρή μορφή και με καθορισμένα μεγέθη σωματιδίων (Πίνακας 2.1) [156].

Η σύγχρονη έρευνα για νέα υλικά έχει οδηγήσει στη δημιουργία και πολλών άλλων ειδών πολυμερών ρητινών. Οι εμπορικές ονομασίες και τα χαρακτηριστικά ορισμένων από αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Από τις ρητίνες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 ενδιαφέρον παρουσιάζει το μακροπορώδες συμπολυμερές PVP-DVB (πολυ(N-βινυλοπυρρολιδόνης-διβινυλοβενζολίου)). Εισήχθηκε στην αγορά από την εταιρεία Waters με την εμπορική ονομασία Oasis HLB. Είναι ένα υλικό κατάλληλο για την εκχύλιση όξινων, βασικών και ουδέτερων συστατικών [150]. Αποτελείται από μια ισορροπημένη αναλογία δύο μονομερών; της υδρόφιλης N-βινυλοπυρρολιδόνης και του υδρόφοβου διβινυλοβενζολίου. Έχει εμβαδόν επιφάνειάς περίπου  $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , μέσο όρο διαμέτρου πόρων  $80 \text{ }\mu\text{m}$  και υψηλή σταθερότητα σε τιμές pH 1-14. Η παρουσία της N-βινυλοπυρρολιδόνης προσφέρει στη ρητίνη αυξημένη ικανότητα για συγκράτηση πολικών οργανικών ενώσεων καθώς και την ικανότητα διαβροχής της, με αποτέλεσμα να μπορεί να εφαρμοσθεί σε ένα ευρύ φάσμα αναλυτών και να παρέχει πιο αναπαραγώγιμες ανακτήσεις [164].

**Πίνακας 2.1: Εμπορικές ονομασίες και χαρακτηριστικά SPE πολυμερών πληρωτικών υλικών [158, 165-167].**

Εμπορική ονομασία	Πάροχος	Υλικό πλήρωσης	Μέγεθος σωματιδίων (μm)	Εμβαδόν επιφάνειας (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Μέγεθος πόρων (Å)	Όγκος πόρων (ml g <sup>-1</sup> )
Amberlite XAD-2	Supelco	PS-DVB	20-60	330	90	0,7
Amberlite XAD-4	Rohm & Haas	PS-DVB	20-60	725	50	1,0
Amberlite XAD-7	Rohm & Haas	EDMA	20-60	450	90	1,1
Amberlite XAD-16	Rohm & Haas	PA	20-60	900	100	1,8
HYSphere-1	Spark Holland	HC-PS-DVB	5	>1000	a	a
PLRP-S 100A	Polymer Labs.	PS-DVB	20	500	100	a
Amberchrom CG-161	TosoHaas	PS-DVB	50-100	900	150	a
Bond Elut PPL	Varian	F-PS-DVB	125	700	150	1,0
Envi-Chrom P	Supelco	HC-PS-DVB	80-160	800-950	110-175	a
LiChrolut EN	Merck	HC-PS-DVB	40-120	1200	a	0,8
Isolute ENV+	IST	HC-PS-DVB-OH	40-140	1000-1100	900	1,0
Styrosorb MN-150	Purolite Int.	HC-PS-DVB	300-800	1070	a	0,7
Styrosorb 2m	Purolite Int.	HC-PS-DVB	70-80	910	10	0,2-0,3
OASIS HLB	Waters	PVP -DVB	25-35	804	82	1,4
OASIS MAX	Waters	PVP-DVB-DMBA	25-35	804	73-89	1,3
Porapak RDX	Waters	PVP -DVB	125-150	a	200	a
Porapak Q	Waters	EVB-DVB	a	500-600	75	a
Porapak S	Waters	4VP - PS-DVB	a	a	a	a
Chromabond EASY	Macherey-Nagel	PS-DVB	a	a	a	a
Strata SDB-L	Phenomenex	PS-DVB	a	a	a	a
Strata-X	Phenomenex	PVP-PS-DVB	30	800	85	1,2

**HC:** Υψηλό ποσοστό διακλαδώσεων (highly crosslinked), **PS:** πολυστυρένιο, **DVB** διβινυλοβενζόλιο, **EDMA:** αιθυλενο-διμεθακρυλικό, **EVB:** αιθυλο-βινυλοβενζόλιο (ethylvinylbenzene), **PVP:** πολυ(N-βινυλπυρρολιδόνη) poly(N-vinylpyrrolidone), **PA:** πολυακρυλικό (polyacrylate), **4VP:** 4-βινυλο-πυριδίνη, **DMBA:** διμεθυλο-βουτυλαμίνη, **a:** δε βρέθηκαν στοιχεία. **F:** μη δημοσιευμένος υποκαταστάτης

Εδώ, θα πρέπει να επισημανθεί η σημασία της ικανότητας διαβροχής μίας ρητίνης. Η ιδότητα αυτή σημαίνει ότι εξασφαλίζει ευνοϊκότερο περιβάλλον στους αναλύτες υδατικών διαλυμάτων να φθάσουν στην επιφάνειά της. Καθώς περισσότερο από το 99% του εμβαδού της επιφάνειας ενός πολυμερούς υλικού βρίσκεται στο εσωτερικό των πόρων, η ανάγκη για εύκολη διείσδυση του ύδατος εκεί, είναι εμφανής [158]. Σε άπολες πολυμερείς και τροποποιημένες πυριτικές ρητίνες, που έχουν αναφερθεί νωρίτερα, οι υδρόφοβες επιφάνειές τους είναι απαραίτητο να υποστούν κατεργασία με

υδρόφιλο διαλύτη (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ακετόνη, κ.α) για να ενεργοποιηθούν και σε επόμενο στάδιο με νερό για να μπορούν να προσροφήσουν αναλύτες από υδατικά διαλύματα. Εάν ο υδρόφιλος διαλύτης διαφύγει οι ρητίνες χάνουν τις ιδιότητές τους. Επομένως, η μόνιμη και σταθερή, με ομοιοπολικούς δεσμούς, ενσωμάτωση του πολικού χαρακτήρα στη σύνθεση της ρητίνης προσφέρει σημαντικό πλεονέκτημα [159].

Εναλλακτική προσέγγιση της παρασκευής ρητινών με συμπολυμερισμό από κατάλληλα μονομερή είναι η παρασκευή χημικά τροποποιημένων πολυμερών ρητινών [156].

Έτσι, προσθήκη ισχυρών ιοντοανταλλακτικών ομάδων όπως τεταρτοταγείς αμίνες (διμεθυλοβουτυλαμίνη) στην επιφάνεια του συμπολυμερούς PVP–DVB (Oasis HLB) οδήγησε στη δημιουργία μιας νέας ρητίνης (Oasis MAX, 830 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) όπου συνδυάζει τις ιδιότητες της πρώτης με επιπλέον χαρακτηριστικά ιοντοανταλλακτικής ρητίνης. Οι ιοντοανταλλακτικές ομάδες προσδίδουν αυξημένη εκλεκτικότητα για ασθενή οξέα έχουν παρουσιάσει ωστόσο υψηλές και αναπαραγωγίμες ανακτήσεις σε όξινα βασικά και ουδέτερα συστατικά [156]. Μπορούν να κατακρατήσουν με αποτελεσματικό τρόπο μη ιονισμένες ενώσεις μέσω υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλοεπιδράσεων [156, 167].

Παρόμοια, η υδροξυλίωση του συμπολυμερούς PS–DVB οδήγησε στη δημιουργία μίας άλλης πολύ ισχυρά υδρόφοβης ρητίνης PS–DVB–OH (Isolute ENV+, 1100 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) με ικανότητα διαβροχής. Χρησιμοποιείται πρωταρχικά όπου οι αναλύτες είναι πολύ υδατοδιαλυτοί και η εκχύλισή τους με πυριτικά υλικά είναι δύσκολη. Πρόκειται για ρητίνη με μεγάλη χωρητικότητα, αυξημένο βαθμό διακλαδώσεων (highly crosslinked) και ικανότητα να συγκρατήσει αναλύτες με διάφορες πολικότητες. Η εύκολα προσβάσιμη μεγάλη επιφάνειά της σε συνδυασμό με την εσωτερική διάρθρωση των πόρων της διευκολύνει τη συγκράτηση πολύ πολικών και υδατοδιαλυτών ουσιών [156, 167].

### **2.2.2 Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPE για προσδιορισμούς συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε σταφύλια & οίνους - Ανασκόπηση**

Στη διεθνή βιβλιογραφία ένας μεγάλος αριθμός από μελέτες αφιερώνεται στην ανάπτυξη ή/και εφαρμογή μεθόδων για την απομόνωση πρωτογενών

αρωματικών συστατικών από οίνους, σταφύλια και άλλα οινολογικά προϊόντα με SPE για τον ποιοτικό ή ποσοτικό προσδιορισμό τους. Σε αυτές τις μελέτες χρησιμοποιούνται διάφορα τροποποιημένα πυριτικά ή πολυμερή προσροφητικά υλικά και δοκιμάστηκαν ποικίλες διαδικασίες κατεργασίας των δειγμάτων. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται μια ανασκόπηση των σημαντικότερων μεθόδων SPE, που αναπτύχθηκαν για αυτόν το σκοπό και των κυριότερων εφαρμογών τους.

#### **2.2.2.1 Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPE με πυριτικά υλικά**

Πρώτοι, το 1982, οι Williams και συνεργάτες [127] απομόνωσαν γλυκοζίτες μονοτερπενίων, νορισοπτενοειδών και άλλων ενώσεων, από διευγασμένο γλεύκος σταφυλιού και οίνο χωρίς αλκοόλη. Για την απομόνωση, χρησιμοποιήθηκε υάλινη στήλη πληρωμένη με υλικό C18. Μετά την έκπλυση με νερό (για την απομάκρυνση αλάτων και σακχάρων), τα προσροφημένα συστατικά εκλούονταν με μεθανόλη. Το μεθανολικό εκχύλισμα ξηραινόταν, επαναδιαλυόταν σε νερό και περνούσε από δεύτερη (μικρότερη) γυάλινη στήλη πληρωμένη με υλικό C18. Ακολουθούσε έκπλυση της δεύτερης στήλης και έκλυση των γλυκοζιλιωμένων πρόδρομων ενώσεων σε δύο κλάσματα, πρώτα με 30% υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και ακολούθως με μεθανόλη.

Μία ενδιαφέρουσα μεθοδολογία προτάθηκε το 1991 από τον Di Stefano [168], με χρήση μικροστηλών C18 για την απομόνωση και την κλασμάτωση ελεύθερων και γλυκοζυλιωμένων τερπενίων από σταφύλια και οίνους. Πιο αναλυτικά, μετά την εισαγωγή του δείγματος σε ενεργοποιημένη μικροστήλη C18, και έκπλυση με νερό, για την απομάκρυνση των παρεμποδιστών, τα ελεύθερα τερπένια εκλούονταν με διχλωρομεθάνιο ενώ τα τριυδροξυλιωμένα τερπένια μαζί με τα γλυκοζίδια εκλούονταν σε επόμενο στάδιο με μεθανόλη. Μετά την απομάκρυνση της μεθανόλης, ακολουθούσε ενζυμική υδρόλυση, και τα αποδεσμευμένα πτητικά συστατικά παραλαμβάνονταν με διχλωρομεθάνιο οπότε μετά από συμπύκνωση προσδιορίζονταν με GC/MS. Η μέθοδος βρήκε ευρεία απήχηση και εφαρμόζεται έως σήμερα από αρκετές ερευνητικές ομάδες [113, 169-174]. Κάποιοι μελετητές αντικατέστησαν το διχλωρομεθάνιο για την έκλυση των ελεύθερων συστατικών με μίγμα πεντανίου:διχλωρομεθανίου (σε αναλογία v/v 2:1) [175]. Με την τροποποίηση αυτή, έγιναν μελέτες με αναλύσεις οίνων [176, 177], σταφυλιών [178] και

αποσταγμάτων [179]. Ωστόσο, παρά την ευρεία απήχηση των παραπάνω προτεινόμενων μεθόδων δεν υπάρχουν αναφορές για επικύρωση των εφαρμοζόμενων διαδικασιών.

Μία μεθοδολογία που συνδυάζει τη μικροεκχύλιση πτητικών αρωματικών ουσιών των οίνων με οργανικό διαλύτη, και την περαιτέρω κλασμάτωσή τους με SPE σε πυριτικό υπόστρωμα, πρότειναν το 1996 οι Ferreira και συνεργάτες [180]. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη διαδικασία, οι πτητικές ενώσεις απομονώνονταν με μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη (freon 113) και το οργανικό εκχύλισμα κατεργαζόταν σε στήλη C18. Ακολουθούσε διαχωρισμός, με διαδοχική έκλουση της στήλης και παραλαβή πρώτα των πιο υδρόφοβων αναλυτών (όπως αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οξικούς εστέρες αλκοολών και ορισμένες αλδεΐδες και κετόνες) με διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια των πιο υδρόφιλων αναλυτών (όπως οι τερπενεόλες, β-ιονόνη και δεκανόλη) με αιθυλαιθέρα. Ελέγχθηκαν η γραμμικότητα και η επαναληψιμότητα της μεθόδου καθώς και οι ανακτήσεις των αναλυτών σε ένα επίπεδο εμβολιασμού, με καλά αποτελέσματα.

Το 1997 οι Mateo και συνεργάτες [181] επιχείρησαν την κλασμάτωση 48 γλυκοζιτών, από γλεύκος, οίνο και εκχύλισμα φλοιών μοσχάτης ποικιλίας, εκλούοντάς τα από στήλη C18 με υδατικά διαλύματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε μεθανόλη. Η απομόνωση των γλυκοζιτών είχε προηγηθεί σε μία πρώτη C18 RP σύμφωνα με την αναλυτική διαδικασία του Di Stefano [168]. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, με τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, έγινε δυνατός ο διαχωρισμός των γλυκοζιτών της βενζυλικής αλκοόλης που είναι οι πιο πολικοί από τους γλυκοζίτες του γερανικού οξέος και των αλκοολών με ένα υδροξύλιο, που είναι πιο υδρόφοβοι. Οι γλυκοζίτες των τερπενικών διολών, των νορισοπρενοειδών ενώσεων καθώς και των φουρανικών και πυρανικών οξειδίων της λιναλοόλης έδειξαν μεσαία πολικότητα

Το 2006, οι LuKic και συνεργάτες [182] εξέτασαν τις δεσμευτικές ικανότητες στήλης C18, για την απομόνωση και τον μετέπειτα ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών συστατικών, πρωτογενούς και δευτερογενούς αρώματος από αποστάγματα σταφυλιών. Το δείγμα υφίστατο SPE και τα πτητικά συστατικά εκλούονταν με διχλωρομεθάνιο. Το εκχύλισμα συμπυκνωνόταν με ρεύμα αζώτου και ακολουθούσε ανάλυση με GC/MS. Η μέθοδος επικυρώθηκε για 28

ενώσεις από διαφορετικές χημικές τάξεις (αιθυλεστέρες, οξέα, αλκοόλες, τερπένια). Υπολογίσθηκε η γραμμικότητα, η ανάκτηση, τα όρια ανίχνευσης, η επαναληψιμότητα και η πιθανή επίδραση του οξικού οξέος και της αιθανόλης. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα μεταξύ 87-98% με εξαίρεση κάποιων αλκοολών όπως της β-φαινυλαιθανόλης (69%) και της cis-3-εξενόλης (78%). Οι συγγραφείς θεώρησαν ότι η χαμηλή ανάκτηση της β-φαινυλαιθανόλης οφειλόταν στον κατά Lewis όξινο χαρακτήρα της και στη μεγαλύτερη διαλυτότητά της στο νερό. Ενώ, συμπέραναν ότι αντίθετα, οι υψηλές ανακτήσεις των άλλων αλκοολών και των οξέων οφείλονταν στην επίδραση των μη πολικών αλκυλικών αλυσίδων των μορίων τους που υπερίσχυαν έναντι των υδρόφιλων υδροξυλικών και καρβονυλικών χαρακτηριστικών ομάδων τους. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενης εργασίας των Ferreira και συνεργάτες [183] όπου είχαν δείξει ότι τα C8 και C18 πυριτικά προσροφητικά υλικά (silica-based sorbents) ήταν κατάλληλα για εκχύλιση αναλυτών που δείχνουν όξινο κατά Bronsted–Lowry χαρακτήρα ενώ δεν παρουσίαζαν ίδιες ικανότητες για εκχύλιση αναλυτών με όξινο κατά Lewis χαρακτήρα. Πρόσφατα οι Dziadas και συνεργάτες [149] παρασκεύασαν, στο εργαστήριό τους, τροποποιημένο πυριτικό υλικό, προσθέτοντας σε πυριτία 3 χαρακτηριστικές ομάδες ((3–(phenylamino)–propyltrimethoxysilane, octyltriethoxysilane), και συνέκριναν την απόδοσή του για την εκχύλιση 53 ελεύθερων αρωματικών συστατικών με μία εμπορικά διαθέσιμη C18 και μία ρητίνη στυρενίου–διβινυλοβενζολίου (ISOLUTE). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, που βασίσθηκαν στην εκχύλιση γλυκών εμβολιασμένων με αναλύτες, η νέα πυριτική φάση παρουσίασε παρόμοια εκχυλιστική ικανότητα με τη C18 στήλη όσον αφορά τα ελεύθερα τερπένια, τις C6 αλκοόλες, τις φαινόλες και τις ισοπρενοειδείς ενώσεις, ενώ ήταν λιγότερο αποτελεσματική από τη C18 και την πολυμερική ρητίνη για τις βενζολικές ενώσεις. Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται, συνοπτικά, πληροφορίες για τις προαναφερόμενες μεθόδους καθώς και για διάφορες άλλες εφαρμογές μεθόδων όπου SPE τροποποιημένα πυριτικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν για την κατεργασία οίνων και συναφών προϊόντων με σκοπό τον προσδιορισμό (μεταξύ άλλων ή αποκλειστικά) πρωτογενών αρωματικών συστατικών.

**Πίνακας 2.2: Ανάπτυξη και εφαρμογές μεθόδων SPE με τροποποιημένα πυριτικά πληρωτικά υλικά, για κατεργασίες οίνων και άλλων συναφών προϊόντων, με σκοπό τον προσδιορισμό (αποκλειστικά ή μεταξύ άλλων) πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε ελεύθερη (FV, Free Volatiles), ή/και δεσμευμένη μορφή (PV, Potential Volatiles).**

Ενώσεις <sup>α</sup>	Δείγματα/ Ποικιλίες	Στήλη SPE	Ανάπτυξη SPE μεθόδου	Επικύρωση SPE μεθόδου	Ανίχνευση	Άλλες Παρατηρήσεις	Αναφορά
<b>56 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή	Γλεύκος & οίνος/ <i>Μοσχάτο Αλεξανδρείας</i>	(1) C <sub>18</sub> , 40 g, (2) C <sub>18</sub> , 3 g Hi-flosil (80-100 mesh).	Ναι	Όχι	GC/MS	(1) Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών. (2) Διαχωρισμός γλυκοζιτών.	[127]
<b>20 FV &amp; 20 PV:</b> τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα	Γλεύκος & οίνος	C <sub>18</sub> , 1 g Baker	Ναι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[168]
<b>48 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, κ.ά.	Γλεύκος, φλοιοί & οίνος/ <i>Μοχάτο bianco</i>	(1) C <sub>18</sub> , 10 g, (2) C <sub>18</sub> , 5 g Waters	Ναι	Όχι	GC/FID	(1) Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών (2) Διαχωρισμός γλυκοζιτών σε 4 κλάσματα	[181]
<b>28 FV :</b> δευτερογενή & πρωτογενή συστατικά	Αποστάγματα στεμφύλων/ 5 ποικιλίες	C <sub>18</sub> Bond Elut 500 mg/6 ml cartridges	Ναι	Ναι	GC/FID/MS	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[182]
<b>33 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα, φαινόλες	Οίνοι λευκοί & ερυθροί, μονοποικιλια-κοί /12 ποικιλίες	(1) Sep Pack Cartridges C <sub>18</sub> (Waters), (2) C <sub>18</sub> Waters	Όχι	Όχι	GC/FID/MS	(1) Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών (2) Διαχωρισμός γλυκοζιτών/	[113]
<b>6 FV &amp; 6 PV:</b> τερπένια	Οίνοι ξηροί, γλυκείς, μυστέλλια / <i>Μοσχάτο λευκό</i>	C <sub>18</sub> , 1 g, IST	Όχι	Όχι	GC/MS	Κλασμάτωση πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[169]
<b>11 FV &amp; 11 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα	Σταφύλια & οίνοι/ <i>Μοσχάτο λευκό,</i> <i>Μοσχάτο Αλεξανδρείας</i>	C <sub>18</sub> , 1 g, IST	Όχι	Όχι	GC/MS	Κλασμάτωση πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[170]
<b>44 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα κ.ά	Οίνοι λευκοί & ερυθροί, <i>/Nero d'Avola, Fiano</i>	(1) C <sub>18</sub> Sep Pack cartridges 5 g (Waters), (2) C <sub>18</sub> Sep Pack cartridges 1 g (Waters), (3) C <sub>18</sub> Sep Pack cartridges 300 mg (Waters).	Όχι	Όχι	GC/MS	(1) Διαχωρισμός γλυκοζιτών, (2) Διαχωρισμός ενζυμικά αποδ/νων αγλυκονών (3) Διαχωρισμός χημικά αποδ/νων αγλυκονών	[171]

**Πίνακας 2.2 (συνέχεια)**

Ενώσεις <sup>α</sup>	Δείγματα/ Ποικιλίες	Στήλη SPE	Ανάπτυξη SPE μεθόδου	Επικύρωση SPE μεθόδου	Ανίχνευση	Άλλες Παρατηρήσεις	Αναφορά
<b>22 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα κ.ά	Οίνοι ξηροί, γλυκείς/ <i>Fiano</i>	(1, 2) C <sub>18</sub> cartridges, 1 g (Phenomenex, Torrance, CA)	Όχι	Όχι	GC/MS	(1) Διαχωρισμός γλυκοζιτών, (2) Διαχωρισμός ενζυμικά αποδ/νων αγλυκονών	[173]
<b>16 FV &amp; 16 PV:</b> τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα.	Οίνοι αφρώδεις, γλυκείς / <i>Brachetto</i>	(1, 2) Sep Pack Cartridges C <sub>18</sub> , 1 g (Waters)	Όχι	Όχι	GC/MS	(1) Κλασμάτωση πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα (2) Διαχωρισμός ενζυμικά αποδ/νων αγλυκονών	[174]
<b>10 FV &amp; 10 PV:</b> τερπένια	Οίνοι/ <i>Albariño</i>	SepPak Vac C <sub>18</sub>	Όχι	Όχι	GC/FID	Κλασμάτωση πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[176]
<b>56 FV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα κ.ά	Εμβολιασμένο γλεύκος	Τροποποιημένο πυριτικό υλικό με 3 λειτουργικές ομάδες	Ναι	Όχι	GC/MS	Σύγκριση 3 πληρωτικών υλικών για την απομόνωση πτητικών συστατικών	[149]
<b>26 FV &amp; 26 PV:</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή,	Οίνοι Liqueur	Isolute C18	Όχι	Όχι	<sup>β</sup> GC-O	Κλασμάτωση πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[19]

α: αριθμός, μορφή και είδος αναλυτών που υπόκεινται σε SPE, β: GC-O: Gas Chromatography-Olfactometry (Αέρια Χρωμ/φία-Οσφρητικής ανάλυσης)



### 2.2.2.2 Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPE με πολυμερικά υλικά

Οι πολυμερείς ρητίνες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα για την απομόνωση οργανικών ενώσεων, έναντι των πυριτικών προσροφητικών υλικών. Για το λόγο αυτό, αρκετοί μελετητές ασχολήθηκαν με την ανάπτυξη μεθοδολογιών, για την απομόνωση των αρωματικών συστατικών από οίνους και συναφή προϊόντα, με τη χρήση αυτών των υλικών. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται μια σύντομη ανασκόπηση των μεθόδων αυτών και διαφόρων εφαρμογών τους.

Το 1985, ερευνητές από το Montpellier [50] πρότειναν μία μέθοδο για την εκχύλιση πέντε ελεύθερων και γλυκοζιτικά δεσμευμένων τερπενολών, βενζυλικής αλκοόλης και β-φαινυλαιθανόλης, με τη χρήση υδρόφοβης πολυμερούς ρητίνης Amberlite XAD-2 (Πίνακας 2.1, παρ. 2.2.1.2). Η ίδια ρητίνη είχε παλαιότερα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση ναργινίνης και λεμονίνης από χυμό γκρέιπφρουτ [184]. Σύμφωνα με την προτεινόμενη διαδικασία, μετά την τοποθέτηση του πληρωτικού υλικού σε υάλινη στήλη, και τη φόρτωση του δείγματος (γλεύκος, αραιωμένος οίνος ή φυτικό εκχύλισμα) γινόταν απομάκρυνση των παρεμποδιστών με νερό, έκλουση των ελεύθερων συστατικών με πεντάνιο και ακολούθως των δεσμευμένων με οξικό αιθυλεστέρα. Στη μελέτη αναφέρεται ότι, το πεντάνιο παρόλο που δεν επέτρεπε την ποσοτική έκλουση των ελεύθερων τερπενολών, επιλέχθηκε λόγω της εκλεκτικότητάς του απέναντι στους γλυκοζίτες, ενώ αντίστοιχα και ο οξικός αιθυλεστέρας επιλέχθηκε, αντί της μεθανόλης, ως πιο εκλεκτικός. Τροποποίησή της μεθοδολογίας προτάθηκε το 1989, από τον Di Stefano, με χρήση μίγματος πεντανίου-διχλωρομεθανίου για την έκλουση των ελεύθερων συστατικών [185]. Με την τροποποίηση αυτή, και χρήση είτε ρητίνης Amberlite XAD-2, είτε άλλων εμπορικά διαθέσιμων συνθετικών ρητινών, η μέθοδος εφαρμόσθηκε και από άλλες ερευνητικές ομάδες, για την εκχύλιση ελεύθερων και δεσμευμένων αρωματικών συστατικών από σταφύλια και οίνους [26, 112, 115].

Το 1992, οι Voirin και συνεργάτες [111] χρησιμοποίησαν συνθετικούς γλυκοζίτες για να ελέγξουν την εκχυλιστική ικανότητα της ρητίνης XAD-2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, για την έκλουση των

πτητικών συστατικών, το αζεοτροπικό μίγμα πεντανίου-διχλωρομεθανίου (2:1 v/v) ήταν καταλληλότερο από το πεντάνιο (ειδικά για την έκλυση αλκοολών όπως των πιο πολικών μονοτερπενικών διολών και των αρωματικών αλκοολών) χωρίς να προκαλείται μερική έκλυση γλυκοζιτών. Για τα δεσμευμένα συστατικά, παρατηρήθηκε ότι ο οξικός αιθυλεστέρας, παρόλο που επέτρεπε καλή ανάκτηση των γλυκοζυλιωμένων μονοτερπενολών δεν ήταν εξίσου αποτελεσματικός για την έκλυση των γλυκοζυλιωμένων αρωματικών αλκοολών ενώ η μεθανόλη οδηγούσε σε αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης κατά περίπου 55%, με το μειονέκτημα της μη εκλεκτικότητας.

Παρόμοια, σε παλαιότερη εργασία [168] είχε επισημανθεί ότι η έκλυση των γλυκοζιτών με μεθανόλη από ρητίνη XAD-2, συμπαρασύρει πολυφαινόλες του γλεύκου ή του οίνου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αντίστοιχων κορυφών στο χρωματογράφημα. Επιπλέον, είχεδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες ανέστειλαν μερικώς τη δραστηριότητα των ενζύμων κατά την ενζυμική υδρόλυση των γλυκοζιτών. Παρόλα αυτά, είχε θεωρηθεί ότι το πρόβλημα αφορά περισσότερο οίνους και εκχυλίσματα φλοιών από ερυθρές ποικιλίες, οπότε είχε προταθεί, ως λύση, να προστίθεται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου κατά τη φάση της υδρόλυσης.

Το 1997, οι Wada & Shibamoto [186] μελέτησαν την εκχύλιση πτητικών αρωματικών συστατικών από ερυθρούς οίνους χρησιμοποιώντας στήλες Porapak Q (Πίνακας 2.1, παρ.2.2.1.2). Για την έκλυση εννέα πτητικών προϊόντων αλκοολικής ζύμωσης δοκιμάστηκαν 3 διαλύτες (διχλωρομεθάνιο, αιθυλαιθέρας, και πεντάνιο) και υπολογίσθηκαν οι αντίστοιχες ανακτήσεις. Γενικά, το διχλωρομεθάνιο έδειξε την καλύτερη εκλουστική ικανότητα ακολουθούμενο από τον αιθυλαιθέρα και το πεντάνιο. Από την εφαρμογή της μεθόδου σε οίνους προσδιορίστηκαν δευτερογενή και πρωτογενή αρωματικά συστατικά.

Το 2000 από τους Ferreira και συνεργάτες [183] δημοσιεύτηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ επτά διαφορετικών υλικών SPE, τόσο πυριτικών (C8, C18) όσο και πολυμερών (Porapak Q, Amberlite XAD-2, 4, 7 και 16), (Πίνακας 2.1, παρ.2.2.1.2), ως προς την ικανότητά τους να εκχυλίσουν 14 πτητικά αρωματικά συστατικά των οίνων που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές οικογένειες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η Porapak Q ήταν η καλύτερη

στερεά φάση για τις μη πολικές ενώσεις, οι ρητίνες Amberlite XAD 4 και Amberlite XAD 16 ήταν οι λιγότερο εκλεκτικές ρητίνες ενώ οι C8 και C18 οι πιο ειδικές για την εκχύλιση συστατικών με χαρακτήρα Bronstead-Lowry.

Αργότερα, οι Piñeiro και συνεργάτες [187] συνέκριναν τρεις μικροστήλες C18 από διαφορετικούς κατασκευαστές (Strata C-18E, Bond Elut C-18, Discovery DSC-18) και τρεις πολυμερείς ρητίνες στυρενίου-διβινυλοβενζολίου (Strata SDB-L, LiChrolut EN, Chromabond EASY), σε συνδυασμό με τέσσερις διαλύτες έκλουσης (πεντάνιο, διχλωρομεθάνιο, αιθανόλη και μεθανόλη) για την εκχύλιση 8 ελεύθερων τερπενοειδών από οίνους. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με δύο μικροστήλες στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, τις LiChrolut EN και Strata SDB-L και έκλουση των αναλυτών με διχλωρομεθάνιο. Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου εξετάστηκε η επίδραση ορισμένων παραμέτρων, όπως της ποσότητας της ρητίνης, του όγκου του εκλουστικού οργανικού διαλύτη και του νερού, του χρόνου που ξηραίνεται/στεγνώνει η στήλη και της έντασης του κενού που εφαρμόζεται. Η μέθοδος επικυρώθηκε με χρήση εμβολιασμένων συνθετικών υποστρωμάτων και ανάλυση σε GC/MS και εφαρμόστηκε σε 12 εμπορικούς οίνους.

Μία απλή και ενδιαφέρουσα μέθοδο δημοσίευσαν το 2002 οι Lopez και συνεργάτες, για τον ποσοτικό προσδιορισμό πτητικών ενώσεων των οίνων που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις [118]. Για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε μικροστήλη LiChrolut EN (Πίνακας 2.1, παρ. 2.2.1.2), και για την έκλουση των αναλυτών μικρή ποσότητα διχλωρομεθανίου, χωρίς περαιτέρω συμπύκνωση. Από το εκχύλισμα προσδιορίστηκαν ποσοτικά, με GC/MS, 29 πτητικά συστατικά του αρώματος, όπως πτητικές φαινόλες, παράγωγα βανιλίνης, αλειφατικές λακτόνες, νορισοπρενοειδείς ενώσεις, εστέρες και τερπενόλες. Επίσης, υπολογίσθηκαν οι συντελεστές κατανομής και οι όγκοι διαφυγής απ' όπου διαπιστώθηκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των αναλυτών. Με βάση τα αποτελέσματα, η πολυμερής ρητίνη μπορούσε να συγκρατήσει ικανοποιητικά λιγότερο πολικά συστατικά (μεγάλοι όγκοι διαφυγής) όπως την ευγενόλη, τον κινναμικό αιθυλεστέρα ή τη β-δαμασκηνόνη, σε αντίθεση με άλλα πιο πολικά συστατικά όπως τη φουρφουράλη, τη φουρφουρική και την ισοαμυλική αλκοόλη (μικρότεροι όγκοι διαφυγής κατά 4 τάξεις μεγέθους). Η μέθοδος σε συνδυασμό με ανάλυση

GC/MS αξιολογήθηκε από τους συγγραφείς ως προς τα ποιοτικά της χαρακτηριστικά και εφαρμόστηκε σε 57 ερυθρούς παλαιωμένους οίνους. Έκτοτε, έχει εφαρμοσθεί και από άλλους ερευνητές για εκχυλίσματα και προσδιορισμούς μη δεσμευμένων αρωματικών συστατικών από οίνους [132, 188-190].

Πρόσφατα, ομάδα ισπανών ερευνητών [102] τροποποίησε τη μέθοδο των Lopez [118] με χρήση μικροστήλης Strata X (Πίνακας 2.1, παρ. 2.2.1.2). Στο στάδιο έπλυσης της στήλης το νερό αντικαταστάθηκε από υδατικό διάλυμα τρυγικού οξέος pH 3,5, και για την έκλυση των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα διχλωρομεθανίου, με την προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου συμπύκνωσης με ρεύμα N<sub>2</sub>. Με αυτή τη διαδικασία απομονώθηκαν από λευκό οίνο, και ποσοτικοποιήθηκαν με GC/MS, 37 πτητικά συστατικά του πρωτογενούς και δευτερογενούς αρώματος χωρίς, ωστόσο, να υπάρξει επικύρωση της προτεινόμενης διαδικασίας.

Οι Cullere και συνεργάτες [161], χρησιμοποιώντας ρητίνη LiChrolut EN, ανέπτυξαν μία μέθοδο για την κλασμάτωση 27 πτητικών αρωματικών ουσιών των οίνων. Οι πτητικές ενώσεις εκλούστηκαν με διχλωρομεθάνιο από μικροστήλη LiChrolut EN και στη συνέχεια κλασματώθηκαν σε δεύτερη μικροστήλη ίδιου τύπου. Το πρώτο κλάσμα, πλούσιο σε αιθυλεστέρες και άλλα μη πολικά συστατικά, εκλούστηκε από τη δεύτερη μικροστήλη με πεντάνιο. Το δεύτερο κλάσμα, που συγκέντρωνε τις αλκοόλες και ορισμένες πτητικές φαινόλες, εκλούστηκε με μίγμα πεντανίου–διχλωρομεθανίου (9:1 ο/ο), ενώ το τρίτο κλάσμα, που εκλούστηκε με διχλωρομεθάνιο, ήταν πλούσιο σε λιπαρά οξέα, παράγωγα βανιλίνης και λακτόνες.

Με χρήση του ίδιου τύπου ρητίνης, προτάθηκε το 2006 από ομάδα ισπανών ερευνητών [121] μία βελτιστοποιημένη μέθοδος για απομόνωση 100 πρόδρομων αρωματικών συστατικών από σταφύλια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ τριών προσροφητικών υλικών (LiChrolut EN, Amberlite XAD–2, C18). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ρητίνη LiChrolut EN επέδειξε δύο φορές μεγαλύτερη εκχυλιστική ικανότητα από τη ρητίνη Amberlite XAD–2 και έξι φορές από την υδρόφοβη C18. Ωστόσο, η C18 έδινε λίγο καλύτερα αποτελέσματα από τη LiChrolut EN στην απομόνωση νορισοπρενοειδών ενώσεων και τερπενίων ενώ οι μεγάλες

διαφορές οφείλονταν σε αρωματικές ενώσεις (βενζένια, πτητικές φαινόλες και παράγωγα της βανιλίνης). Σε αυτού του είδους τις ενώσεις και οι δύο πολυμερείς ρητίνες παρουσίασαν καλύτερη επίδοση από τη C18. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα βάσει των π-π αλληλεπιδράσεων που υπάρχουν, όπως έχουμε προαναφέρει, μεταξύ των δομικών μονάδων των πολυμερών ρητινών και των αρωματικών ενώσεων. Σύμφωνα με την τελική προτεινόμενη διαδικασία, διευγασμένο γλεύκος ή εκχύλισμα φλοιών χωρίς αλκοόλη, διερχόταν από μία πρώτη ρητίνη LiChrolut EN, οι παρεμποδιστές απομακρύνονταν με νερό και ένα διάλυμα πεντάνιου-διχλωρομεθάνιου (2:1, v/v) ενώ οι πρόδρομες ενώσεις εκλούονταν με μίγμα οξικού αιθυλεστέρα-μεθανόλης (9:1, v/v). Μετά από όξινη υδρόλυση τα απελευθερωμένα πτητικά συστατικά, διαχωρίζονταν σε δεύτερη μικρότερη LiChrolut EN ρητίνη και εκλούονταν με διχλωρομεθάνιο. Οι συγγραφείς χαρακτήρισαν τη μέθοδο επαναλήψιμη, ωστόσο δεν πραγματοποιήθηκαν ποσοτικές αναλύσεις.

Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται, συνοπτικά, πληροφορίες για τις προαναφερόμενες μεθόδους καθώς και για διάφορες άλλες εφαρμογές SPE μεθόδων όπου σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, πολυμερείς στατικές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν για την κατεργασία οίνων και συναφών προϊόντων με σκοπό τον προσδιορισμό (μεταξύ άλλων ή αποκλειστικά) πρωτογενών αρωματικών συστατικών

**Πίνακας 2.3: Ανάπτυξη και εφαρμογές μεθόδων SPE με πολυμερείς ρητίνες ως πληρωτικά υλικά για κατεργασίες οίνων και άλλων συναφών προϊόντων για τον προσδιορισμό (αποκλειστικά ή μεταξύ άλλων) πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε ελεύθερη (FV, Free Volatiles), ή/και σε δεσμευμένη μορφή (PV, Potential Volatiles).**

Ενώσεις <sup>α</sup>	Δείγματα/Ποικιλίες	Στήλη SPE	Ανάπτυξη SPE μεθόδου	Επικύρωση SPE μεθόδου	Ανίχνευση	Άλλες Παρατηρήσεις	Αναφορά
<b>7 FV &amp; 7 PV:</b> τερπένια, βενζολικά παράγωγα	Γλεύκος, οίνος, φυτικό εκχύλισμα/ <i>Μοσχάτο, Gewürztraminer</i>	Amberlite XAD-2	Ναι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[50]
<b>8 FV:</b> τερπένια	Οίνοι (εμπορικοί)	LiChrolut EN	Ναι	Ναι	GC/MS	Σύγκριση μεταξύ 6 μικροστηλών: 3 C18 και 3 πολυμερών για το διαχωρισμό πτητικών συστατικών	[187]
<b>29 FV :</b> τερπένια, C <sub>13</sub> νορισ/δή, βενζολικά παράγωγα, πτητικές φαινόλες, λακτόνες	Οίνοι, ερυθροί παλαιωμένοι ισπανικοί (v=57)	LiChrolut EN	Ναι	Ναι	GC/ITMS*	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών - Υπολογισμός συντελεστών κατανομής μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης	[118]
<b>37 FV:</b> πρωτογενή & δευτερογενή συστατικά	Οίνοι λευκοί/ <i>Godello</i>	Strata-X	Ναι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[191]
<b>100 PV:</b> τερπένια, C <sub>6</sub> συστατικά C <sub>13</sub> νορισ/δή, βενζολικά παράγωγα, κ.ά.	Γλεύκος, φυτικό εκχύλισμα/ Cabernet Sauvignon, Syrah	(1, 2) LiChrolut EN	Ναι	Όχι	GC/MS	1) Διαχωρισμός γλυκοζιτών, 2) Διαχωρισμός χημικά αποδ/νων αγλυκονών. -Σύγκριση μεταξύ 3 μικροστηλών: 1 C18 και 2 πολυμερών-	[121]
<b>27 FV:</b> C <sub>6</sub> αλκοόλες, C <sub>13</sub> νορισ/δή, βενζολικά παράγωγα, λακτόνες, κ.ά	Οίνος	(1, 2) LiChrolut EN	Ναι	Όχι	GC/MS	1) Διαχωρισμός πτητικών συστατικών 2) Κλασμάτωση των πτητικών σε 3 κλάσματα	[161]
<b>17 FV &amp; 17 PV:</b> τερπένια	Σταφύλια/5 ισπανικές ποικιλίες	Amberlite XAD-2	Όχι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[13]
<b>13 FV:</b> τερπενόλες, βενζολικά παράγωγα, πτητικές φαινόλες, λακτόνες	Οίνοι λευκοί/ <i>Godello</i>	LiChrolut EN	Όχι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[189]
<b>74 FV &amp; 74 PV:</b> C <sub>13</sub> νορισ/δή, βενζολικά παράγωγα, πτητικές φαινόλες, λακτόνες, κ.ά.	1) Οίνοι πειραματικοί από εμβολιασμένα γλεύκη 2) Γλεύκη εμβολιασμένα με πρόδρομες ενώσεις	(1, 2) LiChrolut EN	Όχι	Όχι	GC/ITMS*	(1) Διαχωρισμός πτητικών συστατικών (2) Διαχωρισμός δεσμευμένων συστατικών	[132]

**Πίνακας 2.3 (συνέχεια)**

Ενώσεις <sup>α</sup>	Δείγματα/ Ποικιλίες	Στήλη SPE	Ανάπτυξη SPE μεθόδου	Επικύρωση SPE μεθόδου	Ανίχνευση	Άλλες Παρατηρήσεις	Αναφορά
<b>82 FV</b> <sup>β</sup> : τερπένια, βενζολικά παράγωγα, πτητικές φαινόλες κ.ά	Οίνοι, ερυθροί παλαιωμένοι ισπανικοί (v=6)	LiChrolut EN	Όχι	Όχι	GC/ITMS*	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[190]
<b>80 FV &amp; 62 PV</b> : τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, C <sub>13</sub> νορισ/δή, αρωματικές αλκοόλες, πτητικές φαινόλες, κ.ά	Οίνοι, ερυθροί/ <i>Royal, Moravia Dulce</i> και <i>Tortosí</i>	LiChrolut EN	Όχι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[191]
<b>75 FV</b> <sup>β</sup> : τερπένια, βενζολικά παράγωγα, πτητικές φαινόλες, κ.ά	Οίνοι λευκοί/ <i>Zalema</i>	LiChrolut EN	Όχι	Όχι	GC/ITMS*	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[117]
<b>28 FV &amp; 28 PV</b> : τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, αρωματικές αλκοόλες, πτητικές φαινόλες, κ.ά	Γλεύκος, φυτικό εκχύλισμα/ <i>Brancellao</i>	1) Strata-X 500 mg 2) Strata-X 200 mg	Όχι	Όχι	GC/ITMS*	1) Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα 2) Διαχωρισμός ενζυμικά αποδ/νων αγλυκονών	[141]
<b>70 FV</b> <sup>β</sup> & <b>PV</b> <sup>β</sup> : τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, αρωματικές αλκοόλες, πτητικές φαινόλες, κ.ά	1) Εμβολιασμένο γλεύκος, 2) Οίνοι από εμβολιασμένα με πρόδρομες ενώσεις γλεύκη (χρήση διαφόρων στελεχών ζυμομυκήτων)	1, 2) LiChrolut EN 200 mg 3) LiChrolut EN, 50 mg	Όχι	Όχι	GC/ITMS*	1) Διαχωρισμός γλυκοζιτών από γλεύκος 2) Διαχωρισμός χημικά αποδ/νων αγλυκονών 3) Διαχωρισμός πτητικών αναλυτών από οίνους	[192]
<b>15 FV</b> : τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα	Γλεύκος, οίνος/ <i>Muscat "a petit grains", Albillo</i>	Bond Elut	Όχι	Όχι	GC/FID/MS	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[26]
<b>24 FV &amp; 24 PV</b> : τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, βενζολικά παράγωγα	Γλεύκος, οίνος, φυτικό εκχύλισμα/ <i>Muscat "a petit grains"</i>	Bond Elut	Όχι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός πρωτογενών συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[112]
<b>276 FV</b> : πρωτογενή και δευτερογενή αρωματικά συστατικά	Οίνοι, ερυθροί/ Cabernet Sauvignon, Pinotage	StrataTM SDB-L, 50 mg/3 mL;	Όχι	Όχι	GCxGC/TOF-MS**	Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	[193]
<b>75 FV &amp; 75 PV</b> : τερπένια, C <sub>6</sub> αλκοόλες, πτητικές φαινόλες, δευτερογενή αρωματικά συστατικά (εστέρες, οξέα αλκοόλες) κ.ά	Οίνοι λευκοί/ <i>Emir</i>	Amberlite XAD-2	Όχι	Όχι	GC/MS	Διαχωρισμός συστατικών σε ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα	[115]

α: αριθμός, μορφή και είδος αναλυτών που υπόκεινται σε SPE β: Αναφορά στο σύνολο των αναλυτών της μελέτης καθώς δεν παρέχονται διευκρινήσεις για τον ακριβή αριθμό των συστατικών που προσδιορίστηκαν μετά από SPE,

\*GC/ITMS: Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry (Αέρια Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μάζας Παγίδευσης Ιόντων,

\*\* GCxGC/TOF-MS: Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography with high speed Time-Of-Flight Mass Spectrometry (Διδιάστατη Αέρια Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας Χρόνου Πτήσεως Ιόντων

### 2.2.2.3 Σύγκριση SPE με άλλες τεχνικές

Το 2008 οι Hernanz και συνεργάτες [194] πραγματοποίησαν συγκριτική μελέτη μεταξύ τριών τεχνικών εκχύλισης για την αποτελεσματικότητά τους ως προς το διαχωρισμό 44 πτητικών ενώσεων από διάφορους οίνους. Επρόκειτο για μία μέθοδο SPE με χρήση πολυμερούς ρητίνης (LiChrolut EN) και εκλουστικό διαλύτη το διχλωρομεθάνιο [118], (περισσότερα για τη συγκεκριμένη μέθοδο αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο) και δύο μεθόδων εκχύλισης υγρού-υγρού υποβοηθούμενων από υπερήχους (US-LLE, Ultra Sound assisted Liquid-Liquid Extraction,), η πρώτη με διαλύτη εκχύλισης μίγμα διαιθυλαιθέρα-πεντανίου (2:1 v/v) και η δεύτερη με διχλωρομεθάνιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η μέθοδος SPE παρουσίασε χαμηλότερες ανακτήσεις σε περισσότερα συστατικά από την μέθοδο LLE (με το μίγμα διαιθυλαιθέρα-πεντανίου) ωστόσο, κρίθηκε από τους συγγραφείς ως η μέθοδος επιλογής καθώς είχε γενικά καλύτερη αναπαραγωγιμότητα, απαιτούσε μικρότερους χρόνους εκχύλισης και είχε μικρότερη κατανάλωση διαλυτών.

Το 2009 σε εργασία για τον προσδιορισμό 30 πτητικών ουσιών σε συνθετικούς οίνους [195] η ίδια SPE μέθοδος συγκρίθηκε με τις επιδόσεις δύο άλλων ευρέως αποδεκτών τεχνικών απομόνωσης: της εκχύλισης υγρού-υγρού με διχλωρομεθάνιο και της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από τον υπερκείμενο χώρο (HS-SPME) με ίνα carboxen-polydimethylsiloxane (περισσότερα για την τεχνική SPME αναφέρονται στη συνέχεια της διατριβής). Η μέθοδος SPE επέδειξε λίγο καλύτερη αναπαραγωγιμότητα (μ.ο. RSD 5%) από τη μέθοδο SPME (μ.ο. RSD 7%) και την LLE (RSD 12%) και παρόμοια ευαισθησία με τη LLE (παρατηρήθηκαν γενικά παρόμοιες κλίσεις στις καμπύλες αναφοράς) και παρόμοια όρια ανίχνευσης. Ειδικά σε κάποια πτητικά συστατικά όπως η γουαϊακόλη, 4-αιθυλο-γουαϊακόλη, ευγενόλη, β-ιονόνη, και βανιλίνη, η SPE παρουσίασε τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και από τις τρεις μεθόδους.

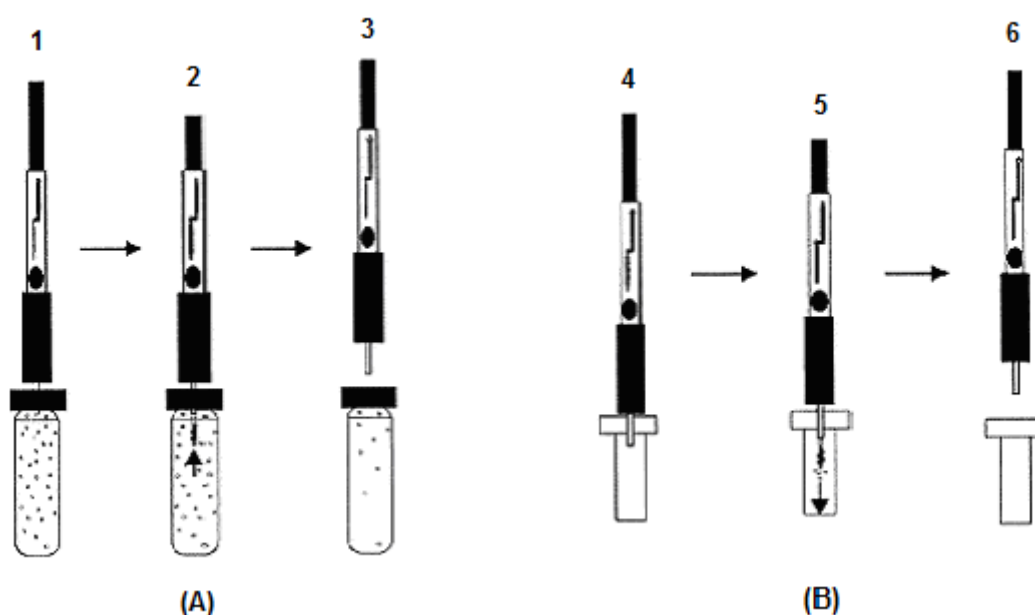
Την ίδια χρονιά δημοσιεύθηκε μία ακόμη συγκριτική μελέτη μεταξύ τριών τεχνικών εκχύλισης για προσδιορισμούς πτητικών συστατικών σε γλεύκος μοσχάτης ποικιλίας [196]. Επρόκειτο για α) μία μέθοδο SPE με χρήση ρητίνης LiChrolut EN και εκλουστικό διαλύτη διχλωρομεθάνιο, β) μία μέθοδο LLE με



πεντάνιο–διχλωρομεθάνιο (60/40 v/v) και γ) με μία μέθοδο παράλληλης απόσταξης και εκχύλισης σε ειδική συσκευή (SDE, Simultaneous Steam Distillation–Solvent Extraction) με διχλωρομεθάνιο, που αναπτύχθηκε από τους Godefroot και συνεργάτες [198] στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας, παρόλο που και οι τρεις τεχνικές ήταν κατάλληλες, οι μέθοδοι SPE και LLE αποδείχθηκαν ικανότερες για τον προσδιορισμό περισσότερο πολικών συστατικών όπως οξέων και αλκοολών.

### 2.3 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού (SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε από τον Pawliszyn στις αρχές της δεκαετίας του 1990 [198-200]. Είναι μία τεχνική προκατεργασίας δείγματος, με χρήση ίνας τετηγμένης πυριτίας (fused silica fiber) επικαλυμμένης με κατάλληλη στερεά φάση από πολυμερές υλικό (επίστρωση, coating) που βασίζεται στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ της μήτρας του δείγματος και της στερεάς φάσης του πολυμερούς [201].



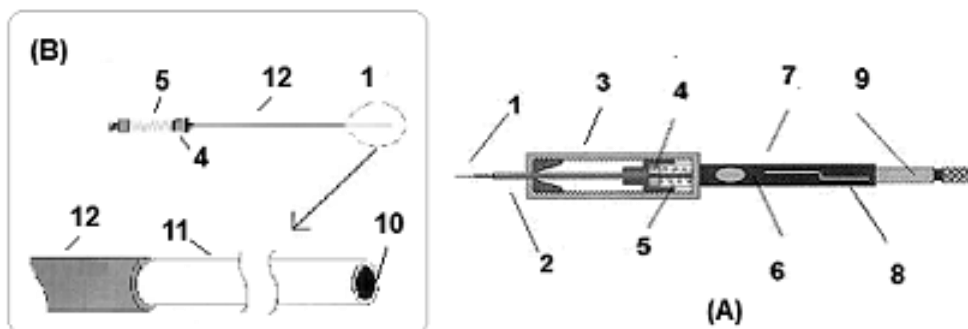
Σχήμα 2.5: Στάδια SPME διαδικασίας (A) εκχύλισης και (B) εκρόφησης. 1: Η βελόνα διαπερνά το διάφραγμα του φιαλιδίου, 2: Εξαγωγή της SPME ίνας/εκχύλιση των αναλυτών, 3: Προστασία της ίνας μέσα στη βελόνα και εξαγωγή από το φιαλίδιο, 4: Η βελόνα διαπερνά το διάφραγμα του εισαγωγέα 5: Εξαγωγή της SPME ίνας/θερμική εκρόφηση των αναλυτών 6: Προστασία της ίνας μέσα στη βελόνα και εξαγωγή από τον εισαγωγέα [202].

Πρόκειται για μια διαδικασία δύο βασικών σταδίων (Σχήμα 2.5). Στο πρώτο στάδιο της εκχύλισης (Α), η ίνα εκτίθεται στη μήτρα του δείγματος και λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της προσρόφησης-απορρόφησης των αναλυτών. Στο δεύτερο στάδιο (Β), η ίνα με τους αναλύτες μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αναλυτικού οργάνου για εκρόφηση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού [152].

Η τεχνική SPME έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών διαχωρισμού διότι συνδυάζει δειγματοληψία, κατεργασία δείγματος και άμεση μεταφορά των αναλυτών σε ένα κλασικό σύστημα αεριοχρωματογραφίας ή υγροχρωματογραφίας, ελαχιστοποιώντας την απώλειά τους [152]. Είναι μία μέθοδος που δεν απαιτεί χρήση διαλυτών ενώ παράλληλα είναι ευαίσθητη, γρήγορη και εύκολα αυτοματοποιούμενη [203]. Επιπλέον, επιτυγχάνει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών [204]. Για τους παραπάνω λόγους, έγινε μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές εκχύλισης σε διάφορους τομείς της αναλυτικής χημείας όπως στην περιβαλλοντική μελέτη, στην ανάλυση τροφίμων και ποτών ή στην κλινική και τοξικολογική έρευνα [199, 200, 202].

Η συσκευή της τεχνικής SPME αποτελείται από μια ειδικά τροποποιημένη σύριγγα και είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να δέχεται ανταλλακτικούς τύπους ινών (Σχήμα 2.6) [200].

Για την επικάλυψη της ίνας χρησιμοποιούνται διάφορα πολυμερή παρόμοια με εκείνα που χρησιμοποιούνται για τις χρωματογραφικές στήλες (π.χ. PDMS—πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, DVB—διβινυλοβενζόλιο, Carbowax, κλπ). Οι ιδιότητες της ίνας εξαρτώνται από το είδος του πολυμερούς, το πάχος του, την πολικότητα και το πορώδες του [205]. Γενικά, χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες πολυμερών. Το πάχος της επίστρωσης κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 7 και 100 μm (για ίνες PDMS) ενώ ο συνολικός όγκος τους δεν ξεπερνά το 1 μL. Το μήκος των ινών που είναι εμπορικά διαθέσιμες είναι 1 cm. Το πολυμερές μπορεί να βρίσκεται στερεωμένο στην ίνα είτε χωρίς ομοιοπολικούς δεσμούς είτε με ομοιοπολικούς δεσμούς και μικρό ή μεγάλο ποσοστό διακλαδώσεων [200].



**Σχήμα 2.6:** Συσκευή τεχνικής SPME (A), και εμπορικά διαθέσιμο ανταλλακτικό ίνας SPME (B) 1: ίνα, 2: ασάλινη βελόνα σύριγγας, 3: οδηγός έκτασης βελόνας, 4: διάφραγμα ασφαλείας, 5: ελατήριο, 6: παράθυρο παρατήρησης για επιβεβαίωση του χρώματος-είδους της ίνας, 7: μεταλλικό κυλινδρικό σώμα, 8: οδηγός σχισμής σχήματος Z, 9: πλαστικό έμβολο, 10: τετηγμένη πυριτία, 11: επίστρωση από πολυμερές υλικό 12: ασάλινος κύλινδρος που εφαρμόζει η ίνα [τροποπ. 202].

Υπάρχουν διαθέσιμες απορροφητικές ίνες υγρών επιστρώσεων (PDMS, Carbowax, PA) καθώς και ίνες που στην επικάλυψή τους έχουν στερεό προσροφητικό και στις οποίες κυριαρχούν προσροφητικές διαδικασίες (DVB/PDMS, Carboxen/PDMS) [206].

Ανάλογα με το εάν το πολυμερές που περιβάλλει τις ίνες ως επίστρωση είναι υγρό ή στερεό έχουν παρατηρηθεί ουσιαστικές διαφορές στην απόδοσή τους. Στην περίπτωση των υγρών επιστρώσεων, οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ του δείγματος και της υγρής επίστρωσης όπως προβλέπεται σε μια διαδικασία εκχύλισης υγρού με υγρό και τα μόρια των αναλυτών διαχέονται μέσα στο υγρό πολυμερές. Ο υψηλός συντελεστής διάχυσης των αναλυτών σε αυτές τις περιπτώσεις επιτρέπει, εφόσον το πάχος της επίστρωσης είναι λεπτό, στα μόριά τους να διεισδύσουν σε όλο τον όγκο του πολυμερούς σε σχετικά μικρό χρόνο [152].

Στην περίπτωση του στερεού προσροφητικού, η επίστρωση έχει μια καλοσχηματισμένη κρυσταλλική δομή, η οποία όμως αν είναι πυκνή ουσιαστικά μειώνει τους συντελεστές διάχυσης των αναλυτών. Συνεπώς, η προσρόφηση πραγματοποιείται μόνο στην επιφάνεια του περιβλήματος και έτσι είναι διαθέσιμο μόνο ένα μικρό τμήμα του συνολικού όγκου της επίστρωσης [207]. Εάν αυτό το επιφανειακό τμήμα είναι κατειλημμένο, είναι ενδεχόμενο να πραγματοποιηθεί αντικατάσταση των μορίων ενός αναλύτη από τα μόρια ενός άλλου που θα δρα ανταγωνιστικά. Επομένως, η ποσότητα σε κατάσταση ισορροπίας που παραλαμβάνεται από την ίνα είναι πολύ πιθανόν να εξαρτάται από τις σχέσεις των συγκεντρώσεων μεταξύ των αναλυτών, αλλά και από την παρουσία άλλων ουσιών του δείγματος που μπορούν να δρουν ανταγωνιστικά προς αυτούς. [152, 207].

Οι πολυμερείς επιστρώσεις χαρακτηρίζονται από διαφορετικές πολικότητες. Το PDMS είναι μη πολικό υλικό και παρουσιάζει μεγάλη αγχιστεία με άπολα συστατικά ενώ το PA (polyacrylate) είναι κατάλληλο για πιο πολικά συστατικά. Ορισμένοι μικτοί τύποι όπως τα polydimethylsiloxane/polydivinylbenzene (PDMS/DVB), polyethyleneglycol/polydivinylbenzene (Carbowax/DVB), και το Carboxen/PDMS είναι πιο πολικοί από το PA και κατάλληλοι για εκχύλιση πολικών συστατικών όπως αλκοόλες και αιθέρες [148].

Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζονται οι εμπορικά διαθέσιμες SPME ίνες και ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά τους [208].

Ανάλογα με τον τρόπο δειγματοληψίας, υπάρχουν δύο βασικοί τύποι μικροεκχύλισης SPME: η άμεση εκχύλιση με την εμβάπτιση της ίνας μέσα στο δείγμα (direct immersion, DI-SPME) και η εκχύλιση στον υπερκείμενο χώρο (head space, HS-SPME) όπου η ίνα εκτίθεται στην αέρια φάση πάνω από το δείγμα [209]. Συχνά γίνεται, παράλληλα, ανάδευση του δείγματος με μικρή περιστρεφόμενη ράβδο για να επιταχυνθεί η επίτευξη ισορροπίας.

Η SPME είναι μία τεχνική πολύ ευαίσθητη στις πειραματικές συνθήκες [210]. Οποιαδήποτε αλλαγή των πειραματικών παραμέτρων επηρεάζει το συντελεστή κατανομής του αναλύτη μεταξύ της επιφάνειας της ίνας και του δείγματος, ή την κινητική της προσρόφησης, επηρεάζει ταυτόχρονα, και το ποσό του αναλύτη που προσροφάται στην SPME ίνα. Έτσι, σημαντικό ρόλο παίζουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος, όπως το pH, η

ιοντική ισχύς του διαλύματος, ή η θερμοκρασία, ο χρόνος της δειγματοληψίας και η ταχύτητα ανάδευσης του δείγματος. [155]. Για να αναπτυχθεί μία μέθοδος εκχύλισης, αυτές οι παράμετροι πρέπει να έχουν βελτιστοποιηθεί, ούτως ώστε να εξασφαλισθεί η επαναληψιμότητα και η ευαισθησία της εκχύλισης [210].

**Πίνακας 2.4: Κύρια χαρακτηριστικά των εμπορικά διαθέσιμων SPME ινών [208].**

Υλικό επικάλυψης	Πάχος (μm)	Πολικότητα	Μέθοδος επικάλυψης	Μέγιστη θερμοκρασία	Αναλυτική μέθοδος	Συστατικά προς εκχύλιση
Polydimethylsiloxane (PDMS)	100	Μη πολικό	Μη δεσμοί	280	GC/HPLC	Πτητικά
PDMS	30	Μη πολικό	Μη δεσμοί	280	GC/HPLC	Μη πολικά ημιπτητικά
PDMS	7	Μη πολικό	Δεσμοί	340	GC/HPLC	Μέτρια προς μη πολικά ημιπτητικά
PDMS–divinylbenzene (DVB)	65	Αμφι-πολικό	Διακλαδώσεις	270	GC	Πολικά πτητικά
PDMS–DVB	60	Αμφι-πολικό	Διακλαδώσεις	270	HPLC	Γενικής χρήσης
PDMS–DVB <sup>a</sup>	65	Αμφι-πολικό	Διακλαδώσεις	270	GC	Πολικά πτητικά
Polyacrylate (PA)	85	Πολικό	Διακλαδώσεις	320	GC/HPLC	Πολικά ημιπτητικά (φαινόλες)
Carboxen–PDMS	75	Αμφι-πολικό	Διακλαδώσεις	320	GC	Αέρια και πτητικά
Carboxen–PDMS <sup>a</sup>	85	Αμφι-πολικό	Διακλαδώσεις	320	GC	Αέρια και πτητικά
Carbowax–DVB	65	Πολικό	Διακλαδώσεις	265	GC	Πολικά (αλκοόλες)
Carbowax–DVB <sup>a</sup>	70	Πολικό	Διακλαδώσεις	265	GC	Πολικά (αλκοόλες)
Carbowax-templated resin (TPR)	50	Πολικό	Διακλαδώσεις	240	HPLC	Επιφανειοδραστικά
DVB–PDMS–Carboxen <sup>a</sup>	50/30	Αμφι-πολικό	Διακλαδώσεις	270	GC	Αρωματικά

τύπος Stableflex σε μήκος ίνας 2 cm

### 2.3.1 Ανάπτυξη & Εφαρμογές μεθόδων SPME για προσδιορισμούς συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε οίνους – Ανασκόπηση

Η τεχνική SPME, λόγω της απλότητάς της, έχει ευρεία απήχηση, γι' αυτό και στη διεθνή βιβλιογραφία βρίσκεται πλήθος μελετών, όπου η μέθοδος εφαρμόζεται για την απομόνωση πτητικών συστατικών από οίνους. Στη συντριπτική πλειονότητα αυτών των ερευνών, πριν την εφαρμογή των πρωτοκόλλων SPME (κυρίως HS–SPME), οι μελετητές πραγματοποίησαν βελτιστοποίηση ορισμένων πειραματικών παραμέτρων χωρίς ωστόσο να ακολουθήσει αξιολόγηση των προτεινόμενων μεθοδολογιών. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται μια σύντομη βιβλιογραφική επισκόπηση των σημαντικότερων

εργασιών, που αφορούν ανάπτυξη SPME μεθοδολογιών για την εκχύλιση πρωτογενών αρωματικών συστατικών από οίνους, και ορισμένες εφαρμογές τους.

Πρώτοι γερμανοί ερευνητές ασχολήθηκαν με την SPME για τον προσδιορισμό τερπενίων σε οίνους, και δημοσίευσαν μια σειρά από διαδοχικές μελέτες [17, 21, 211-215]. Το 1996, με DI-SPME, ίνα PA 85  $\mu\text{m}$  και με κριτήριο την απόκριση ανιχνευτή FID, εξέτασαν την επίδραση ορισμένων παραμέτρων στην εκχύλιση έξι μονοτερπενίων από συνθετικά διαλύματα [211]. Παρατηρήθηκε ότι ο όγκος του δείγματος δεν είχε σημαντική επίδραση και ότι η βέλτιστη απόκριση μπορούσε να επιτευχθεί από δείγμα χωρίς αλκοόλη, κορεσμένο με NaCl, σε συγκεκριμένο χρόνο και θερμοκρασία δειγματοληψίας, με μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης, και σε συγκεκριμένη τιμή pH.

Το επόμενο έτος, από την ίδια ερευνητική ομάδα, παρουσιάστηκε μελέτη [212] όπου έξι εμπορικά διαθέσιμοι τύποι ινών συγκρίθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εκχυλίσουν, με DI-SPME, 90 περίπου πτητικά συστατικά ενός οίνου από μοσχάτη ποικιλία (Morio-Muskat). Οι ενώσεις που απομονώθηκαν ανήκαν σε διαφορετικές χημικές ομάδες, όπως αλκοόλες, οξέα, εστέρες και τερπένια. Με κριτήριο το αναλυτικό σήμα από ανιχνευτή FID, η ίνα PA 85  $\mu\text{m}$  επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλη, καθώς απέδωσε το πιο σύνθετο προφίλ αρωματικών ουσιών. Με το συγκεκριμένο τύπο ίνας παρατηρήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα σε τερπένια και αλκοόλες, ωστόσο, σημειώθηκε ότι τα πρώτα μπορούσαν εξίσου καλά να εκχυλισθούν και από ίνα PDMS.

Το 1998, οι ίδιοι, [17] μελέτησαν τη βελτιστοποίηση μιας διαδικασίας HS-SPME και μετά την εφαρμογή της για την εκχύλιση 11 τερπενικών ενώσεων, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα από την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου DI-SPME στα ίδια δείγματα. Επισημάνθηκε ότι η δειγματοληψία HS-SPME απαιτούσε περίπου 4 φορές περισσότερο χρόνο από τη DI-SPME ενώ αρκούσαν ελάχιστοι όγκοι δείγματος. Η εκχύλιση στην πρώτη περίπτωση επηρεαζόταν πολύ σημαντικά από τη θερμοκρασία, η αύξηση της οποίας σε τιμές μεγαλύτερες από 40 °C οδηγούσε σε μείωση του αναλυτικού σήματος.

Οι Vas και συνεργάτες [216] συνέκριναν τις τεχνικές SPME εμβάπτισης και υπερκείμενου χώρου, με δύο ίνες, για την απομόνωση 22 πτητικών ενώσεων των οίνων (αλκοολών, εστέρων λιπαρών οξέων και τερπενίων). Με ημιποσοτικούς προσδιορισμούς, και κριτήριο την αποτελεσματικότητα των εκχυλίσεων ως προς τους εστέρες, κατέληξαν ότι η τεχνική HS-SPME ήταν καταλληλότερη από την DI-SPME, και την εφάρμοσαν με ίνα PDMS, σε μεταγενέστερη μελέτη τους, για να ταξινομήσουν με βάση το αρωματικό τους προφίλ οίνους από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές [217]. Στο ίδιο συμπέρασμα, ότι δηλαδή η τεχνική HS-SPME ήταν πιο κατάλληλη από την DI-SPME, κατέληξαν αργότερα και οι Selli και συνεργάτες [218], βασιζόμενοι επίσης στην απόδοση ίνας PDMS για την εκχύλιση εστέρων, από οίνο μανταρινιού. Στην ίδια εργασία ωστόσο, παρατηρήθηκαν αντίθετα αποτελέσματα για τις αλκοόλες όπου η εκχύλιση με εμβάπτιση είχε καλύτερη απόδοση.

Οι Whiton & Zoecklein [204] μελέτησαν την επίδραση του μητρικού υποστρώματος και ορισμένων πειραματικών συνθηκών για την εκχύλιση, με HS-SPME και ίνα Carbowax/DVB, δέκα πτητικών συστατικών διαφόρων αντιπροσωπευτικών ομάδων (εστέρες, αλκοόλες, οξέα, πτητικές φαινόλες, ιονόνη) πλην των τερπενίων, από οίνους. Οι δοκιμές έγιναν σε συνθετικά διαλύματα των αναλυτών, και έδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου δειγματοληψίας μπορούσε να αυξήσει την ευαισθησία της ανάλυσης για τα πιο πολικά συστατικά, που είχαν υψηλότερο σ.ζ., και αντίστροφα, να μειώσει την ευαισθησία για τα πολύ πτητικά συστατικά. Με τα αποτελέσματα αυτά συμφωνεί μεταγενέστερη εργασία των Marti και συνεργάτες [219]. Η συγκέντρωση της αιθανόλης στο δείγμα μπορούσε επίσης να έχει διαφορετικό αντίκτυπο στις αποκρίσεις διαφορετικών συστατικών. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι όταν γίνεται βελτιστοποίηση των συνθηκών δειγματοληψίας είναι σημαντική η εστίαση στους αναλύτες που ενδιαφέρουν περισσότερο.

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη δημοσιεύθηκε το 2001 από τους Rocha και συνεργάτες [220]. Οι συγγραφείς μελέτησαν τη συμπεριφορά μίας SPME ίνας polyacrylate (PA) για την εκχύλιση εννέα κοινών αρωματικών συστατικών των οίνων που ανήκαν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες όπως μονοτερπενίων, αλειφατικών και αρωματικών αλκοολών και εστέρων. Οι δοκιμές έγιναν στον

υπερκείμενο χώρο συνθετικών διαλυμάτων των αναλυτών και υπολογίσθηκαν οι σχετικοί συντελεστές απόκρισης (Relative response factors (RRFs)) των προσδιοριζόμενων ενώσεων οι οποίοι δείχνουν τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ενός αναλύτη και του εμβαδού της χρωματογραφικής του κορυφής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η σύσταση του μητρικού υποστρώματος είχε ισχυρή επίδραση στους ποσοτικούς προσδιορισμούς των αναλυτών, με τις ενώσεις που είχαν υψηλότερους συντελεστές απόκρισης να επηρεάζονται λιγότερο.

Οι Bonino και συνεργάτες [7] εξέτασαν 3 τύπους πολυμερών υλικών (PDMS, Carbowax/DVB, PDMS/DVB), για τη εκχύλιση με HS-SPME 27 επιλεγμένων πτητικών ενώσεων από συνθετικά διαλύματα. Η ίνα PDMS/DVB έδειξε μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για χαμηλού και μεσαίου μοριακού βάρους αναλύτες, μέτριας πολικότητας και επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορισθεί ημιποσοτικά το αρωματικό προφίλ οίνων της ιταλικής ποικιλίας Ruché.

Το 2003, οι Martí και συνεργάτες [219] εφάρμοσαν την τεχνική HS-SPME σε συνδυασμό με GC/FID και αεριοχρωματογραφία-οσφρητικής ανάλυσης (GC-O) για να χαρακτηρίσουν το άρωμα νεαρών οίνων Grenache. Έγινε σύγκριση μεταξύ 3 τύπων ινών. Το υλικό Flex DVB/CAR/PDMS επιλέχθηκε ως το πιο κατάλληλο, καθώς απέδωσε μεγαλύτερο αριθμό ενώσεων και βέλτιστη απόκριση από ανιχνευτή FID (εμβαδά κορυφών). Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι ήταν απαραίτητος ο κορεσμός με NaCl, ότι η απόδοση βελτιώνονταν όσο μικρότερος ήταν ο υπερκείμενος χώρος και ότι η επαναληψιμότητα χειροτέρευε με την αύξηση του όγκου του δείγματος. Εξετάσθηκε η γραμμικότητα των καμπύλων αναφοράς 7 ενώσεων, σε υπόστρωμα συνθετικού οίνου, και παρατηρήθηκε μη γραμμική συμπεριφορά κάποιων αναλυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Το 2005, οι Tat και συνεργάτες [221] μελέτησαν την απόδοση 6 εμπορικά διαθέσιμων τύπων ινών, με ανάλυση HS-SPME/GC-FID, ενός οίνου Chardonnay. Με κριτήριο τη συνολική απόκριση του ανιχνευτή (για ταυτοποιημένες και μη ταυτοποιημένες ενώσεις) οι καλύτερες επιδόσεις σημειώθηκαν με το υλικό επικάλυψης DVB/CAR/PDMS. Το υλικό Carboxen/PDMS παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία για τα περισσότερα



πτητικά συστατικά, αλλά η υψηλή ευαισθησία του συνοδεύονταν από μη ικανοποιητικό διαχωρισμό των κορυφών, και κατά συνέπεια φτωχή επαναληψιμότητα. Οι συγγραφείς συμπέραναν ότι, για ειδικές εφαρμογές η επιλογή της κατάλληλης στερεάς φάσης εξαρτάται από την κατηγορία των συστατικών που αναλύονται.

Ξεχωριστό ενδιαφέρον παρουσιάζουν ακόμη οι εργασίες των Setkova [223], Robinson [224], και Demyttenaere [225], στοιχεία για τις οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.5.

Όπως προαναφέρθηκε, ένας πολύ περιορισμένος αριθμός μελετών εστιάζεται σε ποσοτικούς προσδιορισμούς συστατικών του πρωτογενούς αρώματος. Στη συνέχεια, αναφέρονται οι εργασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε επικύρωση των βελτιστοποιημένων μεθόδων και εφαρμογή τους για ποσοτικές αναλύσεις.

Οι Liu και συνεργάτες [222] συνέθεσαν ένα νέο συμπολυμερές υλικό από butyl methacrylate (BMA), διβινυλοβενζόλιο (DVB) και hydroxy-terminated silicone oil (OH-TSO) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως επικάλυψη ίνας SPME. Με χρήση της νέας ίνας ανέπτυξαν πρωτόκολλο HS-SPME και μπόρεσαν να προσδιορίσουν ταυτόχρονα οξέα και εστέρες (προϊόντα αλκοολικής ζύμωσης) καθώς και εξανόλη-1 και λιναλοόλη (συστατικά πρωτογενούς αρώματος). Πραγματοποιήθηκε εκτενής έλεγχος για πιθανή επίδραση του υποστρώματος, με εμβολιασμούς σε προσομοιωτές οίνου και καθαρό (χωρίς αναλύτες) υπόστρωμα οίνου, και ακολούθησε επικύρωση της μεθοδολογίας. Ελέγχθηκαν η γραμμικότητα, η ορθότητα, η ακρίβεια και η ανιχνευσιμότητα της μεθόδου με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Το 2004, οι Torrens και συνεργάτες [226] αφού δοκίμασαν τη συμπεριφορά 4 ινών (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS, PDMS/DVB/CAR) για τον προσδιορισμό με HS-SPME/ GC/FID 40 περίπου πτητικών συστατικών σε λευκούς και ερυθρούς οίνους, βελτιστοποίησαν το χρόνο και τη θερμοκρασία της εκχύλισης με ίνα PDMS/DVB/CAR και πραγματοποίησαν βαθμονόμηση της μεθόδου με πρότυπα σε συνθετικό υπόστρωμα. Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με κατεργασίες ενός λευκού και ενός ερυθρού οίνου.

Το 2005, οι Peña και συνεργάτες [227] ανέπτυξαν και βελτιστοποίησαν μία μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό πέντε μονοτερπενικών ενώσεων των

οίνων, με DI-SPME και GC-MS. Η βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών έγινε με χρήση ίνας PDMS 100 σε συνθετικά διαλύματα. Με κριτήριο το αναλυτικό σήμα κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης, η τεχνική DI-SPME συγκρινόμενη με την HS-SPME, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα. Οι μελετητές δεν παρατήρησαν επίδραση της αιθανόλης στην εκχυλιστική ικανότητα της ίνας, ενώ κρίθηκε απαραίτητος ο κορεσμός του δείγματος με NaCl. Υπό αυτές τις βελτιστοποιημένες πειραματικές συνθήκες, έγινε επικύρωση της μεθοδολογίας. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν περίπου μεταξύ 72% και 91% και οι συντελεστές διακύμανσης μεταξύ 1,28 και 3,71%. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ερυθρών οίνων από περιοχή της βορειοδυτικής Ισπανίας.

Οι Câmara και συνεργάτες [228] ανέπτυξαν μέθοδο HS-SPME για την ποσοτικό προσδιορισμό 7 τερπενίων και 3 νορισοπρενοειδών ενώσεων, σε γλεύκη και ενισχυμένους οίνους. Με χρήση υδατικών διαλυμάτων των αναλυτών (χωρίς αιθανόλη), συγκρίθηκαν 4 εμπορικά διαθέσιμες ίνες (PDMS, PDMS/DVB, PA, Car/PDMS), και η ίνα PA επιλέχθηκε ως πιο κατάλληλη. Έγινε βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας, του χρόνου δειγματοληψίας, της συγκέντρωσης του άλατος, του pH, της περιεκτικότητας σε αιθανόλη καθώς και των συνθηκών στον εισαγωγέα. Για τις δοκιμές βελτιστοποίησης χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα και συνθετικοί οίνοι. Ακολούθησε επικύρωση της βελτιστοποιημένης μεθοδολογίας. Η ακρίβεια, η γραμμικότητα και τα όρια ανίχνευσης μετρήθηκαν με την εκχύλιση συνθετικών οίνων, με ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ από τις δοκιμές για την ανάκτηση, φάνηκε ότι για 4 αναλύτες η επίδραση της μήτρας των γλευκών και των οίνων είναι σημαντική. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε γλεύκη και οίνους διαφόρων ποικιλιών καλλιεργημένων στη νήσο Μαδέρα [229].

Σε δύο πιο πρόσφατες μελέτες ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρησιμοποίηση πειραματικού σχεδιασμού για τη βελτιστοποίηση των μεθόδων. Ωστόσο, σε καμία από τις παρακάτω εργασίες δεν εξετάστηκε η επίδραση του τρόπου δειγματοληψίας και της αιθυλικής αλκοόλης, παράγοντες που όπως προαναφέρθηκε επηρεάζουν σημαντικά την εκχύλιση SPME.

Η πρώτη μελέτη που δημοσιεύθηκε, το 2009, από τους Nogueiro-Pato και συνεργάτες [107], αφορούσε την ανάπτυξη μεθοδολογίας HS-SPME-

GC/ITMS για την απομόνωση και ποσοτικοποίηση 32 πτητικών συστατικών που ανήκουν στο πρωτογενές και δευτερογενές άρωμα των οίνων. Για να εκτιμηθεί η επίδραση 4 παραμέτρων (τύπος ίνας, θερμοκρασία εκχύλισης, προσθήκη άλατος, και όγκος δείγματος) στην απόδοση της εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε μερικός παραγοντικός σχεδιασμός. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επίστρωση της ίνας και η θερμοκρασία αποτελούσαν τις σημαντικότερες μεταβλητές. Στους ποσοτικούς προσδιορισμούς παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της μήτρας των οίνων. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην εύρεση του αρωματικού προφίλ ερυθρών οίνων από την ποικιλία Mencía.

Στη δεύτερη, πολύ πρόσφατη μελέτη [230], αφού επιλέχθηκε η πιο κατάλληλη ίνα ανάμεσα σε 5 τύπους, χρησιμοποιήθηκε κεντρικός σύνθετος πειραματικός σχεδιασμός για να εκτιμηθεί η επίδραση 4 παραγόντων στην εκχύλιση: του χρόνου και της θερμοκρασίας της εκχύλισης, της συγκέντρωσης του προστιθέμενου άλατος και του χρόνου εξισορρόπησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η ίνα DVB/CAR/PDMS απομόνωσε το μεγαλύτερο αριθμό συστατικών και έδωσε τη μεγαλύτερη συνολική απόκριση (άθροισμα εμβαδών κορυφών) σε IT/MS ανιχνευτή. Η συγκέντρωση του άλατος (NaCl) και ο χρόνος εκχύλισης ήταν οι πιο σημαντικές παράμετροι έχοντας θετική επίδραση στα αναλυτικά αποτελέσματα. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος επέτρεψε την απομόνωση 64 συστατικών από λευκό οίνο, και επικυρώθηκε για 20 συστατικά με χρήση συνθετικών διαλυμάτων. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε για την ανάλυση οκτώ λευκών οίνων από την Πορτογαλία.

Στον ακόλουθο Πίνακα 2.5 παρουσιάζονται συνοπτικά, πληροφορίες για τις προαναφερόμενες μεθόδους SPME, τις παραμέτρους που εξετάστηκαν, καθώς και ορισμένες ακόμη εφαρμογές, όπου μέθοδοι SPME χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση (μεταξύ άλλων ή αποκλειστικά) πρωτογενών αρωματικών συστατικών από οίνους.

**Πίνακας 2.5: Ανάπτυξη και εφαρμογές μεθόδων SPME για τον προσδιορισμό (αποκλειστικά ή μεταξύ άλλων) πρωτογενών αρωματικών σε οίνους και σταφύλια**

Αναλύτες	Δείγματα/Ποικιλίες	Ίνα SPME	Τύπος SPME	Ανίχνευση	Παράμετροι βελτιστοποίησης	Επικύρωση SPME μεθόδου	Αναφορά
9 τερπένια	Συνθετικοί οίνοι	PA 85 μm	DI-SPME	GC/FID	$V_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu}, EtOH\%, pH, C_{NaCl}, T, t_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\rho}, t_{\epsilon\kappa\rho}$	Όχι	[211]
90 πτητικές ενώσεις : αλκοόλες, οξέα, εστέρες, τερπένια, κ.ά.	Οίνοι/ Morio-Muskat	PA 85 μm	DI-SPME	GC/FID	Είδος ίνας	Όχι	[212]
11 τερπένια	Οίνοι/ Riesling	PA 85 μm	HS-SPME	GC/MS	Τύπος SPME, $V_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu}, C_{NaCl}, T, t_{\epsilon\kappa\chi}, L$ .	Όχι	[17]
34 πτητικές ενώσεις: αλκοόλες, οξέα, εστέρες, τερπένια, κ.ά.	Οίνοι/ Bläufrankisch	PDMS 100 μm	HS-SPME	GC/MS	Τύπος SPME, είδος ίνας.	Όχι	[216]
10 πτητικές ενώσεις: αλκοόλες, οξέα, εστέρες, φαινόλες, ιονόνη	Συνθετικοί οίνοι	Carbowax/DVB 65 μm	HS-SPME	GC/MS	$EtOH\%, t_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\chi}$ .	Όχι	[204]
30 πτητικές ενώσεις	Οίνοι/ Grenache	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Flex	HS-SPME	GC/FID/O <sup>a</sup>	Είδος ίνας, $V_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu}, C_{NaCl}, t_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\chi}$ .	Όχι	[219]
9 πτητικές ενώσεις: τερπένια, αλειφ. αλκοόλες, εστέρες	Οίνοι/ Arinto, Bical, Cerceal, Maria Gomes	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	HS-SPME	GC/FID	$V_{\delta\epsilon\iota\gamma\mu}, C_{NaCl}, T, t_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\chi}$ .	Όχι	[220]
59 πτητικές ενώσεις	Οίνοι/ Ruché, Brachetto, Malvasia, Pinot grigio, Pinot noir, Nebbiolo, Merlot, Croatina, Cabernet Aosta Cabernet Piemonte	PDMS/DVB 65 μm	HS-SPME	GC/ITMS	Είδος ίνας	Όχι	[7]
19 πτητικές ενώσεις: αλκοόλες, οξέα, εστέρες, λιναλόλη	Συνθετικοί οίνοι, οίνος	OH-TSO-BMA-DVB	HS-SPME	GC/FID	Κατασκευή νέας ίνας, $T_{\epsilon\kappa\chi}, t_{\epsilon\kappa\chi}, C_{NaCl}, EtOH\%, pH$ .	Ναι	[222]
64 πτητικές ενώσεις: αλκοόλες, οξέα, εστέρες, τερπένια, νορισοπρενοειδή	Οίνοι/ Loureiro, Alvarinho, Antão Vaz, Arinto, Fernão, Pires, Sauvignon Blanc, Verdelho, Viosinho	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	HS-SPME	GC/ITMS	Είδος ίνας, $t_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\chi}, C_{NaCl}, t_{\epsilon\kappa\chi}$ .	Ναι	[230]
34 πτητικές ενώσεις	Οίνοι/ Chardonnay	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	HS-SPME	GC/FID <sup>1</sup>	Είδος ίνας, περιβάλλον $N_2$ , $t_{\epsilon\kappa\chi}$ , συνθήκες εισαγωγέα	Όχι	[221]
17 πτητικές ενώσεις	Ice wines	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	HS-SPME	GC/TOFMS	Τύπος SPME, είδος ίνας, $pH, C_{NaCl}, T, t_{\epsilon\kappa\chi}, T_{\epsilon\kappa\chi}, t_{\epsilon\kappa\rho}, T_{\epsilon\kappa\rho}$ ,	Όχι	[223]

Πίνακας 2.5 (συνέχεια)

Αναλύτες	Δείγματα/Ποικιλίες	Ίνα SPME	Τύπος SPME	Ανίχνευση	Παράμετροι βελτιστοποίησης	Επικύρωση SPME μεθόδου	Αναφορά
360 πτητικές ενώσεις	Οίνοι/ Cabernet Sauvignon	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Flex	HS-SPME	GCxGC/TOF MS	Είδος ίνας, $t_{\text{εξισ.}}$ , $C_{\text{NaCl}}$ , $\tau$ , $t_{\text{εκχ.}}$ , $t_{\text{εκρ.}}$ , $T_{\text{εκρ.}}$	Όχι	[224]
61 πτητικές ενώσεις : εστέρες, αλκοόλες, τερπένια, κ.ά.	Οίνοι/ λευκοί τοπικοί ελληνικοί	PDMS 100 μm	HS-SPME	GC/MS	Τύπος SPME, είδος ίνας, $C_{\text{NaCl}}$ , $t_{\text{εκχ.}}$ , $T_{\text{εκχ.}}$	Όχι	[225]
49 πτητικές ενώσεις: εστέρες, οξέα, αλκοόλες, τερπένια, πτητ. φαινόλες κ.ά	Οίνοι/ λευκός εμπορικός, ερυθρός Tempranillo	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Flex	HS-SPME	GC/FID	Είδος ίνας, $t_{\text{εκχ.}}$ , $T_{\text{εκχ.}}$	Ναι	[226]
51 πτητικές ενώσεις	Οίνοι/ερυθροί τοπικοί ισπανικοί	PDMS 100 μm	DI-SPME	GC/MS	Τύπος SPME, $t_{\text{εκχ.}}$ , $C_{\text{NaCl}}$ , $T$ .	<sup>β</sup> Ναι	[227]
7 τερπένια, 3 νορισοπρενοειδή	Οίνοι, γλεύκη/ Boal, Malvazia, Sercial και Verdelho	PA 85 μm	HS-SPME	GC/MS	Είδος ίνας, $C_{\text{NaCl}}$ , EtOH%, pH, $t_{\text{εκχ.}}$ , $T_{\text{εκχ.}}$ , $t_{\text{εκρ.}}$ , $T_{\text{εκρ.}}$	Ναι	[228]
32 πτητικές ενώσεις: εστέρες, πτητ. φαινόλες, αδεΐδες, αλκοόλες, τερπένια, νορισοπρενοειδή	Οίνοι/ ερυθροί Mencia	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	HS-SPME	GC/ITMS	Είδος ίνας, $V_{\text{δείγμ.}}$ , $C_{\text{NaCl}}$ , $T_{\text{εκχ.}}$	Ναι	[107]
27 πτητικές ενώσεις (φυτικό εκχύλισμα) 10 πτητικές ενώσεις (οίνοι)	Οίνοι, φυτικό εκχύλισμα/ Cabernet Sauvignon	PDMS 100 μm	HS-SPME	GC/MS	Είδος ίνας, $t_{\text{εκχ.}}$ , $T_{\text{εκχ.}}$ -εκχυλιστικός δ/της για φλοιούς	<sup>γ</sup> Ναι	[231]
100 πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις : τερπένια, σεσκιτερπένια, αλκοόλες, οξέα, νορισοπρενοειδή, και καρβονυλικές ενώσεις	Σταφύλια, φλοιοί, γλεύκη/Bual, Bastardo	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm	HS-SPME	GC/MS	Είδος ίνας, $V_{\text{δείγμ.}}$ , $C_{\text{NaCl}}$ , $t_{\text{εκχ.}}$ , $T_{\text{εκχ.}}$ , ποσότητα δείγματος, αραιώση δείγματος	Όχι	[232]
12 πτητικές ενώσεις: τερπένια, βενζολικά παράγωγα, κ.ά	Οίνοι/γερμανικοί οίνοι	PA 85 μm	HS-SPME	GC/MS	-	Ναι	[21]

\*Όπου:  $V_{\text{δείγμ.}}$  : όγκος δείγματος, **EtOH%** : περιεκτικότητα αιθανόλης (% v/v),  $C_{\text{NaCl}}$  : συγκέντρωση άλατος (NaCl) ( $\text{mole L}^{-1}$ ),  $\tau$  : ταχύτητα περιστροφής της μαγνητικής ράβδου (rpm),  $t_{\text{εξισ.}}$  : χρόνος εξισορρόπησης (min),  $t_{\text{εκχ.}}$  : χρόνος εκχύλισης (min),  $T_{\text{εκχ.}}$  : θερμοκρασία εκχύλισης ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $t_{\text{εκρ.}}$  : χρόνος εκρόφησης (min),  $T_{\text{εκρ.}}$  : θερμοκρασία εισαγωγέα ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $L$  : διάμετρος εισαγωγέα (liner) (mm).

a: Olfactometry (Οσφρητική ανάλυση), β : η επικύρωση αφορούσε 5 τερπενικές ενώσεις , γ : η επικύρωση αφορούσε μόνο τη μικροεκχύλιση στο φυτικό εκχύλισμα

### 2.3.2 Σύγκριση SPME με άλλες τεχνικές

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές, όπου η τεχνική SPME έχει συγκριθεί με άλλες τεχνικές διαχωρισμού για την απομόνωση πτητικών ενώσεων από οίνους.

Στη μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων, η σύγκριση αφορά τη LLE. Αρχικά, το 1998, οι De la Calle και συνεργάτες [213] συνέκριναν τις τεχνικές DI-SPME, HS-SPME και MHE/SPME (Multi Head Space SPME) για την εκχύλιση 10 τερπενικών ενώσεων από αρωματικούς οίνους, με την εκχύλιση υγρού-υγρού. Με κριτήριο το αναλυτικό σήμα των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε GC/MS, συμπέρασμα της έρευνας ήταν ότι οι πιο κατάλληλες τεχνικές ήταν οι DI-SPME και HS-SPME, ενώ η MHE/SPME προτάθηκε ως εναλλακτική τεχνική. Οι ίδιοι, συνέκριναν επίσης τις μεθόδους DI-SPME, HS-SPME και εκχύλιση υγρού-υγρού με Kaltron (Freon 113), και κατέληξαν ότι η HS-SPME ήταν η πιο κατάλληλη τεχνική για την ποσοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών των οίνων [17]. Τις τεχνικές SPME εμβάπτισης και υπερκείμενου χώρου και τη μέθοδο εκχύλισης με διαλύτη συνέκριναν επίσης οι Vas και συνεργάτες [216], για την απομόνωση πτητικών ενώσεων (αλκοολών, εστέρων λιπαρών οξέων και τερπενίων) από οίνους. Οι συγγραφείς, με κριτήριο την ταχύτητα της ανάλυσης και το πλήθος των χρωματογραφικών κορυφών, κατέληξαν ότι η μέθοδος HS-SPME εξασφάλιζε καλύτερα αποτελέσματα. Παρόμοια, οι Bonino και συνεργάτες [7], συγκρίνοντας ένα πρωτόκολλο HS-SPME με ένα πρωτόκολλο LLE με διχλωρομεθάνιο, για την εκχύλιση 27 επιλεγμένων πτητικών ενώσεων από συνθετικά διαλύματα, παρατήρησαν ότι η τεχνική SPME επέτρεπε την ανίχνευση αρωματικών συστατικών που ήταν μη ανιχνεύσιμα με την συμβατική εκχύλιση υγρού-υγρού. Η ερευνητική ομάδα των Peña και συνεργάτες [233] συνέκρινε μια μέθοδο SPME με μια μέθοδο εκχύλισης υγρού-υγρού υποβοηθούμενης από υπερήχους (Ultra Sound Assisted Extraction, UAE) για την εκχύλιση μονοτερπενίων από ερυθρούς οίνους. Η εφαρμογή και των δύο μεθόδων έδειξε ότι, η UAE πετύχαινε καλύτερη εκχύλιση των μονοτερπενικών συστατικών από την SPME, ωστόσο η δεύτερη μέθοδος προτάθηκε ως ελκυστική εναλλακτική τεχνική, εξαιτίας της

μεγαλύτερης ταχύτητας, των χαμηλών απαιτήσεων σε ποσότητα δείγματος και της αποφυγής χρήσης οργανικών διαλυτών.

Οι Bolscheid και συνεργάτες [234] συνέκριναν, για την εκχύλιση δευτερογενών αρωματικών συστατικών από οίνους, μία μέθοδο HS-SPME με χρήση ίνας PA, και μία μέθοδο SPE με χρήση ρητίνης Amberlite XAD-2. Διαπιστώθηκε ότι οι δύο τεχνικές διέθεταν παρόμοια ποιοτικά χαρακτηριστικά (ορθότητα, πιστότητα, ανιχνευσιμότητα) και τα αποτελέσματα από την εφαρμογή τους για την ανάλυση ενός οίνου Riesling με GC/FID δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρά ταύτα, η τεχνική SPME προτιμήθηκε καθώς ήταν ταχύτερη με το επιπλέον θετικό ότι δεν απαιτούσε διαλύτες.

Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη τους οι Gamero και συνεργάτες [235] αξιολογώντας 5 τεχνικές εκχύλισης (HS-SPME, DI-SPME, headspace (HS), headspace solid-phase dynamic extraction (HS-SPDE), stir bar sorptive extraction (SBSE), και monolithic material sorptive extraction (MMSE)) σε συνδυασμό με GC/MS ως προς την ευαισθησία τους για την ανίχνευση αρωματικών συστατικών πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων, σε μικρού όγκου (3 mL) δείγματα οίνων, διαπίστωσαν ότι η τεχνική DI-SPME επέδειξε την καλύτερη επίδοση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ανάμεσα σε όλες τις προαναφερόμενες μεθόδους, η DI-SPME πέτυχε τόσο την ανίχνευση του υψηλότερου ποσοστού ενώσεων από το σύνολο των αρωματικών συστατικών δείγματος οίνου όσο και την ανίχνευση του υψηλότερου ποσοστού των αρωματικών συστατικών που βρίσκονταν στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (της τάξης των  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Την DI-SPME ακολουθούσαν σε ευαισθησία οι τεχνικές SBSE και MMSE. Η τεχνική HS-SPME ήταν λιγότερο ευαίσθητη αλλά θεωρήθηκε αρκετά ικανή να ανιχνεύσει τα περισσότερα πτητικά συστατικά που υπήρχαν σε πολύ αρωματικούς οίνους, ενώ οι τεχνικές HS και HS-SPDE ήταν λιγότερο αποτελεσματικές.





## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΥΛΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Οινοποιήσεις και δείγματα

##### 3.1.1 Οινοποιήσεις και δείγματα οίνων

Για την ανάπτυξη και εφαρμογή των μεθόδων που πραγματεύεται η παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν μονοποικιλιακοί λευκοί οίνοι από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες αμπέλου *Vitis vinifera*. Οι οινοποιήσεις σε όλες τις περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκαν στο πειραματικό οινοποιείο του Ινστιτούτου Οίνου Αθηνών (ΕΛ.Γ.Ο.- ΔΗΜΗΤΡΑ), κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, στα πλαίσια προγράμματος δημιουργίας κοινοτικής τράπεζας δεδομένων, για τον έλεγχο της νοθείας των αμπελοοινικών προϊόντων με ζάχαρη, με τη μέθοδο Martin (Καν. ΕΟΚ 2347/91 και 2348/91).

Τα σταφύλια προήρθαν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 3.1) και μεταφέρθηκαν σε χάρτινα κιβώτια στο οινοποιείο. Η συγκομιδή ήταν μικρών ποσοτήτων, περίπου 10 Kg για κάθε περίπτωση, και έγινε χειρωνακτικά.

Αμέσως μετά την παραλαβή τους, τα σταφύλια ελέγχθηκαν για την υγιεινή τους κατάσταση, και οδηγήθηκαν για έκθλιψη στο σπαστήρα. Ακολούθησε πίεση του σταφυλοπολτού σε ξύλινο χειρωνακτικό πιεστήριο (στροφιλιά). Τα γλεύκη θειώθηκαν (80 mg θειώδους ανυδρίτη ανά λίτρο γλεύκους) προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος παρακαταθήκης θειώδους ανυδρίτη SO<sub>2</sub> (6 % (m/v)), τοποθετήθηκαν σε γυάλινες δεξαμενές και παρέμειναν για 24 ώρες στους 4 °C, απουσία φωτός. Μετά την απομάκρυνση των οινολασπών, τα διευγασμένα γλεύκη εμβολιάσθηκαν με στελέχη ξηρής ζύμης *Saccharomyces Cerevisiae* (var *oviformis* κοινή οινολογική ονομασία *bayanus*) με την εμπορική ονομασία Blastosel VS (Perdomini, Martino Buon Albergo, Ιταλία) σε συγκέντρωση 0,20 g ανά λίτρο γλεύκους και με θρεπτικά υλικά Go-Ferm (Lallemand, Γαλλία) σε συγκέντρωση 0,30 g L<sup>-1</sup> και Fermaid E (Lallemand, Γαλλία) σε συγκέντρωση

0,35 g L<sup>-1</sup>. Τα εμβόλια παρασκευάστηκαν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ξηρής ζύμης σε ~30 mL γλεύκους, στους 35–37 °C, υπό ανάδευση στην αρχή, για συνολικό χρόνο περίπου 20 min.

**Πίνακας 3.1: Δείγματα σταφυλιών *Vitis vinifera*, εσοδείας 2010, που οινοποιήθηκαν. Συνώνυμα και περιοχές καλλιέργειας των ελληνικών ποικιλιών\***

	Ποικιλία	Νομός προέλευσης	Ημ/νία Τρυγητού	ΔΑΤ	Κατηγ. Οίνου	Συνώνυμα ποικιλίας	Περιοχές καλλιέργειας
ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ	Θρασαθήρι	Ηρακλείου	17/08/10	10,7	Τοπικός		Ν. Σητείας, Ν. Ηρακλείου νησιά Β. Αιγαίου, Σιθωνεία (Χαλκιδική)
	Μονεμβασιά	Λακωνίας	02/09/10	11,4	Τοπικός	Αρτεμίσι, Μονεμβασιάτικο, Μονοβασια, Μονεμβασίτικο, Κλωσσαριά	Εύβοια, νησιά Αιγαίου, Πάρος, Ίος, Σίκινος, Κυκλάδες, Λακωνία, Μακεδονία
	Μαλαγουζιά (1)	Χαλκιδικής	06/09/10	13,7	Τοπικός		Αιτωλοακαρνανία, Αχαΐα, Ν. Θεσ/νίκης (Μακεδονία)
	Μαλαγουζιά (2)	Ευβοίας	06/09/10	15,1	Τοπικός		
	Μαλαγουζιά (3)	Θεσ/νίκης	07/09/10	9,8	Τοπικός		
	Μπατίκι	Λάρισας	10/09/10	11,3		Ντεμπατίκι, Τιμπι-μπατίκι, Ντεβε-μπατίκι	Θεσσαλία, Μακεδονία, Εύβοια, Ν. Πιερίας, Ν. Καστοριάς, Ν. Γρεβενών, Ν. Δράμας, Ν. Θεσ/νίκης, Ν. Έβρου (Θράκη)
	Ασύρτικο	Κιλκίς	08/09/10	13,4	Τοπικός		Κυκλάδες, Σαντορίνη Ανάφη, Μήλος, Νάξος, Χαλκιδική
	Κυδωνίτσα	Λακωνίας	15/09/10	11,8			Λακωνία
	Σκιαδόπουλο	Ζακύνθου	18/09/10	11,6	Επιτραπέζιος	Ζαχάρα, Ζακυνθινό, Ζαχάρο	Ζάκυνθος (Ιόνιοι νήσοι), Ηλεία, Αιτωλοακαρνανία
	Φιλέρι	Ηλείας	20/09/10	13,7	Τοπικός	Φιλέρι μαύρο, Μαυροφίλερο, Φιλέρι κόκκινο	Αρκαδία, Δ/κή. Πελλήσος, Ζάκυνθος, Λευκάδα (Ιόνιοι νήσοι), Ηλεία, Μεσσηνία, Λακωνία

	Ποικιλία	Νομός προέλευσης	Ημ/νία Τρυγητού	ΔΑΤ	Κατηγ. Οίνου	Συνώνυμα ποικιλίας	Περιοχές καλλιέργειας
<b>ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ</b>	Ροδίτης	Μεσσηνίας	20/09/10	12,6	Τοπικός	Κοκκινάρα, Ροδίτης, Κοκκινοστάφυλο, Κανελλάτο, Λιτσισίνες, Σουρμπιώτης, Μουργαλεπού, Μούργα, Ροδομούσι, Σακκοροδίτης, Βιολέντο, Αλεπού	Β. Πελονησος, Θεσσαλία, Εύβοια, Κυκλάδες, Αττική, Βοιωτία
	Σαββατιανό	Αργολίδας	23/09/10	12,4		Σταματιανό, Σαββαθιανό, Περαχωρίτης, Κοντούρα άσπρη ή λευκή, Περαχωρίτικο, Ντούμπραινα άσπρη ή λευκή, Ντόμπραινα	Κυρίως Αττική, Βοιωτία, Εύβοια, Κυκλάδες (Πάρος), Ν. Φωκίδας, Ν. Φθιώτιδας, Σάμος, Αιτωλοακαρνανία, Πελονησος, Θεσσαλία, Κεντρ. Μακεδονία, Ανατολ. Μακεδονία, Θράκη Δυτ. Κρήτη, Δυτ. Κυκλάδες
	Μοσχοφίλερο (1)	Αρκαδίας	09/10/10	11,6	ΟΠΑΠ	Φιλέρι Μοσχάτο, Μοσχόφλερο	Ν. Αρκαδίας, Ν. Ηλείας
	Μοσχοφίλερο (2)	Αρκαδίας	06/10/10	11,8	Τοπικός		
<b>ΞΕΝΙΚΕΣ</b>	Μοσχάτο Αμβούργου	Μαγνησίας	24/09/10	12,4		Μοσχάτο μαύρο, Μαύρο Αμβούργου, Μαύρο Μοσχάτο, Μυρωδάτο, Μυρωδάτο πρώιμο, Μαύρο Αλεξανδρείας,	Κυρίως σε Τύρναβο και Αμπελώνα (Θεσσαλία), Θεσ/νική (Μακεδονία), Θράκη
	Sauvignon Blanc	Λάρισας	27/08/10	12,4			
	Gewürztraminer (1)	Αρκαδίας	02/09/10	11,9	Τοπικός		
	Gewürztraminer (2)	Φλώρινας	08/09/10	12,4	Τοπικός		
	Sauvignon Blanc	Φλώρινας	08/09/10	12,8	Τοπικός		

\*Πληροφορίες από *Greek Vitis Database*: Ελληνικός Αμπελογραφικός Άτλας (<http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/index.htm>).

Οι αλκοολικές ζυμώσεις, έλαβαν χώρα σε γυάλινες δεξαμενές σε θερμοστατούμενο χώρο, στους 18 °C. Μετά το πέρας της ζύμωσης, οι νέοι οίνοι θειώθηκαν (60 mg θειώδους ανυδρίτη L<sup>-1</sup>), και μεταγγίσθηκαν, για διαύγαση, σε γυάλινες φιάλες, στους 4 °C. Οι διευγασμένοι οίνοι τοποθετήθηκαν, για τρυγική σταθεροποίηση, στους - 4 °C στη συνέχεια εμφιαλώθηκαν σε γυάλινες φιάλες των 0,75 L και φυλάχθηκαν στους 12 °C.

### 3.1.2 «Τυφλά» δείγματα οίνων

Για τη συγκριτική μελέτη των μικροστηλών SPE ως προς την ικανότητα εκχύλισης των ελεύθερων αρωματικών συστατικών, και για τις δοκιμές επικύρωσης των μεθόδων, ως «τυφλός» οίνος χρησιμοποιήθηκε νέος, λευκός οίνος από σταφύλια της ποικιλίας *Σαββατιανό*, καλλιεργημένης στην περιοχή της νήσου Ευβοίας, εσοδείας 2010. Η συγκεκριμένη ποικιλία επιλέχθηκε γιατί είναι ιδιαίτερα φτωχή σε πρωτογενή πτητικά συστατικά.

Για τη συγκριτική μελέτη των μικροστηλών SPE ως προς την επίδοσή τους για το δεσμευμένο κλάσμα, χρησιμοποιήθηκε λευκός, αρωματικός οίνος από την ποικιλία *Μοσχαρδίνια*, καλλιεργημένης στη νήσο της Ζακύνθου, εσοδείας 2008. Η συγκεκριμένη ποικιλία επιλέχθηκε γιατί οι οίνοι της είναι πλούσιοι σε πρόδρομες αρωματικές ενώσεις.

## 3.2 Μεθοδολογία SPE-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους.

### 3.2.1 Αρχή μεθόδου

Αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο κατεργασίας δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) σε συνδυασμό με αεριοχρωματογραφία–φασματομετρία μαζών (GC/MS) και δοκιμάστηκε για την απομόνωση, το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 21 σημαντικών συστατικών του πρωτογενούς αρώματος από λευκούς οίνους. Οι οίνοι υπόκειντο σε κατεργασία με SPE, οι ελεύθερες πτητικές (υδρόφοβες) αρωματικές ενώσεις (ή **πτητικό κλάσμα**) εκλούονταν πρώτες, με διχλωρομεθάνιο, και προσδιορίζονταν άμεσα με GC/MS, ενώ οι πρόδρομες (υδρόφιλες) αρωματικές ενώσεις (ή **δεσμευμένο κλάσμα**) εκλούονταν στη συνέχεια, με μεθανόλη, υφίσταντο ενζυμική υδρόλυση για την απελευθέρωση του άγλυκου

τμήματος, και τα αποδεσμευμένα πτητικά συστατικά ανιχνεύονταν στη συνέχεια με GC/MS.

### 3.2.2 Σύνοψη πειραματικών δοκιμών

Αρχικά, ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των 21 αναλυτών και δημιουργήθηκε μέθοδος ανίχνευσης μεμονωμένων αντιδράσεων (SIM) για την αύξηση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας της ανάλυσης GC/MS. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις προτύπων σε διαλύτη, εκχυλισμάτων αρωματικών οίνων και εκχυλισμάτων εμβολιασμένων με πρότυπα οίνων με GC/MS. Σε σχέση με τη μεθοδολογία αναφοράς [168], πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειράματα για την επιλογή εσωτερικού προτύπου (με χρήση οκτανόλης-2 αντί οκτανόλης-1), και δοκιμάστηκε αύξηση του βαθμού συμπύκνωσης.

Για τη **βελτιστοποίηση** της κατεργασίας με SPE, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη μεταξύ επτά εμπορικά διαθέσιμων τύπων μικροστηλών, με διαφορετικά πληρωτικά υλικά. Οι μικροστήλες αξιολογήθηκαν για την απόδοσή τους τόσο στο πτητικό όσο και στο δεσμευμένο κλάσμα. Για το πτητικό κλάσμα, η επίδοση κάθε μικροστήλης εκτιμήθηκε από την σύγκριση του σχετικού εμβαδού των αναλυτών αναφορικά με τα πρότυπα σε διαλύτη ή σε προσομοιωτή οίνου. Για το δεσμευμένο κλάσμα (για το οποίο δεν διατίθενται εμπορικά πρότυπες ενώσεις), η επίδοση εκτιμήθηκε από το σχετικό εμβαδόν των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η **επίδραση του υποστρώματος (matrix effect)** στην ανάκτηση του σήματος μετά από κατεργασία οίνων με SPE.

Με χρήση του επιλεγμένου τύπου SPE μικροστήλης (Isolute ENV+) ακολούθησαν δοκιμές για την **επικύρωση** της μεθοδολογίας SPE-GC/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 21 ελεύθερων, πτητικών συστατικών σε λευκούς οίνους σύμφωνα με τις επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων [236-238]. Τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν αφορούσαν την εκλεκτικότητα, τη γραμμικότητα, την ανιχνευσιμότητα (όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης), την πιστότητα (επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα), την ορθότητα (ανάκτηση) και την αβεβαιότητα.

Στη συνέχεια, η μέθοδος **εφαρμόστηκε** για την ανάλυση είκοσι μονοποικιλιακών οίνων διαφόρων ελληνικών και διεθνών ποικιλιών (Πίνακας 3.1).

### 3.2.3 Πρότυπες ουσίες, διαλύτες και αντιδραστήρια

#### A. Πρότυπες ουσίες

- Εξανόλη-1, καθαρότητας *purum*, PolyScience (Ιλλινόι, Η.Π.Α).
- *cis*- 3-εξενόλη, καθαρότητας 98%, Sigma-Aldrich, (Αγγλία).
- *trans*- 3-εξενόλη, καθαρότητας 98%, Sigma-Aldrich,( Αγγλία).
- Λιναλοόλη, καθαρότητας  $\geq 97\%$ , Merck (Γερμανία).
- Κιτρονελλόλη καθαρότητας  $\geq 98\%$ , Merck, (Γερμανία).
- $\alpha$ -Τερπινεόλη, καθαρότητας  $\geq 98\%$ , Merck, (Γερμανία).
- Νερόλη, καθαρότητας 97%, Sigma-Aldrich, (Γερμανία).
- Γερανιόλη, καθαρότητας *purum*, Fluka, (Ελβετία).
- $\beta$ -ιονόνη, καθαρότητας 96%, Sigma-Aldrich, (Αγγλία).
- $\alpha$ -ιονόνη, καθαρότητας 90%, Sigma-Aldrich, (Αγγλία).
- (-) -Rose οξειδίο, καθαρότητας  $\geq 99\%$ , Merck, (Γερμανία).
- Οξειδίο λιναλοόλης καθαρότητας  $\geq 97\%$ , Fluka, (Ιαπωνία).
- Γερανικό οξύ, CAS 459-80-3, Alfa Aesar, (Γερμανία).
- Κιτράλη, καθαρότητας 95%, Sigma-Aldrich, (Αγγλία).
- Δαμασκηνόνη, 1,1-1,3 wt %, σε αιθανόλη, SΛFC, (Η.Π.Α.).
- Βενζυλική αλκοόλη, άνυδρη, καθαρότητας 99,8%, Sigma-Aldrich, (Γερμανία).
- Φαινυλαιθυλική αλκοόλη, 99+%, Sigma-Aldrich, (Γερμανία).
- Βανιλίνη, καθαρότητας 99%, Panreac, (Ισπανία).
- Οκτανόλη-1, καθαρότητας  $\geq 99,5\%$ , Fluka, (Ελβετία).
- Οκτανόλη-2, καθαρότητας 97%, Acros, (Η.Π.Α.).



## B. Διαλύτες και αντιδραστήρια

Μεθανόλη (καθαρότητας HPLC) και απόλυτη αιθυλική αλκοόλη από την εταιρεία Panreac (Βερκελώνη, Ισπανία), διχλωρομεθάνιο (καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich, Γερμανία), άνυδρο θειικό νάτριο (καθαρότητας >99%) και διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0,1 N, από την εταιρεία Panreac, L(+)-μονοϋδρικό τρυγικό οξύ (καθαρότητας 99,5%) από την εταιρεία Riedel de Haën (Γερμανία), δωδεκαϋδρικό μονόξινο φωσφορικό νάτριο (καθαρότητας >99%) από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Πηκτινολυτικό ένζυμο με β-γλυκοζιτική δράση Lallzyme BETA από την εταιρεία Lallemand (Γαλλία).

### 3.2.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Οι επτά εμπορικά διαθέσιμες μικροστήλες, που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή του βέλτιστου πληρωτικού υλικού, παρατίθενται στον Πίνακα 3.2. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες με τροποποιημένο πυριτικό υλικό και πέντε στήλες με πολυμερή πληρωτικά υλικά.

Πίνακας 3.2: Μικροστήλες SPE που μελετήθηκαν

Εμπορική ονομασία	Δομή	Διάμετρος πόρων (Å)	Διάμετρος σωματιδίων (μm)	Εμβαδόν επιφάνειας (m <sup>2</sup> /g)	Προμηθευτής
Resprep C18, 1000 mg, 6 mL	πυριτικό, C18	α	α	α	<sup>β</sup> Restek
LiChrolut RP18, 200mg, 3 mL	πυριτικό, C18	α	40-63	α	<sup>γ</sup> Merck
Oasis HLB, 200mg, 6 mL	PVP-DVB	73-89	30	804	<sup>δ</sup> Waters
Oasis MAX, 150 mg, 6 mL	PVP-DVB-DMBA	73-89	30	804	Waters
Isolute ENV+, 200 mg, 3 mL	<sup>ζ</sup> PS-DVB-OH	α	121	1000	<sup>ε</sup> Biotage
Isolute 101, 200 mg, 3 mL	PS-DVB	100	66	500	Biotage
PK54 XAD-2, Purified 300 mg, 3 mL,	PS-DVB	20-60	90	334	<sup>στ</sup> Supelco-Sigma-Aldrich

<sup>α</sup>: δεν διατίθενται στοιχεία, DMBA: διμεθυλο-βουτυλαμίνη, <sup>β</sup>Restek: PA, USA, <sup>γ</sup>Merck: Darmstadt, Germany, <sup>δ</sup>Waters: Milford, MA, USA, <sup>ε</sup>Biotage: Uppsala, Sweden, <sup>στ</sup>Supelco-Sigma-Aldrich: PA, USA  
<sup>ζ</sup>: αυξημένος βαθμός διακλαδώσεων

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι :

- Συσκευή Εκχύλισης Στερεάς Φάσης, υπό κενό, 12 θέσεων (Restek, Η.Π.Α.).
- Περιστροφικός εξατμιστής κενού, Rotavapor μοντέλο R-205 (Büchi, Ελβετία).
- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου ύδατος, μοντέλο Milli-Q (Millipore, Η.Π.Α.)
- Αναλυτικός ζυγός, με ακρίβεια ζύγισης  $\pm 0,1$  mg, μοντέλο BP 2105 (Sartorius, Γερμανία).
- Πεχάμετρο μοντέλο Basic 20 (Crison, Βαρκελώνη, Ισπανία), με ηλεκτρόδιο υάλου.
- Επιτραπέζιος κλίβανος υγρής αποστείρωσης, μοντέλο 38050 M, (Tuttnauer, Ισραήλ).
- Υάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη, και ένθετα 250  $\mu\text{L}$  (Agilent Technologies, Η.Π.Α.)
- Υάλινες μικροσύριγγες 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  και 250  $\mu\text{L}$  (Hamilton, Ελβετία).
- Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου, 9 θέσεων μοντέλο L1270, (Link Instruments, Η.Π.Α.).
- Ηλεκτρική θερμαντική εστία με ικανότητα μαγνητικής ανάδευσης, μοντέλο MR Hei-Standard, (Heidolph, Γερμανία)

### 3.2.5 Παρασκευή και έλεγχος σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων

Αρχικά, με ζύγιση των προτύπων ουσιών, παρασκευάσθηκε **πυκνό πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης** ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) μίγματος όλων των αναλυτών σε μεθανόλη, το οποίο αποθηκεύθηκε σε γυάλινη σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Από το πυκνό πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης παρασκευάσθηκαν, με κατάλληλη αραιώση, δύο ενδιάμεσα μεθανολικά διαλύματα παρακαταθήκης μίγματος όλων των αναλυτών ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  και  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) και ένα διάλυμα παρακαταθήκης ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) μίγματος όλων των αναλυτών σε διχλωρομεθάνιο, τα οποία αποθηκεύθηκαν στους  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Με ζύγιση της πρότυπης ουσίας παρασκευάστηκε **πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου** (οκτανόλη-2) σε μεθανόλη ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ). Επίσης, με ζύγιση της πρότυπης ουσίας παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου οκτανόλης-2 ( $133 \text{ mg L}^{-1}$  και  $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε διχλωρομεθάνιο. Όλα τα παραπάνω αποθηκεύθηκαν στους  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Ως **προσομοιωτής οίνου** χρησιμοποιήθηκε συνθετικός οίνος. Για την παρασκευή του, σε ποτήρι ζέσεως των  $100 \text{ mL}$  μεταφέρθηκαν  $0,30 \text{ g}$  τρυγικού οξέος,  $14,0 \text{ mL}$  απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης και  $70 \text{ mL}$  υπερκάθαρου ύδατος. Έγινε ρύθμιση του pH σε  $3,2$  με προσθήκη σταγόνων διαλύματος  $\text{NaOH } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$  και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των  $100 \text{ mL}$  όπου έγινε πλήρωση με υπερκάθαρο ύδωρ ως τη χαραγή.

Παρασκευάστηκαν **πρότυπα διαλύματα εργασίας** μίγματος όλων των **αναλυτών σε διαλύτη** διχλωρομεθάνιο σε 8 επίπεδα συγκεντρώσεων ( $0, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0$  και  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) που περιείχαν το εσωτερικό πρότυπο σε σταθερή συγκέντρωση  $13,3 \text{ mg L}^{-1}$ . Η παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας, πραγματοποιήθηκε με αραιώση του πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης μίγματος όλων των αναλυτών σε διχλωρομεθάνιο, και προσθήκη κατάλληλων όγκων του πυκνού διαλύματος παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου σε διχλωρομεθάνιο.

Η σταθερότητα των παραπάνω προτύπων διαλυμάτων εργασίας των αναλυτών σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, ελέγχθηκε με την περιοδική ανάλυση σε GC/MS (σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παρ 3.2.7) ενός πιο αραιού ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) και ενός πιο πυκνού ( $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) προτύπου διαλύματος εργασίας για χρονική περίοδο 2 μηνών. Για κάθε αναλύτη υπολογίσθηκε το σχετικό εμβαδόν της κορυφής και τα αποτελέσματα παρατίθενται με μορφή διαγράμματος στο Παράρτημα I της διατριβής (Σχήμα Π1).

Παρασκευάστηκαν **διαλύματα εργασίας** μίγματος όλων των **αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου**. Για το σκοπό αυτό, υποδείγματα «τυφλού» δείγματος οίνου φτωχού σε αρωματικά συστατικά (παρ. 3.1.2) όγκου  $25,0 \text{ mL}$

εμβολιάσθηκαν με κατάλληλους όγκους από τα ενδιάμεσα μεθανολικά διαλύματα παρακαταθήκης μίγματος όλων των αναλυτών ώστε να επιτευχθούν 8 επίπεδα συγκεντρώσεων (0, 10,0, 20,0 50,0, 100, 200, 500 και 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) και με 25  $\mu\text{L}$  διαλύματος παρακαταθήκης 133  $\text{mg L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου οκτανόλης-2 ( $C_{\text{TEΛ}}=133 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και κατεργάσθηκαν με SPE όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6 .

Για την παρασκευή **διαλυμάτων εργασίας** μίγματος όλων **των αναλυτών σε προσομοιωτή οίνου**, υποδείγματα 25,0 mL προσομοιωτή οίνου εμβολιάσθηκαν με κατάλληλους όγκους από τα ενδιάμεσα μεθανολικά διαλύματα παρακαταθήκης μίγματος όλων των αναλυτών ώστε να επιτευχθούν 8 επίπεδα συγκεντρώσεων (0, 10,0, 20,0, 50,0, 100, 200, 500 και 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) και με 25  $\mu\text{L}$  διαλύματος παρακαταθήκης 133  $\text{mg L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου οκτανόλης-2 ( $C_{\text{TEΛ}}=133 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και κατεργάσθηκαν με SPE όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6.

Τα διαλύματα εργασίας των αναλυτών, σε υπόστρωμα οίνου και σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου, παρασκευάζονταν πάντα αυθημερόν πριν τη GC/MS ανάλυση.

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών–φωσφορικών, αρχικά παρασκευάσθηκαν υδατικά διαλύματα 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  μονοϋδρικού κιτρικού οξέος και 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  δωδεκαϋδρικού μονόξινου φωσφορικού νατρίου. Έγινε ανάμιξη ίσων όγκων των δύο παραπάνω διαλυμάτων και ρύθμιση του pH σε τιμή 5,0 με προσθήκη σταγόνων του διαλύματος του δωδεκαϋδρικού μονόξινου φωσφορικού νατρίου. Για την αποφυγή επιμολύνσεων από μικροοργανισμούς, το ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, σε θερμοκρασία 120 °C, για 20 λεπτά.

### **3.2.6 Πρωτόκολλο κατεργασίας δείγματος οίνου**

Η κατεργασία των δειγμάτων με SPE πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο των Di Stefano και συνεργάτες [168] με ορισμένες τροποποιήσεις.

#### **3.2.6.1 Προκατεργασία δείγματος**

Σε γυάλινη κωνική φιάλη των 50 mL, μεταφέρονταν 25,0 mL φιλτραρισμένου, με διηθητικό χαρτί, δείγματος οίνου. Στο δείγμα γινόταν, προσθήκη όγκου 83

μL από το διάλυμα παρακαταθήκης  $40 \text{ mg L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου ( $C_{\text{τελική}}=133 \text{ μg L}^{-1}$ ) και 25,0 mL υπερκάθαρου ύδατος, έτσι ώστε το δείγμα να αραιωθεί και να μειωθεί ο αλκοολικός τίτλος. Μετά από ανάδευση, το μίγμα διερχόταν από ενεργοποιημένη ρητίνη (βήμα 3 κατεργασίας SPE), και ακολουθούσαν τα βήματα 4 και 5 όπως περιγράφονται ακολούθως (παρ. 3.2.6.2).

### 3.2.6.2 SPE

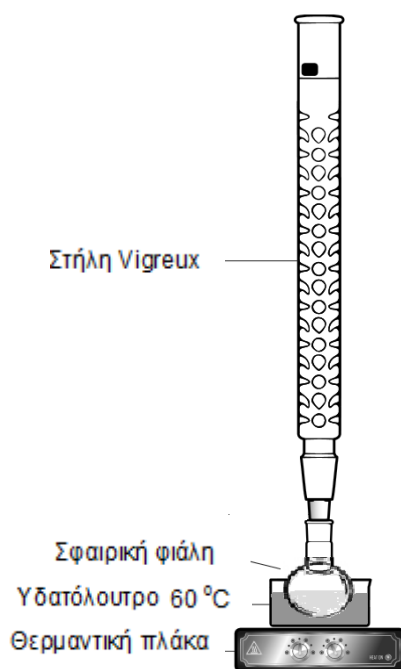
Οι στήλες τοποθετούνταν σε συσκευή που επιτρέπει την παράλληλη εκχύλιση 12 δειγμάτων με εφαρμογή κενού και ακολουθούσαν τα παρακάτω βήματα:

- 1) Ενεργοποίηση ρητίνης: Από τη ρητίνη διέρχονταν διαδοχικά 10 mL μεθανόλης και 20 mL υπερκάθαρου νερού.
- 2) Εισαγωγή δείγματος: Τα 50,0 mL του αραιωμένου δείγματος διέρχονταν μέσω της ρητίνης σε 15 min.
- 3) Έκπλυση ρητίνης: Για την απομάκρυνση των πολύ πολικών παρεμποδιστικών ουσιών (σακχάρων, οξέων, κλπ) η ρητίνη εκπλενόταν με 20 mL υπερκάθαρου νερού.
- 4) Παραλαβή πτητικού κλάσματος: Τα ελεύθερα αρωματικά συστατικά εκλούονταν με 35 mL διχλωρομεθανίου.
- 5) Παραλαβή δεσμευμένου κλάσματος πρόδρομων αρωματικών: Οι γλυκοζίτες μαζί με τα τριυδροξυλιωμένα τερπένια παραλαμβάνονταν με 30 mL μεθανόλης.

### 3.2.6.3 Κατεργασία πτητικού κλάσματος

Το πτητικό κλάσμα μεταφερόταν σε γυάλινη διαχωριστική χοάνη των 50 mL. Η υδατική φάση απορριπτόταν και η οργανική στοιβάδα συλλεγόταν. Τυχόν υπολείμματα υγρασίας αφαιρούνταν με προσθήκη 1,80 g άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Το διχλωρομεθάνιο απομακρυνόταν με ήπιο βρασμό στους 60-70 °C, σε συσκευή αποτελούμενη από εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη των 50 mL και κάθετη στήλη Vigreux (μήκους 46 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2 cm) (Σχήμα 3.1). Για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας, ο βρασμός πραγματοποιείτο σε υδατόλουτρο τοποθετημένο σε θερμαντική πλάκα (Σχήμα 3.1). Ο βρασμός συνεχιζόταν έως ότου το συμπύκνωμα να έχει όγκο ~1,2 mL. Η ποσότητα αυτή μεταφερόταν σε φιαλίδιο των 2 mL, το οποίο τοποθετούνταν σε συσκευή

εξάτμισης, και το εκχύλισμα συμπυκνωνόταν επιπλέον, έως τελικού όγκου 250  $\mu\text{L}$ , με διοχέτευση ήπιου ρεύματος αζώτου στον υπερκείμενο χώρο. Το τελικό συμπύκνωμα μεταφερόταν, με γυάλινη μικροσύριγγα (των 250  $\mu\text{L}$ ), σε ένθετο (insert) χωρητικότητας 250  $\mu\text{L}$ , τοποθετημένο σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη για περαιτέρω ανάλυση με GC/MS. Ο συνολικός συντελεστής συμπύκνωσης ήταν 100.



Σχήμα 3.1: Συμπύκνωση με στήλη Vigreux

#### 3.2.6.4 Κατεργασία δεσμευμένου κλάσματος

Στο κλάσμα των πρόδρομων αρωματικών ενώσεων γινόταν απομάκρυνση της μεθανόλης, υπό μειωμένη πίεση, σε θερμοκρασία 30 °C, σε συσκευή περιστροφικού εξατμιστή. Το υπόλειμμα επαναδιαλυόταν σε 3,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών – κιτρικών pH 5,0 και γινόταν προσθήκη μικρής ποσότητας (70,0 mg) πηκτινολυτικού ενζύμου με  $\beta$ -γλυκοζιτική δράση (Lallzyme BETA (Lallemand, St. Simon, Γαλλία)). Το μίγμα τοποθετούνταν σε θερμοστατούμενο θάλαμο, στους 37 °C, για 18 ώρες, έτσι ώστε να λάβει χώρα ενζυμική υδρόλυση. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη όγκου 83  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα παρακαταθήκης 40  $\text{mg L}^{-1}$  του εσωτερικού

προτύπου (οκτανόλης-2), και τα απελευθερωμένα από την υδρόλυση πτητικά συστατικά εκχυλίζονταν με 35 mL διχλωρομεθανίου.

Ακολουθούσε η ίδια αναλυτική διαδικασία με αυτήν του **πτητικού κλάσματος** (παράγραφος 3.2.6.3) έως τη μεταφορά του δείγματος για ανάλυση στο GC/MS.

### **3.2.7 Ανάλυση με GC/MS**

Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard μοντέλο HP 6890 N, συζευγμένο με φασματογράφο μάζας HP 5972 (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA). Οι πτητικές ενώσεις διαχωρίστηκαν σε τριχοειδή στήλη Innowax (crosslinked polyethylene glycol) διαστάσεων 25 m x 0.2 mm x 0.2 μm. Το φέρον αέριο ήταν ήλιον υψηλής καθαρότητας (He, 5.0), με πίεση 18 psi και ροή 1 mL min<sup>-1</sup>.

Η εισαγωγή του δείγματος, όγκου 2 μL, πραγματοποιήθηκε με αυτόματο δειγματολήπτη. Χρησιμοποιήθηκε γυάλινος εισαγωγέας με λειτουργία splitless/split (μη διαμοιρασμός για 1 min και ακολούθως διαμοιρασμός 1:50). Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του κλιβάνου είχε ως εξής: 60 °C για 5 min (ισόθερμα), στη συνέχεια ρυθμός αύξησης 1,5 °C/min έως τους 140 °C και κατόπιν ρυθμός αύξησης 3 °C/min έως τους 205 °C. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και της γραμμής μεταφοράς (transferline) των αναλυτών στον ανιχνευτή ήταν σταθερή στους 200 °C και 280 °C αντίστοιχα. Η ενέργεια των ηλεκτρονίων για τη θραυσματοποίηση των μορίων στο φασματογράφο μάζας ήταν 70 eV.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με σύγκριση των χρόνων ανάσχεσης και των σχετικών αφθονιών των ιόντων με τα αντίστοιχα των προτύπων ουσιών. Για την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου η ποσοτική ανάλυση έγινε με μέθοδο καταγραφής επιλεγμένων ιόντων (SIM). Τα στοιχεία της μεθόδου SIM και οι χρόνοι ανάσχεσης των αναλυτών (R<sub>t</sub>) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3

Πίνακας 3.3: Στοιχεία μεθόδου SIM

Αναλύτες	R <sub>t</sub> (min)	Ιόντα Ταυτοποίησης (m/z)	Ιόν ποσοτικ/ησης (m/z)
cis-rose οξείδιο	10,3	139, 154	139
εξανόλη-1	11,1	56, 43	56
trans-rose οξείδιο	11,8	139, 154	139
trans-3-εξεν-1-όλη	12,0	67, 55, 82	67
cis-3-εξεν-1-όλη	12,6	67, 55, 82	67
οκτανόλη-2*	14,8	45, 55	45
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	15,6	59, 94, 111	94
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	17,3	59, 94, 111	59
Λιναλοόλη	22,9	71, 93, 121	71
Νεράλη	30,7	84, 94, 152	84
α-τερπινεόλη	32,3	59, 93, 121	59
Γερανιάλη	34,2	84, 94, 152	84
Κιτρονελλόλη	37,6	82, 95, 123	82
β-δαμασκηνόνη	39,2	121, 190	190
Νερόλη	39,9	93, 121	93
α-ιονόνη	41,5	121, 93, 136	121
Γερανιόλη	43,0	93, 123	93
βενζυλική αλκόλη	44,1	79, 107, 108	79
β-φαινυλαιθανόλη	46,2	91, 92, 122	91
β-ιονόνη	47,5	177, 192	177
γερανικό οξύ	68,8	100, 123, 168	100
βανιλίνη	75,4	152, 151, 123	151

\*εσωτερικό πρότυπο

### 3.2.8 Εκτίμηση ανάκτησης σήματος

Η σύγκριση των μικροστηλών με τα διαφορετικά πληρωτικά υλικά έγινε μέσω της εκτίμησης της σύγκρισης του σήματος των αναλυτών που είχαν εμβολιαστεί σε υπόστρωμα οίνου σε συγκέντρωση 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  και είχαν υποστεί SPE (σύμφωνα με τις παραγράφους 3.2.6 και 3.2.7) με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης των αναλυτών σε διαλύτη (20  $\text{mg L}^{-1}$ ) ή με το σήμα των αναλυτών που είχαν εμβολιαστεί σε προσομοιωτή οίνου σε συγκέντρωση 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  και είχαν υποστεί SPE (σύμφωνα με τις παραγράφους 3.2.6 και 3.2.7).



Από την ανάλυση του εμβολιασμένου υποστρώματος οίνου που είχε υποστεί κατεργασία, υπολογίσθηκε το σχετικό εμβαδόν,  $A_{i (rel,spike)}$ , κάθε αναλύτη  $i$ , σύμφωνα με τον τύπο:

$$A_{i (rel,spike)} = A_{i (spike)} / A_{(I.S,spike)} \quad (3.1)$$

Όπου,  $A_{i (spike)}$  το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη  $i$  και  $A_{(I.S,spike)}$  το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Από την ανάλυση του προτύπου σε διαλύτη, υπολογίσθηκε το σχετικό εμβαδόν  $A_{i (rel,solvent)}$ , κάθε αναλύτη  $i$ , σύμφωνα με τον τύπο:

$$A_{i (rel,solvent)} = A_{i (solvent)} / A_{(I.S,solvent)} \quad (3.2)$$

Όπου,  $A_{i (solvent)}$  το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη  $i$  και  $A_{(I.S,solvent)}$  το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Παρόλο που ο «τυφλός οίνος» επιλέχθηκε από μία μη αρωματική ποικιλία, το υπόστρωμα οίνου περιείχε ίχνη κάποιων ενώσεων. Από την ανάλυση του υποστρώματος οίνου που δεν είχε εμβολιαστεί με πρότυπα και είχε υποστεί SPE, το σχετικό εμβαδόν  $A_{i (rel,blank)}$  κάθε αναλύτη  $i$  υπολογίσθηκε με τον τύπο:

$$A_{i (rel,blank)} = A_{i (blank)} / A_{(I.S,blank)} \quad (3.3)$$

Όπου,  $A_{i (blank)}$  το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη  $i$  και  $A_{(I.S,blank)}$  το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Για να υπολογιστεί το καθαρό αναλυτικό σήμα,  $A_{i (rel,spike,net)}$ , κάθε αναλύτη  $i$ , που οφειλόταν στον εμβολιασμό των προσδιοριζόμενων ενώσεων, το σχετικό εμβαδόν κάθε αναλύτη στο εκχύλισμα του οίνου που δεν είχε εμβολιαστεί (εξίσωση 3.3) αφαιρέθηκε από το σχετικό εμβαδόν κάθε αναλύτη  $i$  στο εμβολιασμένο υπόστρωμα οίνου (εξίσωση 3.1):

$$A_{i (rel,spike,net)} = A_{i (rel,spike)} - A_{i (rel,blank)} \quad (3.4)$$

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης,  $E_i$  % του σήματος κάθε αναλύτη  $i$ , σε εμβολιασμένο δείγμα υποστρώματος οίνου, που είχε υποστεί κατεργασία, σε σχέση με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης σε διαλύτη, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση:

$$E_i \% = A_{i (rel, spike, net)} / A_{i (rel, solvent)} \times 100 \quad (3.5)$$

Από την ανάλυση του εμβολιασμένου προσομοιωτή οίνου που είχε υποστεί κατεργασία, υπολογίσθηκε το σχετικό εμβαδόν,  $A_{i (rel, spike, sim)}$ , κάθε αναλύτη  $i$ , σύμφωνα με τον τύπο:

$$A_{i (rel, spike, sim)} / = A_{i (spike, sim)} / A_{(I.S, sim)} \quad (3.6)$$

Όπου,  $A_{i (spike, sim)}$ , το εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη  $i$  και  $A_{(I.S, sim)}$  το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης  $E_i^* \%$ , του σήματος κάθε αναλύτη  $i$ , σε εμβολιασμένο δείγμα υποστρώματος οίνου που είχε υποστεί κατεργασία, σε σχέση με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης σε δείγμα εμβολιασμένου προσομοιωτή οίνου που είχε υποστεί κατεργασία, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση:

$$E_i^* \% = A_{i (rel, spike, net)} / A_{i (rel, spike, sim)} \times 100 \quad (3.7)$$

### 3.2.9 Εκτίμηση επίδρασης υποστρώματος

Για τη διερεύνηση της επίδρασης του υποστρώματος στον ποσοτικό προσδιορισμό των 21 πρωτογενών αρωματικών συστατικών στην ανάλυση οίνων με τη μεθοδολογία SPE-GC/MS, πραγματοποιήθηκαν εμβολιασμοί  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  μίγματος των 21 αναλυτών και  $133 \mu\text{g L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου σε 3 διαφορετικές μήτρες (οίνου, προσομοιωτή οίνου και ύδατος) σε δύο σειρές δοκιμών: Α) πριν την κατεργασία με SPE και Β) μετά την κατεργασία με SPE, όπως περιγράφεται παρακάτω:

**(Α) Πριν την SPE κατεργασία:** Σε υποδείγματα όγκου  $25,0 \text{ mL}$  υποστρώματος οίνου (παρ. 3.2.5), προσομοιωτή οίνου (παρ. 3.2.5), ή ύδατος προστέθηκαν  $83 \mu\text{L}$  από το διάλυμα παρακαταθήκης  $40 \text{ mg L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου και  $25 \mu\text{L}$  από το διάλυμα παρακαταθήκης  $100 \text{ mg L}^{-1}$  μίγματος όλων των αναλυτών σε μεθανόλη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου να είναι  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  και  $133 \mu\text{g L}^{-1}$  αντίστοιχα. Τα εμβολιασμένα δείγματα υπέστησαν κατεργασία SPE σε στήλη Resprep C18, σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.6 και αναλύθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.7. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε για  $25,0 \text{ mL}$  υποστρώματος οίνου χωρίς εμβολιασμό.

(B) **Μετά την SPE κατεργασία:** Υποδείγματα όγκου 25,0 mL υποστρώματος οίνου (παρ. 3.2.5) και προσομοιωτή οίνου (παρ. 3.2.5), υπέστησαν κατεργασία SPE σε στήλη Resprep C18, σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 3.2.6.1, 3.2.6.2 και 3.2.6.3. Η συμπύκνωση του πτητικού κλάσματος (παρ. 3.2.6.3.) συνεχίστηκε μέχρι τελικού όγκου 200 mL. Στην ποσότητα αυτή έγινε προσθήκη 25 mL διαλύματος παρακαταθήκης  $133 \text{ mg L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου σε διχλωρομεθάνιο και 25 mL διαλύματος παρακαταθήκης  $100 \text{ mg L}^{-1}$  μίγματος όλων των αναλυτών σε διχλωρομεθάνιο. Με τη διαδικασία αυτή ο συνολικός όγκος του συμπυκνώματος ήταν 250 mL, η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο εκχύλισμα ήταν  $13,3 \text{ mg L}^{-1}$  (αντίστοιχη με  $133 \text{ μg L}^{-1}$  στο αρχικό δείγμα) και των αναλυτών  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (αντίστοιχη με  $100 \text{ μg L}^{-1}$  στο αρχικό δείγμα).

Η ίδια διαδικασία (B) ακολουθήθηκε και για μη εμβολιασμένο υπόστρωμα οίνου. Σε αυτήν την περίπτωση, η διαδικασία συμπύκνωσης του πτητικού κλάσματος συνεχίστηκε έως τελικού όγκου 225 mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 25 mL διαλύματος παρακαταθήκης  $133 \text{ mg L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου σε διχλωρομεθάνιο .

Για κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις, υπολογίστηκε η ανάκτηση, του σήματος κάθε αναλύτη *i* αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) του αναλύτη *i* σε διαλύτη (διχλωρομεθάνιο).

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης σήματος,  $E_i \%$ , κάθε αναλύτη *i* σε υπόστρωμα οίνου αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης του αναλύτη σε διαλύτη χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 3.5 (παράγραφος 3.2.8). Για τον υπολογισμό της ανάκτησης σήματος,  $E_{i,x} \%$ , κάθε αναλύτη *i* σε μήτρα *x* (προσομοιωτής οίνου ή νερό) αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης του αναλύτη σε διαλύτη, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$E_{i,x} \% = A_{i,x \text{ (rel, spike)}} / A_{i \text{ (rel, solvent)}} \times 100 \quad (3.8)$$

όπου,  $A_{i,x \text{ (rel, spike)}}$  το σχετικό αναλυτικό σήμα του αναλύτη *i*,

$(A_{i,x \text{ (rel, spike, x)}} = A_{i,x \text{ (spike)}} / A_{x \text{ (I.S.)}}$ , στο αντίστοιχο υπόστρωμα *x* (προσομοιωτής οίνου ή νερό) και  $A_{i \text{ (rel, solvent)}}$  το σχετικό αναλυτικό σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης του αναλύτη *i* σε διαλύτη (εξίσωση 3.2 , παράγραφος 3.2.8).

### 3.2.10 Χάραξη καμπυλών βαθμονόμησης

Για τη **χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης σε διαλύτη** (διχλωρομεθάνιο), έγιναν επαναλαμβανόμενες αναλύσεις ( $n=6$ ) σε πρότυπα διαλύματα εργασίας 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 50,0 και 100  $\text{mg L}^{-1}$  των αναλυτών σε διαλύτη (παρ. 3.2.5). Για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση  $i$ , έγινε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης του μέσου σχετικού εμβαδού  $\bar{A}_{i \text{ (rel,sovent)}}$

( $\bar{A}_{i \text{ (rel,sovent)}} = \sum_{n=1}^{n=6} A_{i \text{ (rel,sovent)}} / 6$ ), όπου  $A_{i \text{ (rel,sovent)}}$  προκύπτει από την εξίσωση

3.2) (εξαρτημένη μεταβλητή) συναρτήσει της συγκέντρωσης  $C_i$  (ανεξάρτητη μεταβλητή) με βάση την εξίσωση:

$$\bar{A}_{i \text{ (rel,sovent)}} = (a_{s,i} \pm s_{a,i}) C_i + (b_{s,i} \pm s_{b,i}) \quad (3.9)$$

όπου:  $a_{s,i}$  είναι η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης,  $s_{a,i}$  η τυπική απόκλιση της κλίσης,  $b_{s,i}$  η τεταγμένη επί την αρχή της ευθείας,  $s_{b,i}$  η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή και  $C_i$  η συγκέντρωση κάθε αναλύτη (σε  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Για τη **χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης σε υπόστρωμα οίνου**, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε 3 διαφορετικές ημέρες ( $k=3$ ). Κάθε ημέρα περιελάμβανε παρασκευή και ανάλυση προτύπων διαλυμάτων εργασίας 0, 10, 20, 50,0, 100, 250, 500 και 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  σε υπόστρωμα οίνου (παράγραφος 3.2.5) εις διπλούν ( $l=2$ ). Για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση  $i$ , έγινε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης τού μέσου σχετικού εμβαδού  $\bar{A}_{i \text{ (rel,spike,net)}}$

όλων των ημερών ( $k \times l = 3 \times 2 = 6$ ) ( $\bar{A}_{i \text{ (rel,spike,net)}} = \sum_{n=1}^{n=6} A_{i \text{ (rel,spike,net)}} / 6$ ,

όπου  $A_{i \text{ (rel,spike,net)}}$  προκύπτει από την εξίσωση 3.4) (εξαρτημένη μεταβλητή) συναρτήσει της συγκέντρωσης  $C_i$  (ανεξάρτητη μεταβλητή) με βάση την εξίσωση:

$$\bar{A}_{i \text{ (rel,spike,net)}} = (a_{mm,i} \pm s_{a,i}) C_i + (b_{mm} \pm s_{b,i}) \quad (3.10)$$

όπου:  $a_{mm,i}$  είναι η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης,  $s_{a,i}$  η τυπική απόκλιση της κλίσης,  $b_{mm}$  η τεταγμένη επί την αρχή της ευθείας,  $s_{b,i}$  η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή και  $C_i$  η συγκέντρωση κάθε αναλύτη (σε  $\text{mg L}^{-1}$ ).

### 3.2.11 Εκτίμηση ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Για την εκτίμηση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι βαθμονόμησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) κάθε αναλύτη  $i$  υπολογίσθηκαν από τις παρακάτω σχέσεις [239]:

$$\text{LOD}_i = 3 \times s_{l,i} / a_{mm} \quad (3.11)$$

$$\text{LOQ}_i = 10 \times s_{l,i} / a_{mm} \quad (3.12)$$

όπου:  $s_{l,i}$  είναι η τυπική απόκλιση ( $n=6$ ) του καθαρού μέσου αναλυτικού σήματος  $\bar{A}_{i, (\text{rel, spike, net})}$   $10 \mu\text{g L}^{-1}$  του αναλύτη  $i$  εμβολιασμένου σε υπόστρωμα οίνου που έχει υποστεί κατεργασία SPE και  $a_{mm}$  η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης σε υπόστρωμα οίνου που έχει υποστεί κατεργασία SPE.

### 3.2.12 Εκτίμηση ακρίβειας και πιστότητας

Η ακρίβεια – ορθότητα και η πιστότητα της μεθόδου αξιολογήθηκαν σε επτά επίπεδα συγκεντρώσεων ( $10\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), με υπολογισμό της ανάκτησης κάθε αναλύτη, μετά από κατεργασία SPE των προτύπων σε υπόστρωμα οίνου. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκαν 2 μετρήσεις ( $l=2$ ) σε 3 διαφορετικές ημέρες εργασίας ( $k=3$ ) (συνολικά  $k \times l = 3 \times 2 = 6$  μετρήσεις). Η % ανάκτηση  $R_i$  %, κάθε αναλύτη  $i$  υπολογίσθηκε από τον τύπο:

$$R_i \% = (C_{i, \text{spike}} - C_{i, \text{native}}) / C_{i, \text{std}} \times 100 \quad (3.13)$$

όπου:  $C_{i, \text{spike}}$  είναι η ευρεθείσα συγκέντρωση του αναλύτη  $i$  στο εμβολιασμένο υπόστρωμα οίνου,  $C_{i, \text{native}}$  είναι η ενδογενής συγκέντρωση του αναλύτη  $i$  στο υπόστρωμα οίνου και  $C_{i, \text{std}}$  η συγκέντρωση εμβολιασμού του αναλύτη  $i$  στο υπόστρωμα οίνου.

Οι συγκεντρώσεις  $C_{i, \text{spike}}$  και  $C_{i, \text{native}}$  υπολογίσθηκαν από τις ευθείες βαθμονόμησης σε υπόστρωμα οίνου (εξίσωση 3.10) με χρήση των σχετικών εμβαδών των αντίστοιχων χρωματογραφικών κορυφών.

Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, υπολογίσθηκε η μέση ανάκτηση, %  $\bar{R}_i$ , (%  $\bar{R}_i = \sum_{n=1}^{n=6} R_i \% / 6$ ) (  $k \times l = 3 \times 2 = 6$  μετρήσεις). Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε για κάθε επίπεδο

συγκέντρωσης. Εκφράσθηκε ως η % σχετική τυπική απόκλιση των 6 επαναληπτικών μετρήσεων ( $k \times 2 = 6$  μετρήσεις),  $RSD_{M,i} \%$

Η επαναληψιμότητα του οργάνου εκτιμήθηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και εκφράσθηκε ως η % σχετική τυπική απόκλιση,  $RSD_{r,i} \%$ , του σήματος  $A_i$  (rel,solvent) (εξίσωση 3.2) διαδοχικών μετρήσεων προτύπων σε διαλύτη ( $n=6$ ).

Η % ολική ανάκτηση,  $R_{t,i} \%$ , κάθε αναλύτη  $i$  υπολογίσθηκε από τον τύπο [239]:

$$R_{t,i} \% = a_{s,i} / a_{mm,i} \times 100 \quad (3.14)$$

Όπου:  $a_{s,i}$  η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης σε υπόστρωμα οίνου (εξίσωση 3.10) και  $a_{m,i}$  η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης σε διαλύτη (εξίσωση 3.9).

Ο παράγοντας “Horrat”,  $H_i$ , για κάθε αναλύτη και επίπεδο συγκέντρωσης, υπολογίσθηκε από τον τύπο [239]:

$$H_i = RSD_{M,i} / RSD_{H,i} \quad (3.15)$$

όπου  $RSD_{M,i}$  η πειραματική τιμή της τυπικής απόκλισης της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και  $RSD_{H,i}$  η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης που υπολογίσθηκε από τις παρακάτω σχέσεις [240]:

$$s_{H,i} = 0,22 \times C_i \quad \text{όταν } C_i < 120 \mu\text{g L}^{-1} \quad (3.16)$$

$$s_{H,i} = 0,22 \times C_i^{0,8495} \quad \text{όταν } C_i \geq 120 \mu\text{g L}^{-1} \quad (3.17)$$

Η εξίσωση Horwitz (εξίσωση 3.17) και η τροποποιημένη εξίσωση Horwitz (εξίσωση 3.16) είναι γενικευμένες εξισώσεις ακριβείας που, είναι ανεξάρτητες από την προσδιοριζόμενη ουσία (αναλύτη) και τη μήτρα αλλά, εξαρτώνται μόνο από τη συγκέντρωση για τις περισσότερες αναλυτικές μεθόδους ρουτίνας. Στην πράξη, η απαίτηση για την επικύρωση μίας μεθόδου είναι ο δείκτης “Horrat” να είναι μικρότερος του 1 [241].

### 3.2.13 Εκτίμηση αβεβαιότητας των μετρήσεων

Εκτιμήθηκε η % διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα των μετρήσεων (expanded uncertainty,  $U_{exp} \%$ ) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% σύμφωνα με τον τύπο [238]:

$$U_{exp} \% = k [u(Y)/Y] \times 100 \quad (3.18)$$

Όπου  $k = 2$ , και  $u(Y)$  η συνδυασμένη αβεβαιότητα.

Η συνδυασμένη σχετική αβεβαιότητα των μετρήσεων υπολογίσθηκε από τον τύπο [238]:

$$[u(Y)/Y]^2 = [u(P)/P]^2 + [u(R)/R]^2 \quad (3.19)$$

όπου  $u(P)/P$  η σχετική αβεβαιότητα που προκύπτει από την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (τυχαία σφάλματα) και  $u(R)/R$  η αβεβαιότητα που προκύπτει από τα συστηματικά σφάλματα.

Για να διαπιστωθεί εάν η ανάκτηση  $R$  είναι σημαντικά διαφορετική από 1, εφαρμόσθηκε η δοκιμασία  $t$ , σύμφωνα με τον τύπο:

$$t = |1-R| / u(R) \quad (3.20)$$

Στις περιπτώσεις για τις οποίες οι τιμές  $t$  ήταν μικρότερες από τον παράγοντα κάλυψης  $k=2$  (και κατά συνέπεια η ανάκτηση  $R$  δεν ήταν σημαντικά διαφορετική από 1 για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, δεν έγινε επιπλέον διόρθωση των αποτελεσμάτων). Αντιθέτως, στις περιπτώσεις για τις οποίες οι τιμές  $t$  ήταν μεγαλύτερες από τον παράγοντα κάλυψης  $k=2$  (και κατά συνέπεια η ανάκτηση  $R$  ήταν σημαντικά διαφορετική από 1 για στάθμη εμπιστοσύνης 95%, πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αποτελεσμάτων για την ανάκτηση).

### **3.3 Μεθοδολογία SPME-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους**

#### **3.3.1 Σύνοψη πειραματικών δοκιμών**

Αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε (με χρήση χημειομετρικών μεθόδων) μεθοδολογία SPME-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 ελεύθερων και γλυκοζιτικά δεσμευμένων συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους. Ακολούθησε επικύρωση και εφαρμογή της βελτιστοποιημένης μεθοδολογίας σε δείγματα οίνων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε **συγκριτική μελέτη** μεταξύ πέντε εμπορικά διαθέσιμων τύπων SPME ινών, με δύο τεχνικές δειγματοληψίας (εμβάπτισης της ίνας και υπερκείμενου χώρου) με κατεργασίες εμβολιασμένου με αναλύτες υποστρώματος προσομοιωτή οίνου. Η επίδοση κάθε περίπτωσης SPME μικροεκχύλισης (συνδυασμού ίνας και τεχνικής δειγματοληψίας) εκτιμήθηκε με βάση: α) το συνολικό διορθωμένο εμβαδό όλων των αναλυτών και το

συνολικό διορθωμένο σχετικό εμβαδόν όλων των αναλυτών β) την αναπαραγωγιμότητα της κάθε SPME διαδικασίας.

Με χρήση της καταλληλότερης ίνας (PDMS/DVB) και τεχνικής δειγματοληψίας (εμβάπτιση της ίνας στην στο δείγμα), διερευνήθηκε με **μερικό παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων** (Pluckett-Burman) η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην εκχύλιση. Μελετήθηκαν 7 παράμετροι: το pH, η θερμοκρασία ( $T_{\text{εκχυλ}}$ ) και ο χρόνος ( $t_{\text{εκχ}}$ ) της εκχύλισης, η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης ( $C_{\text{EtOH}}$ ), η συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος ( $C_{\text{NaCl}}$ ), ο όγκος του δείγματος ( $V_{\text{δειγ}}$ ) και η ταχύτητα περιστροφής ( $T_{\text{περ/φής}}$ ) της μαγνητικής ράβδου κατά την ανάδευση.

Οι 4 στατιστικά σημαντικότερες μεταβλητές (pH,  $T_{\text{εκχυλ}}$ ,  $t_{\text{εκχ}}$  και  $C_{\text{EtOH}}$ ) βελτιστοποιήθηκαν, με εφαρμογή της διαδοχικής πολυπαραμετρικής μεθόδου **Simplex**.

Με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες μικροεκχύλισης ακολούθησε **επικύρωση** της GC/MS μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελεύθερων αρωματικών συστατικών από λευκούς οίνους. Τα χαρακτηριστικά που εξετάσθηκαν αφορούσαν τη γραμμικότητα, εκλεκτικότητα, ανιχνευσιμότητα (LODs, LOQs), ακρίβεια, πιστότητα, αβεβαιότητα και **ανθεκτικότητα** της μεθόδου.

Για την απομόνωση των **γλυκοζιτικά δεσμευμένων αρωματικών συστατικών**, προηγήθηκε στάδιο απομόνωσης του μη πτητικού κλάσματος των οίνων, με SPE μικροστήλη (Isolute ENV+). Για την εφαρμογή της μικροεκχύλισης στο δεσμευμένο κλάσμα τροποποιήθηκε το πρωτόκολλο που μελετήθηκε στο προηγούμενο στάδιο της διατριβής (παράγραφος 3.2.6).

Τέλος, η μέθοδος **εφαρμόσθηκε** στον προσδιορισμό 21 ελεύθερων και δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε 20 μονοποικιλιακούς οίνους.

### 3.3.2 Χημικά αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.3 και επιπλέον χλωριούχο νάτριο (καθαρότητας >99%) από την εταιρεία Panreac (Βαρκελώνη, Ισπανία).



### 3.3.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Χρησιμοποιήθηκε ο εργαστηριακός εξοπλισμός που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4 και επιπλέον:

- Σύριγγα SPME, για χειροκίνητη δειγματοληψία του οίκου Supelco, (Η.Π.Α.)
- Γυάλινα βιδωτά φιαλίδια των 10 και 20 mL, κατάλληλα για αναλύσεις με τεχνική υπερκείμενης αέριας φάσης (headspace), και 18 mm μαγνητικά βιδωτά πώματα με προ-τρυπημένο διάφραγμα (sept) από PTFE/σιλικόνη του οίκου Restek (Η.Π.Α.).

Για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου στα δείγματα οίνων χρησιμοποιήθηκαν:

- Αυτόματη συσκευή απόσταξης μεθ' υδρατμών του οίκου Dujardin-Salleron Laboratories (Γαλλία)
- Ηλεκτρονικός υδροστατικός ζυγός, μοντέλο Densimat, συνδεδεμένος με καταγραφέα μοντέλο Alcomat, του οίκου Gibertini (Ιταλία)

Τα χαρακτηριστικά των διαφορετικών ινών που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4

Πίνακας 3.4: Χαρακτηριστικά SPME ινών\* που δοκιμάστηκαν

Υλικό επίστρωσης	Πάχος (μm)	pH	Μέγιστη Θερμοκρασία (°C)	Συνιστώμενη Θερμοκρασία (°C)	Θερμοκρασία Εξισορ/σης (°C)	Χρόνος Εξισ/σης (Hrs)
PDMS	100	2-10	280	200-280	250	0,5
PDMS/DVB	65	2-11	270	200-270	250	0,5
PA	85	2-11	320	220-300	280	1,0
CAR/PDMS	75	2-11	320	250-310	300	1,0
DVB/CAR/PDMS	50/30	2-11	270	230-270	270	1,0

- Όλες οι ίνες που δοκιμάστηκαν κατασκευάστηκαν από τη SUPELCO (Η.Π.Α..)

### 3.3.4 Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου οίνων

Για τον προσδιορισμό του αλκοολικού τίτλου των οίνων χρησιμοποιήθηκε η κοινοτική μέθοδος αναφοράς με υδροστατικό ζυγό, όπως περιγράφεται στην Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων [242].

### 3.3.5 Παρασκευή προσομοιωτών οίνου

Κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της SPME μεθοδολογίας χρειάστηκε να παρασκευασθούν προσομοιωτές οίνου που περιείχαν  $3,0 \text{ g L}^{-1}$  τρυγικό οξύ, διάφορα pH, και διάφορες συγκεντρώσεις αιθυλικής αλκοόλης και χλωριούχου νατρίου. Για την παρασκευή τους ακολουθήθηκε η κάτωθι διαδικασία:

Σε κρυστάλλινη κάψα ζυγίζονταν 300 mg τρυγικού οξέος και μεταφέρονταν σε ποτήρι ζέσεως. Γινόταν προσθήκη 60 mL υπερκάθαρου νερού και κατάλληλου όγκου αιθυλικής αλκοόλης (υπολογισμένη για 100 mL τελικού διαλύματος), αναλόγως της επιθυμητής τελικής περιεκτικότητας. Ακολουθούσε ρύθμιση του pH του διαλύματος στην επιθυμητή τελική τιμή, με προσθήκη σταγόνων διαλύματος NaOH 1 ή  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ή διαλύματος HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Το διάλυμα μεταφερόταν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL που περιείχε ζυγισμένη ποσότητα χλωριούχου νατρίου, αναλόγως της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης του άλατος. Μετά τη διάλυση του άλατος με ανάδευση, γινόταν πλήρωση ως τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό.

### 3.3.6 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων και προτύπων βαθμονόμησης

Παρασκευάστηκε πυκνό πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) μίγματος όλων των αναλυτών σε μεθανόλη. Το διάλυμα φυλάχτηκε στους  $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Από το πυκνό διάλυμα, παρασκευάστηκε ενδιάμεσο μεθανολικό διάλυμα εργασίας του μίγματος των προτύπων, συγκέντρωσης  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , το οποίο επίσης φυλάχτηκε στους  $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Παρασκευάστηκε με ζύγιση της πρότυπης ουσίας (οκτανόλη-2) διάλυμα παρακαταθήκης ( $32,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) του εσωτερικού προτύπου, σε 70% (v/v) υδραλκοολικό διάλυμα.

Παρασκευάστηκαν **πρότυπα διαλύματα** εργασίας μίγματος όλων των αναλυτών **σε προσομοιωτή οίνου**. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε προσομοιωτής οίνου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.5 (με περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ  $3,0 \text{ g L}^{-1}$ , pH 2,8,  $C_{\text{EtOH}} = 9,0\%$  και  $C_{\text{NaCl}} = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). Υποδείγματα προσομοιωτή οίνου εμβολιάστηκαν με κατάλληλους όγκους από το ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης που περιείχε όλους τους αναλύτες και από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού

προτύπου ώστε να επιτευχθούν 6 επίπεδα συγκεντρώσεων (10,0 20,0 50,0 100, 500. 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) των αναλυτών και σταθερή συγκέντρωση 128  $\mu\text{g L}^{-1}$  του εσωτερικού προτύπου και κατεργάσθηκαν με SPME όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.8.3.

Παρασκευάσθηκαν **πρότυπα διαλύματα** εργασίας μίγματος όλων των αναλυτών **σε υπόστρωμα οίνου**. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε δείγμα λευκού οίνου, φτωχού σε πρωτογενή αρωματικά συστατικά (παρ. 3.1.2.). Το δείγμα είχε τροποποιηθεί έτσι ώστε να έχει pH 2,8,  $C_{\text{EtOH}} = 9,0 \%$  και έγινε προσθήκη NaCl σε συγκέντρωση  $C_{\text{NaCl}} = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την τροποποίηση του δείγματος οίνου είχε ως εξής: Μετρήθηκε ο αλκοολικός τίτλος του δείγματος και βρέθηκε 12,1 %. Σε 186,0 mL φιλτραρισμένου δείγματος οίνου έγινε ρύθμιση του pH με την προσθήκη διαλύματος HCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και αραιώθηκε με υπερκάθαρο νερό (ο τελικός οίνος είχε pH 2,8 και  $C_{\text{EtOH}} = 9,0 \%$ ). Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL που περιείχε 43,8 g NaCl έγινε προσθήκη του τροποποιημένου δείγματος οίνου ως τη χαραγή ( $C_{\text{NaCl}} = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). Όγκος 10,0 mL του παραπάνω διαλύματος εμβολιάσθηκε με κατάλληλο όγκο από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (οκτανόλη-2) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου να είναι 128  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Αυτό χρησιμοποιήθηκε ως «τυφλός» οίνος. Άλλα μέρη των 10,0 mL του παραπάνω διαλύματος εμβολιάσθηκαν με κατάλληλους όγκους από το ενδιάμεσο μεθανολικό διάλυμα εργασίας του μίγματος των προτύπων και από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου, ώστε να επιτευχθούν 6 επίπεδα συγκεντρώσεων (10,0 20,0 50,0 100, 500, 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου σταθερή συγκέντρωση 128  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Τα διαλύματα αυτά κατεργάσθηκαν με SPME όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.8.3.

### 3.3.7 Γενικές αναλυτικές διαδικασίες

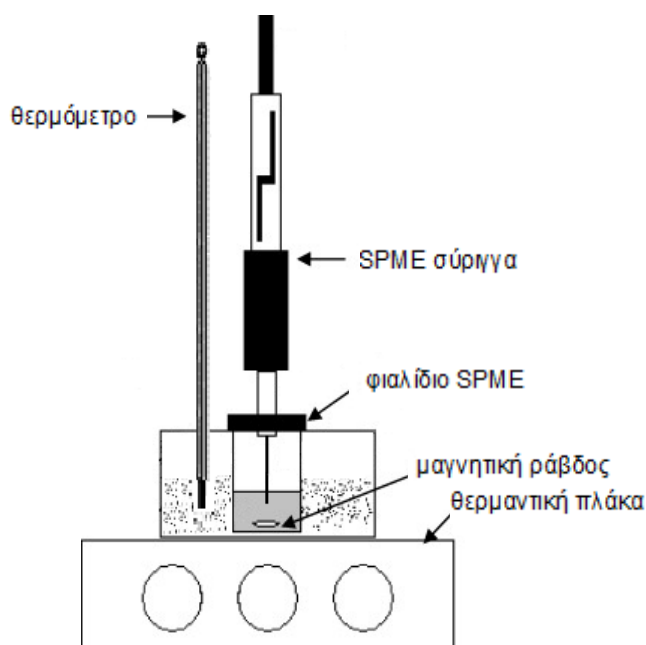
#### 3.3.7.1 Προετοιμασία ίνας

Για κάθε ίνα, προηγείται στάδιο εξισορρόπησης (conditioning) στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Πίνακας 3.4). Επιπλέον εξισορρόπηση, γινόταν σε καθημερινή βάση, πριν

την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή απόδοση της ίνας.

### 3.3.7.2 Διάταξη SPME

Χρησιμοποιήθηκε απλή διάταξη η οποία αποτελείτο από μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαντική πλάκα επάνω στην οποία βρίσκονταν τοποθετημένο γυάλινο κρυσταλλωτήριο 95 mm, πληρωμένο κατά τα 2/3 της χωρητικότητάς του με νερό (υδατόλουτρο) (Σχήμα 3.2). Η θερμοκρασία του νερού ελεγχόταν με θερμόμετρο (κλίμακας 0-50 °C) βυθισμένο στο υδατόλουτρο. Στη διάταξη συμπεριλαμβανόταν μεταλλικό στήριγμα για την SPME σύριγγα, με ρυθμιζόμενο ύψος.



Σχήμα 3.2: Διάταξη SPME

### 3.3.7.3 Γενική SPME κατεργασία

Κατάλληλος όγκος δείγματος μεταφερόταν σε φιαλίδιο SPME που περιείχε μαγνητική περιστρεφόμενη ράβδο 7 mm (Σχήμα 3.2). Για όγκους δείγματος 5 mL χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια των 10 mL, για μεγαλύτερους όγκους χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια των 20 mL. Το φιαλίδιο σφραγιζόταν, με ειδικά πώματα για την τεχνική υπερκείμενης φάσης, και τοποθετείτο σε υδατόλουτρο (Σχήμα 3.2), σε κατάλληλη θερμοκρασία. Το δείγμα παρέμενε υπό ανάδευση

με ανάλογη ταχύτητα περιστροφής, καθ' όλη τη διάρκεια της SPME κατεργασίας. Σε χρόνο 10 min μετά την τοποθέτηση του δείγματος στο υδατόλουτρο, εισαγόταν η βελόνα της SPME σύριγγας εντός του φιαλιδίου και εξαγόταν η ίνα στο επιθυμητό ύψος (εντός του διαλύματος ή στην υπερκείμενη φάση του φιαλιδίου). Μετά την εκχύλιση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, η ίνα καλυπτόταν και εξαγόταν από το φιαλίδιο. Σε όσο το δυνατόν συντομότερο χρόνο, η βελόνα της SPME σύριγγας εισήρχετο στον εισαγωγέα του GC/MS και ακολουθούσε η διαδικασία της εκρόφησης των αναλυτών για 5 min, στους 230 °C (εκτός από ορισμένες δοκιμές που ορίζονταν άλλη θερμοκρασία του εισαγωγέα). Η ίνα παρέμενε στον εισαγωγέα επιπλέον 10 min για καθαρισμό. Από κάθε φιαλίδιο πραγματοποιούνταν μία μέτρηση.

### **3.3.8 Τελικό πρωτόκολλο κατεργασίας δείγματος**

#### **3.3.8.1 Προκατεργασία δείγματος οίνου για προσδιορισμό ελεύθερων συστατικών**

Αρχικά προσδιοριζόταν ο αλκοολικός τίτλος του δείγματος οίνου σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.4. Κατάλληλος όγκος υποδείγματος φιλτραρισμένου οίνου (υπολογισμένος έτσι ώστε μετά την αραίωση σε 50 mL η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης να είναι 9,0% (v/v)) μεταφερόταν σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL για διόρθωση του pH σε 2,8 με σταγόνες διαλύματος HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Η ποσότητα αυτή μεταφερόταν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL όπου γινόταν συμπλήρωση του όγκου έως τη χαραγή με υπερκάθαρο νερό (τροποποιημένος οίνος). Στον τροποποιημένο οίνο, γινόταν εμβολιασμός με 200 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου ( $C_{\text{τελική}} = 128 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Σε δεύτερη ογκομετρική φιάλη των 50 mL μεταφερόταν 8,77 g NaCl χλωριούχου νατρίου. Στη φιάλη αυτή μεταφερόταν μέρος του τροποποιημένου οίνου για διάλυση του άλατος και ακολούθως γινόταν πλήρωση ως τη χαραγή με τροποποιημένο οίνο ( $C_{\text{NaCl}} = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). Ποσότητα 10,0 mL από το παραπάνω διάλυμα μεταφερόταν σε γυάλινο φιαλίδιο των 20 mL για SPME κατεργασία όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.8.3. Τα τελικά αναλυτικά αποτελέσματα διορθώνονταν με τον κατάλληλο συντελεστή αραίωσης.

### 3.3.8.2 Προκατεργασία δείγματος οίνου για προσδιορισμούς δεσμευμένων συστατικών

Για τους προσδιορισμούς των δεσμευμένων αρωματικών συστατικών προηγείτο απομόνωση του δεσμευμένου κλάσματος των οίνων με SPE, και ενζυμική υδρόλυση για την απελευθέρωση των αγλυκονών.

Αναλυτικότερα, όγκος 25,0 mL φιλτραρισμένου δείγματος οίνου αραιωνόταν με ίσο όγκο υπερκάρου νερού και κατεργαζόταν σε ενεργοποιημένη στήλη Isolute ENV+, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.6.2. Αφού γινόταν έκλουση των ελεύθερων αρωματικών με 35 mL διχλωρομεθανίου, η έκλουση των γλυκοζυλιωμένων πρόδρομων αρωματικών ενώσεων γινόταν με 30 mL μεθανόλης. Ο διαλύτης (μεθανόλη) και τα υπολειπόμενα ελεύθερα συστατικά απομακρύνονταν στους 35 °C, υπό μειωμένη πίεση, με χρήση περιστρεφόμενου συμπυκνωτή Rotavapor (Büchi, Switzerland). Οι γλυκοζίτες επαναδιαλύονταν σε 10,0 mL διαλύματος τρυγικού οξέος (7,5 g L<sup>-1</sup>) και γινόταν ρύθμιση του pH στην τιμή 5,0 με 1,0 mol L<sup>-1</sup> NaOH. Ακολουθούσε προσθήκη ποσότητας 20,0 mg πηκτινολυτικού ενζύμου με β-γλυκοζιτική δράση (Lallzyme BETA (Lallemand, St. Simon, France)). Το μίγμα τοποθετείτο σε θερμοστατούμενο θάλαμο, στους 37 °C, για 18 ώρες έτσι ώστε να λάβει χώρα ενζυμική υδρόλυση. Κατόπιν γινόταν ρύθμιση του pH σε 2,8 με προσθήκη σταγόνων HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Το μίγμα μεταφερόταν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL και γινόταν προσθήκη 2,25 mL απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης και πλήρωση έως τη χαραγή με νερό. Ως αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας τα τελικά χαρακτηριστικά του διαλύματος που περιείχε τα απελευθερωμένα πτητικά συστατικά ήταν τα ζητούμενα, δηλαδή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ 3,0 g L<sup>-1</sup>, pH 2,8, και C<sub>EtOH</sub> 9,0% (διάλυμα αγλυκονών).

Στο διάλυμα των αγλυκονών γινόταν εμβολιασμός με 100 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (C<sub>τελική</sub> = 128 μg L<sup>-1</sup>). Σε δεύτερη ογκομετρική φιάλη των 25 mL μεταφερόταν 4,38 g NaCl χλωριούχου νατρίου. Στη φιάλη αυτή μεταφερόταν μέρος του διαλύματος των αγλυκονών για διάλυση του άλατος και ακολούθως γινόταν πλήρωση ως τη χαραγή με το διάλυμα των αγλυκονών (C<sub>NaCl</sub> = 3,0 mol L<sup>-1</sup>). Ποσότητα 10,0 mL από το παραπάνω διάλυμα μεταφερόταν σε γυάλινο φιαλίδιο των 20 mL για SPME

κατεργασία, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.8.3.

### **3.3.8.3 Τελική κατεργασία SPME**

Ποσότητα 10,0 mL δείγματος μεταφερόταν σε γυάλινο φιαλίδιο των 20 mL που περιείχε μαγνητική περιστρεφόμενη ράβδο 7 mm (Σχήμα 3.2). Το φιαλίδιο σφραγιζόταν, με ειδικά πώματα για την τεχνική υπερκείμενης φάσης, και τοποθετείτο σε υδατόλουτρο (Σχήμα 3.2), σε θερμοκρασία 32 °C. Το δείγμα παρέμενε υπό ανάδευση, με ταχύτητα περιστροφής 1000 rpm καθ'όλη τη διάρκεια της SPME κατεργασίας. Σε χρόνο 10 min μετά την τοποθέτηση του δείγματος στο υδατόλουτρο, γινόταν εισαγωγή της βελόνας της SPME σύριγγας εντός του φιαλιδίου. Η ίνα PDMS/DVB (65 μm) εξαγόταν από τη βελόνα και εισαγόταν εντός του διαλύματος του δείγματος όπου και παρέμενε για ακριβώς 30 min. Τότε, η ίνα καλυπτόταν και η βελόνα εξαγόταν από το φιαλίδιο. Σε όσο το δυνατόν συντομότερο χρόνο, η βελόνα της SPME σύριγγας εισαγόταν στον εισαγωγέα του GC/MS και ακολουθούσε με την εξαγωγή της ίνας η διαδικασία της εκρόφησης των αναλυτών για 5 min, στους 230 °C. Η ίνα παρέμενε στον εισαγωγέα επιπλέον 10 min για καθαρισμό. Από κάθε φιαλίδιο πραγματοποιούνταν μία μέτρηση

### **3.3.9 Ανάλυση GC/MS**

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα GC/MS και η τριχοειδής στήλη που περιγράφονται στην παρ. 3.2.7. Η ροή του φέροντος αερίου (He, 5.0) ήταν 1 mL/min, και η πίεση 18 psi. Ο ειδικός εισαγωγέας (γυάλινος σωλήνας, εσωτερικής διαμέτρου 0,70 mm, Supelco (H.Π.Α.)) εξασφάλιζε καλύτερα αποτελέσματα (διαχωρισμούς) για αναλύσεις με SPME. Η εισαγωγή των αναλυτών στη χρωματογραφική στήλη πραγματοποιούνταν με μη διαμοιρασμό και αύξηση της πίεσης του φέροντος αερίου, για 1 min, σε 45 psi (τεχνική pulsed splitless). Ακολουθούσε διαμοιρασμός με αναλογία 1:50. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα και οι συνθήκες στο φασματογράφο μάζας ήταν παρόμοιες με αυτές που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.7.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων στα δείγματα, έγινε με σύγκριση των χρόνων ανάσχεσης και των σχετικών αφθονιών των ιόντων με τα αντίστοιχα των πρότυπων ουσιών. Για την αύξηση της εκλεκτικότητας και της ευαισθησίας της

μεθόδου, η ανίχνευση με MS έγινε με τη μέθοδο καταγραφής επιλεγμένων ιόντων (SIM). Τα στοιχεία της μεθόδου SIM και οι χρόνοι ανάσχεσης των αναλυτών ( $R_t$ ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

**Πίνακας 3.5: Στοιχεία μεθόδου SIM**

<b>Αναλύτες</b>	<b><math>R_t</math> (min)</b>	<b>Ιόντα ταυτοποίησης (m/z)</b>	<b>Ιόν ποσοτικ/ησης (m/z)</b>
cis-rose οξείδιο	10,3	139, 154	139
trans-rose οξείδιο	11,0	139, 154	139
εξανόλη-1	11,3	56, 43	56
trans-3-εξεν-1-όλη	13,7	67, 55, 82	67
cis-3-εξέν-1-όλη	14,8	67, 55, 82	67
οκτανόλη-2*	16,8	45, 55	45
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	17,4	59, 94, 111	94
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	19,3	59, 94, 111	59
λιναλοόλη	25,1	71, 93, 121	71
νεράλη	32,7	84, 94, 152	84
α-τερπινεόλη	34,7	59, 93, 121	59
γερανιάλη	36,4	84, 94, 152	84
κιτρονελλόλη	40,4	82, 95, 123	82
β-δαμασκηνόνη	41,9	121, 190	190
νερόλη	42,3	93, 121	93
α-ιονόνη	44,5	121, 93, 136	121
γερανιόλη	45,7	93, 123	93
βενζυλική αλκόλη	46,9	79, 107, 108	79
β-φαινυλαιθανόλη	49,0	91, 92, 122	91
β-ιονόνη	50,1	177, 192	177
γερανικό οξύ	70,9	100, 123, 168	100
βανιλίνη	77,0	152, 151, 123	151

\*εσωτερικό πρότυπο

### **3.3.10 Συγκριτικά πειράματα επιλογής τύπου ίνας και μεθόδου δειγματοληψίας**

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με πέντε εμπορικά διαθέσιμους τύπους ινών, με δύο τεχνικές δειγματοληψίας:

- α) με έκθεση της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση (HS-SPME, HeadSpace)
- β) με εμβάπτιση της ίνας στην υγρή φάση (DI-SPME, Direct Immersion).

Για την πραγματοποίηση των δοκιμών χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα που περιείχε όλους τους αναλύτες και το εσωτερικό πρότυπο σε



συγκεντρώσεις 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  και 128  $\mu\text{g L}^{-1}$  αντίστοιχα, σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου (ο οποίος παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στην παρ 3.3.5 με σύσταση που φαίνεται στον Πίνακα 3.6). Οι SPME κατεργασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.7.3. Οι πειραματικές συνθήκες (όγκος δείγματος  $V_{\text{δειγμ}}$ , χρόνος εκχύλισης  $t_{\text{εκχ}}$ , θερμοκρασία εκχύλισης  $T_{\text{εκχ}}$ , και ταχύτητα περιστροφής της μαγνητικής ράβδου  $T_{\text{περ/φής}}$ ), παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6.

**Πίνακας 3.6: Πειραματικές συνθήκες για την επιλογή του τύπου ίνας και τεχνικής δειγματοληψίας**

$V_{\text{δειγμ}}$ (mL)	$C_{\text{EtOH}}$ (% v/v)	pH	$C_{\text{NaCl}}$ (mol $\text{L}^{-1}$ )	$T_{\text{εκχυλ-}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_{\text{περ/φής}}$ (rpm)	$t_{\text{εκχ}}$ (min)
10,0	14,0	3,2	4,0	35	1000	60

Για κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Για κάθε αναλύτη  $i$ , με βάση το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής  $A_{i(\text{spike, sim})}$ , υπολογίστηκε το σχετικό εμβαδόν,  $A_{i(\text{rel, spike, sim})}$  (σύμφωνα με την εξίσωση 3.6) και οι

$$\text{αντίστοιχοι μέσοι όροι } \bar{A}_{i(\text{spike, sim})} = \sum_{f=1}^{f=3} A_{(i, \text{spike, sim}),f} / 3 \text{ και } \bar{A}_{i(\text{rel, spike, sim})} = \sum_{f=1}^{f=3}$$

$$\bar{A}_{(i, \text{rel, spike, sim}),f} / 3).$$

Για να αποτυπωθεί η επίδραση της κάθε ίνας στο σύνολο των ενώσεων, ως εξαρτημένη μεταβλητή επιλέγεται συνήθως το άθροισμα των εμβαδών ή των σχετικών εμβαδών όλων των αναλυτών [138, 225, 226, 228, 230]. Όμως, σε αυτή την περίπτωση δεν λαμβάνεται υπόψη η σημαντικά διαφορετική ευαισθησία για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Έτσι, οι ενώσεις που στην ίδια συγκέντρωση εμφανίζουν μεγαλύτερο αναλυτικό σήμα (μεγαλύτερη ευαισθησία) θα έχουν μεγαλύτερη σχετική συνεισφορά στην τιμή του αθροίσματος των εμβαδών ή των σχετικών εμβαδών. Για να εξλειφθεί αυτό το φαινόμενο, έγινε χρήση **συντελεστών βαρύτητας** για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων [221]. Έτσι, για κάθε αναλύτη  $i$ , το διορθωμένο εμβαδόν,  $\bar{A}_{\text{cor}}$  ( $i, \text{spike, sim}$ ), υπολογίστηκε ως:

$$\bar{A}_{\text{cor}(i, \text{spike, sim})f} = [\bar{A}_{i, (\text{spike, sim})}] / \left[ \sum_{f=1}^{f=5} \bar{A}_{(i, \text{spike, sim}),f} / 5 \right] \quad (3.21)$$

όπου το  $\sum_{f=1}^{f=5} \bar{A}_{(i, \text{spike}, \text{sim}),f}$  είναι το άθροισμα των μέσων εμβαδών της ένωσης  $i$

στις 5 διαφορετικές ίνες και ο όρος  $[\sum_{f=1}^{f=5} \bar{A}_{(i, \text{spike}, \text{sim}),f} / 5]$  είναι το μέσο εμβαδόν της ένωσης  $i$  στις 5 διαφορετικές ίνες και αποτελεί το συντελεστή κανονικοποίησης.

Με την ίδια διαδικασία υπολογίσθηκε το διορθωμένο σχετικό εμβαδόν για κάθε αναλύτη  $i$  και ίνα,  $f$ , ως:

$$\bar{A}_{\text{cor}}(i, \text{rel}, \text{spike}, \text{sim})_f = [\bar{A}_{i, (\text{rel}, \text{spike}, \text{sim})}] / [\sum_{f=1}^{f=5} \bar{A}_{(i, \text{rel}, \text{spike}, \text{sim}),f} / 5] \quad (3.22)$$

όπου το  $\sum_{f=1}^{f=5} \bar{A}_{(i, \text{rel}, \text{spike}, \text{sim}),f}$  είναι το άθροισμα των μέσων σχετικών εμβαδών

της ένωσης  $i$  στις 5 διαφορετικές ίνες και ο όρος  $[\sum_{f=1}^{f=5} \bar{A}_{(i, \text{rel}, \text{spike}, \text{sim}),f} / 5]$  είναι το μέσο σχετικό εμβαδόν της ένωσης  $i$  στις 5 διαφορετικές ίνες και αποτελεί τον συντελεστή κανονικοποίησης.

Το συνολικό διορθωμένο εμβαδό όλων των αναλυτών,  $A_{\text{tot},f}$ , σε κάθε ίνα  $f$  υπολογίζεται ως:

$$A_{\text{tot},f} = \sum_{i=1}^{i=21} \bar{A}_{\text{cor}}(i, \text{spike}, \text{sim}) \quad (3.23)$$

Ενώ, το συνολικό διορθωμένο σχετικό εμβαδό όλων των αναλυτών,  $A_{\text{tot,rel},f}$ , σε κάθε ίνα  $f$  υπολογίζεται ως:

$$A_{\text{tot,rel},f} = \sum_{i=1}^{i=21} \bar{A}_{\text{cor}}(i, \text{rel}, \text{spike}, \text{sim}) \quad (3.24)$$

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την αναπαραγωγιμότητα σε κάθε συνδυασμό ίνας και τύπου μικροεκχύλισης SPME. Για κάθε δοκιμή και για κάθε προσδιοριζόμενο συστατικό  $i$ , υπολογίσθηκε η % σχετική τυπική απόκλιση των εμβαδών,  $A_{i (\text{spike}, \text{sim})}$ , των χρωματογραφικών κορυφών της ένωσης από 3 επαναληπτικές μετρήσεις ( $n=3$ ). Στη συνέχεια, για κάθε δοκιμή, υπολογίσθηκε η μέση σχετική τυπική απόκλιση για τις 21 προσδιοριζόμενες

ενώσεις και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της αναπαραγωγιμότητας της συγκεκριμένης SPME διαδικασίας.

### 3.3.11 Εφαρμογή μερικού παραγοντικού σχεδιασμού για εύρεση σημαντικών παραμέτρων στην SPME

Με χρήση της βέλτιστης τεχνικής δειγματοληψίας (DI-SPME) και ίνας (PDMS/DVB), αντικείμενο σε αυτή τη σειρά δοκιμών ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση επτά παραγόντων στην απόδοση της μικροεκχύλισης για τον GC/MS προσδιορισμό 21 ελεύθερων πρωτογενών αρωματικών συστατικών από οίνους.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μερικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο επιπέδων (two level partial factorial design) που αναπτύχθηκε από τους Plackett και Burman [243, 244].

Στο σημείο αυτό κρίνεται απαραίτητο να δοθούν, συνοπτικά, ορισμένες πληροφορίες για τη μέθοδο που εφαρμόστηκε από τον σχετικά νέο κλάδο της χημειομετρίας.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Κοινότητα Χημειομετρίας (International Chemometrics Society), **χημειομετρία** είναι η επιστήμη που συνδέει τις μετρήσεις που γίνονται σε ένα χημικό σύστημα ή μια χημική διεργασία με την κατάσταση του συστήματος μέσω της εφαρμογής μαθηματικών ή στατιστικών μεθόδων [245]. Με άλλα λόγια είναι η εφαρμογή των μαθηματικών μεθόδων για την επίλυση όλων των τύπων χημικών προβλημάτων. Η διαδικασία σχεδιασμού και εκτέλεσης ενός πειράματος, έτσι ώστε να συλλεχθούν δεδομένα κατάλληλα για στατιστική ανάλυση, που να μπορούν να δώσουν έγκυρα και αντικειμενικά αποτελέσματα καλείται στατιστικός σχεδιασμός του πειράματος ή **πειραματικός σχεδιασμός** (experimental design). Στην αναλυτική χημεία, εφαρμόζονται κυρίως **πλήρεις** ή **κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί**. Ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός αποτελείται από έναν αριθμό πειραμάτων ( $n$ ) όπου όλα τα επίπεδα ( $k$ ) ενός παράγοντα, συνδυάζονται με όλα τα επίπεδα όλων των άλλων παραγόντων ( $m$ ), ( $n=k^m$ ). Η εφαρμογή πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού έχει το πλεονέκτημα ότι πληροφορεί τον αναλυτή για τις αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων και το μειονέκτημα ότι απαιτεί μεγάλο αριθμό πειραμάτων. Για να δοθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα

για τη σημαντικότητα των παραγόντων, σε μια αναλυτική τεχνική όπως η SPME, όπου ο αριθμός των παραμέτρων που επηρεάζουν είναι μεγάλος, η εφαρμογή ενός πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού (ακόμα και εάν κάθε παράγοντας εξετάζοταν σε δύο επίπεδα) θα συνεπάγονταν υπερβολικά μεγάλο αριθμό πειραμάτων (π.χ. για 7 παράγοντες,  $n=2^7$ ), με κίνδυνο την αυξημένη εμφάνιση τυχαίων σφαλμάτων. Για τον παραπάνω λόγο, στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η εφαρμογή ενός κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού και πιο συγκεκριμένα του Κλασματικού Παραγοντικού Σχεδιασμού Δύο Επιπέδων των Plackett & Burman (Two Level Partial Factorial Design) όπου με λιγότερα πειράματα (για  $m$  μεταβλητές, αριθμός πειραμάτων  $n=m+1$ ) παρέχονται πληροφορίες για την επίδραση μεγαλύτερου αριθμού παραγόντων.

Στο σχεδιασμό P-B η **επίδραση** (effect,  $E_{j,i}$ ) ενός παράγοντα  $j$  σε έναν αναλύτη  $i$  αντιπροσωπεύει τη διαφορά της μέσης απόκρισης του συστήματος για τον αναλύτη  $i$ , όταν οι δοκιμές γίνονται με τον παράγοντα  $j$  στο υψηλό επίπεδο (+) ή στο χαμηλό επίπεδο (-). Πιο συγκεκριμένα, καθορίζεται από τη σχέση  $2 [ \Sigma(y_i +) - \Sigma(y_i -) ] / N$ , όπου  $N$ , ο αριθμός των πειραμάτων, και οι όροι  $(y_i +)$  και  $(y_i -)$  είναι οι αποκρίσεις όταν ο παράγοντας  $j$  είναι στο υψηλό και στο χαμηλό επίπεδο αντίστοιχα [243]. Σε κάθε κύκλο μετρήσεων οι άλλες παράμετροι βρίσκονται μια φορά στην (+) και μια φορά στην (-) κατάσταση με αποτέλεσμα όταν αφαιρούνται οι μέσοι όροι των μετρήσεων να μηδενίζεται η επίδραση της μεταβολής τους.

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν 7 παράγοντες (αριθμός πειραμάτων  $N=8$ ). Αφορούσαν το pH του οίνου, τη θερμοκρασία ( $T_{\text{εκχυλ}}$ ) και το χρόνο ( $t_{\text{εκχ}}$ ) της εκχύλισης, τον αλκοολικό βαθμό του οίνου ( $C_{\text{EtOH}}$ ), τη συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος ( $C_{\text{NaCl}}$ ), τον όγκο του δείγματος ( $V_{\text{δειγ}}$ ) και την ταχύτητα περιστροφής ( $\tau_{\text{περ/φής}}$ ) της μαγνητικής ράβδου. Οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές των παραπάνω μεταβλητών (επίπεδα + και -) καθώς και η ονομαστική τιμή (επίπεδο 0) που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7

**Πίνακας 3.7: Επίπεδα παραγόντων για πειραματικό σχεδιασμό Plackett-Burman**

Επίπεδο	V <sub>δειγ</sub> (mL)	C <sub>ΕΙΟΗ</sub> (% v/v)	pH	C <sub>NaCl</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	T <sub>εκχυλ.</sub> (°C)	T <sub>περ/φής</sub> (rpm)	t <sub>εκχ</sub> (min)
(0)	10	12,0	3,2	2,0	37	1000	40
(+)	15	15,0	4,0	4,0	45	1500	20
(-)	5	9,0	2,4	0,0	30	500	60

Για την εξαγωγή της μήτρας του παραγοντικού σχεδιασμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STATISTICA 8.0 (Stat. Soft, Inc., USA). Οι συνθήκες των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 3.8

**Πίνακας 3.8: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman για 7 παράγοντες.**

Πείραμα	V <sub>δειγ</sub> (mL)	C <sub>ΕΙΟΗ</sub> (% v/v)	pH	C <sub>NaCl</sub> (mol L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	T <sub>εκχυλ.</sub> (°C)	T <sub>περ/φής</sub> (rpm)	t <sub>εκχ</sub> (min)
0	10	12,0	3,2	2,0	37	1000	40
1	5	15,0	4,0	4,0	45	500	20
2	15	9,0	2,4	4,0	45	500	60
3	5	15,0	2,4	4,0	30	1500	60
4	15	15,0	4,0	0,0	30	500	60
5	15	15,0	2,4	0,0	45	1500	20
6	15	9,0	4,0	4,0	30	1500	20
7	5	9,0	4,0	0,0	45	1500	60
8	5	9,0	2,4	0,0	30	500	20

Αναλυτικά, η πειραματική διαδικασία ήταν η παρακάτω. Παρασκευάστηκαν προσομοιωτές οίνου (παρα 3.3.5) με περιεκτικότητα 3 g L<sup>-1</sup> σε τρυγικό οξύ και με pH, C<sub>ΕΙΟΗ</sub> και C<sub>NaCl</sub> σύμφωνα με τις τιμές του Πίνακα 3.8. Παρασκευάστηκαν πρότυπα στους προσομοιωτές με προσθήκη κατάλληλων όγκων από το ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης 100 mg L<sup>-1</sup> του μίγματος των προτύπων και από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου ώστε η συγκέντρωση όλων των αναλυτών να είναι 100 μg L<sup>-1</sup> και του εσωτερικού προτύπου 128 μg L<sup>-1</sup>. Κατάλληλος όγκος δείγματος (5, 10 ή 15 mL) μεταφέρθηκε σε γυάλινα φιαλίδια για την SPME κατεργασία. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση όπως περιγράφεται στην

παράγραφο 3.3.7.7 με εμφάπιση της ίνας και τις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες (ταχύτητα περιστροφής της μαγνητικής ράβδου, χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης) που αναφέρονται στον Πίνακα 3.8.

Για κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Για κάθε αναλύτη καταγράφηκε το εμβαδόν,  $A_i$  (spike, sim), και το σχετικό εμβαδόν,  $A_i$  (rel, spike, sim) της χρωματογραφικής κορυφής (εξίσωση (3.6)) και υπολογίσθηκαν οι αντίστοιχοι μέσοι όροι.

Στη συνέχεια με χρήση του στατιστικού προγράμματος STATISTICA 8.0 υπολογίσθηκε η αριθμητική τιμή της επίδρασης (effect) κάθε παραμέτρου  $j$  στην κάθε ένωση  $i$ ,  $E_{j,i}$ . Η συνολική επίδραση  $E_{j,sum}$ , της κάθε παραμέτρου  $j$  σε όλες ενώσεις υπολογίσθηκε με τον τύπο:

$$E_{j,sum} = \sum_{i=1}^{i=21} E_{j,i} \quad (3.25)$$

Η συνολική επίδραση όλων των παραμέτρων υπολογίσθηκε ως:

$$E_{total} = \sum_{j=1}^{j=7} E_{j,sum} \quad (3.26)$$

Η % επίδραση που αντιστοιχεί σε κάθε παράμετρο  $j$ ,  $E_j\%$ , είναι μια ένδειξη της στατιστικής σημασίας κάθε παραμέτρου για το σύνολο των ενώσεων:

$$E_j \% = \frac{E_{j,sum}}{E_{total}} \times 100 \quad (3.27)$$

### 3.3.12 Πειραματικός σχεδιασμός για βελτιστοποίηση σημαντικών παραμέτρων

Σκοπός του πειράματος ήταν η εύρεση της βέλτιστης τιμής για τέσσερις παράγοντες που σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μερικού παραγοντικού σχεδιασμού Plackett-Burman (ΚΕΦ.4, παρ. 4.2.2) είχαν (μετά τη συγκέντρωση του άλατος), τη σημαντικότερη επίδραση στη μικροεκχύλιση των αρωματικών συστατικών από οίνους. Οι παράγοντες αυτοί ήταν το pH του οίνου, η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης ( $C_{EtOH}$ ), η θερμοκρασία της εκχύλισης ( $T_{εκχυλ}$ ) και ο χρόνος της εκχύλισης ( $t_{εκχ}$ ). Σε όλες τις δοκιμές η τελική συγκέντρωση του NaCl παρέμεινε σταθερή  $C_{NaCl} = 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

Για την πραγματοποίηση της βελτιστοποίησης, χρησιμοποιήθηκε **τροποποιημένη μέθοδος Simplex** (Modified Simplex). Για την παραγωγή του αλγορίθμου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MultiSimplex2.1.5 (Grabitech Solutions AB, Σουηδία).

Η μέθοδος Simplex είναι μία διαδοχική μέθοδος πολυπαραμετρικού σχεδιασμού που επιτυγχάνει την αποτελεσματική βελτιστοποίηση αλληλεξαρτώμενων παραμέτρων με τη διεξαγωγή μικρού σχετικά αριθμού πειραμάτων. Συνοπτικά η αρχή της μεθόδου είναι η εξής:

Εάν υποθεθεί ότι έχουν επιλεγθεί  $n$  παράμετροι προς βελτιστοποίηση, τότε στο χώρο των  $n$  διαστάσεων ορίζεται ένα υπερεπίπεδο  $n+1$  σημείων, το οποίο ονομάζεται **Simplex**. Το κάθε **σημείο στο χώρο (vertex)** ορίζει ένα σύνολο τιμών των  $n$  υπό βελτιστοποίηση παραμέτρων. Κάθε φορά απορρίπτεται το vertex με τη χειρότερη απόκριση και αντικαθίσταται με συμμετρικό του ως προς το κεντροειδές της υπερεπιφάνειας που ορίζουν τα υπόλοιπα  $n$  vertices.

Με βάση την **τροποποιημένη μέθοδο Simplex**, η απόκριση του συμμετρικού σημείου του χειρότερου vertex συγκρίνεται με τις αποκρίσεις των υπόλοιπων  $n$  σημείων και εφόσον είναι μεγαλύτερη, υπολογίζεται η περαιτέρω επέκταση του Simplex προς την κατεύθυνση του συμμετρικού σημείου κατά έναν καθορισμένο συντελεστή. Αν είναι μικρότερη των υπολοίπων  $n$  σημείων, αλλά μεγαλύτερη της απόκρισης του vertex με τη μικρότερη απόκριση, τότε υπολογίζεται η θετική σύμπτυξη, δηλαδή το ενδιάμεσο vertex της απόστασης μέχρι το κεντροειδές, ενώ αν είναι μικρότερη και από την απόκριση του vertex με τη μικρότερη απόκριση τότε υπολογίζεται η αρνητική σύμπτυξη δηλαδή το vertex που βρίσκεται στο μέσον της απόστασης του κεντροειδούς με το χειρότερο vertex.

Για την εφαρμογή του αλγορίθμου Simplex ορίστηκαν οι τιμές αναφοράς των παραμέτρων, το βήμα μεταβολής κάθε μεταβλητής και ο πρακτικά χρήσιμος αριθμός των δεκαδικών ψηφίων (Πίνακας 3.9).

**Πίνακας 3.9: Αρχική τιμή, βήμα και δεκαδικά ψηφία των υπό βελτιστοποίηση μεταβλητών**

	<b>pH</b>	<b>t<sub>εκχ</sub></b> (min)	<b>C<sub>ΕτΟΗ</sub></b> (% v/v)	<b>T<sub>εκχ</sub></b> (°C)
<b>Αρχική τιμή</b>	3,2	40	12,0	40
<b>Βήμα</b>	0,4	10	1,5	5
<b>Δεκαδικά ψηφία</b>	1	0	0	0

Οι πειραματικές συνθήκες στις δοκιμές (Βήματα Simplex) περιγράφονται στον Πίνακα 3.10.

**Πίνακας 3.10 : Πειραματικές δοκιμές μεθόδου SIMPLEX**

<b>Βήμα</b>	<b>C<sub>ΕτΟΗ</sub></b> (% v/v)	<b>pH</b>	<b>T<sub>εκχυλ.</sub></b> (°C)	<b>t<sub>εκχ</sub></b> (min)
1	12,0	3,2	40	40
2	11,0	3,0	38	45
3	13,0	3,4	38	45
4	11,0	3,4	43	45
5	13,0	3,0	43	35
6	11,0	3,4	38	35
7	10,0	3,0	43	35
8	9,0	3,4	38	45
9	10,0	3,0	36	35
10	9,0	2,8	32	30
11	10,0	3,3	30	43
12	9,0	2,9	31	47
13	11,0	3,0	38	45

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω :

Για κάθε δοκιμή παρασκευάστηκαν προσομοιωτές οίνου (παρ. 3.3.5) με περιεκτικότητα 3,0 g L<sup>-1</sup> σε τρυγικό οξύ, 3,0 mol L<sup>-1</sup> σε χλωριούχο νάτριο και με pH και C<sub>ΕτΟΗ</sub> σύμφωνα με τις τιμές του Πίνακα 3.10. Παρασκευάστηκαν πρότυπα στους προσομοιωτές με προσθήκη κατάλληλων όγκων από το



ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης 100 mg L<sup>-1</sup> του μίγματος των προτύπων και από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου ώστε η συγκέντρωση όλων των αναλυτών να είναι 100 μg L<sup>-1</sup> και του εσωτερικού προτύπου 128 μg L<sup>-1</sup>. Όγκοι δείγματος 10,0 mL φέρονταν σε φιαλίδια των 20 mL. Ακολουθούσε μικροεκχύλιση με εμβάπτιση της ίνας (παρ. 3.3.7.3), όπου για κάθε δοκιμή η ταχύτητα περιστροφής της μαγνητικής ράβδου ήταν 1000 rpm και η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης όπως αναφέρονται στον Πίνακα 3.9. Στην συνέχεια γινόταν ανάλυση σε GC/MS σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.9.

Για κάθε βήμα k πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Για τον κάθε αναλύτη i και βήμα k υπολογίσθηκε το εμβαδόν,  $A_{i, (spike, sim, k)}$ , και ο αντίστοιχος

μέσος όρος,  $\bar{A}_{i, (spike, sim, k)}$ ,  $(\sum_{f=1}^{f=3} A_{(i, spike, sim, k), f} / 3)$  (n=3). Και στην περίπτωση

αυτή έγινε χρήση **συντελεστών βαρύτητας** για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Το σταθμισμένο εμβαδόν,  $\bar{A}_{corr, i (spike, sim) k}$ , για κάθε ένωση i υπολογίσθηκε με τον τύπο :

$$\bar{A}_{corr, i, (spike, sim, k)} = (\bar{A}_{i, (spike, sim, k)}) / (\bar{A}_{i, (spike, sim, st)}) \quad (3.28)$$

όπου  $\bar{A}_{i, spike, sim, st}$  είναι το μέσο εμβαδόν της ένωσης i στις αρχικές συνθήκες (Πίνακας 3.9).

Ως **απόκριση** του αλγορίθμου σε κάθε βήμα k χρησιμοποιήθηκε το άθροισμα  $S_k$  των σταθμισμένων μέσων εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών των 21 προσδιοριζόμενων συστατικών που υπολογίσθηκε από τον τύπο:

$$S_k = \sum_{i=1}^{i=21} \bar{A}_{corr, i (spike, sim) k} \quad (3.29)$$

### 3.3.13 Χάραξη ευθειών βαθμονόμησης της αναλυτικής διαδικασίας

Με τεχνική δειγματοληψίας DI-SPME, ίνα PDMS/DVB και τις βελτιστοποιημένες συνθήκες μικροεκχύλισης που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.11 ακολούθησαν δοκιμές σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στις παραγράφους 3.3.8.3 και 3.3.9 για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου για τον προσδιορισμό των 21 πρωτογενών αρωματικών ουσιών σε οίνους με GC/MS.

**Πίνακας 3.11: Βελτιστοποιημένες συνθήκες για SPME**

$V_{\delta\epsilon\iota\upsilon}$ (mL)	$C_{\text{EtOH}}$ (% v/v)	pH	$C_{\text{NaCl}}$ (mol L <sup>-1</sup> )	$T_{\text{εκχυλ.}}$ (°C)	$T_{\text{περ/φής}}$ (rpm)	$t_{\text{εκχ}}$ (min)
10	9,0	2,8	3,0	32	1000	30

Με αναλύσεις προτύπων διαλυμάτων (παρ. 3.3.6) χαράχθηκαν για κάθε αναλύτη  $i$  δύο ευθείες βαθμονόμησης της μεθόδου: α) σε υπόστρωμα οίνου, και β) σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου. Τα σχετικά εμβαδά κάθε αναλύτη  $i$  σε εμβολιασμένο υπόστρωμα οίνου  $A_{i(\text{rel,spike})}$ , σε υπόστρωμα τυφλού οίνου  $A_{i(\text{rel,blank})}$ , και σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου  $A_{i(\text{rel,spike,sim})}$ , υπολογίσθηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις 3.1, 3.3 και 3.6, αντίστοιχα. Το καθαρό αναλυτικό σήμα,  $A_{i(\text{rel,spike,net})}$  κάθε αναλύτη  $i$  υπολογίσθηκε με την εξίσωση 3.4.

Για τη χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης σε υπόστρωμα οίνου, εφαρμόσθηκε η ίδια διαδικασία με αυτήν της παραγράφου 3.2.10 .

Για τη χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου, πραγματοποιήθηκαν 6 δοκιμές ( $n=6$ ) σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση  $i$ , έγινε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης τού μέσου σχετικού εμβαδού  $\bar{A}_{i(\text{rel,spike,sim})}$  όλων των δοκιμών (εξαρτημένη μεταβλητή) συναρτήσει της συγκέντρωσης  $C_i$  (ανεξάρτητη μεταβλητή) με βάση την εξίσωση:

$$\bar{A}_{i(\text{rel,spike,sim})} = (a_{sim,i} \pm s_{a,i}) C_i + (b_{sim} \pm s_{b,i}) \quad (3.30)$$

όπου:  $a_{sim,i}$  είναι η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης,  $s_{a,i}$  η τυπική απόκλιση της κλίσης,  $b_{sim,i}$  η τεταγμένη επί την αρχή της ευθείας,  $s_{b,i}$  η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή και  $C_i$  η συγκέντρωση κάθε αναλύτη (σε mg L<sup>-1</sup>).

### 3.3.14 Εκτίμηση ορίων ανίχνευσης και προσδιορισμού

Εφαρμόσθηκε η ίδια διαδικασία με την παράγραφο 3.2.11.

### 3.3.15 Εκτίμηση ακρίβειας και πιστότητας

Για τον αξιολόγηση της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες με αυτές που περιγράφονται στην παράγραφο 3.2.12.

Η % ολική ανάκτηση,  $R_{t,i}$  %, κάθε αναλύτη  $i$  υπολογίσθηκε από τον τύπο:

$$R_{t,i} \% = a_{mm,i} / a_{sim,i} \times 100 \quad (3.31)$$

Όπου:  $a_{mm,i}$  η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης σε υπόστρωμα οίνου (εξίσωση 3.10) και  $a_{sim,i}$  η κλίση της ευθείας βαθμονόμησης σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου (εξίσωση 3.30).

### 3.3.16 Εκτίμηση αβεβαιότητας

Εφαρμόσθηκε η ίδια διαδικασία με την παράγραφο 3.2.13

### 3.3.17 Πειραματικός σχεδιασμός για εκτίμηση αντοχής (ruggedness) και ανθεκτικότητας (robustness)

Για την αξιολόγηση της αντοχής και ανθεκτικότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μερικού παραγοντικού σχεδιασμού δύο επιπέδων Plackett και Burman. Οι παράμετροι που εξετάσθηκαν ήταν το pH, η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης του δείγματος ( $C_{EtOH}$ ), η θερμοκρασία της εκχύλισης ( $T_{εκχυλ}$ ), ο χρόνος της εκχύλισης ( $t_{εκχυλ}$ ), η παλαιότητα της ίνας και η συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος ( $C_{NaCl}$ ). Οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές των παραπάνω μεταβλητών (επίπεδα + και -) καθώς και η ονομαστική τιμή (επίπεδο 0) που χρησιμοποιήθηκαν, παρουσιάζονται Πίνακα 3.12

Πίνακας 3.12 :Επίπεδα παραγόντων για έλεγχο ανθεκτικότητας της μεθόδου με πειραματικό σχεδιασμό Plackett-Burman

Επίπεδο	Παλαιότητα ίνας	$C_{EtOH}$ (% v/v)	pH	$C_{NaCl}$ (mol L <sup>-1</sup> )	$T_{εκχυλ}$ (°C)	$T_{inj}$ (°C)	$t_{εκχ}$ (min)
(0)	Χρησ/νη <sup>α</sup>	9,0	2,8	3,0	32	230	30
(+)	Καινούργια <sup>β</sup>	9,5	2,9	3,1	34	235	31
(-)	Παλαιά <sup>γ</sup>	8,5	2,7	2,9	30	225	29

α: 25 μετρήσεις, β: 0 μετρήσεις, γ: 100 μετρήσεις

Για την παραγωγή της μήτρας του παραγοντικού σχεδιασμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STATISTICA 8.0 (Stat. Soft, Inc., USA). Οι πειραματικές συνθήκες που ακολουθήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.13.

**Πίνακας 3.13: Πειραματικός σχεδιασμός Plackett-Burman 7 παραγόντων για έλεγχο ανθεκτικότητας της μεθόδου.**

Πείραμα	Παλαιότητα ίνας	C <sub>EtOH</sub> (% v/v)	pH	C <sub>NaCl</sub> (mol L <sup>-1</sup> )	T <sub>εκχυλ.</sub> (°C)	T <sub>inj.</sub> (°C)	t <sub>εκχ</sub> (min)
0	χρησ/νη	9,0	2,8	3,0	32	230	30
1	καινούργια	8,5	2,7	2,9	30	235	31
2	καινούργια	8,5	2,9	3,1	30	225	29
3	παλαιά	9,5	2,7	3,1	30	235	29
4	παλαιά	9,5	2,9	2,9	30	225	31
5	παλαιά	8,5	2,7	3,1	34	225	31
6	παλαιά	8,5	2,9	2,9	34	235	29
7	καινούργια	9,5	2,7	2,9	34	225	29
8	καινούργια	9,5	2,9	3,1	34	235	31

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η παρακάτω: Παρασκευάστηκαν προσομοιωτές οίνου (παρ. 3.3.5) με περιεκτικότητα 3,0 g L<sup>-1</sup> σε τρυγικό οξύ και με pH, C<sub>EtOH</sub> και C<sub>NaCl</sub> σύμφωνα με τις τιμές του Πίνακα 3.13. Παρασκευάστηκαν πρότυπα στους προσομοιωτές με προσθήκη κατάλληλων όγκων από το ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης 100 mg L<sup>-1</sup> του μίγματος των προτύπων και από το διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου ώστε η συγκέντρωση όλων των αναλυτών να είναι 100 μg L<sup>-1</sup> και του εσωτερικού προτύπου 128 μg L<sup>-1</sup>. Η μικροεκχύλιση πραγματοποιούνταν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.7.3 με εμβάπτιση μίας ίνας PDMS/DVB, ανάλογης παλαιότητας (Πίνακα 3.13) και λοιπές πειραματικές συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 3.13. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ανταποκρίνονταν σε κάθε περίπτωση στις τιμές που αναφέρονται στο Πίνακα 3.13. Ακολουθούσε ανάλυση σε GC/MS σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.9. Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε 3 διαφορετικές σειρές (blocks).

Ως εξαρτημένη μεταβλητή στον πειραματικό σχεδιασμό, χρησιμοποιήθηκε το σχετικό εμβαδόν των κορυφών των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Η στατιστική σημασία για κάθε μία παράμετρο, στο εύρος τιμών που

εξετάσθηκε, υπολογίσθηκε ξεχωριστά για κάθε συστατικό. Για τις παραμέτρους που η παράμετρος βρέθηκε στατιστικά μη σημαντική (ΣΜΣ), η μέθοδος θεωρήθηκε ανθεκτική για το συγκεκριμένο εύρος μεταβλητότητας τιμών. Για τις παραμέτρους που η παράμετρος αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική (ΣΣ), η μέθοδος χαρακτηρίστηκε μη ανθεκτική για τη συγκεκριμένη περιοχή μεταβλητότητας τιμών και υπολογίσθηκαν τα όρια ανθεκτικότητας, δηλ. η περιοχή τιμών στην οποία η μέθοδος είναι ανθεκτική χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο [244] :

$$\left[ X_{(0)} - \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{critical}}{2|E_x|}, X_{(0)} + \frac{|X_{(1)} - X_{(-1)}| E_{critical}}{2|E_x|} \right] \quad (3.32)$$

Όπου :  $X_{(0)}$ ,  $X_{(1)}$  και  $X_{(-1)}$  είναι οι τιμές της παραμέτρου  $X$  για τα επίπεδα (0), (+) και (-), αντίστοιχα

:  $E_x$  είναι η επίδραση κάθε παραμέτρου  $X$

:  $E_{critical} = t_{critical} \cdot (SE)_e$ ,

Το τυπικό σφάλμα  $(SE)_e$  υπολογίσθηκε από τη σχέση [244]:

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{4s^2}{N}} \quad (3.33)$$

όπου:  $s^2$  είναι η διακύμανση του μέσου όρου των αποκρίσεων κατά τον υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας

:  $N$  είναι ο αριθμός των επαναλήψεων που έλαβαν χώρα για να εκτιμηθεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η τιμή  $t_{critical}$  είναι η τιμή  $t$  για τους βαθμούς ελευθερίας με τους οποίους υπολογίσθηκε η διακύμανση  $s^2$ . Μία παράμετρος  $X$  θεωρείτο στατιστικά σημαντική για επίπεδο σημαντικότητας 0,05, όταν ικανοποιούσε τη σχέση [244]:

$$|E_x| > E_{critical} \quad (3.34)$$

### 3.3.18 Εφαρμογή μεθόδου σε δείγματα οίνων

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό 21 ελεύθερων και γλυκοζιτικά δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών από 20 μονοποικιλιακούς οίνους. Τα δείγματα των οίνων που αναλύθηκαν προήρθαν από πειραματικές οινοποιήσεις (παράγραφος 3.1) που πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Οίνου Αθηνών και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.14.

**Πίνακας 3.14: Δείγματα οίνων, περιεκτικότητα σε EtOH, όγκος δείγματος (mL) που αραιώθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL και οι συντελεστές διόρθωσης των αποτελεσμάτων**

a/a	ΚΩΔ	ΔΕΙΓΜΑ ΟΙΝΟΥ	EtOH%	Όγκος δείγματος (mL)	Συντελεστής διόρθωσης
1	MAR01	Θραψαθήρι	10,87	41,4	1,2077
2	MAR03	Chardonnay	13,15	34,2	1,4620
3	MAR04	Sauvignon Blanc	12,92	34,8	1,4368
4	MAR05	Gewürztraminer	11,87	37,9	1,3193
5	MAR08	Μονεμβασιά	11,39	39,5	1,2658
6	MAR09	Μαλαγουζιά (1)	13,82	32,6	1,5337
7	MAR12	Μαλαγουζιά (2)	14,98	30,0	1,6667
8	MAR165	Μαλαγουζιά (3)	10,49	42,9	1,1655
9	MAR17	Sauvignon Blanc	13,16	34,2	1,4620
10	MAR18	Gewürztraminer	12,63	35,6	1,4045
11	MAR27	Μπατίκι	11,94	37,7	1,3263
12	MAR28	Ασύρτικο	13,74	32,8	1,5244
13	MAR29	Κυδωνίτσα	12,14	37,1	1,3477
14	MAR34	Σκιαδόπουλο	14,95	30,1	1,6611
15	MAR35	Φιλέρι	12,35	36,4	1,3736
16	MAR36	Ροδίτης	13,18	34,1	1,4663
17	MAR37	Σαββατιανό	12,70	35,4	1,4124
18	MAR44	Μοσχάτο Αμβούργου	12,50	36,0	1,3889
19	MAR49	Μοσχοφίλερο (1)	11,60	38,8	1,2887
20	MAR50	Μοσχοφίλερο (2)	12,20	36,9	1,3550

Για τους προσδιορισμούς των **ελεύθερων και δεσμευμένων αρωματικών συστατικών** των δειγμάτων ακολουθήθηκαν οι κατεργασίες που περιγράφονται στην παράγραφο 3.3.8 και πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.9. Για τη διόρθωση του αλκοολικού τίτλου χρησιμοποιήθηκαν οι όγκοι των δειγμάτων που αναφέρονται στον Πίνακας 3.14. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 επαναληπτικές κατεργασίες και αναλύσεις. Σε καθημερινή βάση πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας γινόταν εξισορρόπηση της ίνας στον εισαγωγέα, για 1 ώρα, στους 250 °C, έλεγχος για πιθανό carry over με τυφλή μέτρηση, και ανάλυση ενός μίγματος προτύπων 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  και εσωτερικού προτύπου 128  $\mu\text{g L}^{-1}$  σε προσομοιωτή οίνου, για έλεγχο της απόδοσης της ίνας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 4.1. Μεθοδολογία SPE-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους

##### 4.1.1. Συγκριτική μελέτη πληρωτικών υλικών

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί, και διατίθενται εμπορικά, νέα πολυμερή πληρωτικά υλικά (sorbents) με βελτιωμένες ιδιότητες τα οποία δεν έχουν, έως σήμερα, δοκιμασθεί για την απομόνωση συστατικών πρωτογενούς αρώματος από οίνους. Σε αυτό το μέρος της διατριβής, 3 νέοι τύποι SPE ρητινών: α) η υδρόφιλης-λιπόφιλης ισοροπίας Oasis HLB, β) η μικτού τύπου Oasis MAX και γ) η ρητίνη υδροξυλιωμένου συμπολυμερούς πολυστυρένιου-διβινυλοβενζολίου Isolute ENV+, συγκρίθηκαν με πληρωτικά υλικά που έχουν κατά το παρελθόν (Κεφ.2, Πίνακας 2.2 & Πίνακας 2.3) χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό: α) μία συμβατική ρητίνη συμπολυμερούς πολυστυρένιου-διβινυλοβενζολίου (Isolute 101), β) μία 1<sup>ης</sup> γενιάς πολυμερούς XAD-2 και γ) δύο τροποποιημένων με C18 αλκυλοομάδες πυριτικών υλικών αντίστροφης φάσης (Resprep C18 και LiChrolute C18).

Τα δείγματα των οίνων κατεργάσθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παρ. 3.2.6 και αναλύθηκαν σε GC/MS όπως περιγράφεται στην παρ. 3.2.7.

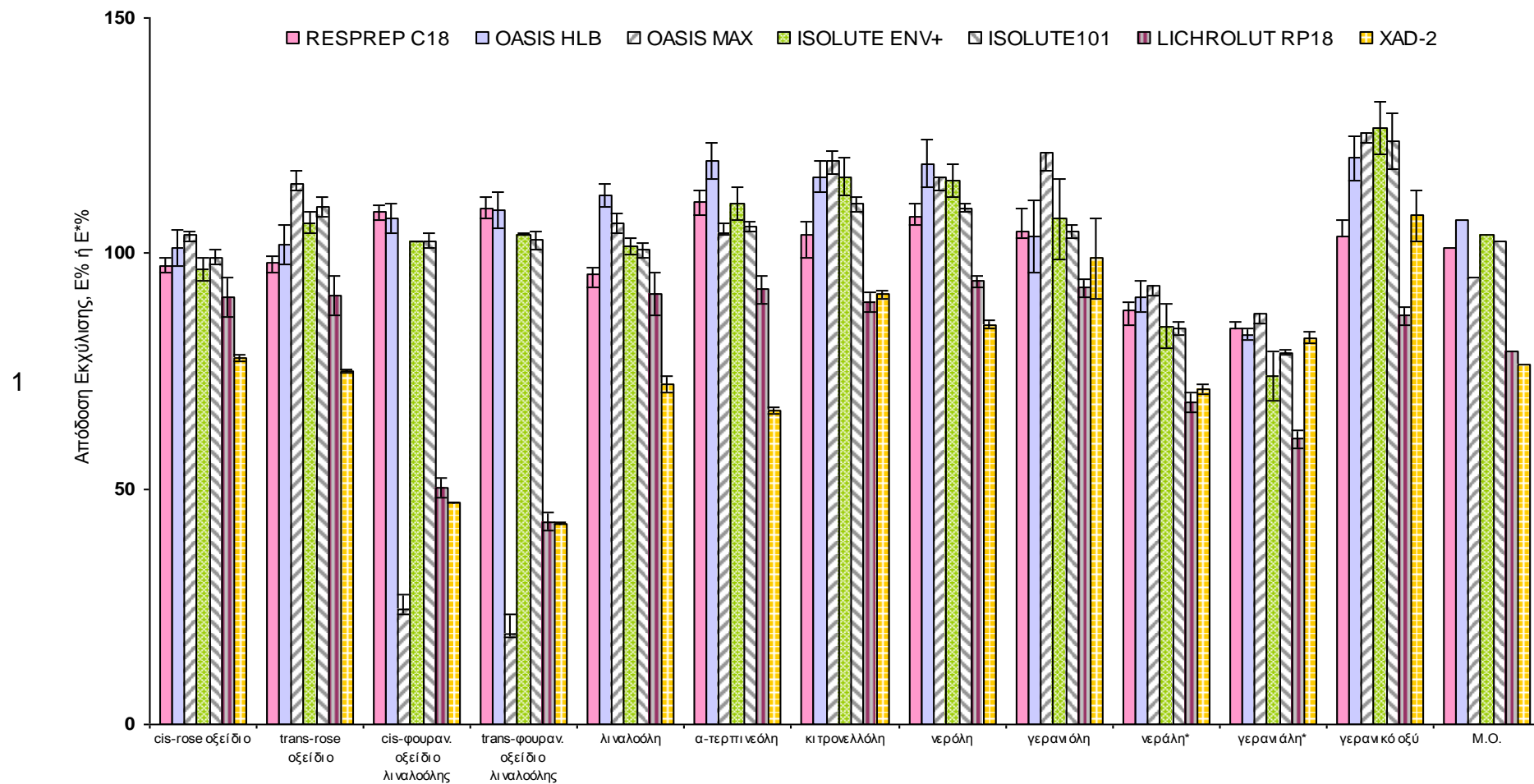
Για τα **ελεύθερα συστατικά** (εκτός από τις ενώσεις νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη) η επίδοση των πληρωτικών υλικών αξιολογήθηκε με βάση την ανάκτηση του σήματος των αναλυτών,  $E_i\%$ , μετά από κατεργασία SPE εμβολιασμένου υποστρώματος οίνου, σε συγκέντρωση  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης των αναλυτών ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε διαλύτη (εξίσωση 3.5, παρ. 3.2.8, Κεφ.3).

Για τις ενώσεις νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη, παρατηρήθηκαν εξαιρετικά υψηλές τιμές ανακτήσεων σήματος  $E_i\%$  με όλα τα πληρωτικά υλικά που



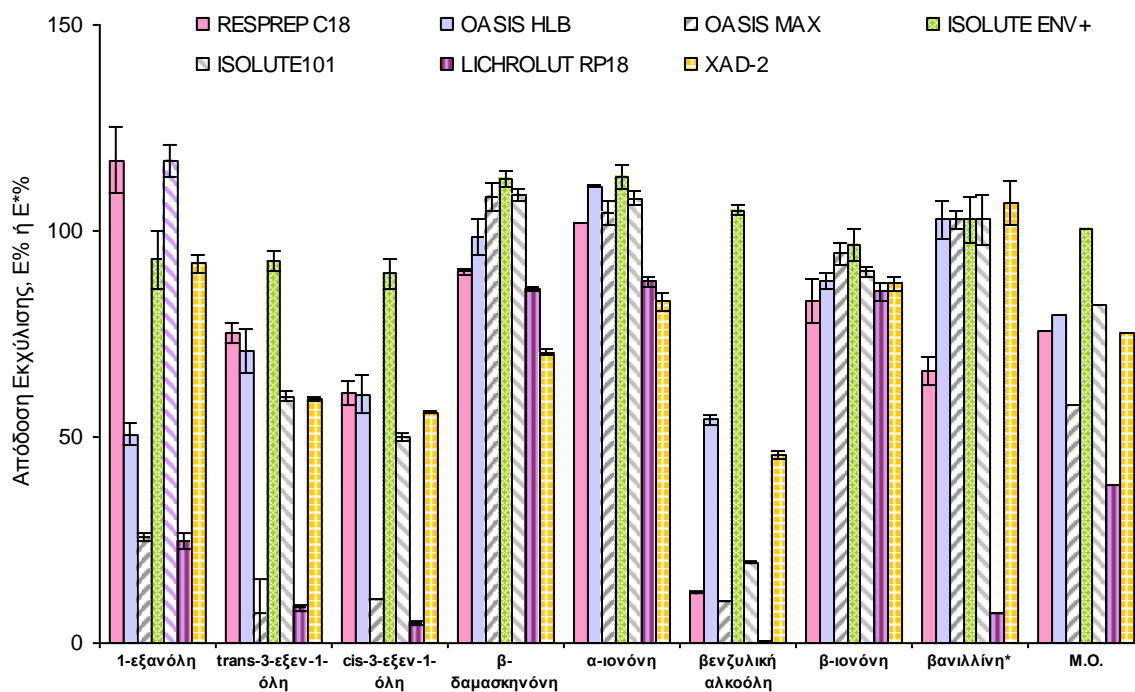
μελετήθηκαν. Το φαινόμενο αποδόθηκε σε επίδραση του υποστρώματος των οίνων (matrix effect) και διερευνήθηκε περαιτέρω για τις παραπάνω προσδιοριζόμενες ενώσεις (παρ. 4.1.2). Για τους τρεις προαναφερόμενους αναλύτες ο υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης των πληρωτικών υλικών, αξιολογήθηκε με βάση την ανάκτηση σήματος,  $E_i^*$ %, δηλαδή με βάση την ανάκτηση του σήματος των τριών ενώσεων που είχαν υποστεί κατεργασία SPE σε δείγμα εμβολιασμένου οίνου σε συγκέντρωση  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ , αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης των αναλυτών έπειτα από κατεργασία SPE σε δείγμα εμβολιασμένου προσομοιωτή οίνου (εξίσωση 3.7, παρ. 3.2.8, Κεφ.3).

Τα αποτελέσματα από την εκχύλιση των **ελεύθερων τερπενοειδών** με τη χρήση των 7 μικροστηλών SPE απεικονίζονται στο Σχήμα 4.1. Όσον αφορά τις δύο C18 ρητίνες που εξετάστηκαν, η ρητίνη Resper C18 επέδειξε μια πιο ισορροπημένη απόδοση για όλα τα εξεταζόμενα συστατικά έχοντας ως αποτέλεσμα η μέση τιμή ανάκτησης σήματος να είναι 101%, σε αντίθεση με τη μέση ανάκτηση σήματος 79% της ρητίνης LiChrolute C18. Η ρητίνη Oasis MAX δεν παρουσίασε σταθερή απόδοση για όλους τους αναλύτες. Για τα cis- και trans- φουρανικά οξείδια της λιναλοόλης απέδωσε ανακτήσεις 24% και 19% αντίστοιχα, ενώ αντίθετα οι τιμές  $E_i\%$  άλλων ενώσεων όπως της γερανιόλης και του γερανικού οξέος ήταν σχετικά υψηλές (121% και 126% αντίστοιχα). Οι ρητίνες Oasis HLB, Isolute ENV+ και Isolute 101 απέδωσαν ικανοποιητικά σε όλο το φάσμα των προσδιοριζόμενων τερπενίων, με μέση τιμή ανακτήσεων 107%, 104% και 103% αντίστοιχα. Τη λιγότερο ικανοποιητική επίδοση για όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά είχε εμφανώς η ρητίνη XAD-2 με μέση τιμή ανάκτησης σήματος 76%.



Σχήμα 4.1: Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των πτητικών τερπενίων ως προς τις ανακτήσεις σήματος ( $E_i\%$  ή  $E_i^*\% \pm S.D.$ ) ( $n=3$ ) των αναλυτών από υπόστρωμα οίνου, για επίπεδο εμβολιασμού  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Τα δεδομένα για την εκχύλιση των ελεύθερων νορισοπρενοειδών, των αλκοολών με 6 άτομα άνθρακα και των βενζολικών παραγώγων (πλην της β-φαινυλαιθανόλης) απεικονίζονται στο Σχήμα 4.2

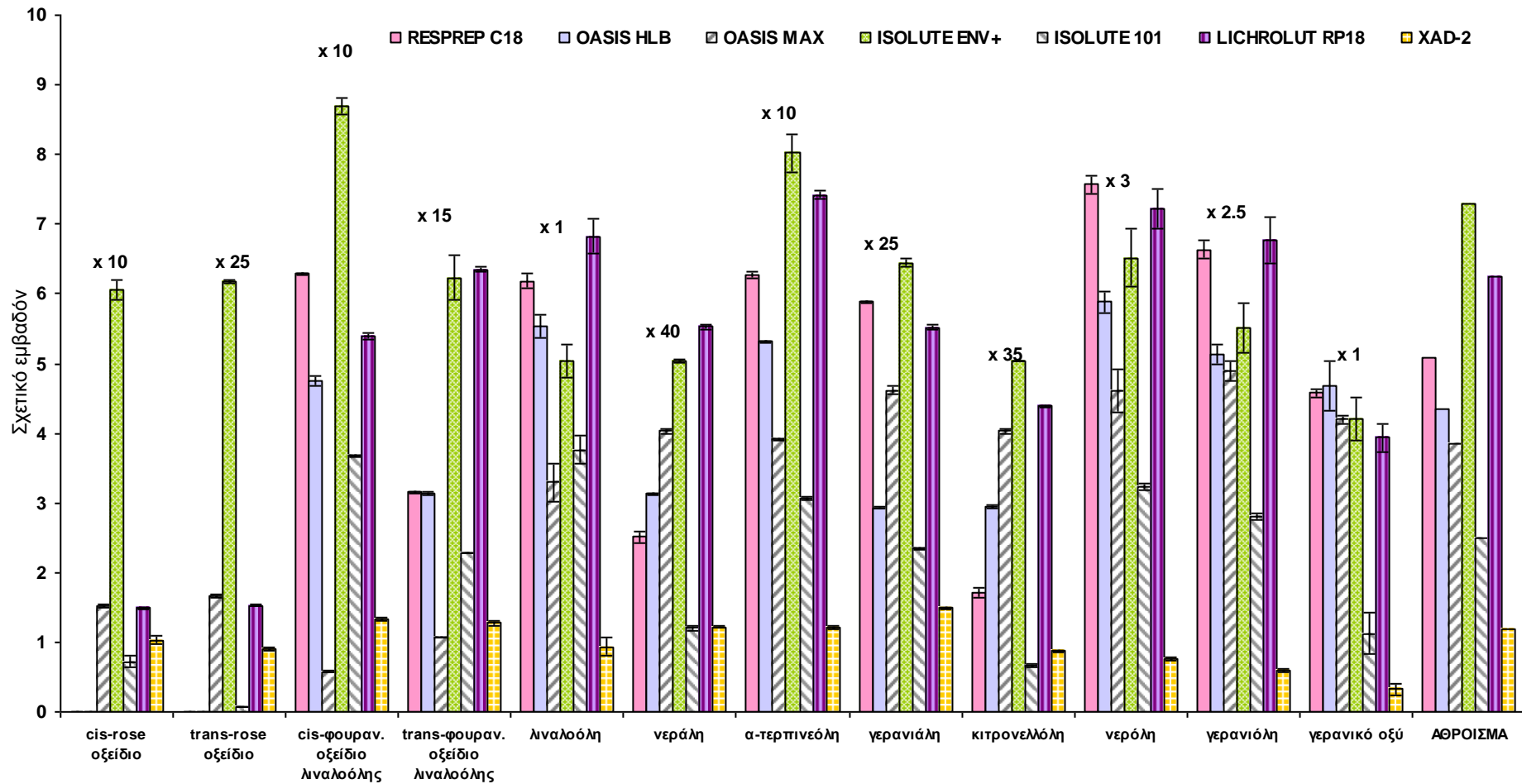


**Σχήμα 4.2** Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των πτητικών C<sub>6</sub> αλκοολών, C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδών και βενζολικών παραγώγων, ως προς τις ανακτήσεις σήματος (E<sub>i</sub>% ή E<sub>i</sub>\*% ± S.D.) (n=3) των αναλυτών από υπόστρωμα οίνου, για επίπεδο εμβολιασμού 200 μg L<sup>-1</sup>.

Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρήθηκε ότι μόνο η μικροστήλη Isolute ENV+, παρείχε υψηλές ανακτήσεις σήματος για όλα τα συστατικά, καθώς και ικανοποιητικό μέσο όρο 101%. Οι άλλες 6 μικροστήλες (Resprep C18, Oasis HLB, Isolute 101, LiChrolut RP-18, Oasis MAX, και XAD-2), χαρακτηρίζονταν γενικά από μεγάλες διακυμάνσεις των αποδόσεων τους για τα διαφορετικά συστατικά και χαμηλότερους μέσους όρους ανακτήσεων. Ανάμεσα στις προαναφερόμενες ρητίνες, πιο αποτελεσματικές ήταν οι Isolute 101 και Oasis HLB, όπου οι μέσες ανακτήσεις των αναλυτών ήταν 82% και 79% αντίστοιχα και ακολουθούσαν οι Resprep C18 και XAD-2 (76% και 75% αντίστοιχα) και η Oasis MAX (58%). Η λιγότερο αποδοτική ρητίνη, από όσες εξετάστηκαν, ήταν εμφανώς η LiChrolut RP-18, με μέση τιμή ανάκτησης 38%.

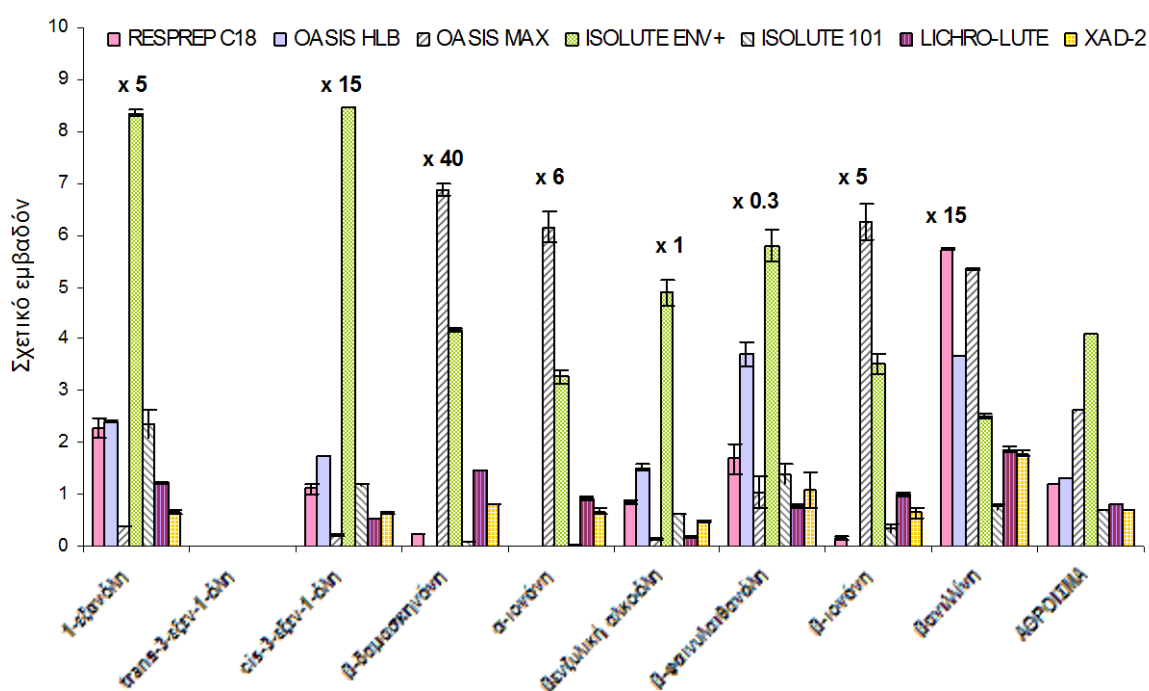
Για τις **πρόδρομες αρωματικές ενώσεις** (όπου δεν διατίθενται πρότυπα) η απόδοση των SPE πληρωτικών υλικών εκφράσθηκε ως σχετικό εμβαδόν των χρωματογραφικών κορυφών των αναλυτών. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί, ότι στην περίπτωση του δεσμευμένου κλάσματος, η επίδοση κάθε πληρωτικού υλικού SPE αντιπροσώπευε τη συνδυασμένη ικανότητα για: α) την ικανοποιητική αρχική συγκράτηση του δεσμευμένου κλάσματος κατά τα στάδια φόρτωσης του δείγματος και έκπλυσης του πληρωτικού υλικού, β) τη συγκράτηση των δεσμευμένων συστατικών κατά τη διάρκεια έκλουσης του ελεύθερου κλάσματος και γ) την απελευθέρωση του δεσμευμένου κλάσματος κατά την έκλουση.

Τα αποτελέσματα από την εκχύλιση των **δεσμευμένων τερπενοειδών** με τη χρήση των 7 μικροστηλών SPE παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.3. Οι δύο ρητίνες C18 που εξετάσθηκαν (Resprep C18 και LiChrolut RP-18) και η Oasis HLB απέδωσαν σχετικά υψηλά αθροίσματα σχετικών εμβαδών των κορυφών αλλά δεν ανταποκρίθηκαν ικανοποιητικά για τα συστατικά που εκλούνται νωρίτερα. Οι Oasis MAX, Isolute 101 και XAD-2 (με αυτή τη σειρά) απέφεραν χαμηλότερα σχετικά εμβαδά τόσο των ανεξάρτητων κορυφών όσο και του συνολικού αθροίσματος. Η αποτελεσματικότερη ρητίνη από όσες εξετάσθηκαν ήταν η Isolute ENV+ η οποία εμφάνισε το υψηλότερο άθροισμα σχετικών εμβαδών των κορυφών των αναλυτών και μία συνεπή επίδοση για τη συγκράτηση όλων των προσδιοριζόμενων ενώσεων.



Σχήμα 4.3: Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλουση των δεσμευμένων τερπενίων, ως προς το σχετικό εμβαδόν  $\pm$  SD (n=3) των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου.

Τα αποτελέσματα από την εκχύλιση των **δεσμευμένων νορισοπρενοειδών, C<sub>6</sub> αλκοολών και βενζολικών παραγώγων** με τη χρήση των 7 μικροστηλών SPE παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.4. Σε αυτές τις κατηγορίες ενώσεων ξεχώρισε η επίδοση της ρητίνης Isolute ENV+ και σε μικρότερο βαθμό της ρητίνης Oasis MAX. Η Isolute ENV+ παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση για το σύνολο των αναλυτών και το βέλτιστο σήμα για τα περισσότερα από τα επιμέρους συστατικά. Η μικροστήλη Oasis MAX παρείχε τα καλύτερα αποτελέσματα για τις 3 κετόνες (α- και β- ιονόνη και β-δαμασκηνόνη).



**Σχήμα 4.4:** Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των δεσμευμένων C<sub>6</sub> αλκοολών, C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδών και βενζολικών παραγώγων, ως προς το σχετικό εμβαδόν ± SD (n=3) των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου.

Από τα συνολικά αποτελέσματα φαίνεται ότι οι μικροστήλες Oasis HLB, Isolute ENV+, Isolute 101 και Resprep C18 ήταν εξίσου κατάλληλες για την εκχύλιση των ελεύθερων τερπενοειδών. Η Isolute ENV+ εμφάνισε την πιο ισορροπημένη συνολική επίδοση για την εκχύλιση ελεύθερων νορισοπρενοειδών, C<sub>6</sub> αλκοολών και βενζολικών ενώσεων από υπόστρωμα οίνου και ξεχώρισε ως η καταλληλότερη για την απομόνωση και έκλυση του

συνόλου των γλυκοζιτικά δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών που προσδιορίστηκαν.

Για τους παραπάνω λόγους, η ρητίνη Isolute ENV+ κρίθηκε ως πιο κατάλληλη για την εφαρμογή της μεθόδου, συγκριτικά με τις καθιερωμένες ρητίνες C18, Amberlite XAD και τα συμβατικά πολυμερή υλικά στυρενίου-διβινυλοβενζολίου, και χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας και την εφαρμογή της σε δείγματα οίνων.

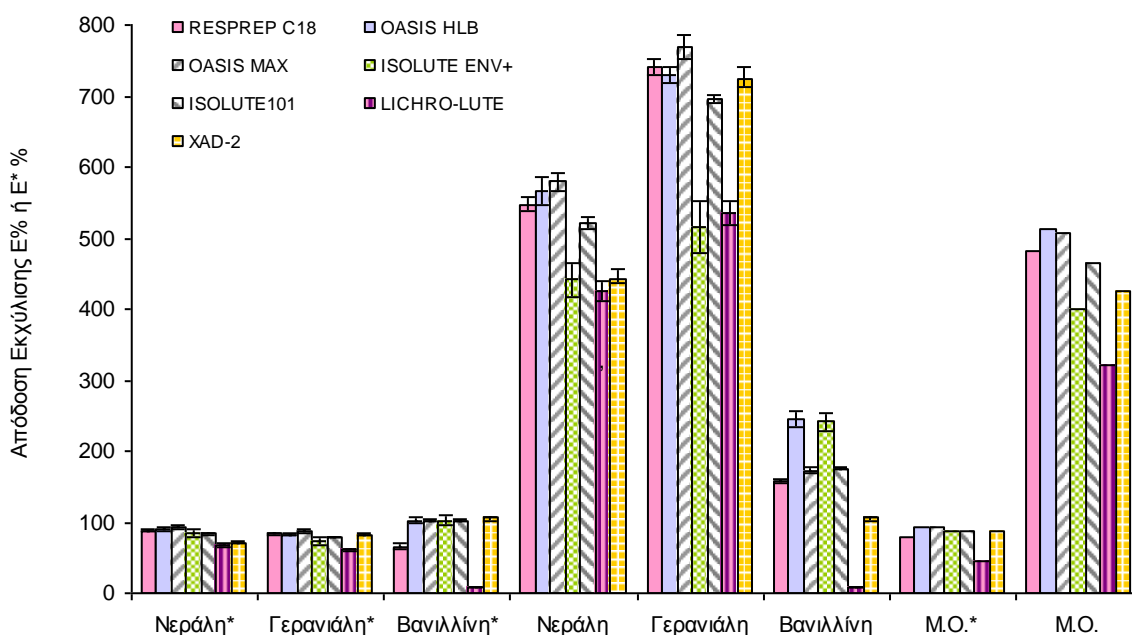
#### **4.1.2. Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)**

Όπως προαναφέρθηκε, κατά τη μελέτη της εκχυλιστικής ικανότητας των επτά πληρωτικών υλικών, οι αναλύτες νεράλη και γερανιάλη (και σε μικρότερο βαθμό η βανιλίνη) εμφάνισαν εξαιρετικά υψηλές τιμές ανακτήσεων σήματος  $E_i\%$ , έπειτα από κατεργασία SPE σε υπόστρωμα οίνου (Σχήμα 4.5). Για τους τρεις προαναφερόμενους αναλύτες ο υπολογισμός της απόδοσης της εκχύλισης των πληρωτικών υλικών, αξιολογήθηκε με βάση την ανάκτηση σήματος,  $E_i^*\%$ , όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.1.1 (Σχήμα 4.5). Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί πιθανή επίδραση του υποστρώματος των οίνων στους προσδιορισμούς των παραπάνω ενώσεων με την προτεινόμενη μεθοδολογία SPE-GC/MS.

Ο όρος υπόστρωμα ή μητρικό υλικό (matrix) αναφέρεται σε όλα τα συστατικά ενός δείγματος πλην των αναλυτών και ο όρος επίδραση υποστρώματος (matrix effect) στην επίδραση που μπορεί να έχουν τα συστατικά του υποστρώματος στους ποσοτικούς προσδιορισμούς των αναλυτών [246].

Μια συνηθισμένη περίπτωση επίδρασης του υποστρώματος στην αέρια χρωματογραφία, που θα μπορούσε να εξηγήσει τις υψηλές παρατηρούμενες τιμές των ανακτήσεων σήματος στην παρούσα περίπτωση, είναι το φαινόμενο της **ενίσχυσης του σήματος** ορισμένων ενώσεων όταν βρίσκονται σε **μητρικό υπόστρωμα** συγκριτικά με το όταν βρίσκονται σε διαλύτη (**matrix-induced enhancement effect**). Το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1993 από τον Erney [247, 248] και συνοπτικά εξηγείται ως εξής: όταν ένα πραγματικό δείγμα εισάγεται στον εγχυτή (liner) του χρωματογράφου, τα συστατικά του υποστρώματος επικαλύπτουν σε κάποιο βαθμό ενεργές θέσεις του εισαγωγέα και της στήλης (κυρίως πυριτικές

ομάδες) με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η διέλευση των αναλυτών και να μειώνονται οι απώλειες από την προσρόφηση ή την αποδόμηση των ουσιών πάνω σε αυτά τα ενεργά σημεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρούνται αυξημένες αποκρίσεις του αναλυτικού συστήματος όταν ο αναλύτης βρίσκεται σε πραγματικό υπόστρωμα συγκριτικά με το όταν βρίσκεται σε διαλύτη [249].



**Σχήμα 4.5:** Επίδοση των 7 πληρωτικών υλικών SPE για την απομόνωση/έκλυση των αναλυτών νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη, ως προς τις ανακτήσεις σήματος ( $E_i\%$  και  $E_i^*\% \pm S.D.$ ) ( $n=3$ ) των αναλυτών από υπόστρωμα οίνου, για επίπεδο εμβολιασμού  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

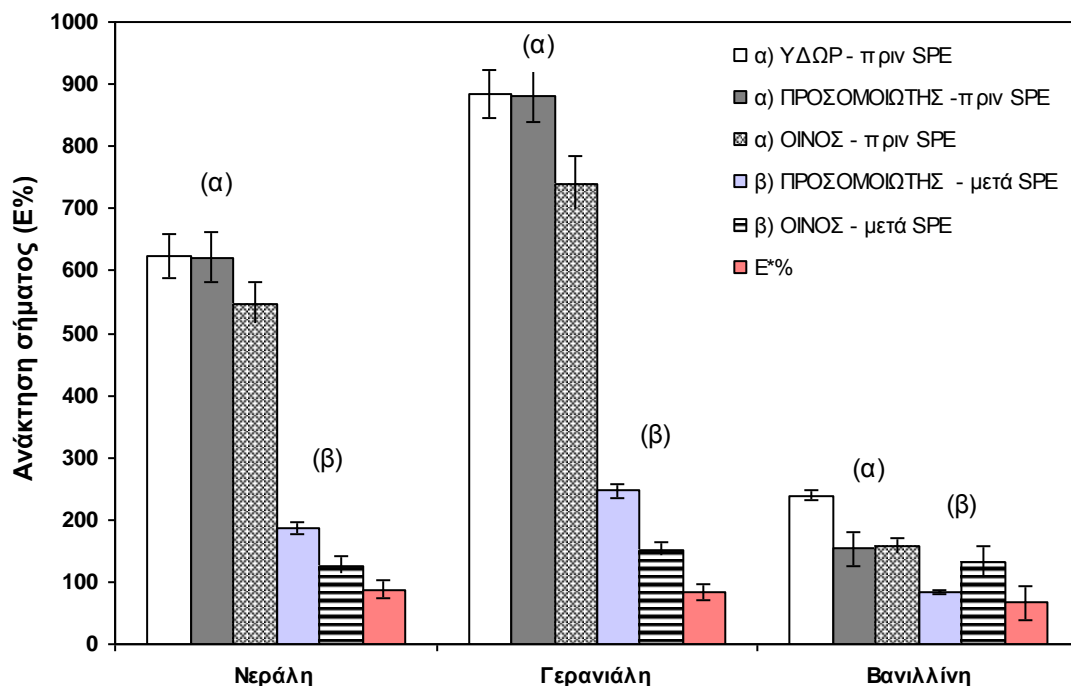
Ένα άλλο φαινόμενο που μπορεί να συμβεί στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων με GC/MS και θα μπορούσε να αποτελεί την αιτία των παρατηρούμενων αυξημένων ανακτήσεων σήματος, είναι η **συνέκλυση** συστατικών του υποστρώματος, με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Ένα τέτοιο φαινόμενο μπορεί να συμβεί ακόμα και στις περιπτώσεις που ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται ένας ειδικός ανιχνευτής όπως ο φασματογράφος μάζας λόγω έλλειψης αρκετά ειδικών χαρακτηριστικών ιόντων  $m/z$  στο φάσμα των



προσδιοριζόμενων ουσιών. Ως αποτέλεσμα, υπάρχει η δυνατότητα συστατικά του υποστρώματος να εκληφθούν λανθασμένα ως αναλύτες [250].

Για να διερευνηθούν τα παραπάνω πιθανά αίτια των αυξημένων ανακτήσεων σήματος, πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός που επέτρεπε τη διεξοδική αξιολόγηση της επίδρασης του υποστρώματος στον προσδιορισμό των συστατικών του πρωτογενούς αρώματος με τη συγκεκριμένη μέθοδο. Τονίζεται ότι, έως σήμερα δεν έχει γίνει άμεση διερεύνηση για την επίδραση του μητρικού υλικού στην ανάλυση οίνων για τον προσδιορισμό αρωματικών συστατικών έπειτα από κατεργασία SPE. Το 2011 σε εργασία των Castro και Vazquez [251] όπου αναφέρεται ότι έγινε μελέτη του matrix effect κατά την ανάλυση παλαιωμένων ερυθρών οίνων της ποικιλίας Tempranillo, αναλύθηκαν δείγματα αναλυτών που υπέστησαν κατεργασία SPE σε υπόστρωμα συνθετικού οίνου και υπολογίσθηκαν οι συντελεστές απόκρισης (Response Factors, R.F) των προσδιοριζόμενων πτητικών συστατικών. Δεν πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις δειγμάτων εμβολιασμένων οίνων (μητρικό υπόστρωμα), και δεν έγινε σύγκριση με το αναλυτικό σήμα των ενώσεων σε διαλύτη.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη περιγράφεται στην παρ. 3.2.9. Συνοπτικά, η αξιολόγηση του matrix effect για κάθε αναλύτη  $i$ , βασίσθηκε στην εκτίμηση της ανάκτησης του σήματος ισοδύναμης συγκέντρωσης ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) του αναλύτη σε υπόστρωμα οίνου, προσομοιωτή οίνου και νερού όπου ο αναλύτης προστέθηκε στο αντίστοιχο υπόστρωμα είτε: α) πριν την κατεργασία με SPE (με στήλη C18) είτε β) μετά την κατεργασία με SPE του κάθε υποστρώματος (με στήλη C18), πάντα με βάση το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης του αναλύτη σε διαλύτη. Για τον υπολογισμό της ανάκτησης σήματος,  $E_i \%$ , σε υπόστρωμα οίνου χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 3.5 (παρ. 3.2.8, Κεφ.3). Για τον υπολογισμό της ανάκτησης σήματος,  $E_{i,x} \%$ , σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου ή ύδατος χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 3.8 (παρ. 3.2.9, Κεφ.3).



**Σχήμα 4.6:** Ανακτήσεις σήματος ( $E\%$ ) των συστατικών νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη, από υπόστρωμα ύδατος, προσομοιωτή οίνου ή οίνου όπου οι αναλύτες προστέθηκαν: α) πριν την κατεργασία SPE (σε στήλη C18) ή β) μετά την κατεργασία SPE (σε στήλη C18), για επίπεδο εμβολιασμού  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , αναφορικά με το σήμα ισοδύναμης συγκέντρωσης των ενώσεων σε διαλύτη.  $E^*\%$  είναι η διορθωμένη ανάκτηση σήματος ισοδύναμης συγκέντρωσης των συστατικών από υπόστρωμα οίνου όπου ο εμβολιασμός έγινε πριν την κατεργασία SPE (σε στήλη C18).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.6 και αφορούν κυρίως τις ενώσεις νεράλη και γερανιάλη (και λιγότερο τη βανιλίνη), μπορούν να γίνουν οι εξής βασικές παρατηρήσεις:

α) Οι εξαιρετικά υψηλές ανακτήσεις σήματος ( $E_i\%$ ) των ενώσεων αυτών παρατηρήθηκαν, τόσο στην περίπτωση όπου οι αναλύτες υπέστησαν κατεργασία SPE (σε στήλη C18) σε υπόστρωμα οίνου (παρ. 3.2.6, Κεφ.3), όσο και στις περιπτώσεις όπου οι αναλύτες υπέστησαν κατεργασία SPE (σε στήλη C18) σε «καθαρά» υποστρώματα (ελεύθερα από αρωματικά συστατικά και παρεμποδιστές) όπως του νερού και του προσομοιωτή οίνου. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η αύξηση του σήματος των τριών

αναλυτών, **δεν οφειλόταν στην ύπαρξη συνεκλουόμενων συστατικών ή παρεμποδιστών** από το μητρικό υλικό (δηλ σε μη ικανοποιητικό καθαρισμό).

β) Το φαινόμενο των υψηλών ανακτήσεων σήματος ( $E_i\%$ ) των τριών αναλυτών δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση όπου ο εμβολιασμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε κατεργασμένο υπόστρωμα οίνου. Αυτό υποδεικνύει ότι δεν ήταν το μητρικό υπόστρωμα υπεύθυνο για τις εξαιρετικά υψηλές ανάκτησεις σήματος των τριών ενώσεων που παρατηρήθηκαν στην περίπτωση που ο εμβολιασμός τους είχε πραγματοποιηθεί, σε υπόστρωμα οίνου πριν την SPE κατεργασία. Άρα **δε συνέβη το φαινόμενο της ενίσχυσης του σήματος λόγω του μητρικού υποστρώματος** (matrix-induced enhancement effect).

Από τα προαναφερόμενα συνάγεται ότι δεν υπήρξε matrix effect στους προσδιορισμούς των παραπάνω αναλυτών. Παραμένει ωστόσο το εύλογο ερώτημα του τι προκάλεσε τις τόσο υψηλές ανακτήσεις σήματος ( $E_i\%$ ) ιδιαίτερα των ενώσεων νερόλη και γερανιάλη μετά την SPE κατεργασία.

Κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυτό το αποτέλεσμα, είναι η παραγωγή επιπλέον ποσοτήτων των παραπάνω ενώσεων από άλλους αναλύτες, κατά την επεξεργασία των δειγμάτων, όπως π.χ από αναγωγή του γερανικού οξέος ή από οξειδωση των αλκοολών νερόλη ή γερανιόλη. Κάτι τέτοιο ωστόσο δε θεωρείται πολύ πιθανό να συνέβη, καθώς δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχα μειωμένες ανακτήσεις σήματος των προαναφερόμενων αναλυτών.

Άλλα πιθανά αίτια του φαινομένου πρέπει να αναζητηθούν στις χημικές ιδιότητες των τριών αναλυτών λόγω της δομής τους. Είναι άξιο προσοχής ότι πρόκειται για τρεις αλδεΐδες, δύο αλειφατικές και μία αρωματική. Ως αλδεΐδες αποτελούν ενδιάμεση μορφή από τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αλκοόλες (νερόλη, γερανιόλη) και τα καρβοξυλικά οξέα (γερανικό, νερικό οξύ) [252]. Η παρουσία της καρβονυλικής ομάδας ωστόσο κάνει τις αλδεΐδες πιο δραστικές από τις προαναφερόμενες άλλες κατηγορίες ενώσεων καθώς υπόκεινται εύκολα σε αντιδράσεις νουκλεόφιλης προσθήκης στο διπλό δεσμό άνθακα-οξυγόνου. [252, 253].

Ειδικότερα, οι μονοτερπενικές αλδεΐδες νεράλη και γερανιάλη - στις οποίες το φαινόμενο ήταν εντονότερο - είναι γεωμετρικά ισομερείς ενώσεις. Η μεν γερανιάλη είναι το trans-ισομερές της 3,7-διμεθυλο-2,6-οκταδιενάλης (κιτράλης) ενώ η νεράλη το cis-ισομερές [252]. Πρόκειται για α, β-ακόρεστες αλειφατικές αλδεΐδες (Κεφ1., Σχήμα 1.2). Η παρουσία στο μόριό τους, εκτός από την καρβονυλική ομάδα των α, β- διπλών C=C δεσμών κάνει τα καρβονυλικά αυτά συστατικά ακόμα πιο υψηλής χημικής δραστηριότητας [254]. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι ενώσεις αυτές αποδομούνται εύκολα, παρουσιάζουν ευαισθησία στην έκθεσή τους στον αέρα και το φως, οξειδώνονται εύκολα προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα και συμμετέχουν σε αντιδράσεις κυκλοποίησης [252, 255, 256].

Είναι επομένως πιθανό, κατά τη GC/MS ανάλυση των δειγμάτων, και εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών του εισαγωγέα (230 °C), της χρωματογραφικής στήλης, της γραμμής μεταφοράς (280 °C), ή του φασματογράφου μάζας, αυτά τα ευάλωτα και υψηλής χημικής δραστηριότητας συστατικά, εν μέρη να αποδομούνταν ή να τροποποιούνταν. Σε αυτήν την περίπτωση, η αύξηση του σήματος που παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις της κατεργασίας τους με SPE, θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι, η κατεργασία παρείχε κάποιου είδους προστασία σε αυτές τις ενώσεις, με αποτέλεσμα να μειώθηκαν οι πιθανές απώλειές τους.

Θα πρέπει εδώ ακόμη να σημειωθεί ότι, στις περιπτώσεις που οι αναλύτες δεν υπέστησαν κατεργασία SPE (χαμηλότερες ανακτήσεις σήματος), οι προσδιορισμοί των συστατικών πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα προτύπων διαλυμάτων και εμβολιασμένων υποστρωμάτων που περιείχαν εκτός από διχλωρομεθάνιο μικρές ποσότητες (1% v/v) μεθανόλης (παρ 3.2.9, Κεφ.3). Αντίθετα, στις περιπτώσεις που οι αναλύτες υπέστησαν κατεργασία SPE (υψηλές ανακτήσεις σήματος), οι αναλύτες βρίσκονταν σε καθαρό περιβάλλον διχλωρομεθανίου, απουσία μεθανόλης. Καθώς η μεθανόλη μπορεί να αντιδράσει με αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών [253], μία ακόμη υπόθεση που θα μπορούσε να γίνει είναι ότι, η απομάκρυνση των υπολειμμάτων της μεθανόλης, που επιτεύχθηκε με την κατεργασία SPE, σχετιζόταν με τη μείωση των απωλειών των αλδευδών, με αποτέλεσμα την αυξημένη απόκριση του αναλυτικού συστήματος .

Ανεξάρτητα ωστόσο, από τα αίτια του φαινομένου, οι μεγάλες διαφορές σήματος που παρατηρήθηκαν μεταξύ των περιπτώσεων όπου οι ενώσεις είχαν ή δεν είχαν υποστεί κατεργασία SPE καθιστά απαραίτητο, η βαθμονόμηση της μεθόδου για αυτές τις ενώσεις να πραγματοποιείται με καμπύλες κατασκευασμένες σε υπόστρωμα οίνου ή συνθετικού οίνου το οποίο να έχει εμβολιασθεί με τους αναλύτες πριν την SPE κατεργασία.

#### 4.1.3. Επικύρωση της μεθόδου

Η επικύρωση (validation) μια μεθοδολογίας αποτελεί σημαντική προαπαιτήση για την εφαρμογή της στη χημική ανάλυση. Σύμφωνα με τον ορισμό του οδηγού της EURACHEM [257], επικύρωση μίας αναλυτικής μεθόδου είναι η επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για τη συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση. Ο σκοπός δηλ. της επικύρωσης μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι να τεκμηριωθεί ότι η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος μετράει αυτό που έχει σχεδιαστεί να μετρήσει και είναι επομένως κατάλληλη για το σχεδιασμένο σκοπό (fitness-for-purpose) [257, 258].

Η επικύρωση μιας μεθόδου πραγματοποιείται πρακτικά με τον υπολογισμό κριτηρίων επίδοσης. Οι Ευρωπαϊκοί και διεθνείς οργανισμοί που καθορίζουν, με την έκδοση κανονισμών και οδηγιών, τη διασφάλιση ποιότητας των αναλυτικών μεθόδων, διαθέτουν διάφορους όρους, τρόπους μελέτης και κριτήρια αποδοχής των χαρακτηριστικών ποιότητας επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου [259]. Κύρια προς αξιολόγηση χαρακτηριστικά (κριτήρια) ποιότητας μιας αναλυτικής μεθόδου είναι: η **ειδικότητα** (specificity) και **εκλεκτικότητα** (selectivity), η **ακρίβεια** (accuracy), η **πιστότητα** (precision), η **γραμμικότητα** (linearity), το **όριο ανίχνευσης** (limit of detection), το **όριο ποσοτικοποίησης** (limit of quantification) και η **ανθεκτικότητα** (robustness ή ruggedness) [259, 260]. Τα τελευταία χρόνια σ' αυτά τα κριτήρια, έχει προστεθεί και η απαίτηση για εκτίμηση της **αβεβαιότητας** (uncertainty) της μεθόδου. [236, 238]

Στη διεθνή βιβλιογραφία ένας πολύ περιορισμένος αριθμός εργασιών έχει αφιερωθεί στην επικύρωση μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αρωματικών συστατικών σε οίνους μετά από SPE κατεργασία.

Στα λίγα πρωτόκολλα αξιολόγησης που υπάρχουν (Κεφ2., Πίνακας 2.2, Πίνακας 2.3), για τον υπολογισμό των παραμέτρων βαθμονόμησης των μεθόδων (γραμμικότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, συντελεστές προσδιορισμού) και για την εκτίμηση της ανάκτησης χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των αναλυτών παρασκευασμένα σε διαλύτη ή σε υπόστρωμα συνθετικού οίνου (αντί για υπόστρωμα οίνου), με αποτέλεσμα η ακρίβεια να μην αξιολογείται σύμφωνα με τις απαιτήσεις για απόδειξη της καταλληλότητας των μεθόδων για την επιδιωκόμενη χρήση.

Στην παρούσα μελέτη, αναπτύχθηκε ένα πλήρες σχήμα επικύρωσης για τον προσδιορισμό πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε οίνους. Τα χαρακτηριστικά επίδοσης που αξιολογήθηκαν αφορούσαν την πλήρη εφαρμογή όλων των σταδίων της μεθόδου στο δείγμα, (προκατεργασία δείγματος και χρωματογραφική ανάλυση). Η βαθμονόμηση και η εκτίμηση της ορθότητας πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους κανόνες και τις επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων της EURACHEM [236-238, 257]. Επιπλέον και σύμφωνα με τις νέες απαιτήσεις για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων [238, 261], πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων.

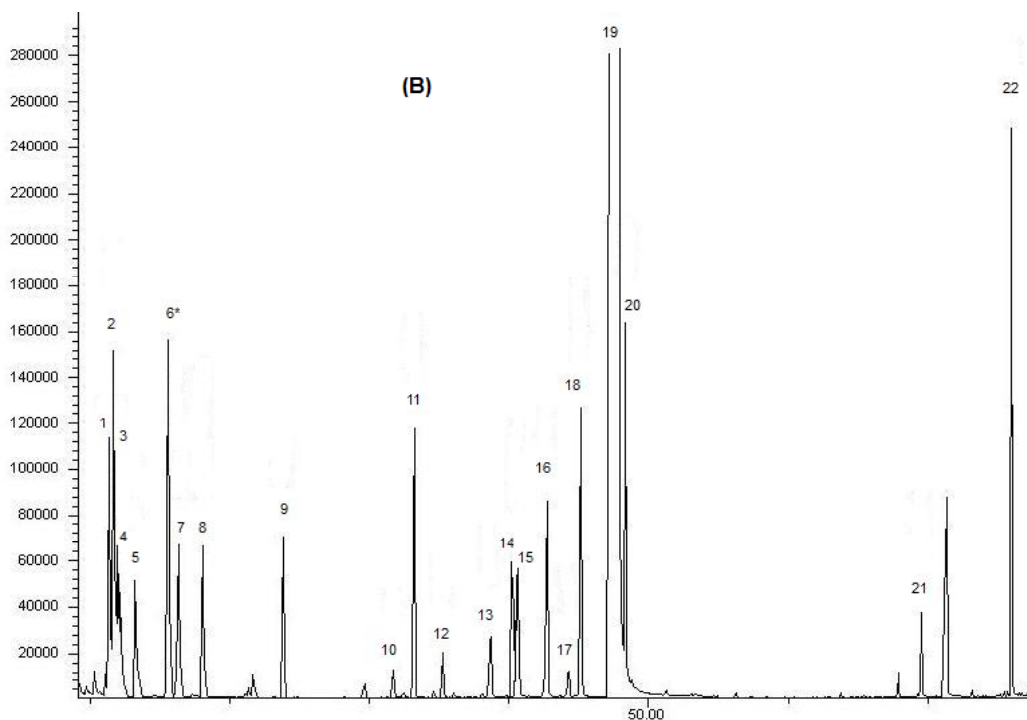
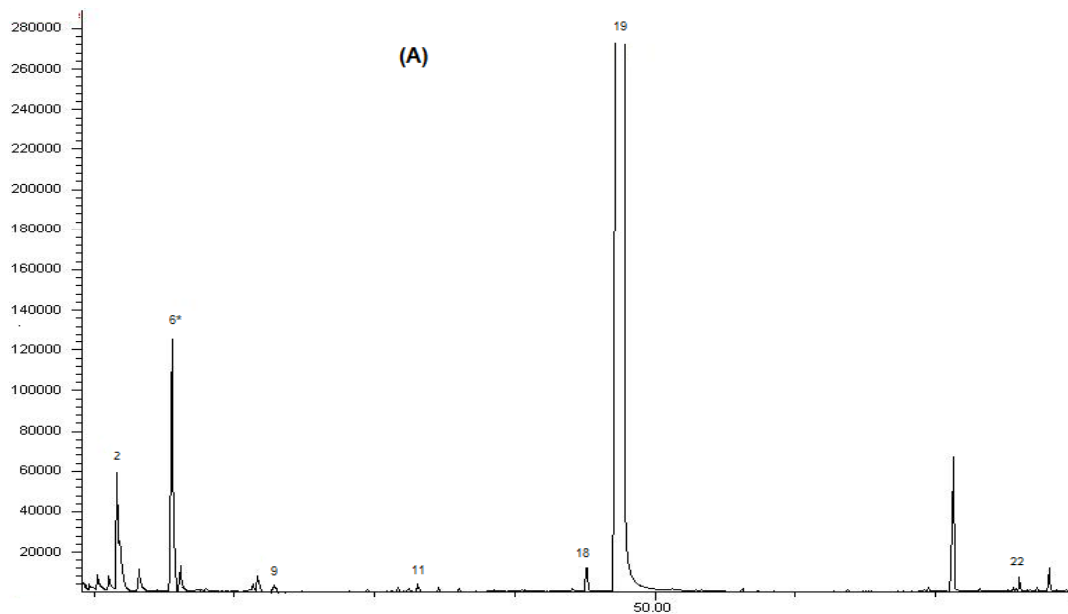
#### **4.1.3.1. Εκλεκτικότητα**

Ως εκλεκτικότητα (πολλές φορές χρησιμοποιείται ισοδύναμα με την έννοια της ειδικότητας) νοείται η ικανότητα μιας μεθόδου να παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις ενός μίγματος χωρίς αλληλεπίδραση με τα υπόλοιπα συστατικά του μίγματος [260]. Μία μέθοδος που είναι εκλεκτική για έναν αναλύτη ή για μία ομάδα αναλυτών θεωρείται ειδική [236].

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με την εφαρμογή της σε είκοσι δείγματα οίνων από δεκαέξι ποικιλίες αμπέλου. Από τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων, για κάθε χρωματογραφική κορυφή, υπολογίσθηκε ο χρόνος ανάσχεσης ( $R_t$ ) και οι λόγοι της αφθονίας του ιόντος ταυτοποίησης προς το ιόν ποσοτικοποίησης. Οι ίδιες παράμετροι εκτιμήθηκαν με την ανάλυση προτύπου διαλύματος μίγματος όλων των αναλυτών ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε διαλύτη, και οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά.

Οι χρόνοι ανάσχεσης και οι λόγοι των ιόντων ταυτοποίησης προς τα ιόντα ποσοτικοποίησης, στις χρωματογραφικές κορυφές των δειγμάτων, βρέθηκαν μέσα στα όρια  $\pm 2\%$  και  $\pm 5\%$  αντίστοιχα, των τιμών του πρότυπου διαλύματος. Επιπλέον, μικρός αριθμός μη ταυτοποιημένων κορυφών παρατηρήθηκαν στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων οι οποίες δεν επικάλυπταν τις κορυφές των αναλυτών. Για τους παραπάνω λόγους η εκλεκτικότητα της μεθόδου θεωρήθηκε ικανοποιητική.

Στο Σχήμα 4.7 παρουσιάζονται δύο χρωματογραφήματα GC/MS μετά από επεξεργασία με SPE: α) υποστρώματος οίνου που προήλθε από «τυφλό» δείγμα οίνου από την ποικιλία Σαββατιανό (φτωχή σε πρωτογενή αρωματικά συστατικά) εμβολιασμένου με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $133 \mu\text{g L}^{-1}$ , και β) του ίδιου υποστρώματος οίνου εμβολιασμένου με όλες τις προσδιοριζόμενες ενώσεις σε συγκέντρωση  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  και εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $133 \mu\text{g L}^{-1}$ . Σε αυτό το δείγμα οίνου καθώς και σε όλα τα δείγματα οίνων που αναλύθηκαν, κυρίαρχες κορυφές ήταν της εξανόλης-1 και της β-φαινυλαιθανόλης.



**Σχήμα 4.7:** Δύο GC-MS χρωμ/τα (μέθοδος SIM) μετά από κατεργασία SPE: (A) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου, και (B) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου εμβολιασμένου με όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά σε συγκέντρωση  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Δείκτης: 1, *cis*-rose οξείδιο· 2, εξανόλη-1· 3, *trans*-rose οξείδιο· 4, *trans*-3-εξεν-1-όλη· 5, *cis*-3-εξεν-1-όλη· 6\*, οκτανόλη-2 (IS)· 7, *cis*-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης· 8, *trans*-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης· 9, λιναλοόλη· 10, νεράλη· 11, α-τερπινεόλη· 12, γερανιάλη· 13, κιτρονελλόλη· 14, β-δαμασκηνόνη· 15, νερόλη· 16, α-ιονόνη· 17, γερανιόλη· 18, βενζυλική αλκοόλη· 19, β-φαινυλαιθανόλη· 20, β-ιονόνη· 21, γερανικό οξύ· 22, βανιλίνη.



#### 4.1.3.2. Γραμμικότητα και ανιχνευσιμότητα

Η γραμμικότητα της απόκρισης του αναλυτικού συστήματος, για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση, ελέγχθηκε με τη χάραξη καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας πρότυπα εργασίας των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου και σε διαλύτη (παρ. 3.2.10, Κεφ.3).

Οι παράμετροι της γραμμικής παλινδρόμησης για κάθε αναλύτη, από τις καμπύλες βαθμονόμησης των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου (Κεφ.3, παρ. 3.2.10, εξίσωση 3.10): κλίση της ευθείας ( $a_{mm}$ ), τυπική απόκλιση της κλίσης της ευθείας ( $s_a$ ) τεταγμένη επί την αρχή ( $b_{mm}$ ), τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή ( $s_b$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ), παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

**Πίνακας 4.1: Παράμετροι βαθμονόμησης και όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου.**

Αναλύτες	$a_{mm}$	$s_a$	$b_{mm}$	$s_b$	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξείδιο	1,6381	0,0323	0,0097	0,0013	0,9970	0,8	2,6
εξανόλη-1	1,5019	0,0333	0,0047	0,0017	0,9980	3,8	12,7
trans-rose οξείδιο	0,7014	0,0142	0,0036	0,0057	0,9970	0,2	0,5
trans-3-εξεν-1-όλη	0,6674	0,0053	0,0014	0,0021	0,9960	1,2	3,8
cis-3-εξεν-1-όλη	1,0192	0,0081	0,0032	0,0033	0,9996	1,3	4,2
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	0,6354	0,0094	0,0027	0,0038	0,9980	0,2	0,6
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	0,6530	0,0101	0,0031	0,0041	0,9980	0,5	1,7
λιναλοόλη	1,0901	0,0160	0,0115	0,0065	0,9980	0,4	1,5
νεράλη	0,1112	0,0051	0,0034	0,0024	0,9920	3,6	11,9
α-τερπινεόλη	0,7352	0,0128	0,0028	0,0052	0,9980	1,0	3,5
γερανιάλη	0,2419	0,0139	0,0075	0,0060	0,9900	5,3	17,7
κιτρονελλόλη	0,5577	0,0067	0,0018	0,0027	0,9991	0,5	1,7
β-δαμασκηνόνη	0,1551	0,0017	0,0005	0,0007	0,9993	0,3	1,1
νερόλη	0,4281	0,0062	0,0013	0,0025	0,9980	2,2	7,2
α-ιονόνη	1,2242	0,0171	0,0034	0,0029	0,9980	0,3	1,0
γερανιόλη	0,1327	0,0019	0,0003	0,0008	0,9980	3,6	12,0
βενζυλική αλκοόλη	1,3834	0,0249	0,0048	0,0010	0,9980	1,3	4,3
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	2,2590	0,0435	0,0431	0,0177	0,9970	0,8	2,5
β-ιονόνη	1,0989	0,0240	0,0042	0,0097	0,9970	0,4	1,2
γερανικό οξύ	0,2686	0,0065	0,0011	0,0028	0,9994	2,7	9,0
βανιλίνη	0,5499	0,0396	0,0063	0,0019	0,9980	3,3	11,0

<sup>a</sup> Σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου

Καθώς η ουσία β-φαινυλαιθανόλη προϋπήρχε στο «τυφλό» δείγμα του οίνου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , ο υπολογισμός του καθαρού σχετικού εμβαδού της κορυφής της ένωσης (Κεφ.3, παρ 3.2.8, εξίσωση 3.4) που αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση εμβολιασμού του τυφλού δείγματος οίνου, δεν ήταν εφικτός. Για το λόγο αυτό, στο συγκεκριμένο αναλύτη αναφέρονται οι παράμετροι γραμμικής παλινδρόμησης από καμπύλη βαθμονόμησης με πρότυπα σε προσομοιωτή οίνου.

Σε όλα τα συστατικά ο συντελεστής προσδιορισμού,  $r^2$ , ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 0,99 δείχνοντας ότι για το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν η γραμμικότητα ήταν πολύ ικανοποιητική.

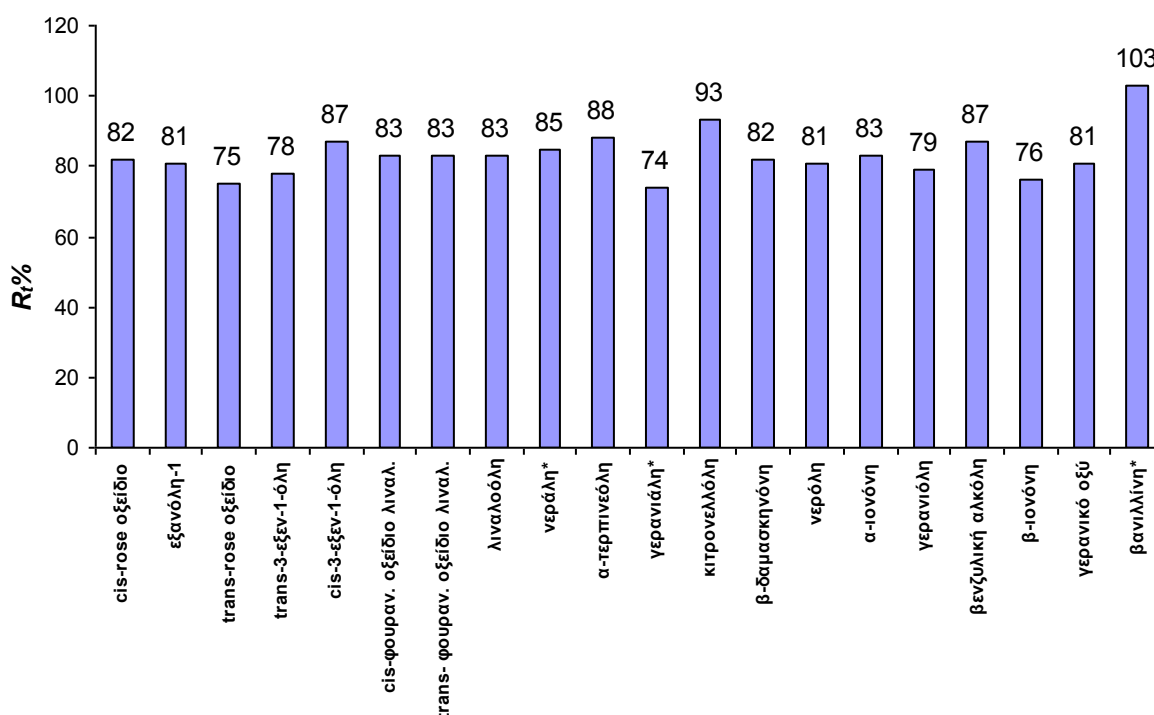
Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) προσδιορίστηκαν, για κάθε αναλύτη, από τις παραμέτρους βαθμονόμησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου σύμφωνα με τις εξισώσεις 3.11 και 3.12 (παρ. 3.2.11, Κεφ.3). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Για τους προσδιορισμούς των LOD και LOQ ήταν απαραίτητο να υπολογισθεί η τιμή της τυπικής απόκλισης του καθαρού αναλυτικού σήματος κάθε ένωσης σε πρότυπο διάλυμα εργασίας  $10 \text{ mg L}^{-1}$  σε υπόστρωμα οίνου. Η παρουσία, ωστόσο, της ενδογενούς εξανόλης-1 στο «τυφλό» δείγμα του οίνου δεν επέτρεπε τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων μικρότερων από  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Για το λόγο αυτό, για το συγκεκριμένο συστατικό στις εξισώσεις 3.11 και 3.12 χρησιμοποιήθηκε η τυπική απόκλιση του προτύπου εργασίας σε υπόστρωμα οίνου με συγκέντρωση  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Επιπλέον οι % ανακτήσεις των ενώσεων νεράλη, γερανιάλη, γερανικό οξύ και βανιλίνη ήταν  $< 50\%$  για επίπεδο εμβολιασμού  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Σε αυτές τις περιπτώσεις τα όρια LOD και LOQ υπολογίστηκαν με χρήση της τυπικής απόκλισης του προτύπου εργασίας σε υπόστρωμα οίνου με συγκέντρωση  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Συνολικά, τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν μεταξύ  $0,2 - 5,3 \text{ mg L}^{-1}$  και τα όρια ποσοτικοποίησης στην περιοχή  $0,6 - 17,7 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### **4.1.3.3. Ολική ανάκτηση**

Η ολική % ανάκτηση  $R_f\%$ , είναι ένα μέτρο εκτίμησης της συνολική επίπτωσης στο αναλυτικό σήμα από το συνδυασμό: α) της επίδρασης του υποστρώματος (ενίσχυση ή καταστολή του σήματος λόγω συστατικών του υποστρώματος) και β) της ανάκτησης των αναλυτών από το στάδιο της εκχύλισης (την

απόδοση του σταδίου κατεργασίας) [262, 263]. Σύμφωνα με την εξίσωση 3.14 (παρ. 3.2.12, Κεφ.3) η ολική ανάκτηση είναι 100% όταν κλίση της ευθείας βαθμονόμησης των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου, που έχει υποστεί κατεργασία SPE, συμπίπτει με την κλίση της ευθείας βαθμονόμησης σε διαλύτη. Οι τιμές  $R_f\%$ , των προσδιοριζόμενων ενώσεων που παρατηρήθηκαν με την προτεινόμενη μεθοδολογία, απεικονίζονται στο Σχήμα 4.8.



Σχήμα 4.8: Ολική ανάκτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών με τη μέθοδο SPE-GC/MS.

Στα περισσότερα συστατικά οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 76 και 93%. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι περιπτώσεις της νεράλης, γερανιάλης και βανιλίνης όπου η ολική ανάκτηση ήταν εξαιρετικά υψηλή γεγονός που αποτέλεσε θέμα προηγούμενης αναλυτικής συζήτησης (παρ. 4.1.2). Για τις ενώσεις αυτές η ολική ανάκτηση υπολογίστηκε ως ο λόγος της ευθείας βαθμονόμησης των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου που έχει υποστεί κατεργασία SPE ως προς την κλίση της ευθείας βαθμονόμησης των αναλυτών σε προσομοιωτή οίνου που έχει υποστεί κατεργασία SPE. Οι τιμές των ολικών ανακτήσεων ήταν αποδεκτές, γεγονός που σημαίνει ότι οι καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν με χρήση προτύπων σε διαλύτη θα μπορούσαν,

θεωρητικά, να χρησιμοποιηθούν ως καμπύλες αναφοράς για ποσοτικούς προσδιορισμούς. Ωστόσο, για να διορθωθεί η υψηλή ολική ανάκτηση της νεράλης, γερανιάλης και βανιλίνης, και για να βελτιωθεί επιπλέον η ποσοτική αξιολόγηση των υπολοίπων συστατικών, η ακόλουθη επικύρωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων σε υπόστρωμα οίνου.

#### 4.1.3.4. Ακρίβεια μεθόδου

Η **ορθότητα** της μεθόδου εκτιμήθηκε από τις τιμές των εκατοστιαίων ανακτήσεων (R%) των αναλυτών, έπειτα από κατεργασία SPE σε υπόστρωμα οίνου, σε 7 επίπεδα συγκεντρώσεων, σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην παρ. 3.2.12, (Κεφ.3). Οι τιμές R% σε 4 αντιπροσωπευτικά επίπεδα συγκεντρώσεων (10, 50, 200 και 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Στο χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού (10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) οι εκατοστιαίες ανακτήσεις των περισσότερων προσδιοριζόμενων συστατικών κυμάνθηκαν από 61 έως 109%. Οι τιμές αυτές συμμορφώνονται με τα προτεινόμενα - για αυτό το επίπεδο εμβολιασμού - όρια 60 - 115% [239]. Εξαίρεση αποτελούσαν οι ενώσεις νεράλη, γερανιάλη, γερανικό οξύ και βανιλίνη των οποίων οι % ανακτήσεις ήταν μικρότερες από 50%. Στο επίπεδο των 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , οι τιμές R% όλων των συστατικών κυμάνθηκαν μέσα στα προτεινόμενα όρια 80 - 110% [239], εκτός από τις ενώσεις νεράλη, γερανιάλη και βανιλίνη που είχαν μέση εκατοστιαία ανάκτηση 116%, 120% και 114%, αντίστοιχα. Στα δύο ψηλότερα επίπεδα εμβολιασμού (200 και 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), οι τιμές R% όλων των αναλυτών κυμάνθηκαν μεταξύ 89% και 105%, ικανοποιώντας πλήρως τις απαιτήσεις για τιμές ανακτήσεων στην περιοχή 80-110% [239].

Η **πιστότητα** εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετράει τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα [264]. Η πιστότητα της προτεινόμενης μεθόδου εκτιμήθηκε με βάση την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, την επαναληψιμότητα του αναλυτικού συστήματος, και το δείκτη "Horrat".

Τα αποτελέσματα για την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα  $\text{RSD}_M$  % (που υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρ. 3.2.12, Κεφ.3) από 4

αντιπροσωπευτικά επίπεδα συγκεντρώσεων (10, 50, 200 και 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Και στα 4 επίπεδα συγκεντρώσεων οι πειραματικές τιμές  $\text{RSD}_M$  %, ήταν χαμηλότερες από 21% και μέσα στα συνιστώμενα όρια από την AOAC (Association of Official Analytical Chemists, Ένωση Αναγνωρισμένων Αναλυτικών Χημικών) [239].

Τα αποτελέσματα για την επαναληψιμότητα του οργάνου  $\text{RSD}_r$  % (που υπολογίστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 3.2.12, Κεφ.3), από 4 αντιπροσωπευτικά επίπεδα συγκεντρώσεων (10, 50, 200 και 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Οι παρατηρούμενες τιμές δείχνουν ότι υπήρχε πολύ καλή επαναληψιμότητα.

Ο δείκτης “Horrat”,  $H$ , είναι ένας τρόπος υπολογισμού της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και αποτελεί κριτήριο επίδοσης για εσωτερική (ενδοεργαστηριακή) επικύρωση μεθόδου. Για τον υπολογισμό του  $H$  χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις 3.15 - 3.17, παρ. 3.2.12, Κεφ.3

Οι τιμές του δείκτη  $H$  της προτεινόμενης μεθόδου, για κάθε αναλύτη και για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Οι υπολογισθείσες τιμές “Horrat”, ήταν  $\leq 1$  για όλα τα συστατικά και σε όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης.

#### **4.1.3.5. Αβεβαιότητα μετρήσεων**

Είναι πλέον ευρέως αναγνωρισμένο ότι η αξιολόγηση της αβεβαιότητας που συνδέεται με ένα αποτέλεσμα, είναι απαραίτητο στοιχείο της διαδικασίας επικύρωσης [238]. Χωρίς πληροφόρηση για την αβεβαιότητα της μέτρησης η παρουσίαση ενός αναλυτικού αποτελέσματος δεν μπορεί να θεωρείται πλήρης [238]. Η πρώτη έκδοση του προτύπου ISO/IEC 17025:1999, απαίτησε από όλα τα εργαστήρια (διακριβώσεων ή δοκιμών) που εκτελούν δικές τους διακριβώσεις, να εφαρμόζουν διαδικασίες για την εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων [261, 265]. Το 2000 η EURACHEM εξέδωσε οδηγία για την ποσοτικοποίηση της αβεβαιότητας των αναλυτικών μετρήσεων [266] αλλά την τελευταία δεκαετία προτάθηκαν και από άλλους φορείς (NORDTEST, EUROLAB, SANCO κ.α.) μια σειρά από οδηγίες και προτάσεις με εναλλακτικούς τρόπους για την εκτίμηση της αβεβαιότητας [267]. Έως σήμερα, δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων σε μεθόδους ποσοτικών προσδιορισμών

πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε οίνους με SPE (Κεφ.2. Πίνακας 2.2 & Πίνακας 2.3). Στην παρούσα μελέτη, η εκτίμηση της αβεβαιότητας πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο LGC/VAM [238] και βασίσθηκε στη χρήση στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων της επικύρωσης (αβεβαιότητα τύπου A) (Κεφ.3, παρ 3.2.13, εξίσωση 3.19).

Ως βασικές πηγές για τον υπολογισμό της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας θεωρήθηκαν η αβεβαιότητα που σχετίζεται με την πιστότητα της μεθόδου ( $u(P)$ , τυχαία σφάλματα) εκφρασμένη ως τυπική απόκλιση της αναπαραγωγιμότητας ( $RSD_M\%$ ) και η αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ορθότητα της μεθόδου ( $u(R)$ , συστηματικά σφάλματα) εκφρασμένη ως τυπική απόκλιση της ανάκτησης ( $RSD_R\%$ ). Οι πηγές αβεβαιότητας τύπου B (αβεβαιότητα από υλικά αναφοράς και εξοπλισμό) θεωρήθηκε ότι δεν έχουν σημαντική συνεισφορά στην ολική αβεβαιότητα και δε λήφθηκαν υπόψη.

Στη συνέχεια, υπολογίσθηκε η εκατοστιαία **διευρυμένη αβεβαιότητα** (expanded uncertainty  $U_{exp}\%$ ), (Κεφ.3, παρ. 3.2.13, σχέση 3.18) που αποτελεί τη συνήθη μορφή αβεβαιότητας που δίνει ένα εργαστήριο για να συνοδεύσει ένα αποτέλεσμα. Η διευρυμένη αβεβαιότητα εκφράζει το διάστημα μέσα στο οποίο εκτιμάται ότι βρίσκεται η μετρούμενη τιμή για δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Η τιμή προέκυψε πολλαπλασιάζοντας τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα με τιμή του **παράγοντα κάλυψης**  $k$  το 2 ( $k$ , coverage factor), καθώς η στάθμη εμπιστοσύνης 95% θεωρήθηκε ικανοποιητική. Τα αποτελέσματα για κάθε αναλύτη και επίπεδο συγκέντρωσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Οι τιμές  $U_{exp}\%$  κυμάνθηκαν από 3,1 έως 40,3%.

**Πίνακας 4.2: Μέσες % ανακτήσεις, R %, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, RSDM %, επαναληψιμότητα οργάνου, RSDr %, τιμές δείκτη “Horrat” H, και εκατοστιαία διευρυμένη αβεβαιότητα U<sub>exp</sub> %, της μεθόδου SPE σε 4 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα οίνου.**

<b>Αναλύτης</b>	<b>R %</b>	<b>RSD<sub>M</sub> %</b>	<b>RSD<sub>r</sub> %</b>	<b>H</b>	<b>U<sub>exp</sub> %</b>
<b>10 µg L<sup>-1</sup></b>					
cis-rose οξείδιο*	74	9,8	1,1	0,45	16,8
εξανόλη-1	–	–	4,5	–	–
trans-rose οξείδιο*	61	6,4	5,6	0,29	8,8
trans-3-εξεν-1-όλη	92	6,8	0,7	0,31	17,1
cis-3-εξέν-1-όλη*	80	10,4	1,2	0,47	19,1
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης*	80	5,6	2,1	0,26	10,5
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης*	78	5,8	2,3	0,26	10,5
λιναλοόλη	88	10,6	2,0	0,48	26,0
νεράλη	< 50				
α-τερπινεόλη*	74	11,3	1,7	0,52	19,5
γερανιάλη	< 50	–	–	–	–
κιτρονελλόλη	91	8,6	2,2	0,39	21,1
β-δαμασκηνόνη	97	5,2	2,7	0,24	12,2
νερόλη*	77	5,4	2,2	0,24	9,5
α-ιονόνη*	80	10,3	2,1	0,47	19,1
γερανιόλη	109	9,7	3,6	0,44	25,3
βενζυλική αλκοόλη*	66	3,9	1,8	0,18	5,1
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	–	–	–
β-ιονόνη*	77	5,9	3,2	0,27	10,6
γερανικό οξύ	< 50	–	5,0	–	–
βανιλίνη	< 50	–	3,4	–	–
<b>50 µg L<sup>-1</sup></b>					
cis-rose οξείδιο	98	6,9	0,9	0,31	15,8
εξανόλη-1	–	–	1,2	–	–
trans-rose οξείδιο	100	5,8	2,4	0,26	13,4
trans-3-εξεν-1-όλη	94	9,5	2,5	0,43	21,9
cis-3-εξέν-1-όλη*	95	1,2	0,9	0,05	2,6
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	98	3,8	1,1	0,17	8,8
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	98	2,5	0,7	0,11	6,0
λιναλοόλη	101	4,5	0,6	0,21	10,6
νεράλη*	116	6,3	1,8	0,28	16,7
α-τερπινεόλη	98	2,2	0,8	0,10	5,5
γερανιάλη*	120	7,1	1,4	0,32	19,7
κιτρονελλόλη	98	1,9	0,7	0,09	4,7
β-δαμασκηνόνη*	108	2,3	0,7	0,10	5,6
νερόλη	100	8,1	1,6	0,37	18,6
α-ιονόνη	103	2,6	1,3	0,12	6,9
γερανιόλη	94	4,1	0,8	0,18	10,8
βενζυλική αλκοόλη	92	8,3	0,6	0,38	20,2
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	1,5	–	–
β-ιονόνη	103	9,4	1,1	0,43	22,5
γερανικό οξύ	104	16,8	1,9	0,76	40,3
βανιλίνη	114	10	1,2	0,47	29,0

<i>Αναλύτης</i>	<i>R %</i>	<i>RSD<sub>M</sub> %</i>	<i>RSD<sub>r</sub> %</i>	<i>H</i>	<i>U<sub>exp</sub> %</i>
<b>200 µg L<sup>-1</sup></b>					
cis-rose οξειδίο	98	2,5	0,7	0,12	6,0
εξανόλη-1*	89	1,8	2,1	0,09	3,6
trans-rose οξειδίο	98	2,2	2,3	0,11	5,4
trans-3-εξεν-1-όλη	96	3,2	2,4	0,16	8,3
cis-3-εξέν-1-όλη	98	2,9	0,9	0,14	6,9
cis-φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	98	2,2	0,9	0,11	5,3
trans- φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	99	2,1	1,0	0,10	5,0
λιναλοόλη	100	2,3	1,1	0,11	5,3
νεράλη*	93	2,4	1,1	0,12	5,2
α-τερπινεόλη	100	2,8	0,8	0,14	6,4
γερανιάλη*	87	2,6	1,2	0,13	5,3
κιτρονελλόλη	102	3,2	1,3	0,16	7,7
β-δαμασκηνόνη*	100	2,4	0,9	0,12	5,6
νερόλη	102	2,9	0,8	0,14	7,3
α-ιονόνη	102	2,8	1,0	0,14	6,9
γερανιόλη	96	5,9	1,2	0,29	13,7
βενζυλική αλκοόλη	101	2,8	1,4	0,14	6,6
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	2,3	–	–
β-ιονόνη	98	2,2	1,1	0,11	5,4
γερανικό οξύ	97	3,1	0,8	0,15	7,8
βανιλίνη	101	10,3	2,1	0,51	24,1
<b>500 µg L<sup>-1</sup></b>					
cis-rose οξειδίο	98	3,4	4,1	0,21	8,1
εξανόλη-1	100	1,6	1,6	0,10	3,7
trans-rose οξειδίο	98	1,8	0,8	0,12	4,6
trans-3-εξεν-1-όλη	100	3,6	2,1	0,23	8,4
cis-3-εξέν-1-όλη	99	1,3	0,3	0,08	3,1
cis-φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	99	2,6	0,2	0,16	6,0
trans- φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	98	2,7	0,3	0,17	6,4
λιναλοόλη	99	2,7	0,4	0,17	6,3
νεράλη	103	3,7	2,1	0,23	9,3
α-τερπινεόλη	98	4,1	0,9	0,26	9,5
γερανιάλη	105	4,5	0,9	0,28	11,9
κιτρονελλόλη	99	4,9	0,8	0,31	11,4
β-δαμασκηνόνη	99	4,4	0,8	0,28	10,2
νερόλη	99	3,6	0,6	0,22	8,3
α-ιονόνη	99	3,8	1,2	0,24	8,8
γερανιόλη	99	6,1	0,7	0,38	14,1
βενζυλική αλκοόλη	98	2,7	1,0	0,17	6,5
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	4,3	–	–
β-ιονόνη	98	4,9	1,2	0,31	11,3
γερανικό οξύ	98	2,1	1,9	0,13	5,1
βανιλίνη	98	5,7	1,7	0,35	14,3

\* Συστατικά των οποίων η % ανάκτηση ήταν στατιστικά διαφορετική από 100%



Με χρήση  $t$  - test (παρ. 3.2.12, Κεφ.3) έγινε εκτίμηση των περιπτώσεων για τα οποίες η % ανάκτηση ήταν στατιστικά διαφορετική από 100%. Οι περιπτώσεις αυτές επισημαίνονται με αστερίσκο στον Πίνακα 4.2 και κατά την εφαρμογή της μεθόδου (παρ. 4.1.4, Κεφ.4) πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αποτελεσμάτων τους ως προς την ανάκτηση.

#### 4.1.4. Εφαρμογή σε δείγματα οίνων

Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση 20 λευκών μονοποικιλιακών οίνων από 11 ελληνικές και 4 διεθνείς ποικιλίες αμπέλου *V. vinifera* καλλιεργημένες σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Τα αναλυτικά αποτελέσματα για κάθε δείγμα οίνου, παρουσιάζονται στο Παράρτημα της διατριβής (Πίνακας Π1).

Οι εξεταζόμενοι οίνοι διέφεραν ως προς τον αρωματικό τους χαρακτήρα. Η επιλογή των ποικιλιών έγινε με τυχαίο τρόπο, με σκοπό μεταξύ των δειγμάτων να υπάρχει τυχαίος αριθμός από μοσχάτες, αρωματικές και ουδέτερες ποικιλίες. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα μοναδικά αρωματικά χαρακτηριστικά κάθε ποικιλίας, είχε ως αποτέλεσμα να μην ανιχνεύονται σε κάθε δείγμα όλες οι προσδιοριζόμενες ενώσεις, και να υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των αναλυτών μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών. Επιπλέον, όπως αναμενόταν στις περισσότερες περιπτώσεις, και για την ίδια ποικιλία μεγάλες διαφορές παρατηρήθηκαν στα επίπεδα των αναλυτών μεταξύ του ελεύθερου και του δεσμευμένου κλάσματος. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί την ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων στην οποία βαθμονομήθηκε η μέθοδος.

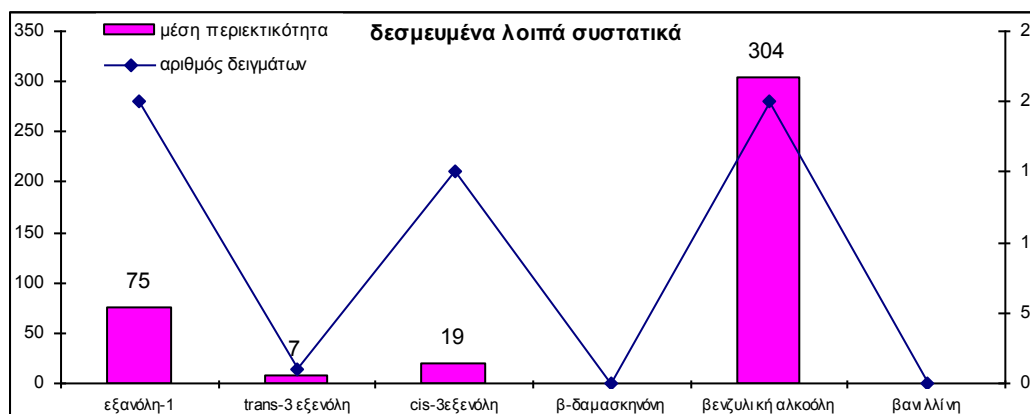
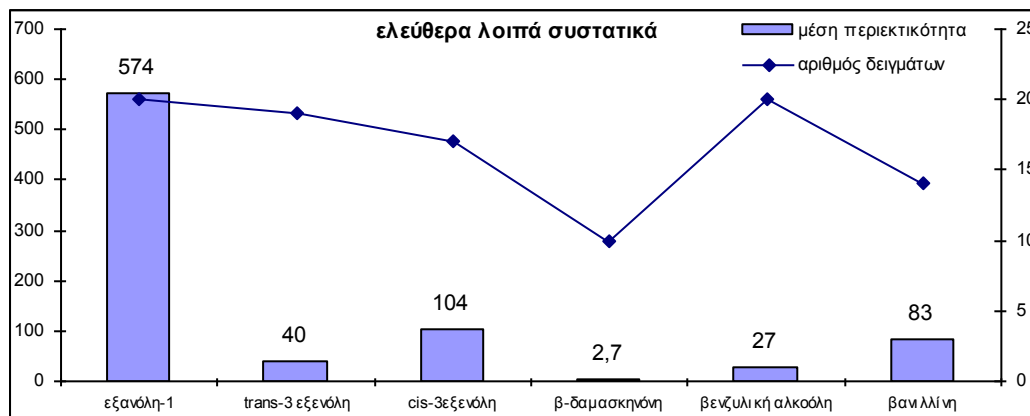
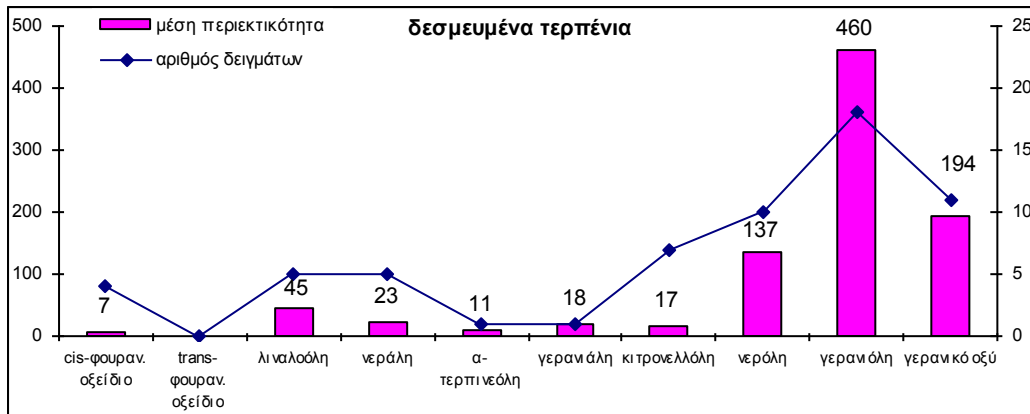
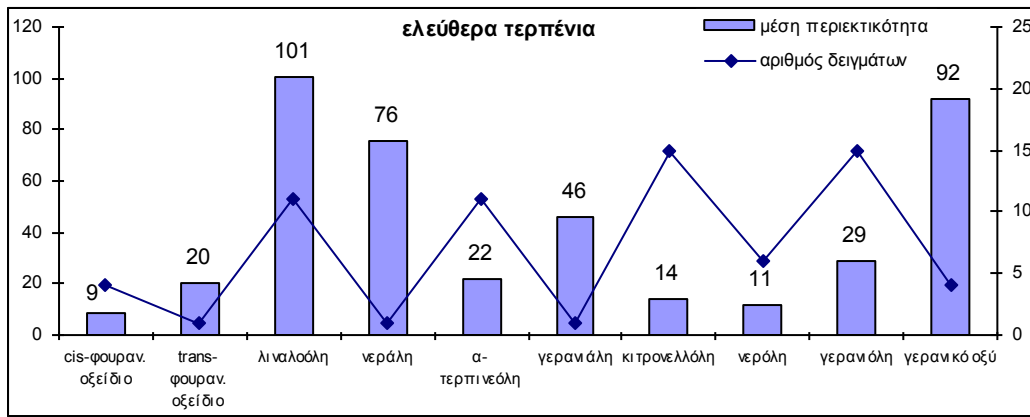
Στον Πίνακα 4.3 και γραφικά στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζονται, συνοπτικά, ορισμένα στατιστικά στοιχεία, για τη συχνότητα εμφάνισης, στους οίνους που μελετήθηκαν, και τις συγκεντρώσεις των 21 αναλυτών σε ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή. Από τα δεδομένα αυτά, μπορούν να γίνουν οι πρακάτω παρατηρήσεις.

Στο ελεύθερο κλάσμα, οι ενώσεις που παρουσιάζουν, τις μεγαλύτερες συγκριτικά, συγκεντρώσεις και οι οποίες ανιχνεύθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων, ήταν η  $\beta$ -φαιθυλαιθανόλη και η εξανόλη-1. Τα επίπεδα της πρώτης, σε όλες τις περιπτώσεις, ήταν υψηλότερα από  $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$  ενώ οι συγκεντρώσεις της δεύτερης κυμαίνονταν μεταξύ 255 και  $1025 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Πίνακας 4.3 Στατιστικά δεδομένα για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις από τις αναλύσεις 20 λευκών οίνων με τη μέθοδο SPE/GC-MS**

<b>ΑΝΑΛΥΤΕΣ</b>	<b>Μορφή</b>	<b>Πλήθος δειγμάτων<sup>α</sup></b>	<b>Ελάχιστη τιμή<sup>β</sup></b>	<b>Μέγιστη τιμή<sup>β</sup></b>	<b>Μέση τιμή<sup>β</sup></b>	<b>Διάμεσος τιμή<sup>β</sup></b>
<b>ΤΕΡΠΕΝΙΑ</b>						
<i>cis</i> -φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	<i>Ελεύθερη</i>	4	0,6	31	8,8	1,8
	<i>Δεσμευμένη</i>	4	1,9	22	7,4	2,7
<i>trans</i> -φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	<i>Ελεύθερη</i>	1	-	-	-	-
	<i>Δεσμευμένη</i>	-	-	-	-	-
Λιναλοόλη	<i>Ελεύθερη</i>	11	5,3	645	101	36
	<i>Δεσμευμένη</i>	5	3,6	76	45	45
Νεράλη	<i>Ελεύθερη</i>	1	-	-	-	76
	<i>Δεσμευμένη</i>	5	13	39	23	14
α-τερπινεόλη	<i>Ελεύθερη</i>	11	3,7	65	22	19
	<i>Δεσμευμένη</i>	1	-	-	-	11
Γερασιάλη	<i>Ελεύθερη</i>	1	-	-	-	-
	<i>Δεσμευμένη</i>	1	-	-	-	-
Κιτρονελλόλη	<i>Ελεύθερη</i>	15	2,2	38	14	8
	<i>Δεσμευμένη</i>	7	2,2	42	17	13
Νερόλη	<i>Ελεύθερη</i>	6	9	16	11	11
	<i>Δεσμευμένη</i>	10	23	277	137	141
Γερασιόλη	<i>Ελεύθερη</i>	15	13	57	29	31
	<i>Δεσμευμένη</i>	18	12	1626	460	107
νερανικό οξύ	<i>Ελεύθερη</i>	4	39	179	92	74
	<i>Δεσμευμένη</i>	11	10	689	194	120
<b>C6 ΑΛΚΟΟΛΕΣ</b>						
εξανόλη-1	<i>Ελεύθερη</i>	20	255	1025	574	585
	<i>Δεσμευμένη</i>	20	41	160	75	64
<i>trans</i> -3- εξενόλη	<i>Ελεύθερη</i>	19	6,6	100	40	29
	<i>Δεσμευμένη</i>	1	-	-	-	-
<i>cis</i> -3- εξενόλη	<i>Ελεύθερη</i>	17	6,1	472	104	73
	<i>Δεσμευμένη</i>	15	4,5	49	19	16
<b>C13 ΝΟΡΙΣ/ΔΗ</b>						
β- δαμασκηνόνη	<i>Ελεύθερη</i>	10	1,2	6,4	2,7	2,3
	<i>Δεσμευμένη</i>	-	-	-	-	-
<b>BENZENIA</b>						
βενζυλική αλκοόλη	<i>Ελεύθερη</i>	20	6,2	76	27	21
	<i>Δεσμευμένη</i>	20	199	489	304	278
β-φαινυλαιθανόλη	<i>Ελεύθερη</i>	20	>10,000	>10,000	>10,000	>10,000
	<i>Δεσμευμένη</i>	20	128	814	318	287
βανιλίνη	<i>Ελεύθερη</i>	14	13	202	83	67
	<i>Δεσμευμένη</i>	-	-	-	-	-

α: αριθμός δειγμάτων οίνων όπου η ένωση προσδιορίστηκε πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης, β: οι συγκεντρώσεις σε mg L<sup>-1</sup>.



**Σχήμα 4.9:** Μέση συγκέντρωση (σε  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ελεύθερων και δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο SPE/GC-MS σε 20 δείγματα οίνων.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών [112, 117, 177, 268].

Οι πολύ υψηλές (εκτός περιοχής βαθμονόμησης) συγκεντρώσεις της ελεύθερης β-φαινυλαιθανόλης οφείλονται στο το ότι εκτός από την αρχική ποσότητα της ένωσης, που προέρχεται από το σταφύλι, επιπρόσθετη ποσότητα παράγεται από τις ζύμες, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (δευτερογενές άρωμα) [9, 115]. Για το λόγο αυτό, και καθώς σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός πρωτογενών αρωματικών συστατικών, η ποσοτικοποίηση της συγκεκριμένης ένωσης περιορίσθηκε για τη δεσμευμένη μορφή της, η οποία είναι φυτικής προέλευσης (πρωτογενές άρωμα) [29, 108-110]. Ο γλυκοζίτης της β-φαινυλαιθανόλης ανιχνεύθηκε στο σύνολο των δειγμάτων ( $n=20$ ) σε συγκεντρώσεις από 128 έως 814  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **4.2. Μεθοδολογία SPME-GC/MS για τον προσδιορισμό 21 συστατικών πρωτογενούς αρώματος σε λευκούς οίνους**

##### **4.2.1. Επιλογή ίνας και τύπου μικροεκχύλισης**

Όπως αναφέρθηκε στο ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Κεφ.2, Πίνακας 2.5), τα τελευταία χρόνια στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές συγκριτικές μελέτες, μεταξύ διαφορετικών SPME ινών, για την απομόνωση/προσυγκέντρωση αρωματικών συστατικών από οίνους (μεταξύ των οποίων και πρωτογενών αρωματικών συστατικών) είτε με HS-SPME είτε με DI-SPME. Ωστόσο, λόγω των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών που ακολουθήθηκαν στις ποικίλες SPME διαδικασίες και τον ανακόλουθο τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων (εμβαδά ή σχετικά εμβαδά), η άμεση σύγκριση των μεθόδων που αφορούν τους ίδιους αναλύτες δεν είναι δυνατή. Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις τα συμπεράσματα είναι αντικρουόμενα και όχι επαρκώς τεκμηριωμένα.

Όσον αφορά τη σύγκριση ανάμεσα στους τύπους μικροεκχύλισης (HS-SPME, DI-SPME) και πάλι τα συμπεράσματα είναι αντικρουόμενα. Παρόλο που στις περισσότερες περιπτώσεις η HS-SPME θεωρείται ως η καλύτερη επιλογή, η μικροεκχύλιση με βύθιση της ίνας στην υγρή φάση του δείγματος κρίθηκε πιο αποτελεσματική για τον προσδιορισμό 5 τερπενίων με ίνα PDMS [227], και για την ανάλυση τερπενίων, νορισοπρενοειδών και αλκοολών με ίνα DVB/CAR/PDMS [235].

Για τους παραπάνω λόγους σε αυτό το μέρος της διατριβής κρίθηκε απαραίτητο να γίνει συγκριτική μελέτη που να περιλαμβάνει 5 τύπους ινών: 1) (PDMS ((poly)dimethylsiloxane), 2) PDMS/DVB ((poly)dimethylsiloxane/(poly)divinylbenzene), 3) PA ((poly)acrylate), 4) CAR/PDMS (carboxen/(poly)dimethylsiloxane) και 5) DVB/CAR/PDMS ((poly)divinylbenzene/carboxen/(poly)dimethylsiloxane)), με δύο τρόπους δειγματοληψίας: α) με εμβάπτιση της ίνας στο υγρό σώμα του δείγματος (DISPME) και β) με έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο του υγρού χώρο του φιαλιδίου (HS-SPME), για την ικανότητα προσυγκέντρωσης/εκχύλισης των 21 προσδιοριζόμενων ενώσεων, με κριτήριο την απόκριση του αναλυτικού συστήματος εκφρασμένη τόσο ως εμβαδά όσο και ως σχετικά εμβαδά των αναλυτών. Επιπλέον, για να εξασφαλισθεί, ότι όλοι οι αναλύτες έχουν την ίδια συνεισφορά στην επιλογή της ίνας και του τύπου μικροεκχύλισης, επιλέχθηκε η χρήση συντελεστών βαρύτητας, με βάση το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφεται στην παρ. 3.3.10.

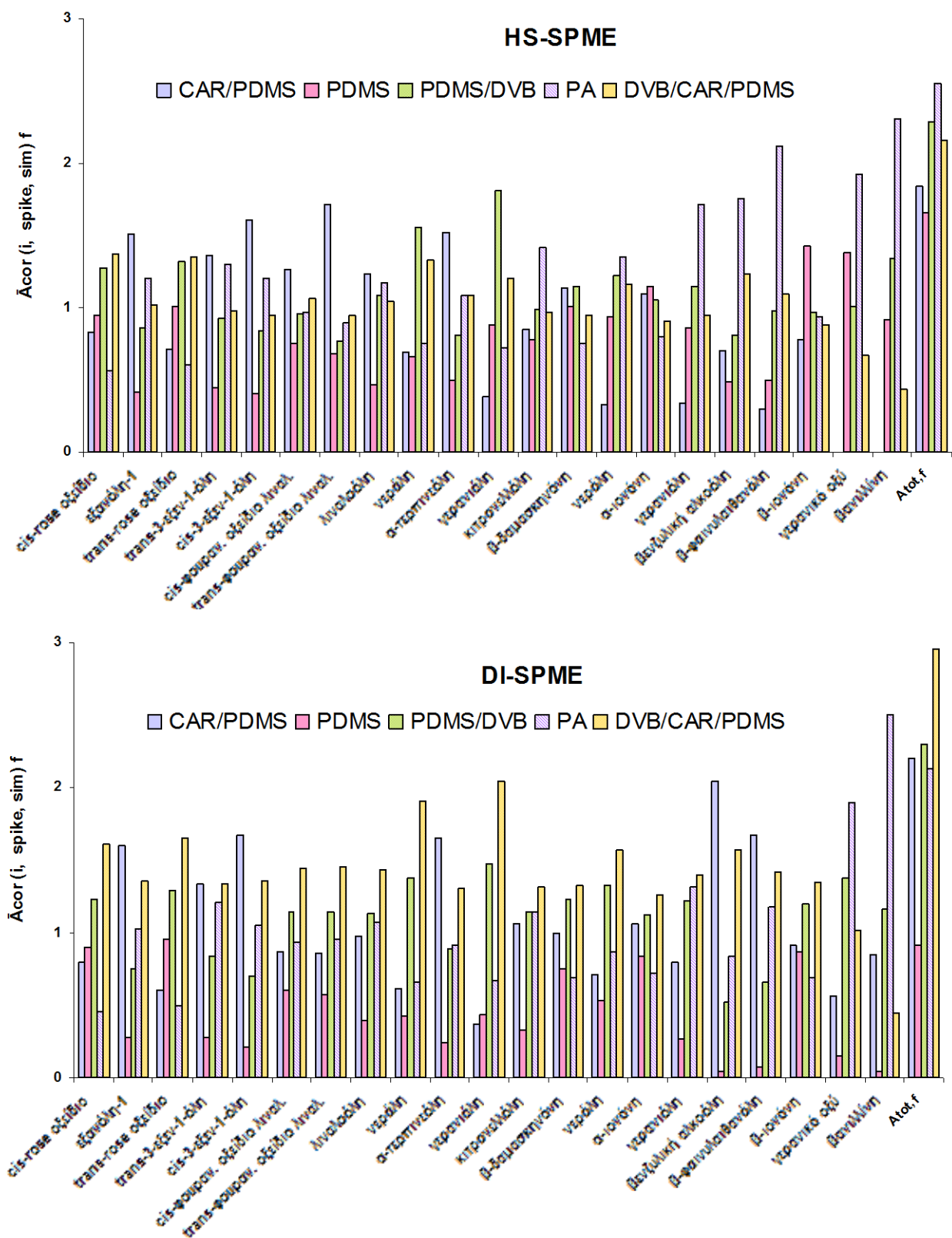
Η σύγκριση ανάμεσα στις ίνες και τους τρόπους δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε με ανάλυση προσομοιωτή οίνου που περιείχε όλους τους αναλύτες σε συγκέντρωση  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $128 \mu\text{g L}^{-1}$  και με σταθερές τις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες (Κεφ.3, παρ. 3.3.10, Πίνακας 3.6).

Τα σταθμισμένα εμβαδά  $\bar{A}_{\text{cor}}(i, \text{spike}, \text{sim})_f$  (εξίσωση 3.21) καθώς και τα αθροίσματα των σταθμισμένων εμβαδών  $A_{\text{tot},f}$  (εξίσωση 3.23) όλων των αναλυτών που απέδωσε κάθε SPME ίνα και με τους δύο τύπους μικροεκχύλισης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.10. Αντίστοιχα, τα σταθμισμένα σχετικά εμβαδά  $\bar{A}_{\text{cor}}(i, \text{rel}, \text{spike}, \text{sim})_f$  (εξίσωση 3.22) και τα αθροίσματα των σταθμισμένων σχετικών εμβαδών  $A_{\text{tot,rel},f}$  (εξίσωση 3.24) όλων των προσδιοριζόμενων ενώσεων που απέδωσε κάθε SPME ίνα και με τους δύο τύπους μικροεκχύλισης παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.11. Από τη σύγκριση των δύο παραπάνω Σχημάτων διαπιστώνεται ότι ο τρόπος έκφρασης των αποτελεσμάτων επηρέαζε την εικόνα απόδοσης των ινών για τους αναλύτες. Το γεγονός αυτό, προφανώς, οφείλεται στο ότι σε πολλές περιπτώσεις οι εξεταζόμενες ίνες είχαν διαφορετική επίδοση για το εσωτερικό πρότυπο (οκτανόλη-2) από την επίδοση που είχαν για τις υπόλοιπες προσδιοριζόμενες

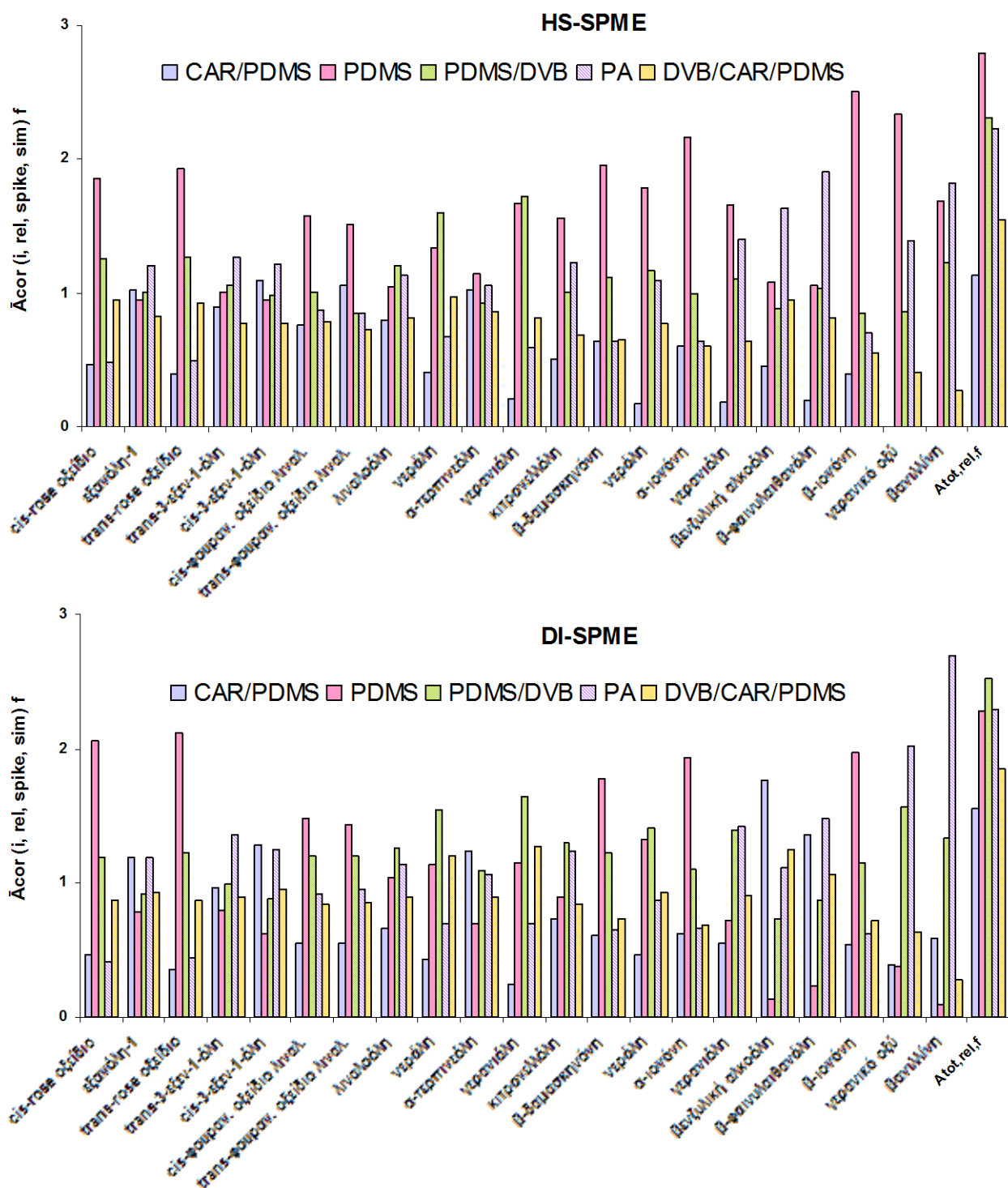
ενώσεις. Ανεξάρτητα ωστόσο από τον τρόπο έκφρασης των αποτελεσμάτων, διαφορές στην ικανότητα εκχύλισης των αναλυτών παρουσιάζουν οι ίνες, όπως ήταν αναμενόμενο, και ανάλογα με τον τρόπο δειγματοληψίας.

Έτσι, για δειγματοληψία από την υπερκείμενη αέρια φάση, οι επιδόσεις των ινών, με κριτήριο τα σταθμισμένα εμβαδά των κορυφών, είχαν ως εξής: Η πολική ίνα PA είχε την καλύτερη επίδοση για τις πιο πολικές ενώσεις (που εμφανίζονται μετά τα μέσα του χρωματογραφήματος) όπως τα βενζολικά παράγωγα, τις C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδείς ενώσεις (με εξαίρεση τη β-ιονόνη), το γερανικό οξύ και ορισμένες τερπενόλες (κιτρονελλόλη, νερόλη και γερανιόλη) χωρίς όμως να παρουσιάζει σταθερή απόδοση στις πρώτες κορυφές. Αντίθετα, η πιο υδρόφοβη ίνα CAR/PDMS φάνηκε για τον ίδιο τύπο εκχύλισης καταλληλότερη για τα συστατικά που εκλούνται νωρίτερα (με εξαίρεση τα cis και trans rose οξειδία), όπως οι C<sub>6</sub> αλκοόλες, τα cis και trans φουρανικά οξειδία της λιναλοόλης και τη λιναλοόλη χωρίς όμως να έχει σταθερή επίδοση για τις τελευταίες κορυφές. Η ίνα PDMS/DVB εμφάνισε μία συνεπή επίδοση για όλους τους αναλύτες ενώ παρουσιάστηκε ως η καλύτερη επιλογή για τις ενώσεις νεράλη, γερανιάλη και β-δαμασκηνόνη. Η ίνα DVB/CAR/PDMS εμφάνισε επίσης ικανοποιητική επίδοση για τους περισσότερους αναλύτες χωρίς όμως να ισχύει το ίδιο για τις τελευταίες κορυφές. Τη λιγότερο ικανοποιητική απόδοση για αρκετές ενώσεις φάνηκε να έχει η ίνα PDMS με εξαίρεση τη β-ιονόνη όπου πέτυχε την καλύτερη απόδοση.

Για δειγματοληψία από την υγρή φάση του δείγματος, οι επιδόσεις των ινών, με κριτήριο τα σταθμισμένα εμβαδά των κορυφών είχαν ως εξής: Η ίνα DVB/CAR/PDMS εμφάνισε την καλύτερη επίδοση για τους περισσότερους αναλύτες με εξαίρεση τις δύο τελευταίες κορυφές. Η ίνα CAR/PDMS παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα για τις αρωματικές αλκοόλες (β-φαινυλαιθανόλη και βενζυλική αλκοόλη), τη cis 3-εξενόλη και πολύ ικανοποιητική απόδοση για τις υπόλοιπες αλειφατικές C<sub>6</sub> αλκοόλες. Η ίνα PA είχε καλύτερη απόδοση για τις ενώσεις που εκλούνται στο τέλος ενώ δεν απέδιδε ικανοποιητικά για αρκετές από τις πρώτες κορυφές. Η ίνα PDMS/DVB εμφάνισε ικανοποιητική επίδοση για τους περισσότερους αναλύτες ενώ η υδρόφοβη ίνα PDMS είχε εμφανώς τη χειρότερη απόδοση.



Σχήμα 4.10: Σταθμισμένα εμβαδά των προσδιοριζόμενων ενώσεων και το άθροισμα  $A_{tot, f}$  των σταθμισμένων εμβαδών, που απέδωσαν οι 5 ίνες SPME με δύο τύπους δειγματοληψία HS-SPME και DI-SPME.

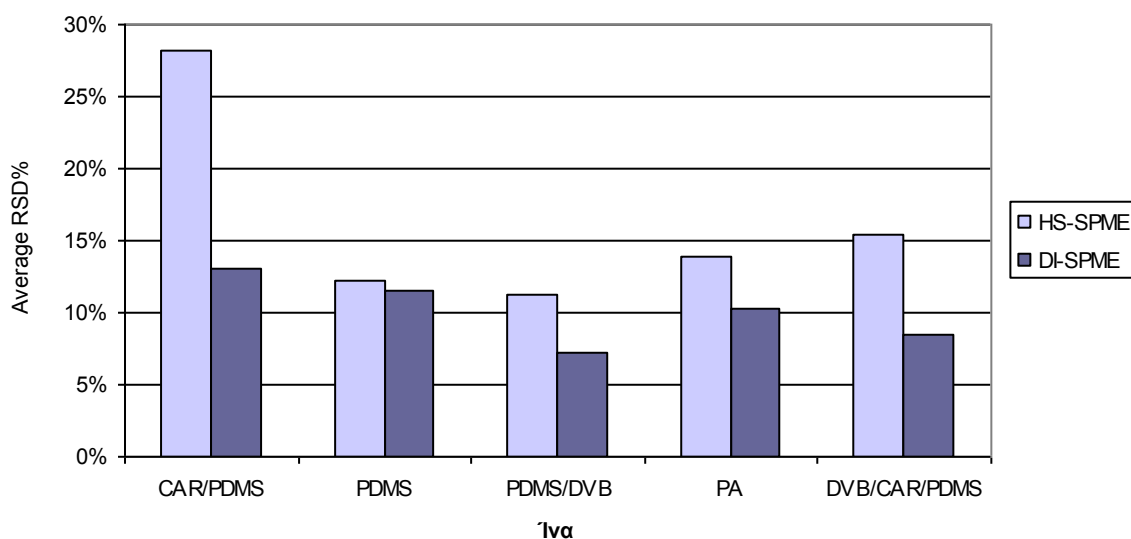


Σχήμα 4.11: Σταθμισμένα σχετικά εμβαδά των προσδιοριζόμενων ενώσεων και το άθροισμα  $A_{tot,rel,f}$  των σταθμισμένων σχετικών εμβαδών, που απέδωσαν οι 5 ίνες SPME με δύο τύπους δειγματοληψία HS-SPME και DI-SPME.



Εξετάζοντας τις επιδόσεις των ινών με βάση τα αθροίσματα των σταθμισμένων εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών  $A_{tot,f}$  η ίνα PA παρουσιάστηκε ως η καταλληλότερη για μικροεκχύλιση στην υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος και η ίνα DVB/CAR/PDMS ως βέλτιστη για μικροεκχύλιση στην υγρή φάση του δείγματος, με την ίνα PDMS/DVB να ακολουθεί και στις δύο περιπτώσεις. Εξετάζοντας τα αποτελέσματα με βάση τα αθροίσματα των σταθμισμένων σχετικών εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών  $A_{tot,rel,f}$ , η ίνα PDMS έδειξε ότι ήταν η πιο αποτελεσματική για δειγματοληψία από την αέρια φάση, ακολουθούμενη από την PDMS/DVB, ενώ το υλικό PDMS/DVB ότι ήταν το καλύτερο όταν η μικροεκχύλιση πραγματοποιούταν με εμβάπτιση της ίνας .

Καθώς η SPME είναι πολύ ευαίσθητη τεχνική, η επιλογή κατάλληλων συνθηκών που να ευνοούν την καλή αναπαραγωγικότητα έχει βαρύνουσα σημασία. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την αναπαραγωγικότητα κάθε διαδικασίας SPME (παρ. 3.3.10). Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 4.12



**Σχήμα 4.12: Αναπαραγωγικότητα των δοκιμαζόμενων ινών με τους δύο τύπους μικροεκχύλισης HS-SPME και DI-SPME**

Από τη σύγκριση των μέσων % σχετικών τυπικών αποκλίσεων μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι με όλες τις ίνες, η μικροεκχύλιση με εμβάπτιση της ίνας

στο δείγμα εξασφάλιζε καλύτερη αναπαραγωγιμότητα (μικρότερες τιμές % σχετικών τυπικών αποκλίσεων) από ότι η μικροεκχύλιση στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα πρόσφατης συγκριτικής μελέτης μεταξύ διαφορετικών τεχνικών [235] για την ανάλυση οίνων, όπου παρατηρήθηκε ότι οι τεχνικές υπερκείμενου χώρου (HS, HS-SPDE και HS-SPME) παρουσίαζαν μειωμένη επαναληψιμότητα. Επιπλέον, η μειωμένη αναπαραγωγιμότητα στις HS-SPME αναλύσεις συγκριτικά με την αναπαραγωγιμότητα στις αναλύσεις DI-SPME έχει και θεωρητική βάση. Στην περίπτωση της DI-SPME, η εκχύλιση βασίζεται στην ισορροπία κατανομής των αναλυτών μεταξύ της στατικής φάσης της ίνας και του δείγματος και εξαρτάται από τους παράγοντες που επηρεάζουν αυτήν την κατανομή ( $K_{\text{sample-fiber}}$ ). Στην περίπτωση της HS-SPME, η διαδικασία είναι πιο σύνθετη καθώς υπάρχουν δύο είδη κατανομών. Το πρώτο είδος, αφορά την κατανομή των αναλυτών μεταξύ της αέριας φάσης του υπερκείμενου χώρου του δείγματος και της υγρής φάσης του δείγματος ( $K_{\text{sample-air}}$ ). Το δεύτερο είδος, αφορά την κατανομή των αναλυτών μεταξύ της αέριας φάσης του υπερκείμενου χώρου του δείγματος και της στερεάς φάσης του πολυμερούς υλικού επίστρωσης της ίνας ( $K_{\text{air-fiber}}$ ). Αποτέλεσμα των δύο κατανομών είναι να υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός παραγόντων που επηρεάζουν την ισορροπία κατανομής των αναλυτών μεταξύ της στατικής φάσης της ίνας και του δείγματος, γεγονός που διακαίολογεί τη μειωμένη παρατηρούμενη αναπαραγωγιμότητα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.12 η χειρότερη αναπαραγωγιμότητα παρατηρήθηκε στην περίπτωση της ίνας CAR/PDMS με HS-SPME και η βέλτιστη για την ίνα PDMS/DVB με DI-SPME. Τα αποτελέσματα για την πρώτη περίπτωση, συμφωνούν με εκείνα δημοσιευμένης εργασίας των Tat et al [221], όπου σε συγκριτική μελέτη μεταξύ 6 SPME ινών, με HS-SPME, το υλικό CAR/PDMS εμφάνισε εκατοστιαίες σχετικές αποκλίσεις της τάξης του 35% ενώ οι υπόλοιπες ίνες είχαν ως ανώτατο όριο τιμής το 15% .

Εξετάζοντας τα συνολικά αποτελέσματα, μπορούν να γίνουν οι κάτωθι παρατηρήσεις:

α) Η ίνα PDMS/DVB επέδειξε την πιο ισορροπημένη απόδοση ανάμεσα στις πέντε που μελετήθηκαν καθώς βρισκόταν πάντα μέσα στις δύο καλύτερες ίνες

είτε το κριτήριο ήταν το συνολικό σταθμισμένο εμβαδόν είτε το συνολικό σταθμισμένο σχετικό εμβαδόν των αναλυτών και με τους δύο τύπους μικροεκχύλισης, β) η μικροεκχύλιση με εμβάπτιση της ίνας στο δείγμα έδειξε καλύτερη επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα και καλύτερους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ανεξάρτητα από την ίνα που δοκιμαζόταν, γ) η ίνα PDMS/DVB με DI-SPME εμφάνισε την καλύτερη αναπαραγωγιμότητα (χαμηλότερες τιμές μέσω RSD%) σε σχέση με τις υπόλοιπες ίνες.

Για τους παραπάνω λόγους η ίνα PDMS/DVB με DI-SPME, κρίθηκε ως ο καταλληλότερος συνδυασμός για τον προσδιορισμό των 21 πρωτογενών αρωματικών συστατικών και η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα.

#### **4.2.2. Χημειομετρική μελέτη στατιστικά σημαντικών παραμέτρων**

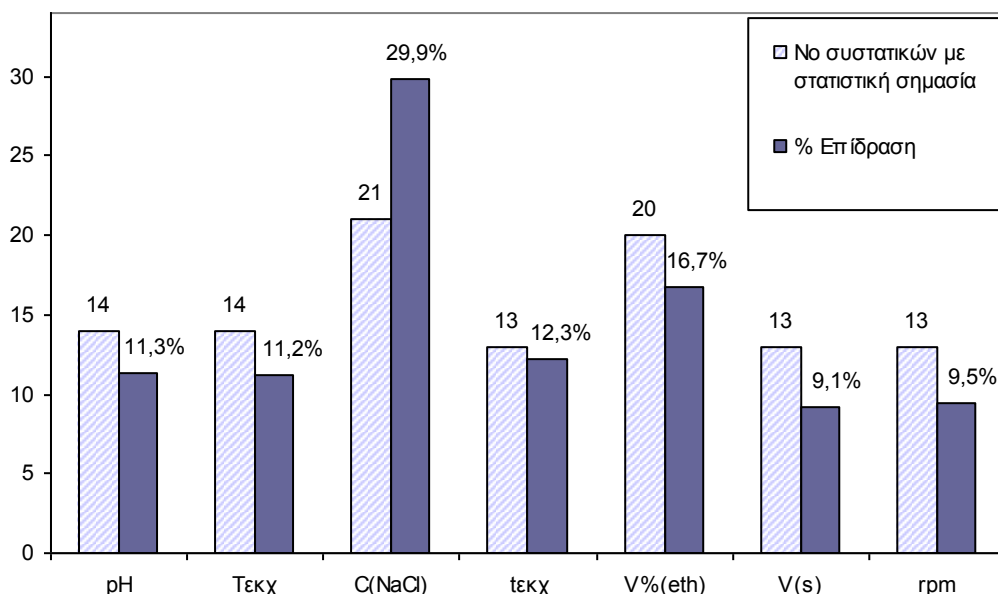
Όπως προαναφέρθηκε, η SPME, παρά την απλότητά της, είναι μία αναλυτική τεχνική ιδιαίτερα ευαίσθητη στις πειραματικές συνθήκες. Είναι γνωστό ότι τα αναλυτικά αποτελέσματα της μικροεκχύλισης επηρεάζονται από μεγάλο αριθμό παραμέτρων όπως η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης, ο όγκος του δείγματος, ο χρόνος εξισορρόπησης, η συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος, η ταχύτητα περιστροφής της μαγνητική ράβδου, κ.τ.λ. Για την ανάλυση οίνων, στα παραπάνω μπορούν να προστεθούν το pH του οίνου και ο αλκοολικός βαθμός. Όπως επίσης αναφέρθηκε στο ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Κεφ.2, παρ. 2.3.1) σε αρκετές προηγούμενες μελέτες, πριν την εφαρμογή της μικροεκχύλισης, για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, επιλέγονταν αυθαίρετα ορισμένοι από τους παραπάνω παράγοντες και πραγματοποιούνταν πειράματα, με μεταβολή ενός παράγοντα κάθε φορά (univariate procedure), με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων τιμών τους. Η τακτική αυτή ωστόσο ενέχει τον κίνδυνο σημαντικοί παράμετροι να μην εξετάζονται.

Στην παρούσα μελέτη, πριν την βελτιστοποίηση της μεθόδου προηγήθηκε ένα στάδιο χημειομετρικής εκτίμησης των στατιστικά σημαντικότερων παραμέτρων. Δηλαδή, αναζητήθηκαν οι παράμετροι εκείνες που έχουν τη στατιστικά μεγαλύτερη επίδραση στην απόκριση του συστήματος και οι οποίες στη συνέχεια εξετάστηκαν πιο διεξοδικά.

Συνολικά, αξιολογήθηκαν ως προς τη στατιστική τους σημασία για την SPME διαδικασία, επτά παράγοντες (ανεξάρτητες μεταβλητές,  $j$ ): 1) το pH του οίνου, 2) η θερμοκρασία εκχύλισης ( $T_{\text{εκχυλ}}$ ), 3) ο χρόνος εκχύλισης ( $t_{\text{εκχ}}$ ), 4) ο αλκοολικός βαθμός του οίνου ( $C_{\text{EtOH}}$ ), 5) η συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος ( $C_{\text{NaCl}}$ ), 6) ο όγκος του δείγματος ( $V_{\text{δειγ}}$ ) και 7) η ταχύτητα περιστροφής της μαγνητικής ράβδου ( $\tau_{\text{περ/φής}}$ ). Ως εξαρτημένες μεταβλητές,  $y$ , ελήφθησαν: α) το σχετικό εμβαδόν  $A_i$  (rel, spike, sim) και β) το εμβαδόν  $A_{(i,\text{sim})}$ , κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης  $i$ . Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε προσομοιωτή οίνου που περιείχε όλους τους αναλύτες σε συγκέντρωση  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $128 \mu\text{g L}^{-1}$ . Οι εκτιμώμενες επιδράσεις των εξεταζόμενων παραμέτρων  $j$ , είτε με βάση το σχετικό εμβαδόν  $A_i$  (rel, spike, sim) είτε με βάση το εμβαδόν  $A_i$  (spike, sim) κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης  $i$  απεικονίζονται, για κάθε αναλύτη με τη μορφή κανονικοποιημένων διαγραμμάτων Pareto, στο Παράρτημα I της εργασίας (Σχήμα Π2 και Σχήμα Π3, αντίστοιχα). Στα διαγράμματα Pareto το μήκος της κάθε μπάρας είναι ανάλογο με την κανονικοποιημένη επίδραση, δηλ με την τιμή της επίδρασης ( $E_j$ ) του κάθε παράγοντα  $j$ , διαιρεμένης με το τυπικό της σφάλμα ( $S_j$ ). Οι μπάρες που εκτείνονται πέρα από την κάθετη γραμμή ( $\text{Standardized Effect} > 2$ ) αντιστοιχούν σε εκείνες τις επιδράσεις οι οποίες είναι στατιστικά σημαντικές, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που λαμβάνονται όταν ως εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιείται το σχετικό εμβαδόν  $A_i$  (rel, spike, sim) με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται όταν ως εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιείται το εμβαδόν  $A_{(i,\text{sim})}$ , μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι σε πολλές περιπτώσεις οι εξεταζόμενοι παράγοντες είχαν διαφορετική επίδραση στο εσωτερικό πρότυπο (οκτανόλη-2) από την επίδραση που είχαν στις υπόλοιπες προσδιοριζόμενες ενώσεις. Καθώς ωστόσο η παρουσία του εσωτερικού προτύπου κρίθηκε ότι ήταν απαραίτητη για την εξασφάλιση καλύτερης πιστότητας των αποτελεσμάτων, η επιλογή των στατιστικά σημαντικών παραμέτρων βασίσθηκε στα αποτελέσματα όπου ως εξαρτημένη μεταβλητή λήφθηκαν τα σχετικά εμβαδά των καρυφών.

Συγκεντρωτικά, με βάση τα σχετικά εμβαδά των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ο αριθμός των συστατικών για τα οποία η κάθε παράμετρος είχε στατιστικά σημαντική επίδραση και η εκατοστιαία επίδραση που αντιστοιχεί σε κάθε παράμετρο  $j$ ,  $E_j$  %, (εξίσωση 3.27), απεικονίζονται στο Σχήμα 4.13 .



**Σχήμα 4.13:** Η % επίδραση που αντιστοιχεί σε κάθε παράμετρο και ο αριθμός των συστατικών για τα οποία κάθε παράμετρος έχει στατιστικά σημαντική επίδραση, με βάση τα σχετικά εμβαδά των προσδιοριζόμενων συστατικών.

Από τα αποτελέσματα αυτά, μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι η συγκέντρωση του NaCl τόσο με βάση τις τιμές  $E_j$ % όσο και από τον αριθμό των συστατικών στα οποία είχε σημαντική επίδραση, είχε τη μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα από όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Η επίδραση του NaCl μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η παρουσία του άλατος επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την κατανομή των ημι-πολικών και μη-πολικών αρωματικών συστατικών μεταξύ του περιβάλλοντος του δείγματος και του υλικού επίστρωσης της ίνας. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος ελαττώνει τη διαλυτότητα των υδρόφοβων οργανικών συστατικών στην υδατική φάση του δείγματος με αποτέλεσμα την αυξημένη ρόφηση στο υδρόφοβο SPME υλικό [269].

Όπως επομένως ήταν αναμενόμενο (Σχήμα Π3, Παράρτημα Ι) η εκχυλιστική ικανότητα βελτιωνόταν καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του NaCl. Ωστόσο, στην υψηλότερη συγκέντρωση των  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  (κατάσταση σχεδόν κορεσμού) ο τυχαίος σχηματισμός κρυστάλλων άλατος εμπόδιζε τη ρόφηση με αποτέλεσμα να προκαλούνται προβλήματα στην αναπαραγωγικότητα. Για την αποφυγή του φαινομένου, σε όλες τις επόμενες πειραματικές δοκιμές η ποσότητα του προστιθέμενου NaCl καθορίστηκε έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο αναλυόμενο δείγμα να είναι  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

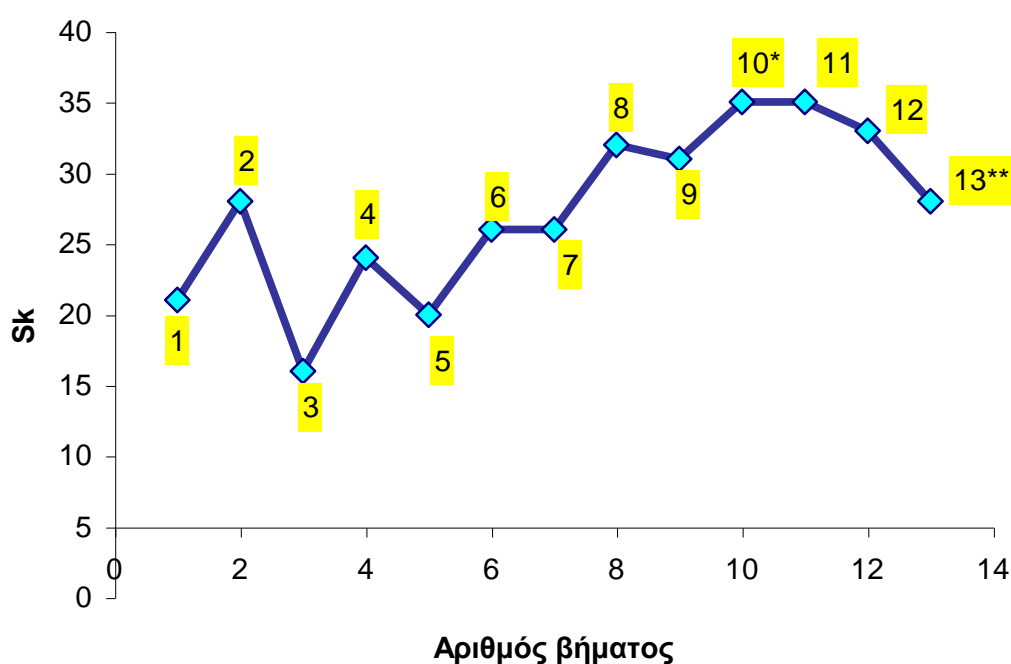
Με βάση τις τιμές  $E_j\%$ , η επόμενη στατιστικά σημαντική παράμετρος (Σχήμα 4.13), ήταν η συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης. Το αποτέλεσμα είναι δικαιολογημένο καθώς η παρουσία οργανικού διαλύτη επηρεάζει επίσης την κατανομή των αναλυτών μεταξύ του δείγματος και της SPME ίνας. Ακολουθούν με βάση τις τιμές  $E_j\%$ , κατά φθίνουσα σειρά, η θερμοκρασία της εκχύλισης, το pH και ο χρόνος της εκχύλισης. Δεδομένου ότι αποφασίστηκε η συγκέντρωση του NaCl να παραμείνει σταθερή, οι προαναφερόμενες παράμετροι ήταν και οι παράγοντες που μελετήθηκαν περαιτέρω για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου (παρ. 4.2.3). Όπως ήταν αναμενόμενο, ο όγκος του δείγματος είχε τη μικρότερη στατιστική σημασία και ακολουθούσε με μικρή διαφορά η ταχύτητα περιστροφής. Η τιμή της ταχύτητας περιστροφής καθώς και η τιμή του όγκου του δείγματος κατά τις επόμενες πειραματικές δοκιμές παρέμειναν σταθερές στο ονομαστικό τους επίπεδο (Πίνακας 3.7).

#### 4.2.3. Βελτιστοποίηση σημαντικών παραμέτρων με μέθοδο Simplex

Μετά τον έλεγχο της σημαντικότητας των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση, και με χρήση **τροποποιημένης μεθόδου Simplex** (Modified Simplex), αναζητήθηκαν οι βέλτιστες τιμές για τέσσερις παραμέτρους: 1) του pH, 2) της συγκέντρωσης της αιθυλικής αλκοόλης ( $C_{EIOH}$ ), 3) της θερμοκρασίας εκχύλισης ( $T_{εκχ}$ ) και 4) του χρόνου εκχύλισης ( $t_{εκχ}$ ).

Η μελέτη βελτιστοποίησης αποσκοπούσε στη μεγιστοποίηση του αναλυτικού σήματος για όλες τις ενώσεις. Ωστόσο, εάν στο σχεδιασμό ως εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιούσαν το άθροισμα των εμβαδών των κορυφών των προσδιοριζόμενων ενώσεων τότε οι αναλύτες με τις μεγαλύτερες

χρωματογραφικές κορυφές (μεγαλύτερη ευαισθησία) θα είχαν μεγαλύτερη συμμετοχή στο τελικό αποτέλεσμα. Για να εξασφαλισθεί ισοδύναμη συμμετοχή όλων των αναλυτών, έγινε κανονικοποίηση των κορυφών, με τη χρήση στατιστικών βαρών, σύμφωνα με το μαθηματικό μοντέλο που περιγράφεται από την εξίσωση 3.28, και ως εξαρτημένη μεταβλητή χρησιμοποιήθηκε τελικά το άθροισμα  $S_k$  των σταθμισμένων μέσω εμβαδών  $\bar{A}_{corr,i,(spike, sim)_k}$  των χρωματογραφικών κορυφών των 21 προσδιοριζόμενων συστατικών (εξίσωση 3.29).



**Σχήμα 4.14:** Απόκριση των διαδοχικών vertex του αλγορίθμου της τροποποιημένης Simplex για τη βελτιστοποίηση 4 σημαντικών παραμέτρων (\* Η δοκιμή η οποία επιλέχθηκε τελικά, \*\* Η δοκιμή 13 επαναλήφθηκε με τις ίδιες συνθήκες της δοκιμής 1).

Τα Βήματα της διαδικασίας Simplex και οι πειραματικές συνθήκες κάθε δοκιμής παρουσιάζονται στο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ στους Πίνακες 3.9 και 3.10 (Κεφ.3, παρ. 3.3.12), ενώ τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 4.14. Όπως φαίνεται ο αλγόριθμος έφθασε σε σύγκλιση στα βήματα 8–12. Στο τελευταίο Βήμα 13, πραγματοποιήθηκε επαναληπτική δοκιμή με ίδιες πειραματικές συνθήκες με αυτές του Βήματος 2 για να διαπιστωθεί η σταθερότητα της απόκρισης. Ανάμεσα στις πειραματικές συνθήκες των

δοκιμών 8–12 επιλέχθηκαν οι τιμές της δοκιμής 10 καθώς απαιτούνταν μικρότερος χρόνος εκχύλισης. Με βάση τα παραπάνω, ο βέλτιστος συνδυασμός των τεσσάρων υπό μελέτη παραμέτρων είχε ως εξής α) pH: 2,8, β)  $C_{EtOH}$ : 9%, γ)  $T_{εκχ}$ : 32 °C και δ)  $t_{εκχ}$  : 30 min.

#### 4.2.4. Επικύρωση της μεθόδου

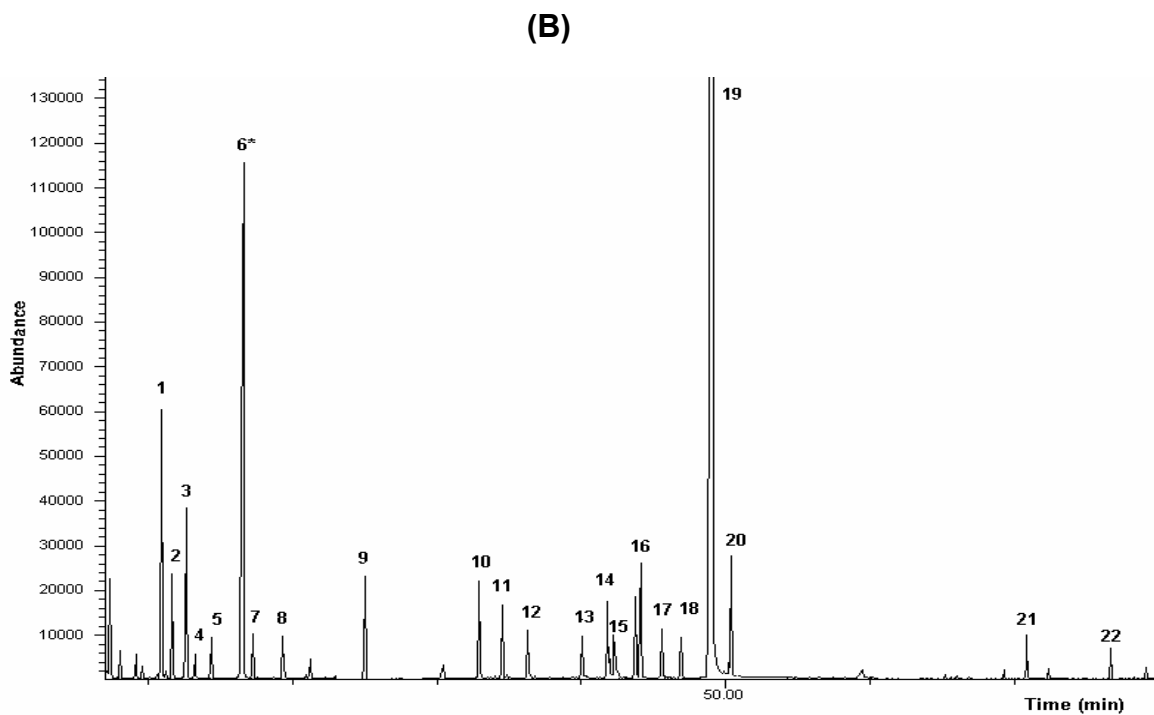
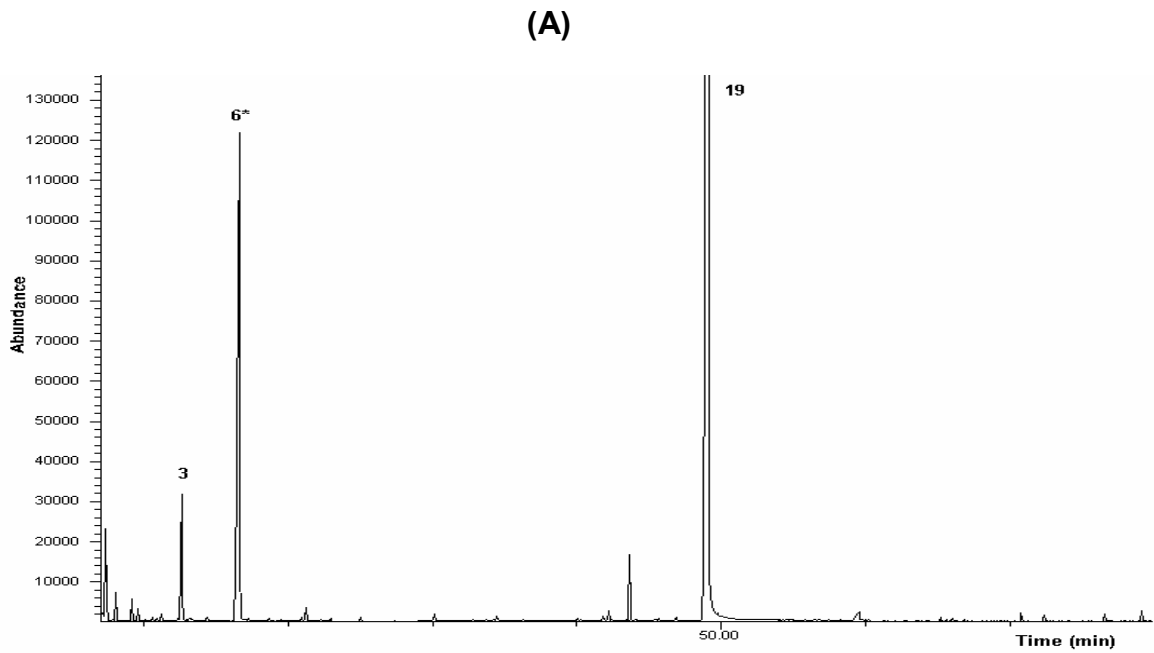
Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες της EURACHEM [236–238, 257]. Τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου που αξιολογήθηκαν, στη μελέτη επικύρωσης, ήταν η εκλεκτικότητα, η γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης (LODs) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), η ολική ανάκτηση, η πιστότητα (εκφρασμένη με όρους ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας) και η ορθότητα. Παράλληλα, και αντίθετα με τις έως τώρα υπάρχουσες προσεγγίσεις [107, 227, 228, 230], το πρωτόκολλο επικύρωσης που αναπτύχθηκε σε αυτή τη διατριβή συμπεριελάμβανε μελέτη για την αβεβαιότητα των μετρήσεων και την ανθεκτικότητα της μεθόδου, ενώ η ακρίβεια ελέγχθηκε σε 4 επίπεδα συγκεντρώσεων των προσδιοριζόμενων ενώσεων (καλύπτοντας περιοχή συγκεντρώσεων από 10-500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

##### 4.2.4.1. Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με την εφαρμογή της σε είκοσι δείγματα οίνων από δεκαέξι ποικιλίες αμπέλου. Από τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων, υπολογίσθηκε ο χρόνος ανάσχεσης ( $R_t$ ) και οι λόγοι του ιόντος ταυτοποίησης προς το ιόν ποσοτικοποίησης κάθε χρωματογραφικής κορυφής. Οι ίδιες παράμετροι εκτιμήθηκαν με την ανάλυση προσομοιωτή οίνου εμβολιασμένου με όλους τους αναλύτες σε συγκέντρωση 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  και με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 128  $\mu\text{g L}^{-1}$  και οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως τιμές αναφοράς.

Οι χρόνοι ανάσχεσης και οι λόγοι των ιόντων ταυτοποίησης προς τα ιόντα ποσοτικοποίησης, στις χρωματογραφικές κορυφές των δειγμάτων, κυμάνθηκαν μέσα στα όρια  $\pm 2\%$  και  $\pm 5\%$  αντίστοιχα, των τιμών αναφοράς του προτύπου διαλύματος. Επιπλέον, στα χρωματογραφήματα των δειγμάτων παρατηρήθηκε μικρός αριθμός μη ταυτοποιημένων κορυφών και οι κορυφές αυτές δεν επικάλυπταν τις κορυφές των προσδιοριζόμενων ενώσεων.





Σχήμα 4.15: Δύο χρωμ/τα GC-MS μετά από SPME: (A) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου εμβολιασμένο με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $128 \mu\text{g L}^{-1}$ , και (B) υποστρώματος οίνου από “τυφλό” δείγμα οίνου εμβολιασμένο με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $128 \mu\text{g L}^{-1}$  και με όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά σε συγκέντρωση  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Δείκτης: 1, *cis*-rose οξείδιο· 2, *trans*-rose οξείδιο· 3, εξανόλη· 4, *trans*-3-εξεν-1-όλη· 5, *cis*-3-εξεν-1-όλη· 6\*, οκτανόλη-2 (IS)· 7, *cis*-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης· 8, *trans*-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης· 9, λιναλοόλη· 10, νεράλη· 11, α-τερπινεόλη· 12, γερανιάλη· 13, κιτρονελλόλη· 14, β-δαμασκηνόνη· 15, νερόλη· 16, α-ιονόνη· 17, γερανιόλη· 18, βενζυλική αλκοόλη· 19, β-φαινυλαιθανόλη· 20, β-ιονόνη· 21, γερανικό οξύ· 22, βανιλίνη.

Για τους παραπάνω λόγους η εκλεκτικότητα της μεθόδου θεωρήθηκε ικανοποιητική.

Στο Σχήμα 4.15 παρουσιάζονται δύο χρωματογραφήματα GC/MS: α) ενός υποστρώματος οίνου που προήρθε από «τυφλό» δείγμα οίνου από την ποικιλία Σαββατιανό (φτωχή σε πρωτογενή αρωματικά συστατικά) εμβολιασμένου με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $128 \mu\text{g L}^{-1}$ , και β) του ίδιου υποστρώματος εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών σε συγκέντρωση  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  και με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $128 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Στο υπόστρωμα οίνου καθώς και σε όλα τα δείγματα οίνων που αναλύθηκαν, κυρίαρχες κορυφές ήταν της εξανόλης-1 και της β-φαινυλαιθανόλης.

#### 4.2.4.2. Γραμμικότητα και ανιχνευσιμότητα

Η γραμμικότητα της απόκρισης του αναλυτικού συστήματος, για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση, ελέγχθηκε με τη χάραξη καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα εργασίας των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου και σε υπόστρωμα συνθετικού οίνου (Κεφ. 3, παρ. 3.3.13).

Οι παράμετροι της γραμμικής παλινδρόμησης για κάθε αναλύτη από τις καμπύλες βαθμονόμησης των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου (εξίσωση 3.10): κλίση της ευθείας ( $a_{mm}$ ), τυπική απόκλιση της κλίσης της ευθείας ( $s_a$ ) τεταγμένη επί την αρχή ( $b_{mm}$ ), τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή ( $s_b$ ) και συντελεστής προσδιορισμού ( $r^2$ ),: παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.

Τα όρια ανίχνευσης (LODs) και ποσοτικοποίησης (LOQs) προσδιορίστηκαν, για κάθε αναλύτη  $i$ , από τις παραμέτρους βαθμονόμησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου, με βάση τις σχέσεις 3.11 και 3.12. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4.

Τα συστατικά β-φαινυλαιθανόλη και εξανόλη-1 προϋπήρχαν στο “τυφλό” δείγμα του οίνου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Αυτό είχε ως αποτέλεσμα για τους συγκεκριμένους αναλύτες να μην είναι δυνατός ο υπολογισμός του μέσου καθαρού σχετικού αναλυτικού σήματος  $A_{i(\text{rel, spike, net})}$  (εξίσωση 3.4) και οι παράμετροι βαθμονόμησης καθώς και τα όρια LODs και LOQs να υπολογισθούν με βάση τα αναλυτικά δεδομένα από τα πρότυπα διαλύματα των ενώσεων σε υπόστρωμα συνθετικού οίνου.

Πίνακας 4.4: Παράμετροι βαθμονόμησης και όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε υπόστρωμα οίνου.

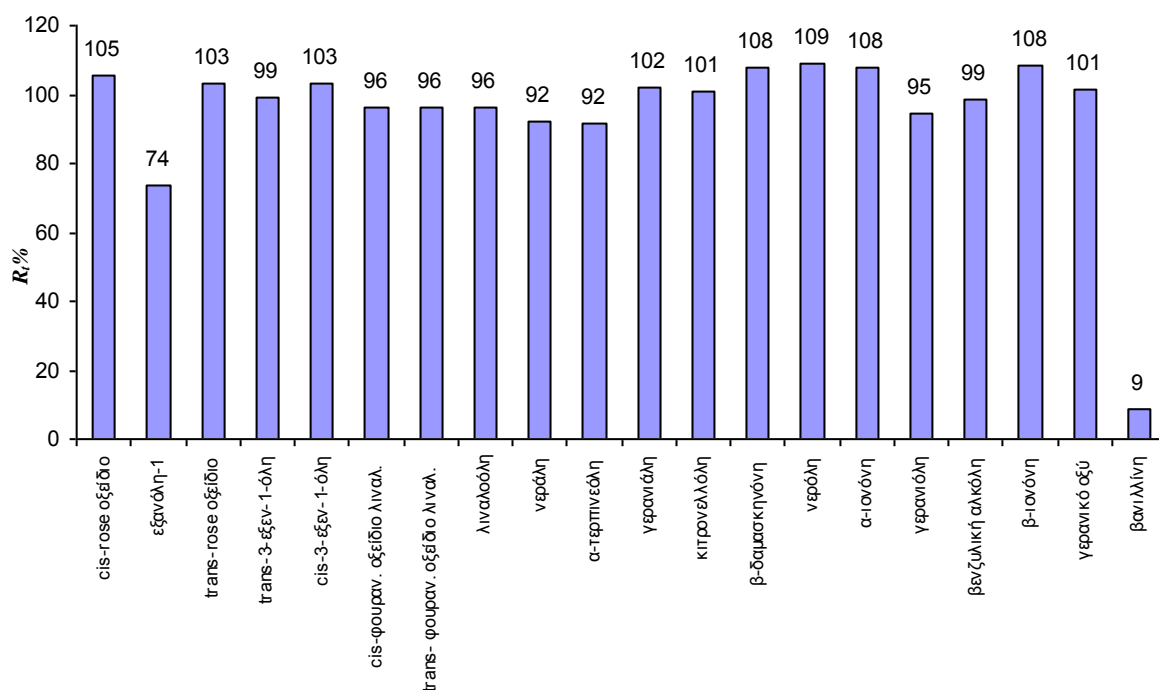
Αναλύτες	$a_{mm}$ ( $\times 10^{-1}$ )	$s_a$ ( $\times 10^{-1}$ )	$b_{mm}$ ( $\times 10^{-3}$ )	$s_b$ ( $\times 10^{-3}$ )	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξείδιο	39,34	0,45	29,76	20,50	0,999	0,6	2,0
εξανόλη-1	0,56	0,04	0,87	2,36	0,996	1,6	5,3
trans-rose οξείδιο	15,96	0,05	3,21	2,30	0,999	0,5	1,5
trans-3-εξεν-1-όλη	0,27	0,04	0,09	2,36	0,999	1,4	4,7
cis-3-εξέν-1-όλη	0,34	0,01	0,26	0,36	0,998	2,3	7,6
cis-φουραν. οξείδιο λιναλοόλης	0,45	0,01	0,59	0,29	0,999	1,0	3,2
trans- φουραν. οξείδιο λιναλοόλης	0,63	0,01	0,97	0,57	0,998	1,2	4,0
λιναλοόλη	8,36	0,04	1,70	1,91	0,999	1,8	6,0
νεράλη	1,79	0,06	3,35	2,96	0,994	2,7	8,9
α-τερπινεόλη	5,29	0,07	4,38	2,99	0,999	0,8	2,8
γερανιάλη	2,67	0,04	0,34	0,96	0,999	2,3	7,6
κιτρονελλόλη	6,37	0,05	1,82	2,27	0,999	1,8	6,0
β-δαμασκηνόνη	4,68	0,04	1,72	1,77	0,999	1,3	4,3
νερόλη	2,79	0,10	2,44	2,30	0,996	3,5	11,0
α-ιονόνη	32,96	0,14	3,10	6,26	0,999	0,6	1,9
γερανιόλη	1,21	0,01	0,57	0,67	0,999	1,6	5,3
βενζυλική αλκοόλη	0,27	0,01	0,54	0,68	0,999	2,0	6,6
β-φαινυλαιθανόλη	0,89	0,01	3,51	0,45	0,999	8,0	26
β-ιονόνη	39,39	0,37	36,34	16,91	0,999	0,6	2,1
γερανικό οξύ	3,42	0,02	0,92	0,69	0,999	1,6	5,2
βανιλίνη	0,05	0,00	0,01	0,10	0,992	8,9	30,0

Σε όλα τα συστατικά ο συντελεστής προσδιορισμού,  $r^2$ , ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 0,99 δείχνοντας ότι για το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν η γραμμικότητα ήταν πολύ ικανοποιητική. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν μεταξύ 0,5 – 8,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  και τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 1,5 – 30,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.2.4.3. Ολική ανάκτηση

Η τιμή της ολικής % ανάκτησης  $R_i\%$ , για κάθε αναλύτη  $i$ , υπολογίστηκε από την εξίσωση 3.31. Όπως προαναφέρθηκε, η τιμή της ολικής % ανάκτησης  $R_i\%$ , αποτελεί ένα δείκτη της επίδοσης όλης της διαδικασίας της κατεργασίας ενός δείγματος, αντανακλώντας τη συνδυασμένη επίπτωση της απόδοσης της

εκχύλισης και της ενίσχυσης ή καταστολής του σήματος λόγω επίδρασης του υποστρώματος. Στην περίπτωση της SPME όπου δεν υπάρχουν απώλειες από το στάδιο της εκχύλισης, οι τιμές  $R_t\%$ , αντανakλούν μόνο την επίδραση του υποστρώματος, εξαιτίας της ύπαρξης δευτερευόντων συστατικών (π.χ. πρωτεϊνών, αμινοξέων, σακχάρων και πολυφαινολών) που περιέχει το υπόστρωμα οίνου και που δεν περιλαμβάνονται σε υπόστρωμα προσομοιωτή οίνου.



**Σχήμα 4.16: Ολική ανάκτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών**

Σε παλαιότερες μελέτες έχει επισημανθεί ότι η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα, των HS-SPME αναλύσεων, εξαιτίας της επίδρασης ορισμένων συστατικών του δείγματος στην πτητικότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων [270-274]. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος έχουν προταθεί διάφορες λύσεις όπως μεταξύ άλλων [107]:

- 1) η χρήση επισημασμένων ισοτόπων των αναλυτών ως εσωτερικά πρότυπα,
- 2) η εφαρμογή μεθόδου πολλαπλής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου (MHS-SPME, Multiple Headspace - SPME), η οποία έπειτα από πραγματοποίηση αρκετών επαναλαμβανόμενων διαδοχικών

μικροεκχυλίσεων οδηγεί στην ολοκληρωτική εκχύλιση των αναλυτών [275], 3) η αραίωση των δειγμάτων και 4) η ποσοτικοποίηση με μέθοδο σταθερής προσθήκης [107].

Στην παρούσα μελέτη, οι τιμές  $R_i\%$ , των προσδιοριζόμενων ενώσεων απεικονίζονται στο Σχήμα 4.16. Σε όλες τις ενώσεις, οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 92 και 109%, εκτός από τις περιπτώσεις της εξανόλης-1 (με τιμή 74%) και της βανιλίνης όπου η ολική ανάκτηση ήταν μόλις 9%. Η β-φαινυλαιθανόλη δε συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα, εξαιτίας της παρουσίας της στο υπόστρωμα οίνου σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Για τον ίδιο λόγο, η ολική ανάκτηση της εξανόλης-1 υπολογίσθηκε για την περιοχή συγκεντρώσεων από 0,1 έως  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Οι τιμές των ολικών ανακτήσεων δείχνουν ότι η επίδραση του υποστρώματος, στην προτεινόμενη DI-SPME μέθοδο, ήταν σχετικά χαμηλή (αν και στην περίπτωση της βανιλίνης σημαντική). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν άμεσα από το υγρό σώμα του δείγματος, όπου αντίθετα από τη δειγματοληψία στον υπερκείμενο χώρο, επηρεάζεται λιγότερο από την πτητικότητα των αρωματικών συστατικών.

Παρόλα αυτά, για να βελτιωθεί περισσότερο η ποσοτική επίδοση της μεθόδου, για να διορθωθεί η ισχυρή επίδραση υποστρώματος στην περίπτωση της βανιλίνης και για να διορθωθεί η μέτρια επίδραση υποστρώματος στα υπόλοιπα προσδιοριζόμενα συστατικά, η παρακάτω διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων σε υπόστρωμα οίνου.

#### **4.2.4.4. Ακρίβεια, πιστότητα και αβεβαιότητα**

Η ακρίβεια-ορθότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε από τις μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις,  $R_i\%$  των προσδιοριζόμενων ενώσεων, έπειτα από εμβολιασμό των αναλυτών σε υπόστρωμα οίνου, σε 7 επίπεδα συγκεντρώσεων. Η τιμή της εκατοστιαίας ανάκτησης ( $R_i\%$ ) για κάθε αναλύτη  $i$ , υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον τύπο 3.13 που αναφέρεται στην παρ. 3.2.12.

Στον Πίνακα 4.5 που ακολουθεί, αναγράφονται οι μέσες τιμές των % ανακτήσεων,  $R_i\%$ , όλων των αναλυτών, σε 4 αντιπροσωπευτικά επίπεδα συγκεντρώσεων ( $10, 50, 100$  και  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Στο χαμηλότερο επίπεδο ( $10 \text{ } \mu\text{g}$

L<sup>-1</sup>) οι ανακτήσεις των περισσότερων προσδιοριζόμενων ενώσεων βρίσκονταν μέσα στη προτεινόμενη περιοχή τιμών από 60 έως 115% [239]. Εξαιρέση, αποτελούν η trans-3-εξενόλη και η νεράλη (με μέσες τιμές ανακτήσεων R<sub>i</sub>% 121 και 135% αντίστοιχα) καθώς και οι ενώσεις νερόλη και βανιλίνη, οι οποίες δεν ήταν δυνατόν να ποσοτικοποιηθούν. Παρόμοια, στο επίπεδο των 50 μg L<sup>-1</sup> οι τιμές R<sub>i</sub>% όλων των συστατικών κυμαίνονταν μέσα στα αποδεκτά όρια των 60 και 115% [239] εκτός από τη βανιλίνη με μέση ανάκτηση 125%. Στα 100 μg L<sup>-1</sup> οι τιμές R<sub>i</sub>% βρίσκονται στην προτεινόμενη περιοχή 80 έως 110% [239], εκτός από τις νεράλη και βανιλίνη με ανακτήσεις 125% και 149%. Στο υψηλότερο επίπεδο των 500 μg L<sup>-1</sup> οι μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις όλων των προσδιοριζόμενων συστατικών ικανοποιούν πλήρως τις απαιτήσεις για εύρος τιμών μεταξύ 80 και 110% [239].

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα της μεθόδου, εκτιμήθηκε για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, και εκφράστηκε ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων (RSD<sub>M</sub>%) από 6 επαναλαμβανόμενες αναλύσεις (2 μετρήσεις ανά ημέρα για 3 διαφορετικές ημέρες εργασίας) εμβολιασμένων δειγμάτων υποστρώματος οίνου. Τα αποτελέσματα από 4 αντιπροσωπευτικά επίπεδα συγκεντρώσεων (10, 50, 100 και 500 μg L<sup>-1</sup>) παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5. Οι πειραματικές τιμές της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας, και στα 4 επίπεδα συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, είναι μικρότερες από 21%. Η μέθοδος πληρεί τις απαιτήσεις του προγράμματος Peer Verified Methods, του AOAC (Association of Official Analytical Chemists) [239].

Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από την εξέταση των τιμών του δείκτη «Horrat» (*H*). Τα αποτελέσματα του δείκτη *H*, για κάθε αναλύτη και επίπεδο συγκέντρωσης, παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5. Οι παρατηρούμενες τιμές σε όλες τις περιπτώσεις ήταν  $H \leq 1$ .

**Πίνακας 4.5: Μέσες % ανακτήσεις R %, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα RSDM %, τιμές δείκτη “Horrat” H, και εκατοστιαία διευρυμένη αβεβαιότητα  $U_{exp}$  %, της μεθόδου SPME-GC/MS σε 4 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα οίνου.**

<b>Αναλύτης</b>	<b>R %</b>	<b>RSD<sub>M</sub> %</b>	<b>H</b>	<b>U<sub>exp</sub> %</b>
<b>10 µg L<sup>-1</sup></b>				
cis- rose οξείδιο*	83	3	0,1	5
εξανόλη-1	–	–	–	–
trans - rose οξείδιο*	94	1	0,02	1
trans-3 -εξανόλη*	121	3	0,2	10
cis-3-εξανόλη	98	16	0,7	37
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης*	78	9	0,4	17
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης *	84	11	0,5	21
λιναλοόλη	84	16	0,7	31
νεράλη*	135	11	0,5	34
α-τερπινεόλη	95	14	0,7	32
γερανιάλη	115	8	0,4	21
κιτρονελλόλη	102	6	0,3	14
β-δαμασκηνόνη*	124	4	0,2	10
νερόλη	–	–	–	–
α-ιονόνη*	101	2	0,1	4
γερανιόλη	100	5	0,2	12
βενζυλική αλκοόλη	87	12	0,6	25
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	–	–
β-ιονόνη*	87	5	0,2	11
γερανικό οξύ	86	16	0,7	32
βανιλίνη				
<b>50 µg L<sup>-1</sup></b>				
cis- rose οξείδιο	98	6	0,3	13
εξανόλη-1	–	–	–	–
trans - rose οξείδιο	98	5	0,2	11
trans-3 -εξανόλη	93	20	1,0	49
cis-3-εξανόλη	87	9	0,4	18
cis-φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	98	11	0,5	24
trans- φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	97	10	0,4	22
λιναλοόλη	101	6	0,3	13
νεράλη	111	6	0,3	16
α-τερπινεόλη	96	11	0,5	25
γερανιάλη	85	12	0,6	24
κιτρονελλόλη	99	6	0,3	15
β-δαμασκηνόνη	95	12	0,6	27
νερόλη	111	6	0,3	17
α-ιονόνη	96	8	0,3	17
γερανιόλη	87	8	0,4	17
βενζυλική αλκοόλη	83	17	0,8	32
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	–	–
β-ιονόνη	107	5	0,2	13
γερανικό οξύ	96	9	0,4	21
βανιλίνη*	125	7	0,3	20

<b>Αναλύτης</b>	<b>R %</b>	<b>RSD<sub>M</sub> %</b>	<b>H</b>	<b>U<sub>exp</sub> %</b>
<b>100 µg L<sup>-1</sup></b>				
cis- rose οξειδίο	100	10	0,5	24
εξανόλη-1	–	–	–	–
trans - rose οξειδίο	99	9	0,4	21
trans-3 -εξενόλη	101	6	0,3	14
cis-3-εξενόλη	98	3	0,1	6
cis-φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	107	4	0,2	10
trans- φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	107	4	0,2	9
λιναλοόλη	101	3	0,1	7
νεράλη*	79	4	0,2	7
α-τερπινεόλη	100	4	0,2	8
γερανιάλη	93	16	0,7	34
κιτρονελλόλη	97	6	0,3	13
β-δαμασκηνόνη	97	12	0,5	26
νερόλη*	122	4	0,2	12
α-ιονόνη	96	12	0,5	26
γερανιόλη	105	3	0,1	8
βενζυλική αλκοόλη*	86	3	0,2	7
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	–	–
β-ιονόνη*	86	7	0,3	13
γερανικό οξύ	98	7	0,3	15
βανιλίνη*	149	6	0,3	19
<b>500 µg L<sup>-1</sup></b>				
cis- rose οξειδίο	100	8	0,5	19
εξανόλη-1	93	5	0,3	10
trans - rose οξειδίο	100	8	0,5	19
trans-3 -εξενόλη	100	3	0,2	7
cis-3-εξενόλη	100	4	0,2	9
cis-φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	100	3	0,2	7
trans- φουρανικό οξειδίο λιναλοόλης	100	3	0,2	7
λιναλοόλη	100	6	0,3	14
νεράλη	104	16	0,9	38
α-τερπινεόλη	100	4	0,2	9
γερανιάλη	100	4	0,2	9
κιτρονελλόλη	100	7	0,4	16
β-δαμασκηνόνη	100	9	0,5	20
νερόλη	99	3	0,2	7
α-ιονόνη	100	10	0,6	23
γερανιόλη	100	6	0,3	13
βενζυλική αλκοόλη	100	16	0,9	37
β-φαινυλαιθανόλη	–	–	–	–
β-ιονόνη	100	10	0,5	22
γερανικό οξύ	100	6	0,3	14
βανιλίνη	98	8	0,4	18

- Συστατικά των οποίων η % ανάκτηση ήταν στατιστικά διαφορετική από 100%



Ο πειραματικός σχεδιασμός που εφαρμόστηκε κατά τη διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου, επέτρεψε την εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο LGC/VAM [238]. Η % διευρυμένη σχετική αβεβαιότητα των μετρήσεων (expanded uncertainty,  $U_{exp}\%$ ) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% εκτιμήθηκε σύμφωνα με τον τύπο 3.18 που περιγράφεται στην παρ. 3.2.13. Τα αποτελέσματα για κάθε αναλύτη και επίπεδο συγκέντρωσης, αναγράφονται στον Πίνακα 4.5. Οι τιμές  $U_{exp}\%$  κυμάνθηκαν από 1 έως 42%.

Με χρήση της αβεβαιότητας των συστηματικών σφαλμάτων  $u(R)$ , εφαρμόστηκε t-test (παρ. 3.2.12) για να υπολογιστούν οι περιπτώσεις για τις οποίες η % ανάκτηση ήταν στατιστικά διαφορετική από 100%. Τα συστατικά αυτά επισημαίνονται (με αστερίσκο) στον Πίνακα 4.5. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου (παρ. 4.2.6) σε πραγματικά δείγματα οίνων, έγινε διόρθωση των αποτελεσμάτων των συγκεκριμένων ενώσεων ως προς την ανάκτηση.

#### 4.2.4.5. Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα (ruggedness) μιας μεθόδου περιγράφει την ευαισθησία της σε προσχεδιασμένες, σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Σχετίζεται με την αντοχή (robustness) της σε τυχαίες, μη σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών συνθηκών κατά τον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας ή κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε βάθος χρόνου.

Στην παρούσα μελέτη, η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με χρήση μερικού παραγοντικού σχεδιασμού δύο επιπέδων Plackett & Burmann [244] όπως περιγράφεται στην παρ. 3.3.17. Οι 6 ποσοτικές παράμετροι που εξετάστηκαν αφορούσαν: (1) την συγκέντρωση της αιθυλικής αλκοόλης του οίνου  $C_{EtOH}$  (σε % v/v), (2) τη θερμοκρασία της εκχύλισης  $T_{εκχ}$  (σε °C), (3) το pH, (4) το χρόνο της εκχύλισης  $t_{εκχ}$  (σε min), (5) τη θερμοκρασία του εισαγωγέα  $T_{inj}$  (σε °C) και (6) τη συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος  $C_{NaCl}$  (σε mol L<sup>-1</sup>). Η ποιοτική παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η παλαιότητα της ίνας. Η στατιστική σημασία της επίδρασης των μικρομεταβολών των παραπάνω παραγόντων στο σχετικό εμβαδόν κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης, με βάση τη σχέση 3.34, παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.6



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μέθοδος παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε μικρές μεταβολές του pH, της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου και του χρόνου εκχύλισης. Η διακύμανση της θερμοκρασίας διεξαγωγής της μικροεκχύλισης μεταξύ των 30 και 34 °C δεν επηρεάζει σημαντικά τα σχετικά εμβαδά σχεδόν του συνόλου των αναλυτών, με εξαίρεση τη β-ιονόνη όπου η μικροεκχύλιση δείχνει ανθεκτικότητα για θερμοκρασίες στην περιοχή μεταξύ 31 και 33 °C. Οι μεταβολές της συγκέντρωσης της αιθυλικής αλκοόλης μεταξύ των τιμών 8,5 και 9,5% δεν επηρεάζουν σημαντικά τα περισσότερα προσδιοριζόμενα συστατικά, με εξαίρεση τις ενώσεις trans rose οξειδίου και βενζυλική αλκοόλη. Για τα συγκεκριμένα συστατικά η μέθοδος δείχνει αντοχή για αλκοολικούς τίτλους μεταξύ 8,7 και 9,3%. Παρόμοια, μεταβολές της θερμοκρασίας του εισαγωγέα μεταξύ των οριακών τιμών 226 και 234 °C φαίνεται να μην έχουν σημαντική επίπτωση στις αναλυτικές μετρήσεις όλων των αναλυτών.

Αντίθετα, ο βαθμός χρησιμοποίησης της ίνας (ή αλλιώς η παλαιότητά της) αποτελεί στατιστικά σημαντικό παράγοντα για όλα τα προσδιοριζόμενα συστατικά. Για το λόγο αυτό, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην κατάσταση της ίνας κατά τη διάρκεια ενός κύκλου πειραμάτων.

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιούνταν επί καθημερινής βάσης πριν την έναρξη των πειραματικών δοκιμών, έλεγχος της κατάστασης της ίνας με την ανάλυση προτύπου διαλύματος που περιείχε όλους τους αναλύτες σε συγκέντρωση 100 μg L<sup>-1</sup> και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 128 μg L<sup>-1</sup>. Οι τιμές των μέσων σχετικών εμβαδών των κορυφών των προσδιοριζόμενων ενώσεων και οι τυπικές τους αποκλίσεις sd, καταγράφονταν σε μορφή διαγράμματος. Στις περιπτώσεις όπου τα σχετικά εμβαδά των κορυφών παρουσίαζαν διακύμανση μεγαλύτερη από ±3 sd γινόταν αντικατάσταση της ίνας. Μία γενική εκτίμηση που αποκομίσθηκε από το σύνολο των δοκιμών (αναλύσεις προτύπων διαλυμάτων, οίνων και εμβολιασμένων οίνων) με την προτεινόμενη DI-SPME μέθοδο, είναι ότι μία ίνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητική απόδοση για περίπου 80-100 αναλύσεις. Ο αριθμός αυτός θεωρείται ικανοποιητικός σε σχέση με τον αριθμό χρήσεων που αναφέρεται σε άλλες εργασίες [227, 276].

#### 4.2.5. Προσδιορισμός δεσμευμένων αρωματικών συστατικών

Για να εφαρμοσθεί η μέθοδος SPME σε δείγματα οίνων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 21 συστατικών του πρωτογενούς αρώματος που βρίσκονται δεσμευμένα με τη μορφή γλυκοζιτών και απελευθερώνονται με ενζυμική υδρόλυση, αναπτύχθηκε ένα νέο πρωτόκολλο SPE-SPME-GC/MS.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν συνολικά μόνο δύο αναφορές με συνδυασμό των τεχνικών SPE και SPME για τον προσδιορισμό σε οίνους των πρωτογενών αρωματικών συστατικών του δεσμευμένου κλάσματος [16, 138]. Και στις δύο προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκε SPE για απομόνωση/προσυγκέντρωση των συστατικών, όπου μετά την έκλυση του ελεύθερου κλάσματος, με υδρόφοβο διαλύτη, ακολουθούσε έκλυση του δεσμευμένου κλάσματος με πολικό διαλύτη. Στη συνέχεια, το δεσμευμένο κλάσμα υφίστατο υδρόλυση και τα απελευθερωμένα πτητικά συστατικά συλλέγονταν απευθείας από τον υπερκείμενο χώρο του διαλύματος με HS-SPME. Παρά ταύτα, με τις συγκεκριμένες διαδικασίες δεν υπήρξε πρόβλεψη η σύσταση του υδρολύματος από το οποίο εκχυλίζονταν τα αποδεσμευμένα συστατικά να είναι παρόμοια με τη σύσταση του διαλύματος από το οποίο εκχυλίζονταν τα συστατικά του ελεύθερου κλάσματος. Εξαιτίας, ωστόσο, της ευαισθησίας που παρουσιάζει η τεχνική SPME στην επίδραση του υποστρώματος [107, 270-274] αυτό είχε ως αποτέλεσμα, η σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο κλασμάτων να μην είναι επιτρεπτή. Για τον ίδιο λόγο, όσον αφορά τα αποδεσμευμένα συστατικά, δεν μπορούσε να γίνει εφαρμογή των προαναφερόμενων μεθόδων για ποσοτικούς προσδιορισμούς, αλλά μόνο για ποιοτικούς.

Το πειραματικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη, περιγράφεται αναλυτικά στο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (παρ. 3.3.8.2). Τα βασικά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει είναι:

- I. Χρήση κατάλληλης μικροστήλης (Isolute ENV+) για τη διεξαγωγή της SPE που παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση των δεσμευμένων συστατικών. Όπως προαναφέρθηκε (παρ 4.1.1) ο συγκεκριμένος τύπος μικροστήλης ελέγχθηκε για την επίδοσή του και συγκρινόμενος με

άλλους τύπους στηλών αποδείχθηκε ως πιο αποτελεσματικός για την απόδοση των συστατικών του δεσμευμένου κλάσματος.

- II. Εξασφάλιση βέλτιστων τιμών των πειραματικών παραμέτρων (όπως αυτές καθορίστηκαν στην παρ. 4.2.3), για τη διεξαγωγή της SPME στο δεσμευμένο κλάσμα.
- III. Δυνατότητα ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων, καθώς η SPME ανάλυση των συστατικών του δεσμευμένου κλάσματος πραγματοποιείται υπό τις συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιείται η βαθμονόμηση της μεθόδου.
- IV. Δυνατότητα σύγκρισης των ποσοτικών αποτελεσμάτων των δύο κλασμάτων (ελεύθερου και δεσμευμένου) καθώς οι αναλύσεις γίνονται υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Θα πρέπει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι λόγω της μη διάθεσης στο εμπόριο γλυκοζιτικά δεσμευμένων πτητικών συστατικών δεν έγινε δυνατή η επικύρωση της προτεινόμενης διαδικασίας.

#### **4.2.6. Εφαρμογή σε δείγματα οίνων**

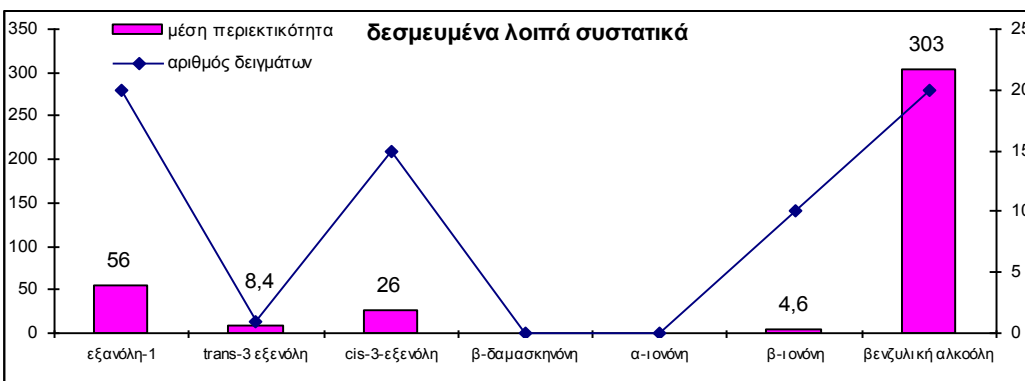
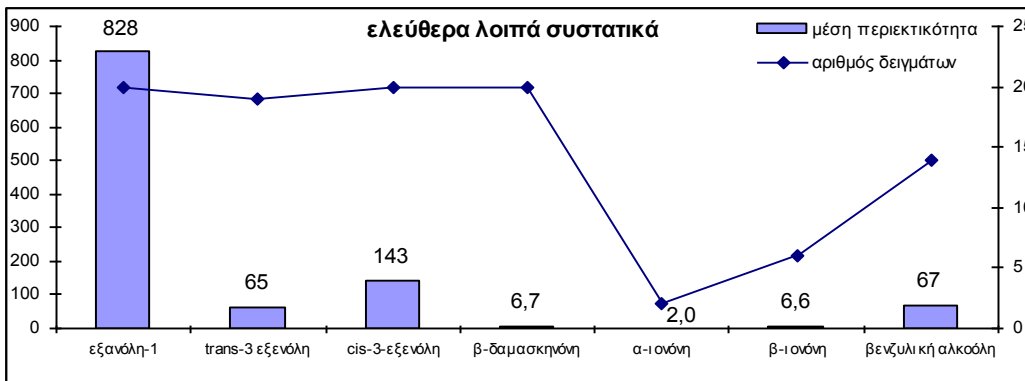
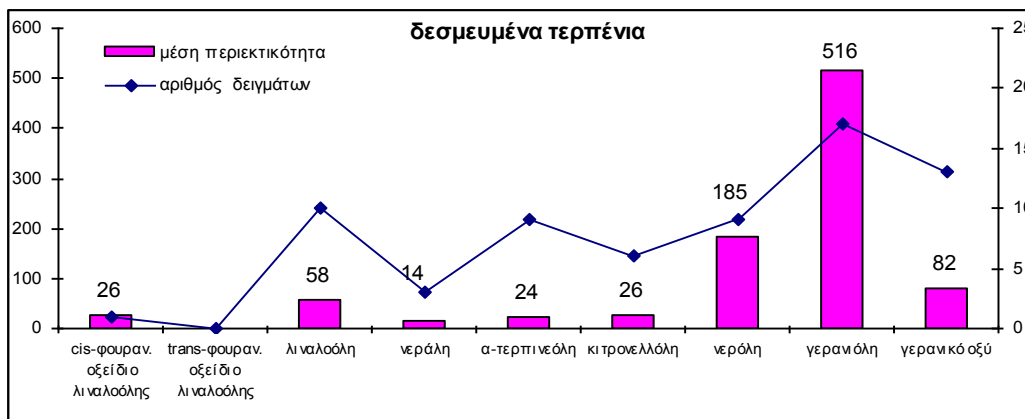
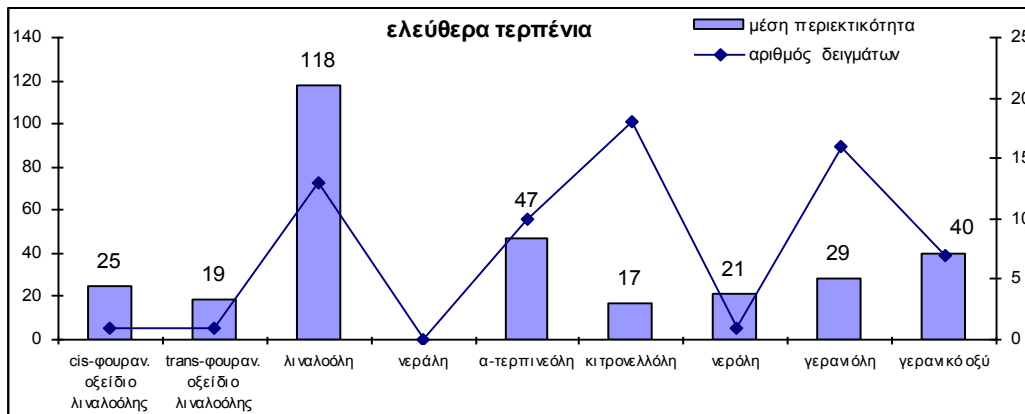
Η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου δοκιμάσθηκε με την ανάλυση 20 λευκών, μονοποικιλιακών οίνων από 11 ελληνικές και 4 διεθνείς ποικιλίες αμπέλου *V. vinifera* καλλιεργημένες σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα οίνων στα οποία είχε εφαρμοσθεί η μέθοδος SPE/GC-MS. Τα αποτελέσματα για κάθε δείγμα οίνου παρουσιάζονται στο Παράρτημα II της διατριβής (Πίνακας Π2).

Στον Πίνακα 4.7 και στο Σχήμα 4.17 παρουσιάζονται, συνοπτικά, ορισμένα στατιστικά στοιχεία, από τα δείγματα που αναλύθηκαν, για τις συγκεντρώσεις και τη συχνότητα ανίχνευσης των 21 αναλυτών, σε ελεύθερη και σε δεσμευμένη μορφή

**Πίνακας 4.7: Στατιστικά δεδομένα για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις από τις αναλύσεις 20 λευκών οίνων με τη μέθοδο SPME/GC-MS**

ΑΝΑΛΥΤΕΣ	Μορφή	Πλήθος <sup>α</sup> δειγμάτων	Ελάχιστη τιμή <sup>β</sup>	Μέγιστη τιμή <sup>β</sup>	Μέση τιμή <sup>β</sup>	Διάμεσος τιμή <sup>β</sup>
<b>ΤΕΡΠΕΝΙΑ</b>						
<i>cis</i> -φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	<i>Ελεύθερη</i>	1	-	-	-	-
	<i>Δεσμευμένη</i>	1	-	-	-	-
<i>trans</i> -φουρανικό οξείδιο λιναλοόλης	<i>Ελεύθερη</i>	1	-	-	-	-
	<i>Δεσμευμένη</i>	-	-	-	-	-
λιναλοόλη	<i>Ελεύθερη</i>	13	6	814	118	40
	<i>Δεσμευμένη</i>	10	8	122	58	58
νεράλη	<i>Ελεύθερη</i>	-	-	-	-	-
	<i>Δεσμευμένη</i>	3	13	14	14	14
α-τερπινεόλη	<i>Ελεύθερη</i>	10	4	207	47	37
	<i>Δεσμευμένη</i>	9	7	62	24	23
κιτρονελλόλη	<i>Ελεύθερη</i>	18	6	42	17	13
	<i>Δεσμευμένη</i>	6	17	44	26	22
νερόλη	<i>Ελεύθερη</i>	1	-	-	-	-
	<i>Δεσμευμένη</i>	9	12	392	185	193
νερανιόλη	<i>Ελεύθερη</i>	16	6	136	29	22
	<i>Δεσμευμένη</i>	17	7	1849	516	80
νερανικό οξύ	<i>Ελεύθερη</i>	7	11	130	40	27
	<i>Δεσμευμένη</i>	13	5	311	82	16
<b>C6 ΑΛΚΟΟΛΕΣ</b>						
εξανόλη-1	<i>Ελεύθερη</i>	20	348	1464	828	720
	<i>Δεσμευμένη</i>	20	16	102	56	54
<i>trans</i> -3- εξενόλη	<i>Ελεύθερη</i>	19	15	183	65	55
	<i>Δεσμευμένη</i>	1	-	-	-	-
<i>cis</i> -3- εξενόλη	<i>Ελεύθερη</i>	20	10	715	143	36
	<i>Δεσμευμένη</i>	15	13	60	26	25
<b>C13</b>						
β- δαμασκηνόνη	<i>Ελεύθερη</i>	20	4,5	10,5	6,7	6,7
	<i>Δεσμευμένη</i>	-	-	-	-	-
α-ιονόνη	<i>Ελεύθερη</i>	2	1,9	2,1	2,0	2,0
	<i>Δεσμευμένη</i>	-	-	-	-	-
β- ιονόνη	<i>Ελεύθερη</i>	6	3,5	9,9	6,6	6,6
	<i>Δεσμευμένη</i>	10	3,0	6,2	4,6	4,5
<b>BENZOLIKA</b>						
βενζυλική αλκοόλη	<i>Ελεύθερη</i>	14	4,3	197	67	49
	<i>Δεσμευμένη</i>	20	71	1098	303	219
β-φαινυλαιθανόλη	<i>Ελεύθερη</i>	20	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000
	<i>Δεσμευμένη</i>	20	71	724	254	223

α: αριθμός δειγμάτων οίνων όπου η ένωση προσδιορίστηκε πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης, β: οι συγκεντρώσεις σε  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



**Σχήμα 4.17:** Μέση συγκέντρωση (σε  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ελεύθερων και δεσμευμένων συστατικών που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο SPME/GC-MS και αριθμός δειγμάτων, από τα συνολικά 20 δείγματα οίνων στα οποία οι ενώσεις προσδιορίστηκαν.

#### 4.2.7. Συγκριτικά αποτελέσματα SPME-SPE

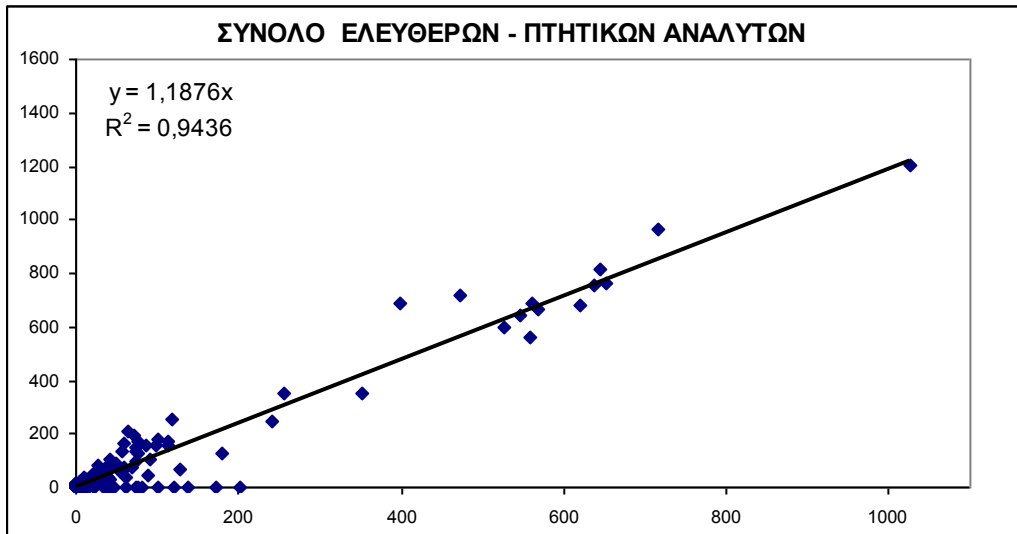
Μετά την εφαρμογή των δύο μεθόδων SPME/GC-MS και SPE/GC-MS για την ανάλυση 20 κοινών δειγμάτων οίνων (παρ. 4.1.4, παρ 4.2.6), πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τη συμφωνία των αποτελεσμάτων.

Για τη σύγκριση χρησιμοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης όπου ως μεταβλητές (x, y) ορίστηκαν οι τιμές των αποτελεσμάτων από τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των 21 πρωτογενών αρωματικών συστατικών με την κάθε μέθοδο αντίστοιχα. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης έγινε χωριστά για τα αποτελέσματα του ελεύθερου και του δεσμευμένου κλάσματος. Σε κάθε περίπτωση, υπολογίσθηκαν οι παράμετροι της γραμμικής παλινδρόμησης δηλαδή, η τιμή της κλίσης της ευθείας (a) και του συντελεστή προσδιορισμού ( $r^2$ ). Οι τιμές αυτές παρέχουν την πληροφορία για το βαθμό που σχετίζονται τα αποτελέσματα από τις δύο μεθόδους. Έτσι, όταν η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης ισούται με 1, η σχέση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων είναι η σχέση  $y = x$ . Αντίστοιχα, συντελεστής προσδιορισμού με τιμή κοντά στη μονάδα, σημαίνει σημαντική συσχέτιση των αποτελεσμάτων, και γραφικά ότι όλα τα σημεία τείνουν να συγκεντρώνονται κοντά στην ευθεία παλινδρόμησης.

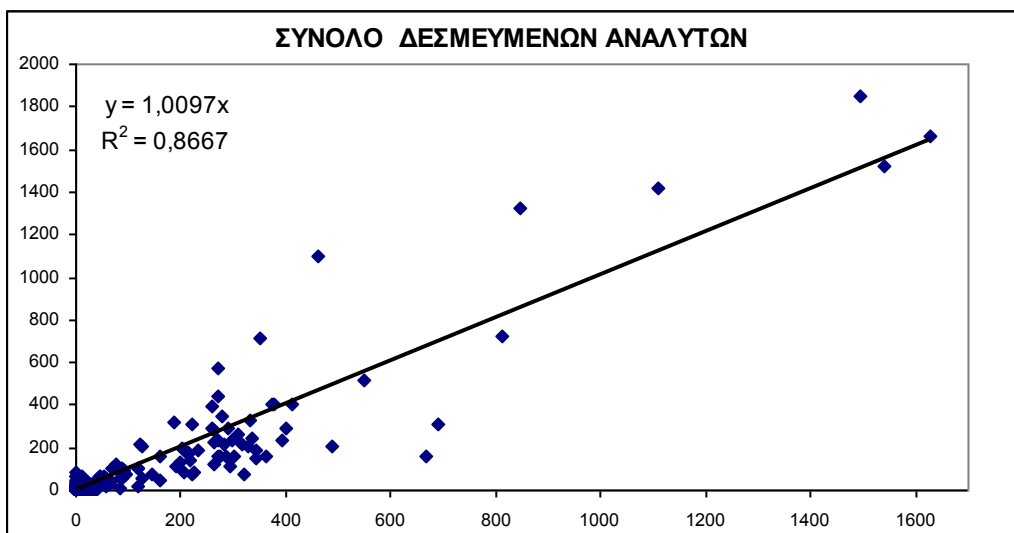
Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων απεικονίζεται με τη μορφή διαγραμμάτων διασποράς στο Σχήμα 4.18 (A) για το σύνολο των 21 πτητικών συστατικών στο ελεύθερο κλάσμα και στο Σχήμα 4.18 (B) για το σύνολο των 21 ενώσεων με τη μορφή γλυκοζιδίων στο δεσμευμένο κλάσμα. Κάθε ζευγάρι (x, y) αντιπροσωπεύει ένα από τα 21 αρωματικά συστατικά σε κάποιο από τα 20 δείγματα οίνων. Η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης βρέθηκε και στις δύο περιπτώσεις (ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα) πολύ κοντά στην τιμή 1, και ο συντελεστής προσδιορισμού με τιμές  $r^2 = 0,9436$  και  $r^2 = 0,8667$  για τους ελεύθερους και δεσμευμένους αναλύτες αντίστοιχα, κρίθηκε ικανοποιητικός. Από τα παραπάνω, συνάγεται ότι υπάρχει ικανοποιητική συμφωνία, μεταξύ των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τις δύο μεθόδους, για το σύνολο των αναλυτών τόσο στο ελεύθερο όσο και στο δεσμευμένο κλάσμα. Στη συνέχεια, εξετάζεται η συσχέτιση των αναλυτικών αποτελεσμάτων από τις δύο μεθόδους ανά κατηγορία ενώσεων.



(A)



(B)



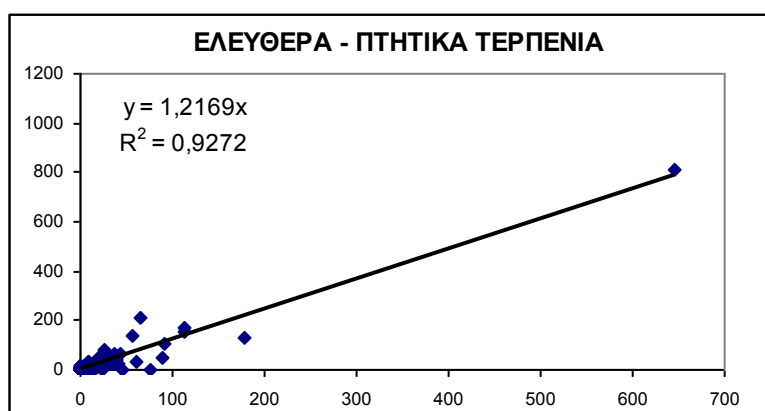
**Σχήμα 4.18:** Συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό: (A) των ελεύθερων-πτητικών αναλυτών και (B) των δεσμευμένων (μετά από ενζυμική υδρόλυση) 21 πρωτογενών αρωματικών συστατικών, σε 20 δείγματα οίνων με τις μεθόδους SPE-GC/MS και SPME-GC/MS.

### A. Τερπένια

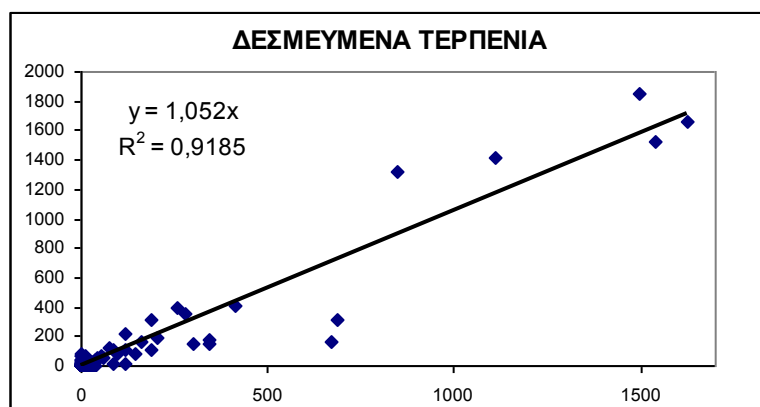
Στο Σχήμα 4.19 απεικονίζεται, με τη μορφή διαγραμμάτων διασποράς, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων της εφαρμογής στα 20 δείγματα οίνων των δύο μεθόδων (SPE/GC-MS και SPME/GC-MS) όσον αφορά τον ποσοτικό

προσδιορισμό των 10 τερπενικών ενώσεων τόσο σε ελεύθερη (A) όσο και σε δεσμευμένη (B) μορφή.

Και στις δύο περιπτώσεις (ελεύθερα και δεσμευμένα τερπένια) ο πολύ υψηλός δείκτης προσδιορισμού  $r^2 > 0,9$  και η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης που είναι κοντά στην τιμή 1 δείχνουν ότι για αυτήν την κατηγορία ενώσεων υπήρξε ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων .



(A)



(B)

**Σχήμα 4.19: Συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό: (A) των ελεύθερων και (B) των δεσμευμένων (μετά από ενζυμική υδρόλυση) τερπενικών ενώσεων, σε 20 δείγματα οίνων με τις μεθόδους SPE/GC-MS και SPME/GC-MS**

Παρά ταύτα, από μια πιο λεπτομερή εξέταση των αποτελεσμάτων σε επίπεδο μεμονομένων αναλυτών, και με σύγκριση των στοιχείων των Πινάκων 4.5 και 4.9, μπορεί να παρατηρηθεί ότι υπήρξαν αρκετές διαφορές, κυρίως ως προς την ανιχνευσιμότητα των επιμέρους συστατικών.

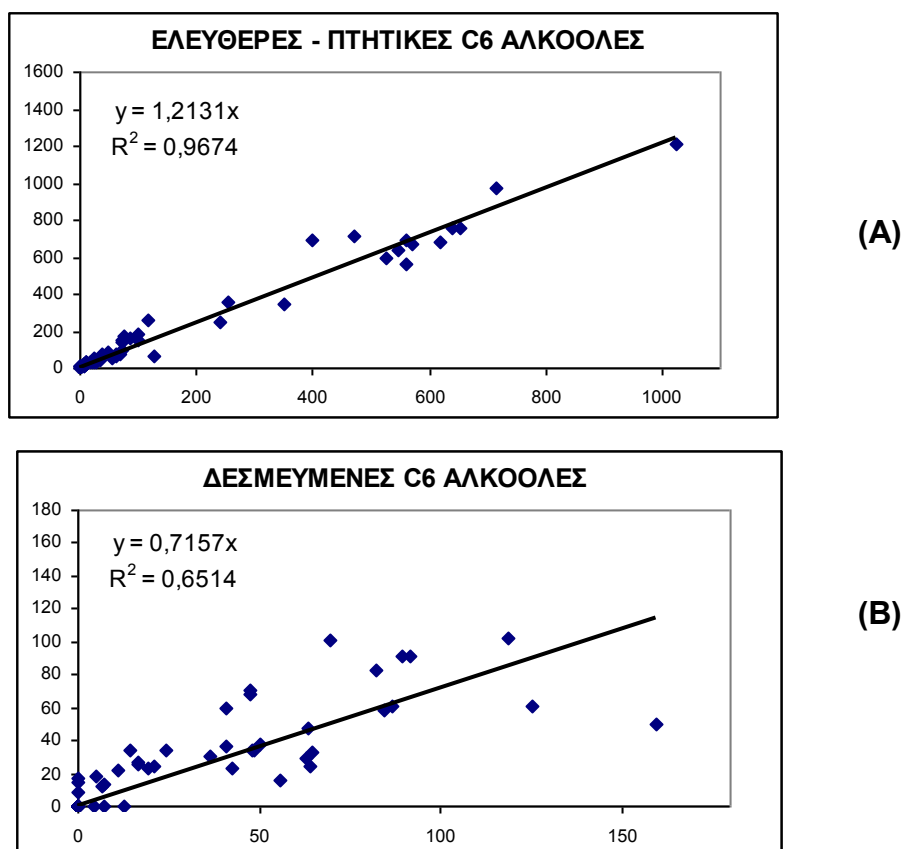
Αρχικά, επισημάνθηκε ότι ορισμένες τερπενικές ενώσεις προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο SPME/GC-MS σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων από ότι με τη μέθοδο SPE/GC-MS. Έτσι, στο δεσμευμένο κλάσμα, η λιναλοόλη προσδιορίστηκε μετά από ενζυμική υδρόλυση με τη μέθοδο SPME σε 10 από τα 20 δείγματα οίνων που εξετάστηκαν ενώ με τη μέθοδο SPE σε 5 δείγματα. Ακόμη, η α-τερπινεόλη ανιχνεύθηκε και προσδιορίστηκε (μετά από ενζυμική υδρόλυση) με τη μέθοδο SPME σε 9 από τα δείγματα ενώ με τη μέθοδο SPE έγινε ανίχνευση και προσδιορισμός της ένωσης μόνο σε 1 δείγμα. Επιπλέον, το γερανικό οξύ ανιχνεύθηκε και προσδιορίστηκε με την SPME σε 2 περισσότερα δείγματα από ότι με τη μέθοδο SPE. Παρόμοια, στο ελεύθερο κλάσμα, οι ενώσεις κιτρονελλόλη και γερανικό οξύ ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν με την πρώτη μέθοδο σε 3 περισσότερα δείγματα από ότι με τη δεύτερη μέθοδο ενώ και όσον αφορά τις ενώσεις λιναλοόλη και γερανιόλη υπήρχε ελαφρά αυξημένος αριθμός δειγμάτων στα οποία ανιχνεύτηκαν οι συγκεκριμένες ενώσεις με την πρώτη μέθοδο.

Αντίθετα, έγινε ανίχνευση και προσδιορισμός της ένωσης γερανιάλη τόσο σε ελεύθερη όσο και σε δεσμευμένη μορφή αποκλειστικά με τη μέθοδο SPE (σε ένα δείγμα) ενώ επιπλέον με τη μέθοδο SPE έγινε ανίχνευση και προσδιορισμός σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων των ενώσεων, νερόλη, cis φουρανικό οξείδιο της λιναλοόλης και νεράλη τόσο στο ελεύθερο όσο και στο δεσμευμένο κλάσμα.

Καθώς όμως, οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων αναλυτών στα δείγματα που ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν μόνο με τη μία ή με την άλλη μέθοδο, είναι πολύ χαμηλές (της τάξης των  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), οι παραπάνω διαφορές είναι πιθανόν να οφείλονται κατά ένα μεγάλο μέρος, στη χρονική απόσταση που μεσολάβησε ανάμεσα στην εφαρμογή των δύο μεθόδων για την ανάλυση των συγκεκριμένων δειγμάτων οίνων, και στη μεταβολή της σύστασης των οίνων από διάφορες αντιδράσεις που πιθανόν να έλαβαν χώρα κατά το διάστημα αυτό, όπως π.χ. υδρόλυσης γλυκοζιτών ή αντιδράσεις οξειδωσης ή/και αναγωγής ορισμένων αναλυτών.

## B. C<sub>6</sub> αλκοόλες

Στο Σχήμα 4.20 απεικονίζεται, με τη μορφή διαγραμμάτων διασποράς, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελεύθερων (A) και δεσμευμένων (B) (μετά από ενζυμική υδρόλυση) C<sub>6</sub> αλκοολών από την ανάλυση 20 δειγμάτων οίνων με τις δύο μεθόδους SPE/GC-MS και SPME/GC-MS.



**Σχήμα 4.20: Συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τον ποσοτικό προσδιορισμό: (A) των ελεύθερων και (B) των δεσμευμένων (μετά από ενζυμική υδρόλυση) C<sub>6</sub> αλκοολών, σε 20 δείγματα οίνων με τις μεθόδους SPE/GC-MS και SPME/GC-MS**

Για τα ελεύθερα συστατικά, μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι, τα σημεία που ορίζονται από τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων συγκεντρώνονται πολύ κοντά σε μία ευθεία (ο δείκτης προσδιορισμού είναι πολύ υψηλός  $r^2 = 0,9674$ ) και ότι η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης έχει τιμή κοντά στη μονάδα. Από τα στοιχεία αυτά, συνάγεται ότι για αυτήν την κατηγορία ενώσεων, στην

ελεύθερη-πτητική μορφή τους διαπιστώθηκε συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων.

Ωστόσο, για τα δεσμευμένα συστατικά, η σχέση των αποτελεσμάτων δεν είναι τόσο ισχυρή. Ο χαμηλότερος δείκτης προσδιορισμού ( $r^2 = 0,6514$ ) δείχνει ότι τα σημεία που ορίζουν οι τιμές των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων αποκλίνουν περισσότερο από την ευθεία παλινδρόμησης χωρίς να τείνουν πάντως στο σχηματισμό τυχαίου νέφους σημείων.

Η πληροφορία αυτή υποδεικνύει ότι η παρατηρούμενη μερική ασυμφωνία των αποτελεσμάτων ήταν σε ορισμένο βαθμό τυχαία και δεν οφειλόταν σε κάποιο συστηματικό σφάλμα μίας εκ των δύο (ή και των δύο) μεθόδων. Καθώς ωστόσο, οι δύο μέθοδοι έχουν αξιολογηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ορθότητα και πιστότητά τους όσον αφορά τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των συγκεκριμένων ενώσεων, στην ελεύθερη μορφή τους, σε συγκεντρώσεις αυτής της τάξης μεγέθους, καθώς επίσης στο ελεύθερο κλάσμα υπάρχει ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων, οι παρατηρούμενες διαφορές στο δεσμευμένο κλάσμα, θα μπορούσαν να αποδοθούν: α) σε μη σταθερή απόδοση των ενζύμων κατά το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης των γλυκοζιτών, β) σε πιθανή υδρόλυση μέρους των γλυκοζιτών κατά τη χρονική περίοδο που μεσολάβησε ανάμεσα στην εφαρμογή των δύο μεθόδων για την ανάλυση των δειγμάτων οίνου ή γ) σε άλλες χημικές μεταβολές των γλυκοζιτών όπως π.χ. από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής ή εστεροποίησης κατά το ίδιο μεσοδιάστημα.

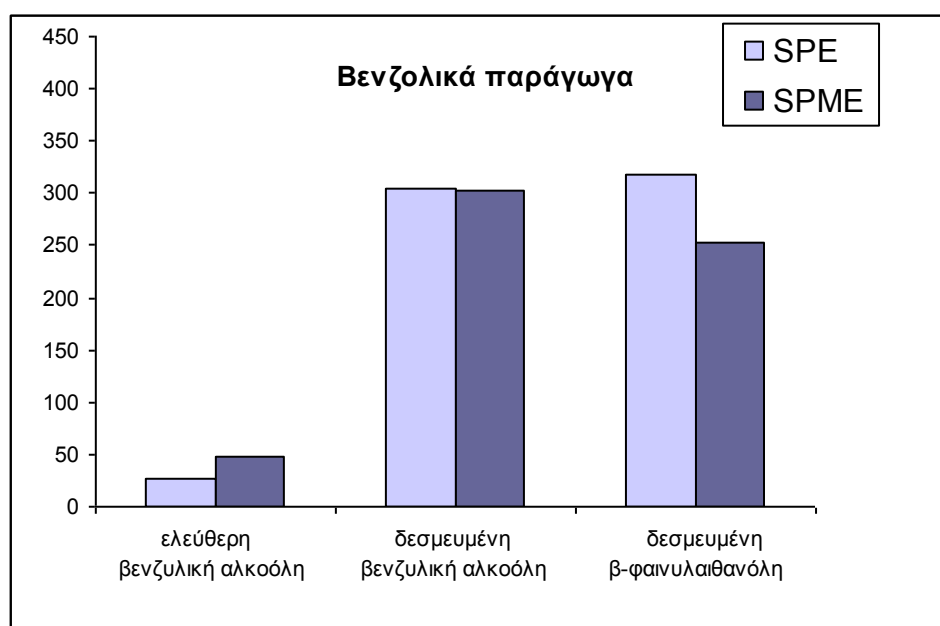
Από τα παραπάνω πιθανά αίτια, η μη σταθερή απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης δεν φαίνεται να υποστηρίζεται από προηγούμενα αποτελέσματα για το δεσμευμένο κλάσμα είτε αυτά αφορούν το σύνολο των αναλυτών (Σχήμα 4.18 (B)) είτε άλλες κατηγορίες ενώσεων όπως τα τερπένια (Σχήμα 4.19 (B)).

Συνεπώς, και καθώς όπως έχει ήδη προαναφερθεί οι οίνοι αποτελούν δείγματα η σύσταση των οποίων μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του χρόνου, θεωρείται πιο πιθανό οι παρατηρούμενες διαφορές να οφείλονταν στα δύο άλλα πιθανά αίτια, δηλαδή σε χημικές μεταβολές που συνέβησαν στους

γλυκοζίτες των C<sub>6</sub> αλκοολών των δειγμάτων στο μεσοδιάστημα μεταξύ των εφαρμογών των δύο μεθόδων.

### Γ. Βενζολικά παράγωγα

Από τα τρία βενζολικά παράγωγα (βενζυλική αλκοόλη, βανιλίνη και β-φαινυλαιθανόλη) που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, η βανιλίνη ανιχνεύθηκε σε 14 δείγματα οίνων (στο ελεύθερο κλάσμα) αποκλειστικά με τη μέθοδο SPE, ενώ η β-φαινυλαιθανόλη στην ελεύθερη μορφή της, όπως προαναφέρθηκε (Κεφ1, παρ 1.2.4), αποτελεί ουσιαστικά συστατικό του δευτερογενούς αρώματος και οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της ήταν και για τις δύο μεθόδους, εκτός των ορίων βαθμονόμησης. Επομένως, η συσχέτιση των αποτελεσμάτων από τις δύο μεθόδους κατέστη δυνατή μόνο για τη βενζυλική αλκοόλη (και στις δύο μορφές της) και για τη β-φαινυλαιθανόλη στη δεσμευμένη της μορφή.



Σχήμα 4.21: Σύγκριση του μέσου όρου των αναλυτικών αποτελεσμάτων για τη βενζυλική αλκοόλη και τη δεσμευμένη β-φαινυλαιθανόλη, από την ανάλυση 20 δειγμάτων οίνων με δύο μεθόδους προσδιορισμού SPE/GC-MS και SPME/GC-MS.

Από την ξεχωριστή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, για τις ενώσεις αυτές, προέκυψαν αρκετά διαφορετικοί δείκτες προσδιορισμού, κατά

περίπτωση. Έτσι, ενώ στις μεν δεσμευμένη β-φαινυλαιθανόλη και ελεύθερη βενζυλική αλκοόλη οι δείκτες προσδιορισμού ( $r^2 = 0,73$  και  $r^2 = 0,85$  αντίστοιχα) θεωρήθηκαν σχετικά ικανοποιητικοί στη δεσμευμένη βενζυλική αλκοόλη προέκυψε πολύ χαμηλός δείκτης προσδιορισμού της τάξης του 0,22. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα και από την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για το σύνολο των βενζολικών ενώσεων να μην προκύψει ικανοποιητικός δείκτης συσχέτισης όπως στις προηγούμενες κατηγορίες ενώσεων. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ξανά, ότι μεσολάβησαν αρκετοί μήνες μεταξύ των αναλύσεων των δειγμάτων με τις δύο μεθόδους. Αυτό μπορεί να εξηγεί μερικά τις διαφορές στα αποτελέσματα των προσδιορισμών μεταξύ των δύο μεθόδων, ειδικά για ενώσεις που είτε βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις είτε είναι επιρρεπείς σε χημικές μεταβολές όπως το πολικό μόριο της βενζυλικής αλκοόλης. Παρόλα αυτά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.21 από τη σύγκριση για κάθε συστατικό αυτής της κατηγορίας ενώσεων, των μέσων όρων των αναλυτικών αποτελεσμάτων, από την ανάλυση 20 δειγμάτων οίνου με τις δύο μεθόδους, προκύπτει πολύ ικανοποιητική συσχέτιση ειδικά όσον αφορά τη δεσμευμένη μορφή των αναλυτών όπου παρουσιάζονται και οι μεγαλύτερες τιμές συγκεντρώσεων.

#### **Δ. Νορισοπρενοειδείς ενώσεις**

Όσον αφορά τη σύγκριση των δύο μεθόδων για τους προσδιορισμούς των αναλυτών από την κατηγορία των C<sub>13</sub> νορισοπρενοειδών ενώσεων, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ενώσεις αυτές δεν ανιχνεύθηκαν σε αρκετά μεγάλο αριθμό δειγμάτων (με εξαίρεση τη β-δαμασκηνόνη στην ελεύθερη μορφή της), ενώ παράλληλα οι συγκεντρώσεις τους ήταν τόσο χαμηλές ( $< 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ώστε η εξαγωγή στατιστικών συμπερασμάτων είναι παρακινδυνευμένη.

#### **4.2.8. Αρωματικά χαρακτηριστικά ποικιλιών**

Στην παρούσα μελέτη για την εφαρμογή των προτεινόμενων μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μονοποικιλιακών οίνων η παραγωγή των οποίων έγινε με πειραματικές οινοποιήσεις. Η χρήση πειραματικών αντί εμπορικών οίνων εξασφάλισε τα κάτωθι: α) ότι όλοι οι οίνοι παρασκευάστηκαν με τις ίδιες διαδικασίες και στον ίδιο περιβάλλοντα χώρο (οικολογία οινοποιείου), β) ότι χρησιμοποιήθηκε το ίδιο στέλεχος ζύμης για τη διαξαγωγή των αλκοολικών

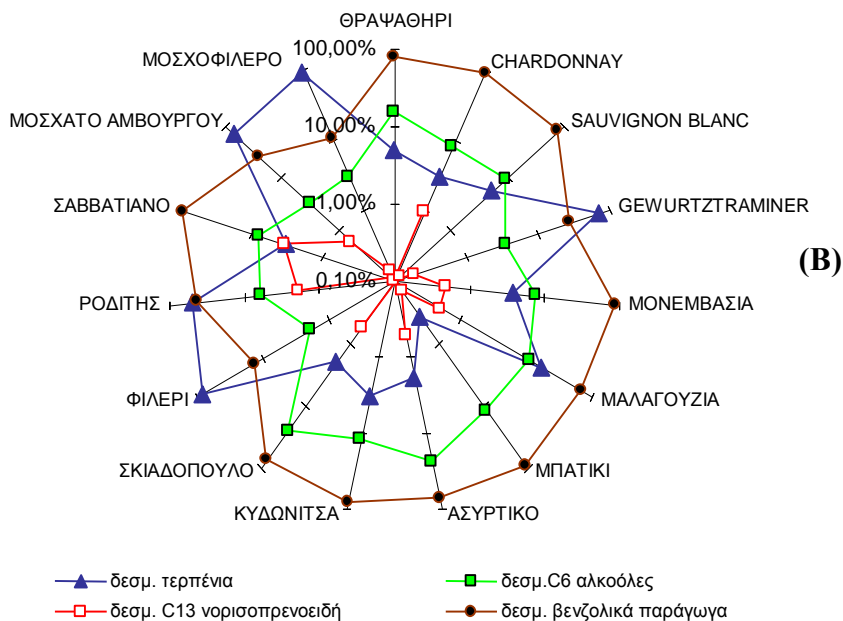
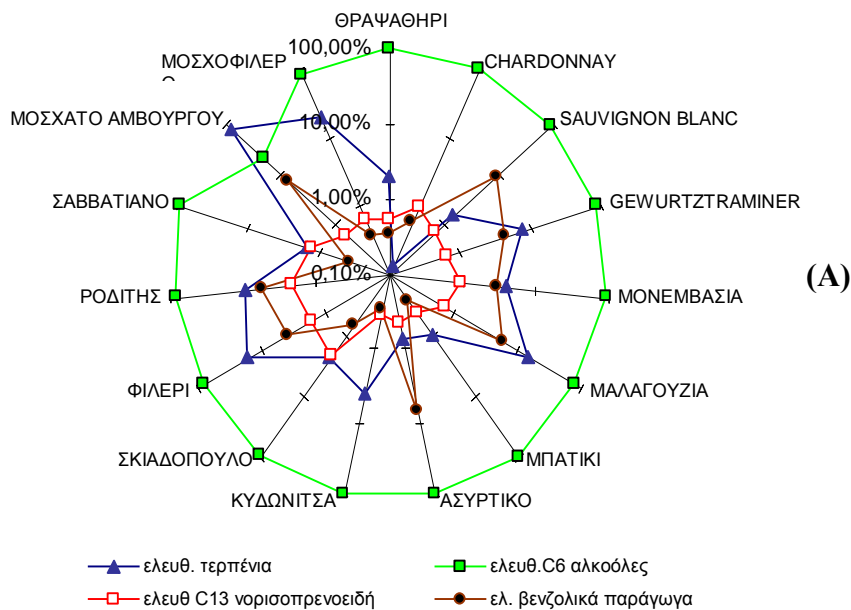
ζυμώσεων και γ) ότι απουσίασε από τη διαδικασία παραγωγής η προσθήκη εξωγενών γλυκοζιδασών, πρακτική που εφαρμόζεται σε μεγάλο αριθμό οινοποιείων, και η οποία θα εμπόδιζε την αξιολόγηση του δεσμευμένου αρωματικού δυναμικού των οίνων. Σε αυτό το πλαίσιο, η χρήση της ίδιας αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των αρωματικών συστατικών προσέφερε ένα μοναδικό πλεονέκτημα για να μπορέσει να γίνει δυνατή η σύγκριση των αναλυτικών αποτελεσμάτων μεταξύ των ποικιλιών ούτως ώστε να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα για τα ιδιαίτερα αρωματικά χαρακτηριστικά τους.

Όπως προαναφέρθηκε (παρ. 4.2.7) με τη μεθοδολογία SPME-GC/MS που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκαν περισσότεροι αναλύτες τόσο στο ελεύθερο όσο και στο δεσμευμένο κλάσμα από ότι με τη μέθοδο SPE-GC/MS. Για το λόγο αυτό τα αναλυτικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας (Παράτημα II, Πίνακας Π2) χρησιμοποιήθηκαν για το σχολιασμό της αρωματικής σύνθεσης των 20 μονοποικιλιακών οίνων.

Πολλές μελέτες έχουν αφιερωθεί κατά το παρελθόν για τον προσδιορισμό του αρωματικού προφίλ διαφόρων μονοποικιλιακών οίνων. [7, 12, 14-18, 26, 56, 95, 113, 115, 268, 277]. Σημαντικός αριθμός πρωτότυπων εργασιών και άρθρων ανασκόπησης έχουν δημοσιευθεί σχετικά με αυτό το αντικείμενο και την προσπάθεια συσχέτισης των αναλυτικών αποτελεσμάτων με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων [84, 88, 94, 102, 278] ή τη γεωγραφική τους προέλευση [20, 279]. Ωστόσο σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε, ελάχιστες δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες υπάρχουν με δεδομένα για το ποικιλιακό άρωμα των ελληνικών οίνων [22, 169, 170, 225, 280]. Η παρούσα μελέτη αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη συστηματική προσπάθεια να αξιολογηθεί το αρωματικό προφίλ αρκετών ελληνικών ποικιλιών και να συγκριθεί με το προφίλ διεθνώς αναγνωρισμένων ξένων ποικιλιών.

Στο Σχήμα 4.22 παρουσιάζεται σχηματικά η κατανομή των αρωματικών συστατικών (A) στο ελεύθερο κλάσμα (μη συμπεριλαμβανομένης της β-φαινυλαιθανόλης) και (B) στο δεσμευμένο κλάσμα, των ποικιλιών που μελετήθηκαν.





**Σχήμα 4.22:** Εκατοστιαία κατανομή των αρωματικών συστατικών: (A) στο ελεύθερο κλάσμα (μη συμπεριλαμβανομένης της β-φαινυλαιθανόλης) και (B) στο δεσμευμένο κλάσμα, σε 11 ελληνικές και 4 διεθνείς ποικιλίες (σε λογαριθμική κλίμακα).

Με κριτήριο τη συνολική περιεκτικότητα σε τερπένια (άθροισμα των συγκεντρώσεων των ελεύθερων και των δεσμευμένων τερπενίων), οι τέσσερις πιο αρωματικές ποικιλίες κατά αύξουσα σειρά ήταν: Gewürztraminer, Φιλέρι,

Μοσχάτο Αμβούργου και Μοσχοφίλερο, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ  $1936 \mu\text{g L}^{-1}$  και  $2660 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Η πιο πλούσια σε ελεύθερα τερπένια ποικιλία ήταν το Μοσχάτο Αμβούργου με  $1936 \mu\text{g L}^{-1}$ . Η ποικιλία αυτή από όσες μελετήθηκαν διακρίθηκε για την υψηλότερη περιεκτικότητα, σε ελεύθερη ( $814 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και δεσμευμένη ( $122 \mu\text{g L}^{-1}$ ) λιναλοόλη όπως και σε ελεύθερη γερανιόλη ( $136 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, όπου αναφέρεται ότι η λιναλοόλη και η γερανιόλη αποτελούν τις πιο σημαντικές ενώσεις για τον τερπενικό χαρακτήρα των Μοσχάτων οίνων [281].

Μεταξύ των ποικιλιών που εξετάστηκαν, η ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου, περιείχε επίσης τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γερανικού οξέος σε ελεύθερη ( $130 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και σε δεσμευμένη μορφή ( $311 \mu\text{g L}^{-1}$ )

Επόμενες ως προς την περιεκτικότητά τους σε ελεύθερα τερπένια ήταν, κατά σειρά, οι ποικιλίες Μαλαγουζιά και Μοσχοφίλερο με συγκεντρώσεις  $238$  και  $226 \mu\text{g L}^{-1}$  αντίστοιχα. Το Μοσχοφίλερο χαρακτηριζόταν από πιο σύνθετο προφίλ ελεύθερων τερπενίων με τη λιναλοόλη και τη γερανιόλη να ξεπερνούν το κατώφλι αντίληψης (τιμές OAV  $4,4$  και  $1,4$  αντίστοιχα) και να αντιπροσωπεύουν συνολικά το  $48\%$  των ελεύθερων τερπενίων. Η ποικιλία Μαλαγουζιά ξεχώρισε για τα υψηλά επίπεδα της ελεύθερης λιναλοόλης. Στα τρία δείγματα οίνων της συγκεκριμένης ποικιλίας που εξετάστηκαν, η μέση συγκέντρωση της λιναλοόλης ήταν ( $145 \pm 35 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Η τιμή αυτή είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από τα επίπεδα λιναλοόλης που βρέθηκαν σε άλλες ποικιλίες που θεωρούνται αρωματικές όπως το Φιλέρι ( $32 \mu\text{g L}^{-1}$ ), το Gewürztraminer ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και το Μοσχοφίλερο ( $66 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Στο σημείο αυτό, αξίζει να γίνει μια ειδική αναφορά για την ποικιλία Κυδωνίτσα στην οποία παρόλο που δεν βρέθηκε μεγάλη συγκέντρωση ελεύθερων τερπενίων προσδιορίστηκε συγκέντρωση ελεύθερης λιναλοόλης ( $41 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ικανή να ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης (τιμή OAV  $2,7$ ).

Όσον αφορά τις  $C_{13}$  νορισοπρενοειδείς ενώσεις, η β-δαμασκηνόνη (που έχει ευχάριστη οσμή) ανιχνεύτηκε σε ελεύθερη μορφή με συγκεντρώσεις πάνω από το όριο αντίληψης σε όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν. Την υψηλότερη συγκέντρωση διέθετε η ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ενώ στις

υπόλοιπες ποικιλίες η συγκέντρωση της ένωσης κυμάνθηκε μεταξύ 5,1 και 8,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα δεδομένα πρόσφατης ανασκόπησης των Sefton et al [83] για την παρουσία της συγκεκριμένης ένωσης στους οίνους. Το συστατικό  $\alpha$ -ιονόνη ανιχνεύθηκε στο ελεύθερο κλάσμα με τιμές OAVs<1 ενώ αντίθετα η  $\beta$ -ιονόνη ανιχνεύθηκε σε ελεύθερη μορφή στις ποικιλίες Μαλαγουζιά, Φιλέρι, Ροδίτης και Σαββατιανό σε συγκεντρώσεις πάνω από το όριο αντίληψης μεταξύ 3,5 και 9,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Οι  $C_6$  αλκοόλες προσδίδουν στους οίνους γενικά χορτώδεις οσμές και βρέθηκαν με υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ελεύθερη μορφή Σχήμα 4.22 (Α). Συνολικά οι συγκεντρώσεις τους στο ελεύθερο κλάσμα κυμάνθηκαν μεταξύ 392 και 1630  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ενώ στο δεσμευμένο κλάσμα μεταξύ 23 και 151  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα αυτά όπως έχει αναφερθεί και για άλλες ποικιλίες [191, 281] επιβεβαιώνουν τη μικρή σημασία που έχουν οι  $C_6$  αλκοόλες για το δεσμευμένο κλάσμα. Στις περισσότερες ποικιλίες, από τις ελεύθερες  $C_6$  αλκοόλες το μεγαλύτερο ποσοστό (71% έως 96%) ανήκε στην εξανόλη-1. Εξάιρεση αποτέλεσαν οι ποικιλίες Θραψαθήρι και Κυδωνίτσα όπου η εξανόλη-1 αντιπροσώπευε το 31% και 43% των αλειφατικών αλκοολών. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι οι ποικιλίες αυτές είναι και οι μοναδικές όπου οι συγκεντρώσεις της *cis*-3 εξανόλης ξεπέρασαν το κατώφλι αντίληψης (OAV 1,8 και 1,7 αντίστοιχα).

Η παρούσα μελέτη αποκάλυψε, στους οίνους που μελετήθηκαν, την παρουσία σημαντικών αποθεμάτων αρωματικών ενώσεων που βρίσκονται δεσμευμένα με τη μορφή γλυκοζιτών. Η ύπαρξη των πρόδρομων αυτών αρωματικών ενώσεων είναι πολύ σημαντική καθώς με τις κατάλληλες τεχνικές, κατά τη διαδικασία της οινοποίησης, είναι δυνατό να απελευθερωθούν φέροντας ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του αρώματος των παραγόμενων οίνων.

Η πλουσιότερη ποικιλία σε δεσμευμένα τερπένια ήταν το Μοσχοφίλερο (2436  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ακολουθούμενο από το Φιλέρι (1966  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) και το Gewürztraminer (1849  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις αυτές είναι 11 φορές, 16 φορές και 21 φορές υψηλότερες από τα επίπεδα των ελεύθερων τερπενίων (226, 127 και 88  $\mu\text{g L}^{-1}$ , αντίστοιχα) σε αυτές τις ποικιλίες. Το υψηλότερο ποσοστό

από τα δεσμευμένα τερπένια, ανήκε στη γερανιόλη (72%, 77% και 72%, αντίστοιχα). Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών για την ποικιλία Gewürztraminer [111]. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε για τη μη αρωματική ποικιλία Ροδίτης με το ποσοστό του γλυκοζίτη της γερανιόλης να αντιστοιχεί στο 79% του συνόλου των δεσμευμένων τερπενίων και να ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης. Όσον αφορά την ποικιλία Sauvignon Blanc, η περιεκτικότητα της δεσμευμένης γερανιόλης ξεπέρασε το κατώφλι αντίληψης ( $OAV > 1,5$  και στα δύο δείγματα οίνων που αναλύθηκαν). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες πάνω στην ποικιλία όπου αναφέρθηκε επίσης η παρουσία δεσμευμένων τερπενικών ενώσεων [75, 282].

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.22 (B) με εξαίρεση τις ποικιλίες Μοσχοφίλερο, Φιλέρι, Gewürztraminer, Μοσχάτο Αμβούργου και Ροδίτης όπου στο δεσμευμένο αρωματικό δυναμικό υπερτερούσαν τα τερπένια, οι υπόλοιπες ποικιλίες ήταν πλουσιότερες σε δεσμευμένα βενζολικά παράγωγα (βενζυλική αλκοόλη και β-φαινυλαιθανόλη). Σε όλους τους οίνους, εκτός από το Ασύρτικο, τα επίπεδα της βενζυλικής αλκοόλης στη δεσμευμένη μορφή ( $24-1097 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ήταν πολύ υψηλότερα από εκείνα στην ελεύθερη μορφή (από ίχνη έως  $197 \mu\text{g L}^{-1}$ ) επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα από άλλες ποικιλίες [141, 283, 284].

Οι πιο πλούσιες ποικιλίες σε δεσμευμένα βενζολικά παράγωγα ήταν το Μπατίκι ( $977 \mu\text{g L}^{-1}$ ), το Sauvignon Blanc ( $939 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και η Μονεμβασιά ( $838 \mu\text{g L}^{-1}$ ). ακολουθούμενα από το Gewürztraminer ( $775 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Τέλος σημαντικό είναι ότι στο δεσμευμένο κλάσμα σε αρκετές ποικιλίες βρέθηκαν αρκετά υψηλά επίπεδα νορισοπρενοειδών ενώσεων. Συγκεντρώσεις δεσμευμένης β-ιονόνης (που ξεπερνούν το κατώφλι αντίληψης και κυμάνθηκαν μεταξύ  $3,0$  και  $6,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) μετρήθηκαν στις ποικιλίες Gewürztraminer, Μαλαγουζιά, Σκιαδόπουλο, Ροδίτης, Σαββατιανό, Μοσχάτο Αμβούργου και Μοσχοφίλερο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν: α) μία μεθοδολογία SPE-GC/MS και β) μία μεθοδολογία SPME-GC/MS, για τον προσδιορισμό 21 ελεύθερων και δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών σε οίνους. Σύμφωνα με την ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (που παρουσιάζεται στο θεωρητικό μέρος της διατριβής), οι συγκεκριμένες μέθοδοι είναι οι πρώτες στις οποίες εφαρμόζεται πλήρης πρωτόκολλο επικύρωσης για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων. Οι δύο μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε δείγματα λευκών μονοποικιλιακών οίνων από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες αμπέλου *Vitis vinifera*, οι οινοποιήσεις των οποίων έλαβαν χώρα, υπό καθορισμένες συνθήκες, σε πειραματικό οινοποιείο.

A) Από τα αποτελέσματα που αφορούν την ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή της μεθοδολογίας SPE-GC/MS, μπορούν να εξαχθούν συνολικά τα κάτωθι συμπεράσματα:

- ✓ Από τη συγκριτική μελέτη μεταξύ επτά εμπορικά διαθέσιμων SPE μικροστηλών από διάφορα πολυμερή και πυριτικά πληρωτικά υλικά, αποδείχτηκε ότι η μικροστήλη Isolute ENV+ έχει την καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα, με κριτήριο την ανάκτηση σήματος τόσο των ελεύθερων όσο και των δεσμευμένων αρωματικών συστατικών από υπόστρωμα οίνου.
- ✓ Ανεξάρτητα από το πληρωτικό υλικό της στήλης, οι αναλύτες νεράλη και γερανιάλη (και σε μικρότερο βαθμό η βανιλίνη) όταν υφίστατο κατεργασία SPE, εμφάνιζαν υψηλότερο αναλυτικό σήμα από το σήμα που έδιναν οι ίδιες ενώσεις σε διαλύτη. Μετά από μία σειρά δοκιμών σε στήλη C18, αποδείχθηκε ότι το φαινόμενο είναι ανεξάρτητο από το μητρικό υπόστρωμα. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα, ότι ειδικά για αυτές τις ενώσεις, η βαθμονόμηση είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται με πρότυπα τα οποία έχουν υποβληθεί σε κατεργασία SPE.

- ✓ Από την αξιολόγηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της μεθοδολογίας SPE-GC/MS, που αφορούσαν την ειδικότητα, γραμμικότητα, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, ανάκτηση, αναπαραγωγιμότητα, επαναληψιμότητα και αβεβαιότητα της μεθόδου, διαπιστώθηκε ότι το προτεινόμενο πρωτόκολλο γενικά πληρεί τις προϋποθέσεις για τον προσδιορισμό των 21 ελεύθερων πρωτογενών αρωματικών σε οίνους.
- ✓ Η μεθοδολογία SPE-GC/MS εφαρμόστηκε επιτυχώς για την αξιολόγηση του αρωματικού προφίλ 20 δειγμάτων λευκών οίνων από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες οινάαμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα και συνεπώς μπορεί να εφαρμοσθεί για την αξιολόγηση και άλλων ποικιλιών.

B) Από τα αποτελέσματα που αφορούν την ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή της SPME-GC/MS μεθοδολογίας, μπορούν να εξαχθούν συνολικά τα κάτωθι συμπεράσματα:

- ✓ Από τη συγκριτική μελέτη που έγινε μεταξύ πέντε διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων ειδών ινών SPME, με δύο τρόπους δειγματοληψίας (υπερκεείμενου χώρου και εμβάπτισης στο δείγμα), διαπιστώθηκε ότι η ίνα PDMS/DVB με δειγματοληψία από την υγρή φάση του δείγματος είναι η καταλληλότερη τεχνική για αυτού του είδους τους προσδιορισμούς, καθώς με το συγκεκριμένο συνδυασμό εξασφαλίζεται ικανοποιητικότερη εκχύλιση των αναλυτών και αυξημένη αναπαραγωγιμότητα.
- ✓ Με εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού Plackett & Burmann αξιολογήθηκε η στατιστική σημαντικότητα των κυριότερων παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση. Οι σημαντικότερες παράμετροι είναι κατά φθίνουσα σειρά: η συγκέντρωση του προστιθέμενου άλατος, ο αλκοολικός βαθμός του δείγματος, ο χρόνος εκχύλισης, το pH, και η θερμοκρασία της εκχύλισης.
- ✓ Για την βελτιστοποίηση των παραπάνω παραμέτρων εφαρμόστηκε πολυπαραμετρική βελτιστοποίηση με τη μέθοδο Simplex.
- ✓ Από την αξιολόγηση της βελτιστοποιημένης μεθοδολογίας SPME-GC/MS, ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αφορούσαν την ειδικότητα, τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, την ανάκτηση, την αναπαραγωγιμότητα, την επαναληψιμότητα και την

αβεβαιότητα, διαπιστώθηκε ότι το προτεινόμενο πρωτόκολλο γενικά πληρεί τις προϋποθέσεις για τον προσδιορισμό των 21 ελεύθερων προσδιοριζόμενων ενώσεων σε οίνους.

- ✓ Η μέθοδος επιδεικνύει ανθεκτικότητα σε μικρομεταβολές έξι πειραματικών παραμέτρων, ωστόσο, η παλαιότητα της ίνας μπορεί να επηρεάσει τα αναλυτικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητο κατά την εφαρμογή της μεθόδου για την ανάλυση μιας σειράς δειγμάτων οίνων να ελέγχεται σε περιοδική βάση η σταθερή απόδοση της ίνας.
- ✓ Η βελτιστοποιημένη μέθοδος SPME-GC/MS, σε συνδυασμό με κατεργασία SPE, εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των δεσμευμένων αρωματικών συστατικών μετά σπό ενζυμική υδρόλυση των τελευταίων.
- ✓ Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση του αρωματικού προφίλ 20 δειγμάτων λευκών οίνων από ελληνικές και διεθνείς οινοποιήσιμες ποικιλίες αμπέλου, που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, και συνεπώς μπορεί να εφαρμοσθεί περαιτέρω για την αξιολόγηση και άλλων ποικιλιών.

Γ) Από τη σύγκριση των αναλυτικών αποτελεσμάτων με τις δύο μεθόδους βρέθηκε αρκετά ικανοποιητική συσχέτιση τόσο για τα συνολικά ελεύθερα όσο και για τα συνολικά δεσμευμένα αρωματικά συστατικά. Την καλύτερη συσχέτιση παρουσίασαν τα αποτελέσματα που αφορούσαν τις ελεύθερες και δεσμευμένες τερπενικές ενώσεις και τις ελεύθερες C<sub>6</sub> αλκοόλες ενώ τη χειρότερη συσχέτιση παρουσίασαν τα αποτελέσματα που αφορούσαν τη δεσμευμένη βενζυλική αλκοόλη. Η σύγκριση των δύο μεθόδων ωστόσο, θα μπορούσε, να αποτελέσει ανεξάρτητο θέμα μελλοντικής μελέτης, όπου με τη σύγχρονη εφαρμογή τους για την ανάλυση κοινών δειγμάτων οίνων, καθώς και χρήση κατάλληλης στατιστικής ανάλυσης θα μπορούσαν να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Δ) Η παρούσα διατριβή έδωσε την ευκαιρία να αξιολογηθεί το αρωματικό προφίλ 11 ελληνικών μονοποικιλιακών οίνων, για τους περισσότερους από τους οποίους δεν υπήρχαν στοιχεία που να αφορούσαν τα ποικιλιακά αρωματικά τους χαρακτηριστικά. Ορισμένες πληροφορίες που συλλέχθηκαν για αυτές τις γηγενείς ποικιλίες αλλά και για τις 4 διεθνείς ποικιλίες που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

- ✓ Οι ποικιλίες Μοσχοφίλερο, Μοσχάτο Αμβούργου, Φιλέρι, και Gewürztraminer διέθεταν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο συνολικό άθροισμα ελεύθερων και δεσμευμένων τερπενίων, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ποικιλίες που μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή.
- ✓ Το Μοσχάτο Αμβούργου, ακολουθούμενο από τη Μαλαγουζιά και το Μοσχοφίλερο, ήταν οι πιο πλούσιες ποικιλίες, από όσες μελετήθηκαν, σε ελεύθερα τερπένια.
- ✓ Το Μοσχοφίλερο, ακολουθούμενο από το Φιλέρι και το Gewürztraminer, ήταν οι πλουσιότερες ποικιλίες, από όσες μελετήθηκαν, σε δεσμευμένα τερπένια.
- ✓ Οι ποικιλίες Μπατίκι, Sauvignon Blanc και Μονεμβασιά, ακολουθούμενες από το Gewürztraminer, ήταν οι πιο πλούσιες σε δεσμευμένα βενζολικά παράγωγα από τις ποικιλίες που μελετήθηκαν.
- ✓ Οι ποικιλίες Θρασαθήρι και Κυδωνίτσα ξεχώρισαν από τις υπόλοιπες ως προς την κατανομή των ελεύθερων C<sub>6</sub> αλκοολών.
- ✓ Ορισμένες, μη αρωματικές, ελληνικές ποικιλίες όπως η Κυδωνίτσα και ο Ροδίτης περιείχαν λιναλοόλη και γερανιόλη στο ελεύθερο και δεσμευμένο κλάσμα, αντίστοιχα, σε συγκεντρώσεις πάνω από το όριο αντίληψης.

Οι πληροφορίες αυτές δίνουν μια πρώτη εικόνα των ιδιαίτερων αρωματικών χαρακτηριστικών της κάθε ποικιλίας που εξετάστηκε. Ωστόσο, για την εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων, θα μπορούσε το αρωματικό προφίλ των συγκεκριμένων ποικιλιών να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής μελέτης, όπου με εφαρμογή των μεθόδων που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή, να γίνει μία σειρά αναλύσεων σε οίνους από σταφύλια παραγόμενα από διαδοχικές χρονιές καλλιέργειας και από διάφορες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας.

Επιπλέον, ενδιαφέρον θα είχε με εφαρμογή των προτεινόμενων μεθόδων να εξεταστεί η επίδραση διαφορετικών τεχνικών οινοποίησης ή στελεχών ζυμών στις συγκεντρώσεις των 21 προσδιοριζόμενων ενώσεων (ελεύθερων και δεσμευμένων) στους παραγόμενους οίνους, όπως και η παρακολούθηση των μεταβολών τους κατά τη διάρκεια της οινοποίησης.



Μια ακόμη πρόταση για μελλοντική έρευνα που θα συντελέσει να αποκτηθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα των αρωματικών χαρακτηριστικών κάθε ποικιλίας, είναι η επέκταση και επικύρωση των πρωτοκόλλων που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή και για την ανάλυση σταφυλιών, γλευκών και φυτικών εκχυλισμάτων. Με τον τρόπο αυτό, σε μια πλήρη σειρά αναλύσεων, θα μπορούσε να ελεγχθούν οι ποσότητες και οι μεταβολές των 21 ελεύθερων και δεσμευμένων αρωματικών συστατικών από το σταφύλι έως και την παλαίωση των οίνων.

Η εφαρμογή των μεθόδων που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή για την ανάλυση οίνων από περισσότερες ποικιλίες μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την κατηγοριοποίηση των ελληνικών ποικιλιών ως προς τον τερπενικό τους χαρακτήρα (μοσχάτες, αρωματικές, ουδέτερες ποικιλίες).

Τέλος, αξίζει να τονισθεί το γεγονός ότι η αξιόπιστη μέτρηση του αρωματικού προφίλ των οίνων μπορεί να συντελέσει στην ταυτοποίησή τους. Πράγματι, καθώς τα πρωτογενή αρωματικά συστατικά στους οίνους είναι αποτέλεσμα δράσεων του ενζυμικού οπλοστασίου του φυτού, είναι χαρακτηριστικά για κάθε ποικιλία και έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αρκετές χημειοταξικές μελέτες. Επομένως, ο προσδιορισμός τους σε ελληνικούς μονοποικιλιακούς οίνους με εφαρμογή επικυρωμένων αναλυτικών διαδικασιών όπως αυτές που προτάθηκαν στην παρούσα διατριβή, θα μπορούσε να βοηθήσει για τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων των αρωματικών συστατικών των διαφόρων ποικιλιών, η οποία θα μπορούσε στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την επαλήθευση της ταυτότητας μονοποικιλιακών οίνων και πιθανόν για τον έλεγχο της νοθείας τους.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

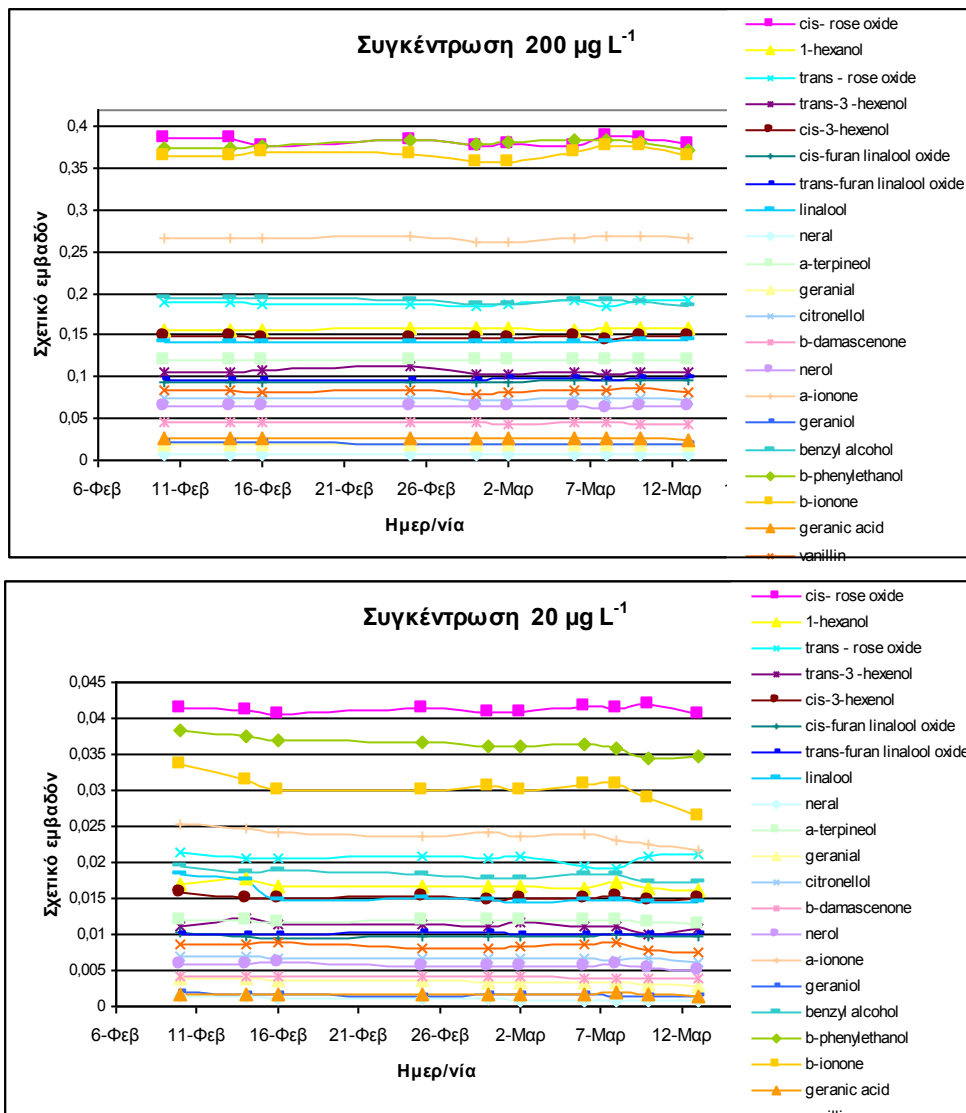
Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Association of Official Analytical Chemists	Ένωση Αναγνωρισμένων Αναλυτικών Χημικών
Cartridge	Μικροστήλη
Experimental design	Πειραματικός σχεδιασμός
Gas Chromatography / Mass Spectrometry	Αέρια Χρωματογραφία / Φασματομετρία Μαζών
Odour Threshold	Κατώφλι οσφρητικής αντίληψης
Single Ion Monitoring	Παρακολούθηση ενός ιόντος
Solid Phase Extraction	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης
Solid Phase Microextraction	Μικροεκχύλιση Στεράς Φάσης
Sorbent	Πληρωτικό υλικό

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

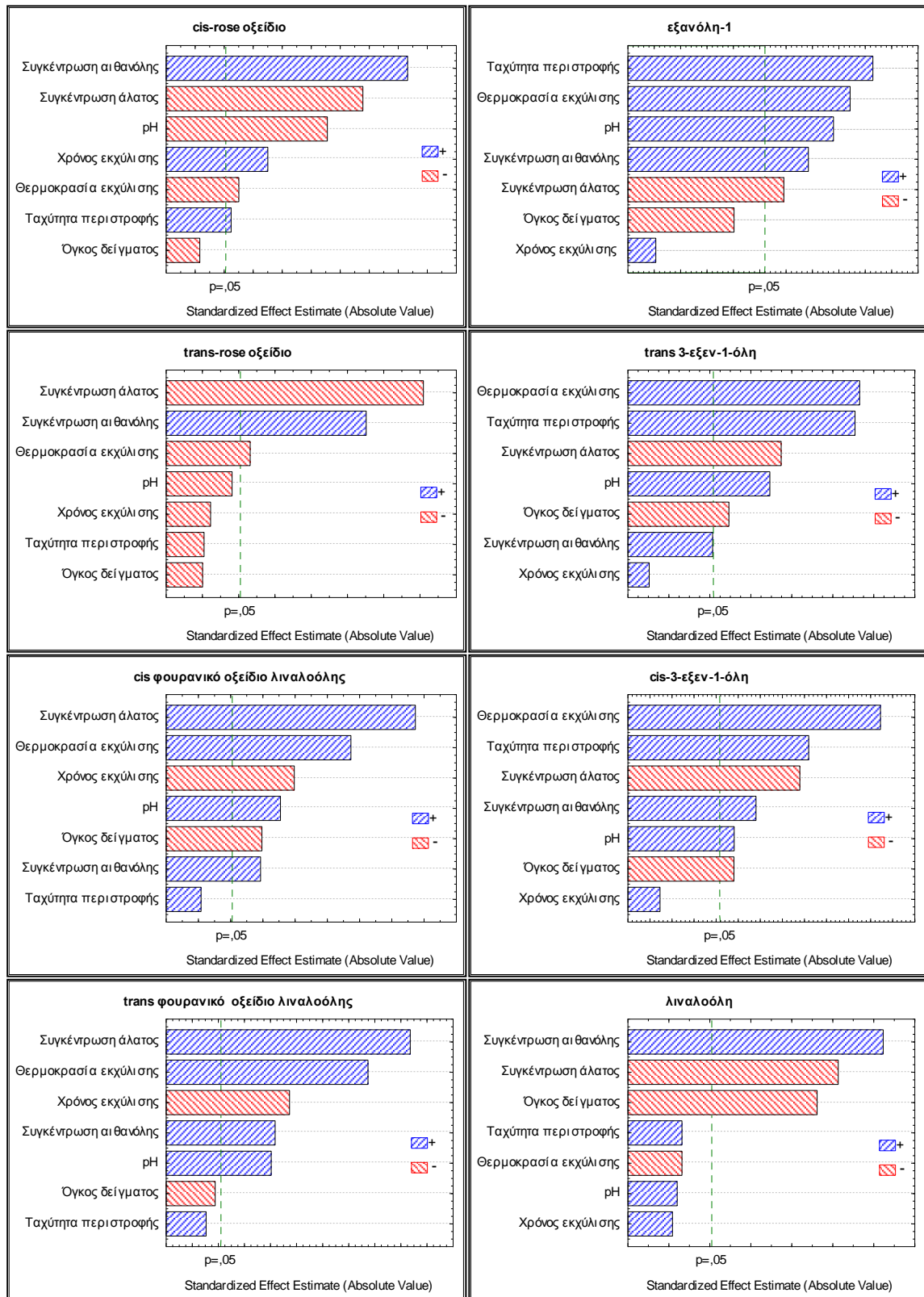
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ADH	Alcohol Dehydrogonase
C <sub>13</sub>	Ενώσεις με 13 άτομα άνθρακα
C <sub>6</sub>	Ενώσεις με 6 άτομα άνθρακα
CAR	Carboxen
DI	Direct Immersion
DVB	Divinylbenzene
EtOH	Αιθανόλη
GC/MS	Gas Chromatography / Mass Spectrometry
HPL	Hyperoxide Lyase
HS	Headspace
IEC	International Electrotechnical Commission
ISO	International Organization for Standardization
LLE	Liquid Liquid Extraction
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LOX	Lypoxygenase
MEP	2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate
MHS	Multiple HeadSpace
MT	Μονοτερπένια
MVA	Mevalonate
OAV	Odour Activity Value
PA	Polyacrylate
PDMS	Polydimethylsiloxane
RSD	Relative Standard Deviation
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SIM	Single Ion Monitoring
SPDE	Solid Phase Dispersion Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction

ΕΘΙΑΓΕ	Εθνικό Ίδρυμα αγροτικής Έρευνας
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΕΛΓΟ	Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός

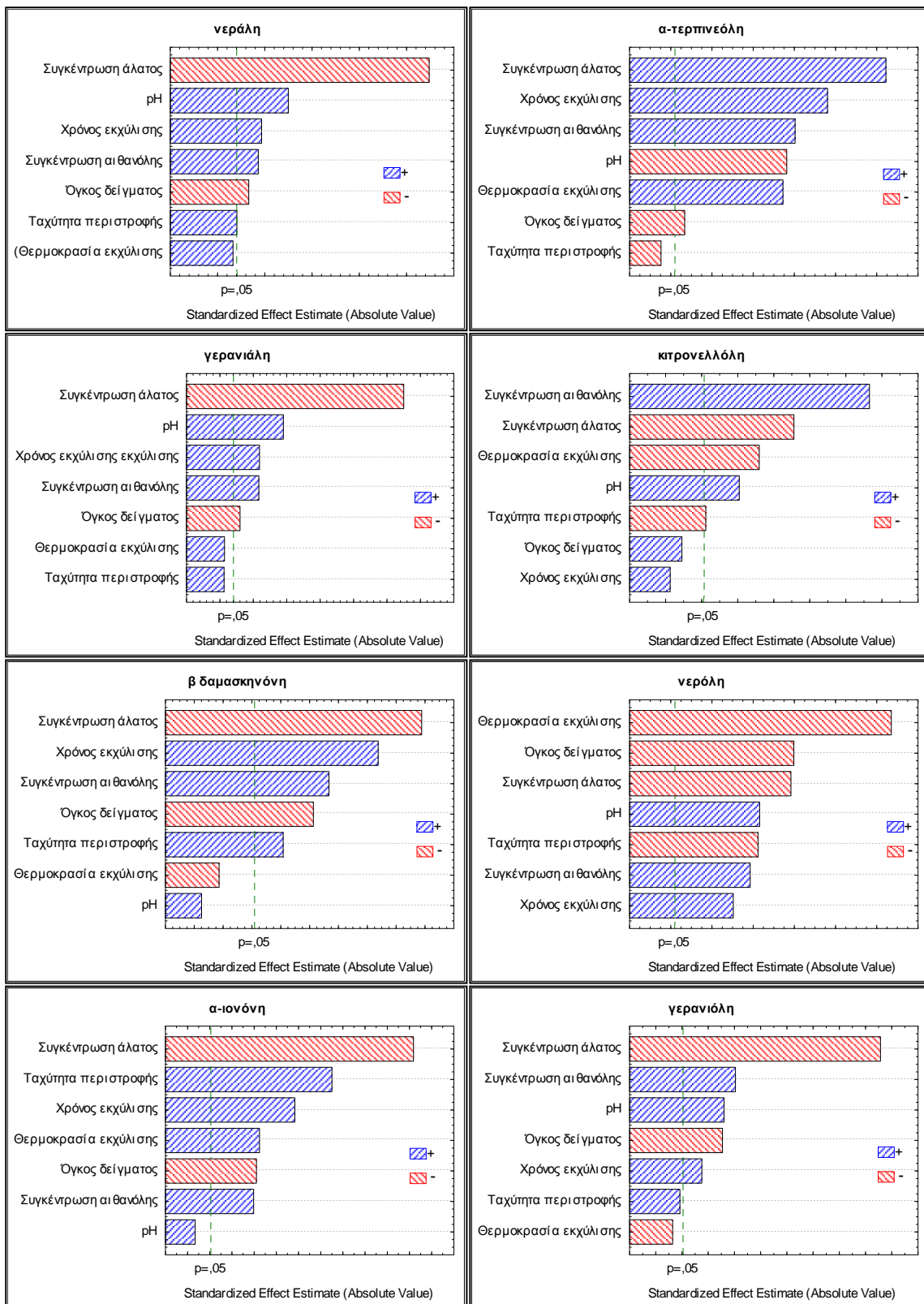
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



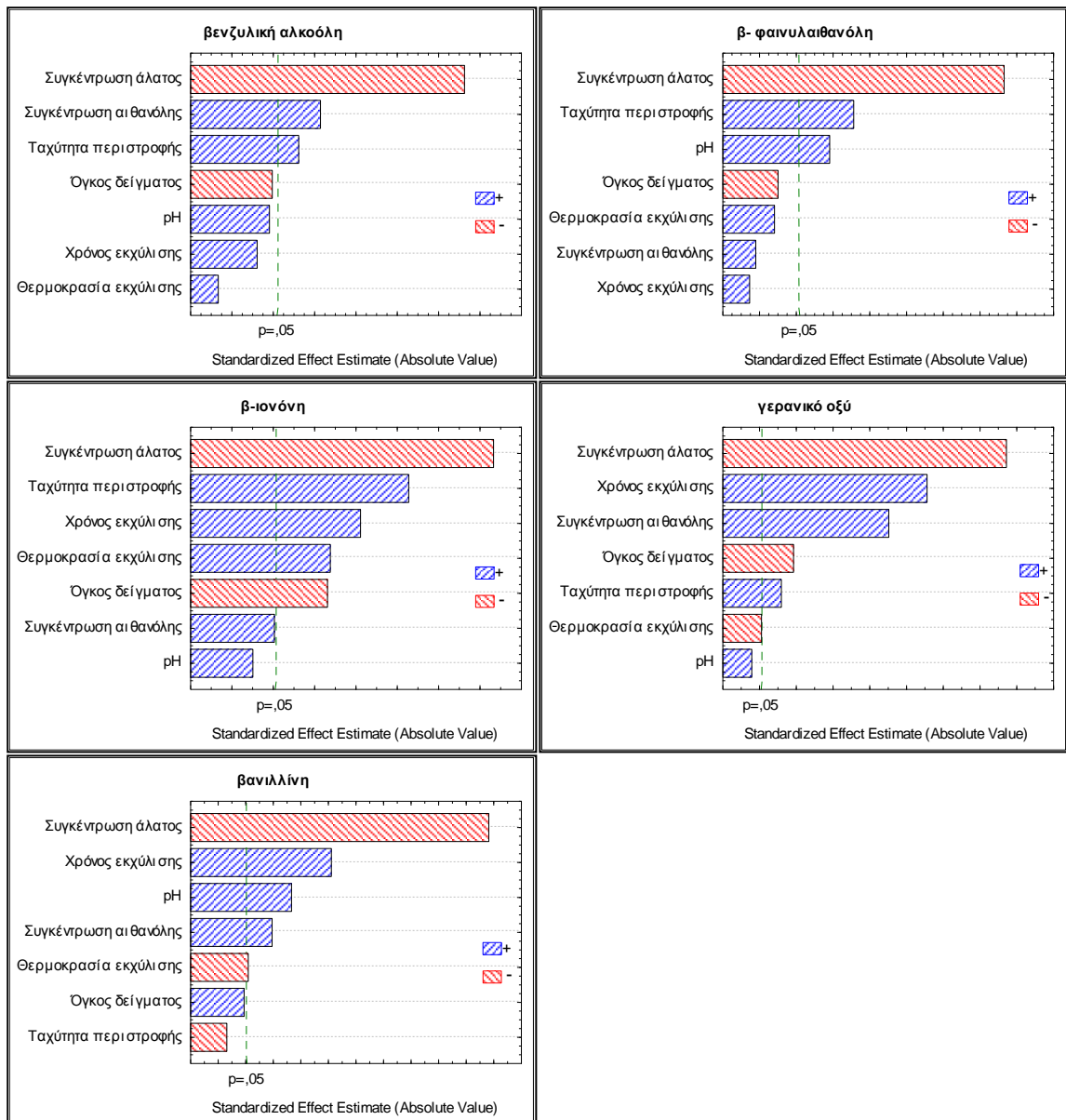
Σχήμα Π1: Σταθερότητα προτύπων σε διάστημα 8 εβδομάδων με βάση το σχετικό εμβαδόν των αναλυτών



Σχήμα Π2: Κανονικοποιημένα διαγράμματα Pareto, των πειραμάτων διαλογής σημαντικών παραμέτρων, με βάση το σχετικό εμβαδόν των αναλυτών

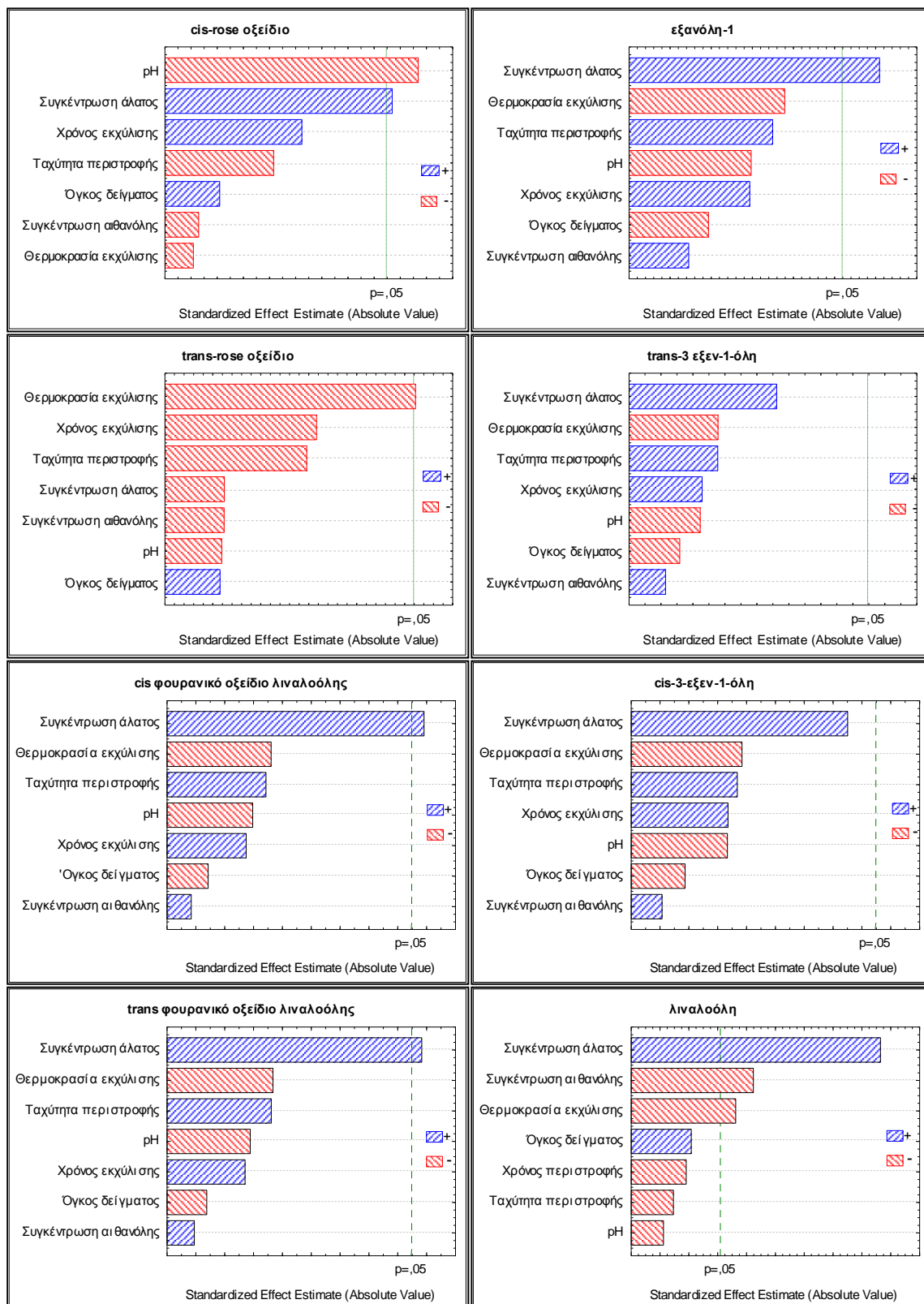


Σχήμα Π2: (συνέχεια)

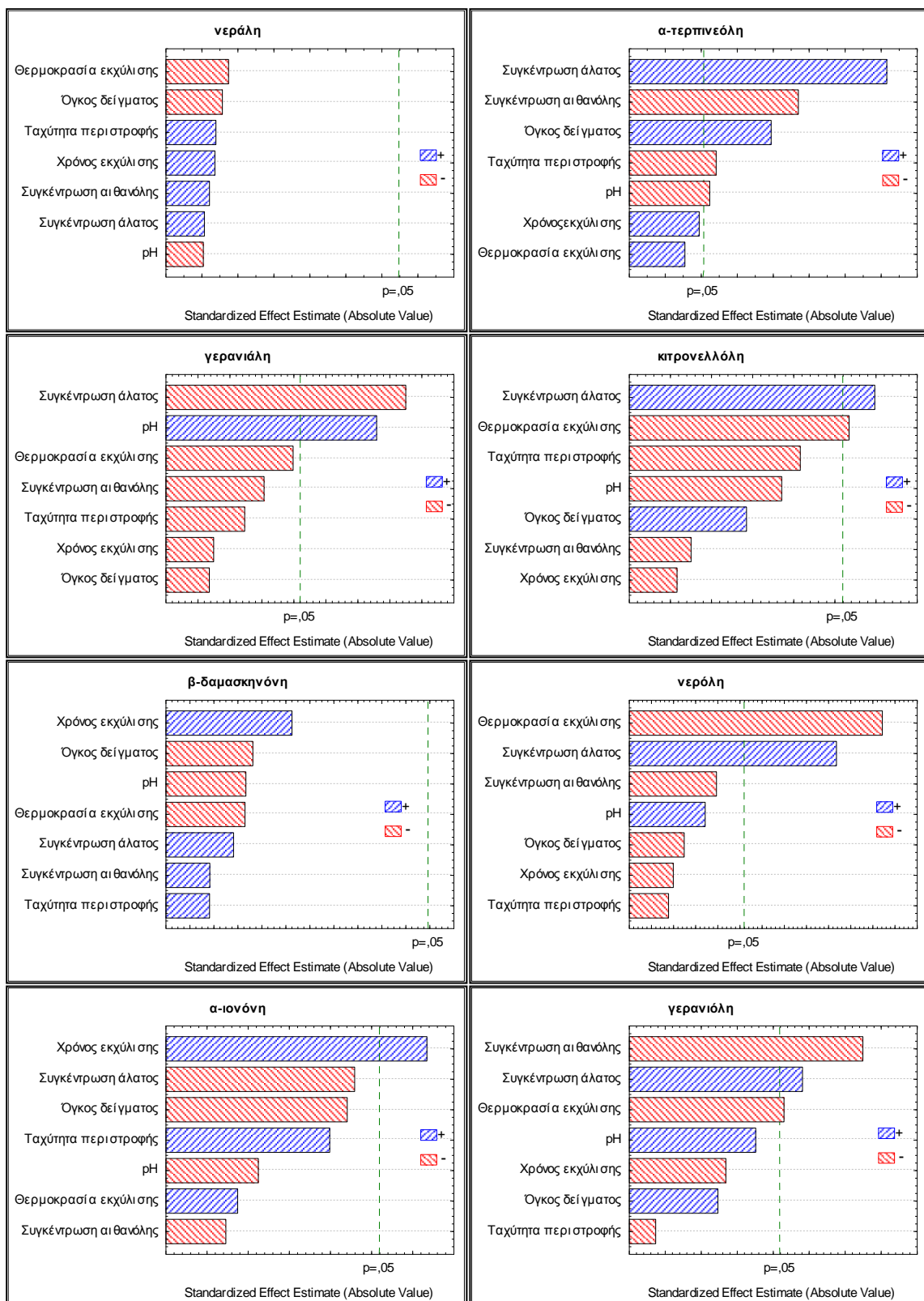


Σχήμα Π2: (συνέχεια)

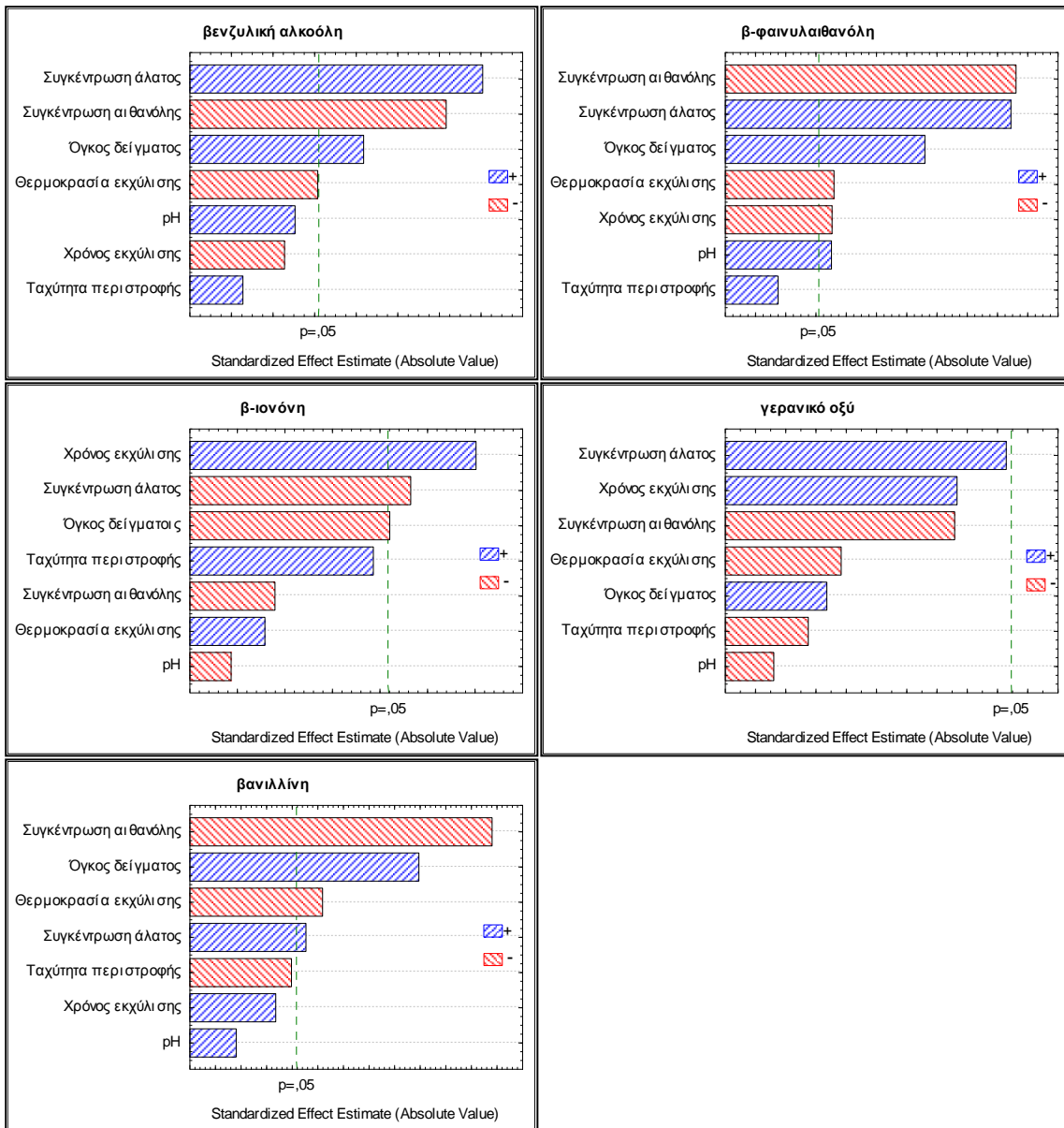




Σχήμα Π3: Κανονικοποιημένα διαγράμματα Pareto, των πειραμάτων διαλογής σημαντικών παραμέτρων, με βάση το εμβαδόν των αναλυτών



Σχήμα Π3: (συνέχεια)



Σχήμα Π3: (συνέχεια)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

**Πίνακας Π1: Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των 21 ελεύθερων και δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών, σε 20 δείγματα λευκών οίνων, από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες οινάμπλου, με τη μέθοδο SPE-GC/MS. Για τα ελεύθερα συστατικά η αβεβαιότητα εκφράζεται ως διευρυμένη αβεβαιότητα  $U_{exp}$ , ενώ για τα δεσμευμένα συστατικά η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση SD, από 3 προσδιορισμούς**

Αναλύτης	Gewürztraminer 1		Gewürztraminer 2		Sauvignon Blanc 1		Sauvignon Blanc 2	
	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	5,3 ± 1,4	< LOD	9,7 ± 2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
νεράλη	< LOD	30 ± 2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	6,9 ± 1,3	< LOD	3,9 ± 1,6	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	27 ± 1	42 ± 1	14 ± 3	12 ± 1	< LOD	< LOD	3,0 ± 0,6	< LOD
νερόλη	9,0 ± 0,9	188 ± 7	< LOD	121 ± 11	Ίχνη	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιόλη	31 ± 3	1109 ± 78	42 ± 5	848 ± 59	< LOD	59 ± 3	< LOD	40 ± 2
γερανικό οξύ	< LOD	190 ± 7	< LOD	88 ± 3	< LOD	12 <sup>a</sup> ± 2	< LOD	< LOD
εξανόλη-1	716 ± 46	92 <sup>a</sup> ± 6	476 ± 30	48 <sup>a</sup> ± 3	545 ± 35	119 ± 9	683 ± 44	47 <sup>a</sup> ± 2
trans-3-εξεν-1-όλη	8,7 ± 1,5	< LOD	50 ± 11	< LOD	60 ± 3	< LOD	99 ± 10	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	6,1 ± 1,2	1,1 ± 0,2	< LOD	< LOD	11 ± 2	16 ± 0,2	6,7 ± 1,3	4,9 ± 0,5
β-δαμασκηνόνη	1,2 ± 0,2	< LOD	1,3 ± 0,2	< LOD	1,7 ± 0,2	< LOD	3,7 ± 0,5	< LOD
α-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	36 ± 7	272 ± 10	22 ± 5	270 ± 9	31 ± 1	375 ± 21	60 ± 12	461 ± 25
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	220 ± 20	>10000	271 ± 19	>10000	212 ± 11	>10000	128 ± 6
βανιλίνη	13 <sup>a</sup> ± 1	< LOD	121 ± 17	< LOD	60 ± 16	< LOD	202 ± 49	< LOD
Αναλύτης	Σαββατιανό		Μοσχάτο Αμβούργου		Μοσχοφίλερο1		Μοσχοφίλερο 2	
	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	31 ± 6	22 ± 2	Ίχνη	< LOD	2,9 ± 0,6	< LOD
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	21 ± 3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	645 ± 75	76 ± 3	36 ± 4	< LOD	43 ± 5	< LOD
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	35 ± 3	< LOD	14 ± 3
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	65 ± 4	11 ± 2	20 ± 6	< LOD	27 ± 8	< LOD
γερανιάλη	< LOD	< LOD	46 ± 9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	4,2 ± 0,9	< LOD	38 ± 2	14 ± 2	36 ± 2	25 ± 1	37 ± 2	13 ± 1
νερόλη	< LOD	< LOD	16 ± 4	161 ± 6	9,1 ± 0,9	260 ± 10	< LOD	277 ± 10
γερανιόλη	< LOD	17 ± 2	57 ± 6	413 ± 20	35 ± 4	1494 ± 105	33 ± 3	1626 ± 114
γερανικό οξύ	< LOD	22 ± 3	179 ± 14	669 ± 32	88 ± 6	344 ± 10	60 ± 24	301 ± 11
εξανόλη-1	1025 ± 10	64 <sup>a</sup> ± 4	352 ± 13	48 <sup>a</sup> ± 5	621 ± 40	87 ± 7	638 ± 41	85 ± 7
trans-3-εξεν-1-όλη	29 ± 2	< LOD	6,9 ± 1,2	< LOD	24 ± 3	< LOD	21 ± 3	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	3,5 ± 0,4	< LOD	16 ± 1	7,1 ± 0,7	241 ± 17	21 ± 1	129 ± 6	19 ± 1
β-δαμασκηνόνη	< LOD	< LOD	3,9 ± 0,5	< LOD	2,4 ± 0,3	< LOD	< LOD	< LOD
α-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	14 ± 1	264 ± 17	76 ± 3	297 ± 10	6,2 ± 0,3	284 ± 10	12 ± 1	215 ± 7
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	286 ± 18	>10000	361 ± 20	>10000	334 ± 5	>10000	317 ± 10
βανιλίνη	41 ± 1	Ίχνη	173 ± 42	Ίχνη	73 ± 3	Ίχνη	< LOD	< LOD
Αναλύτης	Θραψαθήρι		Μαλαγουζιά 1		Μαλαγουζιά 2		Μαλαγουζιά 3	
	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ξλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	2,5 ± 0,2	< LOD	1,9 ± 0,1	< LOD	2,9 ± 0,2
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	114 ± 8	55 ± 3	91 ± 7	44 ± 2	113 ± 8	45 ± 2
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	27 ± 5	< LOD	36 ± 6	< LOD	19 ± 3	< LOD
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

**Πίνακας Π1: (συνέχεια)**

Αναλύτης	Θραψαθήρι		Μαλαγουζιά 1		Μαλαγουζιά 2		Μαλαγουζιά 3	
	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )
κιτρονελλόλη	< LOD	< LOD	7,8 ± 1,6	< LOD	7,9 ± 1,7	< LOD	8,8 ± 1,9	< LOD
νερόλη	10 ± 1	< LOD	< LOD	23 ± 1	7,1 ± 0,7	23 ± 1	ΐχνη	30 ± 2
γερανιόλη	< LOD	23 ± 1	34 ± 2	118 ± 10	24 ± 2	96 ± 8	38 ± 4	144 ± 12
γερανικό οξύ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
εξανόλη-1	256 ± 9	64 <sup>a</sup> ± 6	829 ± 31	90 ± 7	615 ± 39	82 ± 6	256 ± 9	125 ± 10
trans-3-εξεν-1-όλη	37 ± 8	< LOD	11 ± 2	< LOD	22 ± 3	< LOD	< LOD	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	472 ± 26	49 ± 1	73 ± 3	41 ± 1	73 ± 6	16 ± 1	76 ± 3	36 ± 1
β-δαμασκηνόνη	< LOD	< LOD	1,3 ± 0,2	< LOD	2,2 ± 0,3	< LOD	6,4 ± 0,8	< LOD
α-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	13 ± 1	293 ± 10	30 ± 1	263 ± 9	25 ± 1	264 ± 9	72 ± 3	489 ± 27
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	391 ± 14	>10000	376 ± 13	>> 1000	289 ± 12	>> 1000	814 ± 33
βανιλίνη	138 ± 20	< LOD	ΐχνη	< LOD	82 ± 2	ΐχνη	< LOD	ΐχνη
Αναλύτης	Ασύρτικο		Κυδωνίτσα		Σκιαδόπουλο		Φιλέρι	
	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	32 ± 4	3,6 ± 0,5	< LOD	< LOD	9,4 ± 2,4	< LOD
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	39 ± 3
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	16 ± 3	< LOD	ΐχνη	< LOD	3,7 ± 0,7	< LOD
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	18 ± 4
κιτρονελλόλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	11 ± 2	11 ± 1
νερόλη	< LOD	< LOD	12 ± 1	ΐχνη	< LOD	< LOD	14 ± 1	203 ± 7
γερανιόλη	13 ± 3	27 ± 1	14 ± 4	12 ± 2	< LOD	ΐχνη	39 ± 4	1541 ± 108
γερανικό οξύ	< LOD	11 ± 2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	39 ± 16	344 ± 13
εξανόλη-1	612 ± 39	160 ± 10	380 ± 24	41 <sup>a</sup> ± 4	570 ± 36	43 <sup>a</sup> ± 3	560 ± 36	63 <sup>a</sup> ± 4
trans-3-εξεν-1-όλη	86 ± 9	7,0 ± 0,6	100 ± 10	< LOD	68 ± 15	< LOD	7,5 ± 1,3	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	9,5 ± 1,8	12 ± 1	400 ± 22	24 ± 1	< LOD	< LOD	35 ± 2	6,6 ± 0,7
β-δαμασκηνόνη	ΐχνη	< LOD	< LOD	< LOD	ΐχνη	< LOD	< LOD	< LOD
α-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	41 ± 1	319 ± 11	21 ± 1	234 ± 8	11 ± 1	199 ± 6	26 ± 1	273 ± 9
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	221 ± 17	>10000	261 ± 19	>10000	>10000	>10000	270 ± 19
βανιλίνη	ΐχνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Αναλύτης	Chardonnay		Ροδίτης		Μονεμβασιά		Μπατίκι	
	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )	Έλευθ ± U <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	Δεσμ ± SD (μg L <sup>-1</sup> )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	9,3 ± 2,4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
νεράλη	< LOD	< LOD	76 ± 14	14 ± 3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	8,0 ± 1,6	< LOD	ΐχνη	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	2,2 ± 0,5	< LOD	6,3 ± 1,3	2,2 ± 0,5	6,0 ± 1,3	< LOD	3,9 ± 0,8	< LOD
νερόλη	ΐχνη	< LOD	< LOD	83 ± 16	< LOD	ΐχνη	< LOD	< LOD
γερανιόλη	23 ± 2	ΐχνη	15 ± 1	667 ± 61	16 ± 2	26 ± 1	17 ± 2	14 ± 2
γερανικό οξύ	< LOD	< LOD	< LOD	120 ± 8	< LOD	< LOD	< LOD	10 ± 1
εξανόλη-1	653 ± 42	50 <sup>a</sup> ± 5	527 ± 34	56 <sup>a</sup> ± 2	561 ± 36	63 <sup>a</sup> ± 3	600 ± 38	70 ± 3
trans-3-εξεν-1-όλη	60 ± 13	< LOD	55 ± 2	< LOD	11 ± 2	< LOD	6,6 ± 1,1	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	9,8 ± 1,9	< LOD	10 ± 3	4,5 ± 0,9	74 ± 3	11 ± 1	119 ± 5	14 ± 1
β-δαμασκηνόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,6 ± 0,3	< LOD	ΐχνη	< LOD
α-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	8,1 ± 0,4	401 ± 22	20 ± 1	226 ± 15	13 ± 1	331 ± 11	9,9 ± 0,5	351 ± 20
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	215 ± 19	>10000	206 ± 10	>10000	548 ± 21	>10000	309 ± 14
βανιλίνη	ΐχνη	< LOD	34 ± 9	< LOD	102 ± 15	ΐχνη	35 ± 9	< LOD

<sup>a</sup> Τα αποτελέσματα υπολογίσθηκαν με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης σε διαλύτη.

< LOD σημαίνει ότι η συγκέντρωση ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

ΐχνη σημαίνει ότι η συγκέντρωση ήταν κάτω από το όριο προσδιορισμού αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης

**Πίνακας Π2: Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των 21 ελεύθερων και δεσμευμένων πρωτογενών αρωματικών συστατικών, σε 20 δείγματα λευκών οίνων, από ελληνικές και διεθνείς ποικιλίες οιναμπέλου, με τη μέθοδο SPME-GC/MS. Για τα ελεύθερα συστατικά η αβεβαιότητα εκφράζεται ως διευρυμένη αβεβαιότητα  $U_{exp}$ , ενώ για τα δεσμευμένα συστατικά η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση SD, από 3 προσδιορισμούς.**

Αναλύτης	Gewürztraminer 1		Gewürztraminer 2		Sauvignon Blanc 1		Sauvignon Blanc 2	
	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξείδιο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξείδιο	< LOD	Ίχνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξείδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξείδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	19 ± 3	43 ± 6	23 ± 4	37 ± 5	6,4 ± 2,4	Ίχνη	6,5 ± 2,5	Ίχνη
νεράλη	< LOD	14 ± 1	< LOD	14 ± 5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	Ίχνη	23 ± 2	3,6 ± 1,5	11 ± 4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιάλη	< LOD	2,3 ± 0,6	< LOD	Ίχνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	27 ± 3	44 ± 7	16 ± 2	22 ± 2	7,8 ± 1,1	Ίχνη	7,9 ± 1,1	Ίχνη
νερόλη	< LOD	319 ± 22	< LOD	216 ± 46	6,3	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιόλη	28 ± 4	1415 ± 596	28 ± 9	1322 ± 556	< LOD	55 ± 13	< LOD	45 ± 19
γερανικό οξύ	14 ± 5	109 ± 17	14 ± 5	104 ± 16	< LOD	6,1 ± 2,2	< LOD	4,4 ± 1,6
εξανόλη-1	968 ± 536	91	866 ± 419	70	642 ± 82	102	658 ± 71	68
trans-3-εξεν-1-όλη	34 ± 5	< LOD	87 ± 12	< LOD	72 ± 10	< LOD	156 ± 22	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	10 ± 5	17 ± 4	11 ± 5	14 ± 7	25 ± 6	25 ± 6	24 ± 5	18 ± 4
β-δαμασκηνόνη	6,6 ± 0,7	< LOD	5,9 ± 0,6	< LOD	6,7 ± 0,7	< LOD	6,6 ± 0,7	< LOD
α-ιονόνη	Ίχνη	< LOD	Ίχνη	< LOD	Ίχνη	Ίχνη	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1
β-ιονόνη	< LOD	6,0 ± 1,5	< LOD	3,0 ± 0,8	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	53 ± 21	438 ± 161	45 ± 17	575 ± 211	57 ± 22	405 ± 149	161 ± 11	1098 ± 406
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	306	>10000	232	>10000	168	>10000	209
βανιλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Αναλύτης	Σαββατιανό		Μοσχάτο Αμβούργου		Μοσχοφίλερο1		Μοσχοφίλερο 2	
	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξείδιο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξείδιο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξείδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	25 ± 2	26 ± 2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξείδ. λιναλ	< LOD	< LOD	19 ± 5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	815 ± 266	122 ± 8	64 ± 9	64 ± 9	68 ± 9	83 ± 6
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	6,8 ± 2,6	< LOD	6,4 ± 2,4
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	207 ± 17	62 ± 16	37 ± 10	27 ± 5	38 ± 10	39 ± 10
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	10 ± 1	< LOD	38 ± 6	22 ± 2	42 ± 6	31 ± 5	37 ± 6	20 ± 2
νερόλη	< LOD	< LOD	21 ± 5	158 ± 34	< LOD	393 ± 28	< LOD	347 ± 24
γερανιόλη	6,1 ± 0,7	Ίχνη	136 ± 12	405 ± 54	47 ± 11	1849 ± 778	35 ± 8	1665 ± 701
γερανικό οξύ	Ίχνη	Ίχνη	130 ± 20	311 ± 42	48 ± 10	183 ± 29	34 ± 7	156 ± 24
εξανόλη-1	1207 ± 669	25	348 ± 44	34	681 ± 87	60	753 ± 96	58
trans-3-εξεν-1-όλη	38 ± 5	< LOD	15 ± 3	< LOD	31 ± 5	< LOD	30	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	13 ± 6	< LOD	29 ± 7	14 ± 7	246 ± 17	25 ± 6	160 ± 11	23 ± 5
β-δαμασκηνόνη	5,8 ± 0,6	3,2 ±	10 ± 1	Ίχνη	7,2 ± 0,7	< LOD	6,0 ± 0,6	< LOD
α-ιονόνη	1,9 ± 0,1	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	< LOD	Ίχνη	Ίχνη
β-ιονόνη	8,6 ± 1,8	6,1 ± 1,3	< LOD	3,1 ± 1,0	< LOD	3,0 ± 0,7	< LOD	3,1 ± 0,8
βενζυλική αλκοόλη	Ίχνη	126 ± 9	131 ± 9	235 ± 41	Ίχνη	212 ± 37	Ίχνη	179 ± 12
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	156	>100000	160	>10000	243	>10000	213
βανιλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Αναλύτης	Θραψαθήρι		Μαλαγουζιά 1		Μαλαγουζιά 2		Μαλαγουζιά 3	
	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξείδιο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξείδιο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξείδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξείδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	Ίχνη	< LOD	171 ± 12	65 ± 9	106 ± 7	40 ± 5	158 ± 11	52 ± 7
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	Ίχνη	< LOD	Ίχνη	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	81 ± 7	15 ± 6	41 ± 11	7,0 ± 3,0	45 ± 11	13 ± 6
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	< LOD	Ίχνη	15 ± 2	Ίχνη	12 ± 2	Ίχνη	13 ± 2	Ίχνη
νερόλη	< LOD	< LOD	< LOD	13 ± 2	< LOD	12 ± 2	< LOD	Ίχνη
γερανιόλη	19 ± 3	13 ± 1,6	28 ± 9	106 ± 10	21 ± 7	80 ± 7	22 ± 7	78 ± 7
γερανικό οξύ	< LOD	4,1 ± 1,5	< LOD	7,0 ± 2,5	< LOD	6,4 ± 2,3	< LOD	5,6 ± 2,0
εξανόλη-1	352 ± 45	33	1464 ± 811	91	1141 ± 362	82	484 ± 62	61
trans-3-εξεν-1-όλη	74 ± 10	< LOD	28 ± 5	< LOD	55 ± 11	< LOD	< LOD	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	715 ± 61	35 ± 8,3	138 ± 10	60 ± 14	148 ± 10	26 ± 6	171 ± 12	31 ± 7
β-δαμασκηνόνη	5,1 ± 0,5	< LOD	7,0 ± 0,7	< LOD	6,8 ± 0,7	< LOD	8,3 ± 0,8	Ίχνη

**Πίνακας Π2: (συνέχεια)**

Αναλύτης	Θραψαθήρι		Μαλαγουζιά 1		Μαλαγουζιά 2		Μαλαγουζιά 3	
	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
α-ιονόνη	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	< LOD	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	4,5 ± 0,0	< LOD	< LOD	6,0 ± 1,0	3,5 ± 0,5	3,0 ± 0,4
βενζυλική αλκοόλη	Ίχνη	113 ± 7,8	60 ± 23	227 ± 39	24 ± 4	281 ± 103	197 ± 14	211 ± 14
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	236	>10000	402	>10000	289	67999	724
βανιλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Αναλύτης	Ασύρτικο		Κυδωνίτσα		Σκιαδόπουλο		Φιλέρι	
	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	41 ± 5	8,4 ± 3,2	Ίχνη	< LOD	33 ± 5	67 ± 9
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	13 ± 5	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	7 ± 3	< LOD	< LOD	< LOD	4,1 ± 1,8	24 ± 5
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	6,9 ± 0,9	< LOD	6,2 ± 0,8	< LOD	7,3 ± 1,0	Ίχνη	25 ± 3	17 ± 2
νερόλη	< LOD	< LOD	Ίχνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	193 ± 23
γερανιόλη	Ίχνη	< LOD	9,1 ± 1,1	9,4 ± 1,1	7,8 ± 0,9	19 ± 6	38 ± 9	1519 ± 640
γερανικό οξύ	< LOD	Ίχνη	< LOD	< LOD	< LOD	7,7 ± 2,7	27 ± 3	146 ± 23
εξανόλη-1	1228 ± 680	49	660 ± 365	37	665 ± 85	23	560 ± 71	29
trans-3-εξεν-1-όλη	159 ± 22	< LOD	183 ± 26	< LOD	75 ± 10	< LOD	17 ± 4	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	31 ± 7	< LOD	688 ± 117	34 ± 8	13 ± 6	< LOD	42 ± 10	13 ± 6
β-δαμασκηνόνη	5,9 ± 0,6	< LOD	4,5 ± 0,5	< LOD	6,9 ± 0,7	Ίχνη	7,5 ± 0,8	Ίχνη
α-ιονόνη	1,4 ± 0,1	Ίχνη	Ίχνη	< LOD	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	9,9 ± 2,5	6,1 ± 2,0	4,1 ± 1,2	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	106 ± 7	71 ± 12	Ίχνη	189 ± 33	Ίχνη	128 ± 9	30 ± 5	160 ± 11
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	71	>10000	294	>10000	207	>10000	159
βανιλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Αναλύτης	Chardonnay		Ροδίτης		Μονεμβασιά		Μπατίκι	
	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Έλευθ ± $U_{ex}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Δεσμ ± SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
cis-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans-rose οξειδίο	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
cis φουραν. οξειδ. λιναλ.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
trans φουραν. οξειδ. λιναλ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
λιναλοόλη	< LOD	< LOD	29 ± 4	5,6 ± 2,1	Ίχνη	Ίχνη	< LOD	< LOD
νεράλη	< LOD	< LOD	< LOD	6,7 ± 2,5	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
α-τερπινεόλη	< LOD	< LOD	5,2 ± 2,	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιάλη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
κιτρονελλόλη	< LOD	Ίχνη	14 ± 2	Ίχνη	13 ± 2	Ίχνη	8,6 ± 1,2	< LOD
νερόλη	< LOD	< LOD	< LOD	12 ± 1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
γερανιόλη	< LOD	6,6 ± 0,8	12 ± 1	163 ± 14	15 ± 2	24 ± 8	7,6 ± 0,9	< LOD
γερανικό οξύ	< LOD	4,4 ± 1,6	11 ± 4	16 ± 2	< LOD	5,5 ± 1,9	< LOD	Ίχνη
εξανόλη-1	761 ± 97	37	596 ± 75	16	687 ± 87	48	1290 ± 715	101
trans-3-εξεν-1-όλη	67 ± 9	< LOD	58	8,4 ± 1,6	30 ± 5	< LOD	26 ± 4	< LOD
cis-3-εξεν-1-όλη	21 ± 5	< LOD	21 ± 5	< LOD	100 ± 7	22 ± 5	257 ± 22	34 ± 8
β-δαμασκηνόνη	7,0 ± 0,7	3,3 ± 0,3	6,3 ± 0,6	< LOD	7,0 ± 0,7	Ίχνη	5,9 ± 0,6	Ίχνη
α-ιονόνη	Ίχνη	Ίχνη	2,1 ± 0,1	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	Ίχνη	< LOD
β-ιονόνη	< LOD	< LOD	9,0 ± 2,3	6,2 ± 1,9	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
βενζυλική αλκοόλη	Ίχνη	295 ± 108	42 ± 17	88 ± 6	26 ± 4	324 ± 119	< LOD	715 ± 262
β-φαινυλαιθανόλη <sup>a</sup>	>10000	139	>10000	89	>10000	514	>10000	262
βανιλίνη	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

<sup>a</sup> Τα αποτελέσματα υπολογίσθηκαν με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης σε προσομοιωτή οίνου.

< LOD σημαίνει ότι η συγκέντρωση ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Ίχνη σημαίνει ότι η συγκέντρωση ήταν κάτω από το όριο προσδιορισμού αλλά πάνω από το όριο ανίχνευσης.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έγιναν οι ακόλουθες δημοσιεύσεις σε έγκριτα διεθνή επιστημονικά περιοδικά:

M. Metafa, A. Economou, Comparison of solid-phase extraction sorbents for the fractionation and isolation of important free and glycosidically-bound varietal aroma compounds in wines and validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for their determination, *Central. European Journal of Chemistry* , vol. 11, no. 2, 2013, pp. 228-244.

M. Metafa, A. Economou, Chemometrical development and comprehensive validation of a solid phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry methodology for the determination of important free and bound primary aromatics in Greek wines, *Journal of Chromatography A*, vol. 1305, 2013, pp. 244-58.

## ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής παρουσιάσθηκε στα ακόλουθα συνέδρια:

- M. Metafa, A. Economou, 2010. Validation of an analytical method for the analysis of free and glycosidically-bound primary volatile aroma compounds in wines with SPE and GC/MS. 7<sup>th</sup> International Conference «*Aegean Analytical Chemistry Days (AACD)*», Lesvos, Greece.
- M. Metafa, A. Economou, 2011. Development and validation of an analytical method for the analysis of primary volatile aroma compounds in wines with Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography- Mass Spectrometry, 16th European Conference on Analytical Chemistry *EUROanalysis*, Belgrade, Serbia. **Διάκριση του πόντου στα 8 καλύτερα.**
- M. Metafa, A. Economou, 2012, Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Determination of Free and Glycosidically-Bound Varietal Aroma Compounds in White Wines, 8<sup>th</sup> International Conference «*Aegean Analytical Chemistry Days (AACD)*», İzmir, Turkey.



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. V. Ferreira and J. Cacho, Identification of Impact Odorants of Wines, *Wine Chemistry and Biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas, M.C. Polo eds., Springer Science + Business Media, LLC, 2009, pp 393-415.
2. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Aroma Compounds, *Food Chemistry*, Springer, 2009, pp. 340-402.
3. W. Grosch, Review: Evaluation of Key Odorants of Foods by Dilution Experiments, Aroma Models and Omission, *Chemical Senses*, vol. 26, 2001, pp. 533-545.
4. I.L. Francis, J.L. Newton, Determining wine aroma from compositional data, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 11, 2005, pp. 114–126.
5. A. Zalacain, J. Marín, G.L. Alonso, M.R. Salinas, Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction, *Talanta*, vol. 71, 2007, pp. 1610–1615.
6. D. Rauhut, H. Kürbel, H.H. Dittrich, Sulfur compounds and their influence on wine quality, *International symposium on viticulture and enology in cool climates N° 3, Geisenheim/Mainz, Allemagne*, vol. 48, no 3-6 (44 ref.), 1993, pp. 214-218.
7. M. Bonino, R. Schellino, C. Rizzi, R. Aigotti, C. Delfini, C. Baiocchi, Aroma compounds of an Italian wine (Ruche´) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS, *Food Chemistry*, vol. 80, 2003, pp. 125–133.
8. G. Styger, B. Prior, F.F. Bauer, Review: Wine flavor and aroma, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 38, 2011, pp. 1145–1159.
9. P. Polášková, J. Herszage and S.E. Ebeler, CRITICAL REVIEW: Wine flavor: chemistry in a glass, *Chemical Society Reviews*, vol. 37, 2008, pp. 2478–2489.
10. A.F. Pisarnitskii, Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review), *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 37, no. 6, 2001, pp. 552–560.
11. S.E. Ebeler, Analytical Chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor, *Food Reviews International*, vol. 17, no. 1, 2001, pp.45–64.
12. E. Gómez García-Carpintero, E. Sánchez-Palomo, M.A. González-Viñas, Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region, *Food Research International*, vol. 44, 2011, pp. 61–70.
13. J.M. Oliveira, I.M. Araújo, O.M. Pereira, J.S. Maia, A.J. Amaral, M.O. Maia, Characterization and differentiation of five “Vinhos Verdes” grape varieties on the basis of monoterpenic compounds, *Analytica Chimica Acta*, vol. 513, 2004, pp. 269–275.
14. E. Marengo, M. Acetoa, V. Maurino, Classification of Nebbiolo-based wines from Piedmont (Italy) by means of solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds, *Journal of Chromatography A*, vol. 943, 2001, pp. 123–137.
15. S.M. Rocha, P. Coutinho, E. Coelho, A.S. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, 2010, pp. 1508-1516.
16. A. Nasi, P. Ferranti, S. Amato, L. Chianese, Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques, *Food Chemistry*, vol. 110, 2008, pp. 762–768.

17. D. De la Calle García, M. Reichenbächer, and K. Danzer, Analysis of Wine Bouquet Components Using Headspace Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 21, no.7, 1998, pp. 373-377.
18. J.S. Câmara, P. Herbert, J.C. Marques, M.A. Alves, Varietal flavour compounds of four grape varieties producing Madeira wines, *Analytica Chimica Acta*, vol. 513, 2004, pp. 203–207.
19. H.H. Jelén, M. Majcher, M. Dziadas, R. Zawirska-Wojtasiak, K. Czaczyk, E. Wąsowicz, Volatile compounds responsible for aroma of Jutrzenka liqueur wine, *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, 2011, pp. 7566– 7573.
20. L. Setkova, S. Risticovic, J. Pawliszyn, Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic–time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical evaluation of the data, *Journal of Chromatography A*, vol. 1147, 2007, pp. 224–240.
21. J. Weber, M. Beeg, C. Bartsch, K.-H. Feller, D. De la Calle Garcia, M. Reichenbächer, K. Danzer, Improvement of the Chemometric Variety Characterization of Wines by Improving the Detection Limit for Aroma Compounds, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 22, no. 6, 1999, pp. 322–326.
22. S. Koundouras, V. Marinos, A. Gkoulioti, Y. Kotseridis, C. Van Leeuwen, Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on Wine Phenolic and Aroma Components, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, 2006, pp. 5077-5086.
23. I. Sabon, G. de Revel, Y. Kotseridis, A. Bertrand, Determination of Volatile Compounds in Grenache Wines in Relation with Different Terroirs in the Rhone Valley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, 2002, pp. 6341-6345.
24. J. Marais, C.J. van Wyk and A. Rapp, Effect of Sunlight and Shade on Norisoprenoid Levels in Maturing Weisser Riesling and Chenin blanc Grapes and Weisser Riesling Wines, *South African Journal for Enology and Viticulture*, vol. 13, 1992, pp. 23-32.
25. S. Bureau, M.A.J. Razungles, R.L. Baumes, The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, 2000, pp. 2012–2020.
26. E. Sánchez Palomo, M.C. Díaz-Maroto, M.A. González Viñas, A. Soriano-Pérez, M.S. Pérez-Coello, Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening, *Food Control*, vol. 18, 2007, pp. 398–403.
27. J. Fenoll, A. Manso, P. Hellín, L. Ruiz, P. Flores, Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening, *Food Chemistry*, vol. 114, 2009, pp. 420–428.
28. E. Coelho, S.M. Rocha, A.S. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, Screening of variety- and pre-fermentation-related volatile compounds during ripening of white grapes to define their evolution profile, *Analytica Chimica Acta*, vol. 597, 2007, pp. 257–264.
29. M. Vilanova, Z. Genisheva, L. Bescansa, A. Masa, J.M. Oliveira, Changes in free and bound fractions of aroma compounds of four *Vitis vinifera* cultivars at the last ripening stages, *Phytochemistry*, vol. 74, 2012, pp. 196–205.
30. B. W. Zoecklein, T.K. Wolf, J.E. Marcy, Y. Jasinski, Effect of fruit zone leaf thinning on total glycosides and selected aglycone concentrations of Riesling (*Vitis Vinifera* L.) grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 49, no. 1, 1998, pp. 35–43.

31. S. Maicas, J.J. Mateo, Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review, *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 67, 2005, pp. 322–335
32. C. Delfini, C. Cocito, M. Bonino, R. Schellino, P. Gaia, C. Baiocchi, Definitive Evidence for the Actual Contribution of Yeast in the Transformation of Neutral Precursors of Grape Aromas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, 2001, pp. 5397-5408.
33. I. Francis, S. Kassara, A.C. Noble, P.J. Williams, *Chemistry of Wine Flavour*, A. L. Waterhouse, S. E. Ebeler eds., American Chemical Society, Washington, DC, 1999, pp. 13.
34. E. Pogorzelski, A. Wilkowska, Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review, *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 22, 2007, pp. 251–254.
35. M. Ugliano, E.J. Bartowsky, J. Mccarthy, L. Moio, and P.A. Henschke, Hydrolysis and Transformation of Grape Glycosidically Bound Volatile Compounds during Fermentation with Three *Saccharomyces* Yeast Strains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, 2006, pp. 6322-6331.
36. J. McMurry, *Οργανική Χημεία*, τόμος II, Ελληνική Μετάφραση: Βάρβογλης Α., Ορφανόπουλος Μ., Σμόνου Ι., και Στρατάκης Μ., 1η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1999.
37. R.S. Jackson, *Wine Science: Principles and Applications*, S.L. Taylor ed., Academic Press, London, 1994, pp. 203-211.
38. E.M. Davis, R. Croteau, Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes sesquiterpenes and diterpenes, *Biosynthesis: Aromatic Polyketides Isoprenoids Alkaloids*, F. J. Leeper, J.C. Vederas eds., Springer-Verlag, Berlin, 2000.
39. N. Dudareva, F. Negre, D.A. Nagegowda, I. Orlova, Plant volatiles: Recent advances and future perspectives, *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 25, 2006, pp. 417-440.
40. M. Wink, Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 75, 1988, pp. 225-233.
41. M. Heil, and C. Kost, Priming of indirect defences, *Ecology Letters*, vol. 9, 2006, pp. 813-817.
42. N. Dudareva, E. Pichersky, J. Gershenzon, Biochemistry of plant volatiles, *Plant Physiology*, vol. 135, 2004, pp. 1893-1902.
43. A. Rapp, Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception, *Nahrung-Food*, vol. 42, 1998, pp. 351-363
44. D.M. Martin, S. Aubourg, M.B. Schouwey, L. Daviet, M. Schalk, O. Toub, S.T. Lund, and J. Bohlmann, Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays, *BMC Plant Biology*, vol. 10, 2010, pp. 226.
45. S.K. Park, J.C. Morrison, D.O. Adams, and A.C. Noble, Distribution of Free and Glycosidically Bound Monoterpenes in the Skin and Mesocarp of Muscat of Alexandria Grapes during Development, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, 1991, pp. 514-518.
46. P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud, *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*, J. Wiley & Sons, 2006, (a) pp. 224-239, (b) pp. 288.
47. J.J. Mateo, M. Jiménez, Review: Monoterpenes in grape juice and wines, *Journal of Chromatography A*, vol. 881, 2000, pp. 557–567.

48. J. Shimizu, M. Watanabe, Neutral volatile components in wines of Koshu and Zenkoji grapes, *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, vol. 45, 1981, pp. 2797.
49. P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud, *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Stabilization and Treatments*, J. Wiley & Sons, 2006, pp. 189-193.
50. Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier, The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some grape aroma components, *Journal of Chromatography A*, vol. 331, 1985, pp. 83–90.
51. H. Guth, Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, 1997, pp. 3027-3032.
52. E. Coelho, S.M. Rocha, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening, *Analytica Chimica Acta*, vol. 563, 2006, pp. 204–214.
53. M. Parker, A.P. Pollnitz, D. Cozzolino, I.L. Francis, and M.J. Herderich, Identification and quantification of a marker compound for 'pepper' aroma and flavor in Shiraz grape berries by combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 2007, pp. 5948-5955.
54. T.E. Siebert, C. Wood, G.M. Eelsey, and A.P. Pollnitz, Determination of Rotundone, the Pepper Aroma Impact Compound, in Grapes and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, 2008, pp. 3745-3748
55. C. Wood, T.E. Siebert, M. Parker, D.L. Capone, G.M. Eelsey, A.P. Pollnitz, M. Eggers, M. Meier, T. Vössing, S. Widder, G. Krammer, M.A. Sefton, and M.J. Herderich, From wine to pepper: Rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, 2008, pp. 3738-3744.
56. V. Ferreira, R. López and J.F Cacho, Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 80, 2000, pp. 1659-1667.
57. B.J. Hausch, *Flavor Chemistry of Lemon-Lime Carbonated Beverages*, master's thesis, Dept. Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, 2010.
58. P.X. Etiévant, *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, H. Marse ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1991, pp. 483–587.
59. P. Manito, *Biosynthesis of natural products*, Ellis Horwood, Chichester, 1980.
60. H.K. Lichtenhaler, J. Schwender, A. Disch, and M. Rohmer, Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate – independent pathway, *FEBS Letters*, vol. 400, 1997, pp. 271–274.
61. F. Bouvier, A. Rahier, B. Camara, Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids, *Progress in Lipid Research*, vol. 44, 2005, pp. 357-429
62. M. Rodriguez-Concepcion, Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells *Phytochemistry Reviews*, vol.5, 2006, pp. 1-15.
63. J.D. Dunlevy, C.M. Kalua, R.A. Keyzers and P.K. Boss, The production of flavour & aroma compounds in grape berries, *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, K. A. Roubelakis-Angelakis ed., 2nd edn., Springer Science+Business Media B.V., 2009, pp. 293-340.

64. F. Luan, M. Wüst, Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp, *Phytochemistry*, vol. 60, 2002, pp. 451–459.
65. R. Cordonnier, C. Bayonove, Étude de la phase préfermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme ; cas des terpénols, des aldehydes et des alcools en C6, *Connaissance de la Vigne et du Vin*, vol. 15, 1981, pp. 269–286.
66. F. Drawert, and J. Barton, Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*, *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, vol. 26, 1978, pp. 765-767.
67. G.L. Fagan, R.E. Kepner and A.D. Webb, Production of linalool, cis- and trans-nerolidol, and trans- farnesol by *Saccharomyces* fermentation growing as a film on simulated wine, *Vitis*, vol. 20, 1981, pp. 36-42.
68. R. Hock, I. Benda, P. Schreier, Formation of Terpenes by Yeasts during Alcoholic Fermentation, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung (European Food Research and Technology)*, vol. 179, 1984, pp. 450-452
69. A. Klingenberg and E. Sprecher, Production of monoterpenes in liquid cultures by the yeast *Ambrosiozyma monospora*, *Planta Medica*, vol. 3, 1985, pp. 264-265.
70. M.F. Carrau, K. Medina, E. Boido, L. Farina, C. Gaggero, E. Dellacassa, G. Versini, P.A. Henschke, *De novo* synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 243, 2005, pp. 107–115.
71. P. Winterhalter, and R. Rouseff, Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, P. Winterhalter and R. Rouseff eds., American Chemical Society, Washington DC , 2002, pp. 1-17.
72. I. Souid, Z. Hassene, E.S. Palomo, M.S. Perez-Cóello, A. Ghorbel, Varietal aroma compounds of *vitis vinifera* CV. *Khamri* grown in Tunisia, *Journal of Food Quality*, vol. 30, 2007, pp. 718–730
73. A. Razungles, Z. Gunata, S. Pinatel, R. Baumes, and C. Bayonove Quantitative studies on terpenes, norisoprenoids and their precursors in several varieties of grapes, *Sciences des Aliments*, vol.13, 1993, pp.59-72.
74. M.A. Sefton, I.L. Francis, and P.J. Williams, The Volatile Composition of Chardonnay Juices - a Study by Flavor Precursor Analysis, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 44, 1993, 359-370.
75. M.A. Sefton, I.L. Francis, and P.J. Williams, Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Sauvignon blanc, *Journal of Food Science*, vol. 59, 1994, pp. 142-147
76. M.A. Sefton, I.L. Francis, and P.J. Williams, The free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Semillon, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 2, 1996, pp. 179-183.
77. M.A. Sefton, Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice sample of *Vitis vinifera* grape cvs Merlot and Cabernet Sauvignon, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 4, 1998, pp. 30-38.
78. M.M. Mendes-Pinto, Review: Carotenoid breakdown products the–norisoprenoids–in wine aroma, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 483, 2009, pp. 236–245.
79. M. Petrozziello, D. Borsa, M. Guaita, V. Gerbi, A. Bosso, Quantification by solid phase micro extraction and stable isotope dilution assay of norisoprenoid compounds in red wines obtained from Piedmont rare varieties, *Food Chemistry*, vol. 135, 2012, pp. 2483–2489.

80. W. Pickenhagen, *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*; R. Teranishi, E. L. Wick, I. Hornstein eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, pp 75-87.
81. Y. Kotseridis, R.L. Baumes, A. Bertrand, G.K. Skouroumounis, Quantitative determination of  $\beta$ -ionone in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay, *Journal of Chromatography A*, vol. 848, 1999, pp. 317–325.
82. B. Pineu, J.-C. Barbe, C. Van Leeuwen, D. Dubourdieu, Which Impact for  $\beta$ -Damascenone on Red Wines Aroma?, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 2007, pp. 4103-4108.
83. M.A. Sefton, G.K. Skouroumounis, G.M. Elsey, and D.K. Taylor, Occurrence, Sensory Impact, Formation, and Fate of Damascenone in Grapes, Wines, and Other Foods and Beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, 2011, pp. 9717-9746.
84. A. Escudero, E. Campo, L. Fariña, J. Cacho, and V. Ferreira, Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 2007, pp. 4501-4510.
85. P. Crupi; A. Coletta, D. Antonacci, Analysis of carotenoids in grapes to predict norisoprenoid varietal aroma of wines from Apulia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, 2010, pp. 9647–9656.
86. R. Baumes, J. Wirth, S. Bureau, Y. Gunata, A. Razungles, Biogenesis of C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines, *Analytica Chimica Acta*, vol. 458, 2002, pp. 3–14.
87. P. Winterhalter, M.A. Sefton, P.J. Williams, Volatile C<sub>13</sub>-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 41, 1990, pp. 277–283.
88. H. Guth, Comparison of different white wine varieties in odor profiles by instrumental analysis and sensory studies, *Chemistry of Wine Flavor*, A. L. Waterhouse, S.E. Ebeler eds., ACS Symposium Series, vol. 714; American Chemical Society, Washington, DC, 1999; pp 39-54.
89. M.A. Daniel, G.M. Elsey, D.L. Capone, M.V. Perkins, M.A. Sefton, Fate of damascenone in wine: the role of SO<sub>2</sub>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, 2004, pp. 8127–8131.
90. D.R.N. Lloyd, D.L. Capone, M. Ugliano, D.K. Taylor, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, and G.M. Elsey, Formation of Damascenone under both Commercial and Model Fermentation Conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, 2011, pp. 1338–1343.
91. P. Schreier, F. Drawert, A.Z. Junker, Sesquiterpenes Hydrocarbons from Grapes, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung (European Food Research and Technology)*, vol. 161, 1976, pp.271- 274.
92. S. Mathieu, J. Wirth, F.-X. Sauvage, J.-P. Lepoutre, R. Baumes, Z. Gunata, Biotransformation of C<sub>13</sub>-norisoprenoids and monoterpenes by a cell suspension culture of cv. Gamay (*Vitis vinifera*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 97, 2009, pp. 203–213.
93. F.L. Denise, G. de Revel, J.P. Rosier, M.T. Bordignon-Luiz, Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-olfactometry), *Food Chemistry*, vol. 107, 2008, pp. 497–505.
94. A. Escudero, B. Gogorza, M.A. Melus, N. Ortin, J. Cacho, and V. Ferreira, Characterization of the aroma of a wine from Maccabeo. Key role played by compounds

- with low odor activity values, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, 2004, pp. 3516–3524.
95. Y. Kotseridis, A.A. Beloqui, A. Bertrand, J.P. Doazan, An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 48, 1998, pp. 44–48.
  96. C.M. Kalua, P.K. Boss, *Evolution of Volatile Compounds during the Development of Cabernet Sauvignon Grapes (Vitis vinifera L.)*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, 2009, pp. 3818–3830.
  97. E. Sánchez-Palomo, E.G. García-Carpintero, M.A. G. Gallego and M.A.G. Viñas, The Aroma of Rojal Red Wines from La Mancha Region – Determination of Key Odorants, *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, Dr. Bekir Salih ed., 2012, Available from: <http://www.intechopen.com> (τελευταία επίσκεψη Ιούλιος 2013).
  98. K. Bindon, C. Varela, J. Kennedy, H. Holt, M. Herderich, Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon 1*. Grape and wine chemistry, *Food Chemistry*, vol. 138, 2013, pp. 1696–1705.
  99. C.M. Kalua, P.K. Boss, Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera L.*) from fruitset to harvest, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 16, 2010, pp. 337–348.
  100. J. Crouzet, Les enzymes et l'arôme du vin, *Revue française d'oenologie*, vol. 102, 1986, pp 42-49.
  101. W. Schwab, R. Davidovich-Rikanati, E. Lewinsohn, Biosynthesis of Plant-Derived Flavor Compounds, *The Plant Journal*, vol.54, 2008, pp. 712-732.
  102. M. González Álvarez, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC–MS, *Food Chemistry*, vol. 129, 2011, pp. 890-898.
  103. J.M. Oliveira, M. Faria, F. Sá, F. Barros, I.M. Araújo, C<sub>6</sub>-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin, *Analytica Chimica Acta*, vol. 563, 2006, pp. 300–309.
  104. D. Dubourdieu, C. Ollivier and J.N. Boidron, Incidence des opérations préfermentaires sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs, *Connaissance de la Vigne et du Vin*, vol. 20, 1986, pp. 53-76.
  105. J. Garavaglia, S. Hickmann Flôres, T.M. Pizzolato, M. do Carmo Peralba, M.A. Záchia Ayub, Bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol by *Kluyveromyces marxianus* in grape must cultures *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 23, 2007, pp. 1273–1279.
  106. J. Cacho, L. Moncayo, J.C. Palma, V. Ferreira and L. Culleré, Comparison of the aromatic profile of three aromatic varieties of Peruvian pisco (Albilla, Muscat and Torontel) by chemical analysis and gas chromatography–olfactometry, *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 28, 2013, pp. 340-352.
  107. R. Noguerol-Pato, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Quantitative determination and characterisation of the main odourants of Mencía monovarietal red wines, *Food Chemistry*, vol. 117, 2009, pp. 473-484.
  108. P.J. Williams, C.R. Strauss, B. Wilson, and R.A. Massy-Westropp, Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis vinifera* grapes, *Phytochemistry*, vol. 22, no. 9, 1983, pp. 2039-2041.
  109. M. Ugliano, L. Moio, Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera L. cv. Fiano* grapes as odour-active constituents of Fiano wine, *Analytica Chimica Acta*, vol. 621, 2008, pp. 79-85.

110. S. Rocha, P. Coutinho, A. Barros, M. A. Coimbra, I. Delgadillo, and A. Dias Cardoso, Aroma Potential of Two Bairrada White Grape Varieties: Maria Gomes and Bical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, 2000, pp. 4802-4807.
111. S.G. Voirin, R.L. Baumes, J.-C. Sapis and C.L. Bayonove, II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape, *Journal of Chromatography*, vol. 595, 1992, pp. 269-281.
112. E. Sánchez Palomo, M.S. Pérez-Coello, M.C. Díaz-Maroto, M.A. González Viñas, M.D. Cabezudo, Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat 'a petit grains' wines and effect of skin contact, *Food Chemistry*, vol. 95, 2006, pp. 279-289.
113. M.J. Cabrita, A.M.C. Freitas, O. Laureano, D. Borsa, R. Di Stefano, Aroma compounds in varietal wines from Alentejo, Portugal, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, 2007, pp. 375–390.
114. O. Lamikanra, C.C. Grimm & I.D. Inyang, Formation and occurrence of flavor components in Noble muscadine wine, *Food Chemistry*, vol. 56, 1996, pp. 373-376.
115. T. Cabaroglu, A. Canbas, R. Baumes, C. Bayonove, J.P. Lepoutre, and Z. Günata, Aroma Composition of a White Wine of *Vitis vinifera* L. cv. Emir as Affected by Skin Contact, *Journal of Food Science*, vol. 62, no. 4, 1997, pp. 680-683.
116. J.J. Rodríguez-Bencomo, H.M. Cabrera-Valido, J.P. Pérez-Trujillo, J. Cacho, Bound aroma compounds of Gual and Listán blanco grape varieties and their influence in the elaborated wines, *Food Chemistry*, vol. 127, 2011, pp. 1153-1162.
117. M.J. Gómez-Míguez, J.F. Cacho, V. Ferreira, I.M. Vicario, F.J. Heredia, Volatile components of Zalema white wines, *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, pp. 1464–1473.
118. R. Lopez, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, vol. 966, 2002, pp. 167–177.
119. R. Flamini, P. Traldi, *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*, D.M. Desiderio, N.M.M. Nibbering eds, A. John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2010, pp. 132.
120. P.J. Spillman, A.P. Pollnitz, D. Liacopoulos, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, Accumulation of Vanillin during Barrel-Aging of White, Red, and Model Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 5, 1997, pp. 2584-2589.
121. M.J. Ibarz, V. Ferreira, P. Hernandez-Orte, N. Loscos, J. Cacho, Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes, *Journal of Chromatography A*, vol. 1116, 2006, pp. 217–229.
122. W.J. Hardie, S.J. Aggenbach, and V.G. Jaudzems, The plastids of the grape pericarp and their significance in isoprenoid synthesis, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, vol. 2, 1996, pp. 144-154.
123. P. Winterhalter, and G.K. Skouroumounis, Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation, *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, T. Scheper ed., Springer-Verlag, Berlin, 1997, pp. 73-105.
124. S. Sirikantaramas, M. Yamazaki, and K. Saito, Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants, *Phytochemistry Reviews*, vol. 7, 2008, pp. 467-477.
125. M.J.O. Francis, C. Allcock, Geraniol  $\beta$ -D-glucoside: occurrence and synthesis in rose flowers, *Phytochemistry*, vol. 8, 1969, pp. 1339–1347.



126. D. Chassagne, J. Crouzet, C.L. Bayonove, and R.L. Baumes, Identification of Passion Fruit Glycosides by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46, 1998, pp. 4352-4357.
127. P. J. Williams, C. R Straus, B. Wilson R.A., Massy-Westropp, use of Cis reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines, *Journal of Chromatography*, vol. 235, 1982, pp. 471-480.
128. M. Arévalo Villena, J. Díez Pérez, J.F. Úbeda, E. Navascués, A.I. Briones, A rapid method for quantifying aroma precursors: Application to grape extract, musts and wines made from several varieties, *Food Chemistry*, vol. 99, 2006, pp. 183-190.
129. P.J. Williams, Hydrolytic flavor release in fruit and wines through hydrolysis of nonvolatile precursors, *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*, T. Acree and R. Teranishi eds., American Chemical Society: Washington, DC, 1993, pp. 287-308.
130. P. Ribéreau-Gayon, The Chemistry of Red Wine Color. *Chemistry of Winemaking*, A. Webb ed., American Chemical Society: Dallas, TX, 1974, pp. 50-87.
131. Z. Günata, J.L. Wirth, W. Guo, and R.L. Baumes C13-norisoprenoid aglycon composition of leaves and grape berries from Muscat of Alexandria and Shiraz cultivars, *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, P. Winterhalter and R. Rouseff eds., American Chemical Society: Washington DC, 2002, pp. 255-261.
132. N. Loscos, P. Hernandez-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 2007, pp. 6674-6684.
133. Z. Günata, C. Bayonove, R. Baumes, R. Cordonnier, Stability of free and bound fractions of some aroma components of grape cv. Muscat during the wine processing, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 37, 1985, pp. 112-114.
134. Z. Günata, J.E. Sarry, Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, vol. 87, 2004, pp. 509-521.
135. Z. Günata, I. Dugelay, J.C. Sapis, R. Baumes, and C. Bayonove, Role of enzymes in the use of the flavour potential from grape glycosides in winemaking, *Progress in flavour precursor studies: analysis, generation, biotechnology*, P. Schreier and P. Winterhalter eds., Allured Pub. Corp.: Carol Stream, IL, 1993, pp. 219-234.
136. A.P. Aryan, B. Wilson, C.R. Strauss, and P.J. Williams, The Properties of Glycosidases of *Vitis vinifera* and a Comparison of Their beta-Glucosidase Activity with that of Exogenous Enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 38, 1987, pp. 182-188.
137. A. Delcroix, Z. Gunata, J.C. Sapis, J.M. Salmon, and C. Bayonove, Glycosidase Activities of Three Enological Yeast Strains during Winemaking - Effect on the Terpenol Content of Muscat Wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 45, 1994, pp. 291-296.
138. M. Dziadas, H.H. Jelen, Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach, *Analytica Chimica Acta*, vol. 677, 2010, pp. 43–49.
139. N. Loscos, P. Hernandez-Orte, J. Cacho, V. Ferreira, Comparison of the Suitability of Different Hydrolytic Strategies To Predict Aroma Potential of Different Grape Varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 7, 2009, pp. 2468–2480.
140. R. Schneider, A. Razungles, C. Augier, R. Baumes, Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines, *Journal of Chromatography A*, vol. 936, 2001, pp. 145–157.

141. R. Noguero-Pato, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, J.L. Santiago, M.C. Martínez, J. Simal-Gándara, Aroma potential of Brancellao grapes from different cluster positions, *Food Chemistry*, vol. 132, 2012, pp. 112–124.
142. M.J. Cabrita, A.M. Costa Freitas, O. Laureano R. Di Stefano, Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 86, 2006, pp. 922-931.
143. H.H. Baek K.R. Cadwallader, Contribution of Free and Glycosidically Bound Volatile Compounds to the Aroma of Muscadine Grape Juice, vol. 4, no 3, *Journal of Food Science*, 1999, pp. 441-444.
144. R. Perestrelo, M. Caldeira, J.S. Câmara, Solid phase microextraction as a reliable alternative to conventional extraction techniques to evaluate the pattern of hydrolytically released components in *Vitis vinifera* L. grapes, *Talanta*, vol. 95, 2012, pp. 1– 11.
145. M. Ortega-Heras, M.L. González-SanJosé, S. Beltrán, Aroma composition of wine studied by different extraction methods, *Analytica Chimica Acta*, vol. 458, 2002, pp. 85–93.
146. G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, J. Tabera, A comparison of different extraction methods for the volatile components of grape juice, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 29, 1991, pp. 11-15.
147. P.X. Etievant, Artifacts and contaminants in the analysis of food flavor, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 36, no. 7, 1996, pp. 733-745.
148. R. Castro, R. Natera, E. Durán, C. García-Barroso, *European Food Research and Technology*, Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products, vol 228, 2008, pp 1-18.
149. M. Dziadas, M. Nowacka, T.I Jesionowski, H.H. Jelen, Comparison of silica gel modified with three different functional groups with C-18 and styrene–divinylbenzene adsorbents for the analysis of selected volatile flavor compounds, *Analytica Chimica Acta*, vol. 699, 2011, pp. 66– 72.
150. C.W. Huck, G.K. Bonn, Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, vol. 885, 2000, pp. 51–72.
151. K. Bielicka-Daszkiwicz, A. Voelkel, Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents, *Talanta*, vol. 80, 2009, pp. 614–621.
152. Ε. Μπακέα, Κ. Ευσταθίου, *Εισαγωγή στους αναλυτικούς διαχωρισμούς*, Συμπληρωματικές σημειώσεις για το μάθημα “Ενόργανη Ανάλυση Ι”, Αθήνα, 2008. [http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/DIAXORISMOI\\_10.pdf](http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/DIAXORISMOI_10.pdf) (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2013).
153. Żwir-Ferenc, M. Biziuk, Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications, *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 5, 2006, pp. 677-690.
154. M. Moors, D. L. Massart and R. D. McDowall, Analyte isolation by solid phase extraction (SPE) on silica-bonded phases: Classification and recommended practices, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66, no. 2, 1994, pp. 277-304.
155. A. Nongonierma, P. Cayot, J. Le Quéré, M. Springett, A. Voilley, Mechanisms of Extraction of Aroma Compounds from Foods, Using Adsorbents. Effect of Various Parameters, *Food Reviews International*, vol. 22, 2006, pp. 51–94.
156. N. Fontanals, R.M. Marce, F. Borrull, New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds, *Journal of Chromatography A*, vol. 1152, 2007, pp. 14–31.

157. L.D. Butler, M.F. Burke, Chromatographic characterization of porous polymers for use of adsorbents in sampling columns, *Journal Chromatography Science*, vol. 14, no. 3, 1976, pp. 117–122.
158. I. Liška, J. Krupčík, P.A. Leclercq, The Use of Solid Sorbents for Direct Accumulation of Organic Compounds from Water Matrices - A Review of Solid-Phase Extraction Techniques, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 12, 1989, pp. 577-590.
159. Somenath Mitra editor, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, 2003, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
160. J.S. Fritz, P.J. Dumont, L.W. Schmidt, Methods and materials for solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, vol. 691, 1995, pp. 133-140.
161. L. Culleré, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent. Optimization of a method to fractionate wine flavor extracts, *Journal of Chromatography A*, vol. 1017, 2003, pp. 17–26.
162. M.E. Leon-Gonzalez, L.V. Perez-Arribas, Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration, *Journal of Chromatography A*, vol. 902, 2000, pp. 3–16.
163. Θ.Π. Χατζηγιάννου, *Εργαστήρια και Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας*, Αθήνα, 1980, σελ. 258
164. N.J.K. Simpson, ed., *Solid Phase Extraction Principles, Technics and Applications*, Marcel Dekker Inc, New York, 2000.
165. N. Masquè, R.M. Marcè, F. Borrell, New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 17, no. 6, 1998, pp. 384-394.
166. [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/xad16pis.Par.0001.File.tmp/xad16pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/xad16pis.Par.0001.File.tmp/xad16pis.pdf) (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2013).
167. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002007en.pdf> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2013).
168. R. Di Stefano, Proposition d'une methode de preparation de l'échantillon pour la determination des terpenes libres et glycosides des raisins et des vins, *Bulletin de l'OIV*, vol. 4, 1991, pp. 721–725.
169. S. Karagiannis, A. Economou, P. Lanaridis, Phenolic and Volatile Composition of Wines Made from *Vitis vinifera* Cv. Muscat Lefko Grapes from the Island of Samos, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 8, 2000, pp. 5369-5375.
170. P. Lanaridis, M.-J. Salaha, I. Tzourou, E. Tsoutsouras, S. Karagiannis, Volatile compounds in grapes and wines from two Muscat varieties cultivated in Greek Islands, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 2002, vol. 36, no. 1, pp. –47.
171. M. Esti, P. Tamborra, Influence of winemaking techniques on aroma precursors, *Analytica Chimica Acta*, vol. 563, 2006, pp. 173–179.
172. L. Moio, M. Ugliano, A. Gambuti, A. Genovese, & P. Piombino, Influence of clarification treatments on the concentrations of selected free varietal aroma compounds and glycoconjugates in Falanghina (*Vitis vinifera* L.) must and wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 55, no. 1, 2004, pp. 7–12.
173. A. Genovese, A. Gambuti, P. Piombino, L. Moio, Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine, *Food Chemistry*, vol. 103, 2007, pp. 1228–1236.
174. F. Torchio, S. Río Segade, V. Gerbi, E. Cagnasso, M. Giordano, S. Giacosa, L. Rolle, Changes in varietal volatile composition during shelf-life of two types of aromatic red

- sweet Brachetto sparkling wines, *Food Research International*, vol. 48, 2012, pp. 491–498.
175. S. Cortés, *Determinación de monoterpenos, ácidos y azúcares para la optimización de la fecha de vendimia*, doctoral dissertation, Universidad de Vigo, Spain, 1997.
  176. M. Vilanova, C. Sieiro, Determination of free and bound terpene compounds in Albarino wine, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, 2006, pp. 694–697.
  177. S. Zamúz, M. Vilanova, Volatile compounds after spontaneous fermentation of musts from *Vitis vinifera* cv. Albariño grapes cultivated in different origins from Rías Baixas AOC, Spain, *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 21, 2006, pp. 743-748.
  178. L. Carballeira, S. Cortés, M.L. Gil, E. Fernández, Determination of aromatic compounds, during ripening, in two white grape varieties, by SPE-GC, *Chromatographia*, vol. 53, suppl. 1, 2001, pp. S350-S355.
  179. S.C. Dieázquez, M.G. De La Pena, E.F. Gomez, Approaches to Spirit Aroma: Contribution of Some Aromatic Compounds to the Primary Aroma in Samples of Orujo Spirits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, pp. 7385-7390.
  180. V. Ferreira, M. Sharman, J.F. Cache, J. Dennis, New and efficient microextraction/ solid-phase extraction method for the gas chromatographic analysis of wine volatiles, *Journal of Chromatography A*, vol. 731, 1996, pp. 247-259.
  181. J.J. Mateo, N. Gentilini, T. Huerta, M. Jimenez, R. Di Stefano, Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine, *Journal of Chromatography A*, vol. 778, 1997, pp. 219-224.
  182. I. Lukic, M Banović, D. Peršuric, S. Radeka, B. Sladonja, Determination of volatile compounds in grape distillates by solid-phase extraction and gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 1101, 2006, pp. 238–244.
  183. V. Ferreira, L. Ortega, A. Escudero, J.F. Cacho, A Comparative Study of the Ability of Different Solvents and Adsorbents to Extract Aroma Compounds from Alcoholic Beverages, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 38, 2000, pp. 469-476.
  184. R.L. Johnson and B.V. Chandler, Cellulose acetate as a selective sorbent for limonin in orange juice, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 33, 1982, pp. 287-293.
  185. R. Di Stefano, Evoluzione dei composti terpenici liberi e glucosidici e degli actinidioli durante la conservazione dei mosti e dei vini in funzione del pH, *Riv Vitic Enol*, vol. 2, 1989, pp. 11–23.
  186. K. Wada, T. Shibamoto, Isolation and Identification of Volatile Compounds from a Wine Using Solid Phase Extraction, Gas Chromatography, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 5, 1997, pp. 4362-4366.
  187. Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, vol. 513, 2004, pp. 209–214.
  188. A. Gamero, P. Hernández-Orte, A. Querol, V. Ferreira, Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces* species and their hybrids, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 147, 2011, pp. 33–44.
  189. M.M. Losada, J. Andrés, J. Cacho, E. Revilla, J.F. López, Influence of some prefermentative treatments on aroma composition and sensory evaluation of white Godello wines, *Food Chemistry*, vol. 125, 2011, pp. 884–891.
  190. L. Cullere, A. Escudero, J. Cacho, V. Ferreira, Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 2, 2004, pp. 1653-1660.

191. E. Gómez García-Carpintero, E. Sánchez-Palomo, M.A. Gómez Gallego, M.A. González-Viñas, Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines, *Food Chemistry*, vol. 131, 2012, pp. 90–98.
192. P. Hernandez-Orte, M. Cersosimo, N. Loscos, J. Cacho, E. Garcia-Moruno, V. Ferreira, The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera, *Food Chemistry*, vol. 107, 2008, pp. 1064–1077.
193. B.T. Weldegergis, A.M. Crouch, T. Górecki, A. de Villiers, Solid phase extraction in combination with comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry for the detailed investigation of volatiles in South African red wines, *Analytica Chimica Acta*, vol. 701, 2011, pp. 98– 111.
194. D. Hernanz, V. Gallo, A.F. Recamales, A.J. Melendez-Martinez, F.J. Heredia, Comparison of the effectiveness of solid-phase and ultrasound-mediated liquid–liquid extractions to determine the volatile compounds of wine, *Talanta*, vol. 76, 2008, pp. 929–935.
195. I. Andujar-Ortiz, M.V. Moreno-Arribas, P.J. Martín-Álvarez, M.A. Pozo-Bayón, Analytical performance of three commonly used extraction methods for the gas chromatography–mass spectrometry analysis of wine volatile compounds, *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, 2009, pp. 7351–7357.
196. E. Sánchez-Palomo, M.E. Alañón, M.C. Díaz-Maroto, M.A. González-Viñas, M.S. Pérez-Coello, Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice, *Talanta*, vol. 79, 2009, pp. 871–876.
197. M. Godefroot, P. Sandra, M. Verzele, New method for quantitative essential oil analysis, *Journal of Chromatography*, vol. 203, 1981, pp 325-335.
198. J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction. Theory and practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
199. J. Pawliszyn, *Applications of solid phase microextraction*, Royal Society of Chemistry Chromatography Monographs, Cambridge, 1999.
200. H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *Journal Chromatography A*, vol. 880(1–2), 2000, pp. 35–62.
201. K.D. Buchholz and J. Pawllszyn, Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols, *Analytical Chemistry*, vol. 66, no. 1, 1994, pp. 160-167.
202. A. Fabio, A.L.P. Valente, Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 21, no. 6-7, 2002, pp. 428-438.
203. C.L. Arthur, L. Killam, K. Buchholz, J. Pawlszyn and J Berg, Automation and optimization of solid-phase microextraction, *Analytical Chemistry*, vol. 64, 1992, pp. 1960.
204. R.S. Whiton, B.W. Zoecklein, Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 51, 2000, pp. 379–382.
205. R. Azodanlou, C. Darbellay, J.L. Luisier, J.C. Villettaz, R. Amado, A new concept for the measurement of total volatile compounds, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung (European Food Research and Technology)*, vol. 208, no.4, 1999, pp. 254–258.
206. H.H. Jeleń, M. Majcher, M. Dziadas, Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review, *Analytica Chimica Acta*, vol. 738, 2012, pp. 13-26.
207. E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, Sorptive sample preparation – a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 373, 2002, pp. 3–22.

208. G. Vas, and K. Vékey, Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis, *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 39, 2004, pp. 233–254.
209. S. Balasubramanian, & S. Panigrahi, Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review, *Food and Bioprocess Technology*, vol. 4, 2011, pp. 1–26.
210. C. Duan, Z. Shen, D. Wu, Y. Guan, Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 10, 2011, pp. 1569-1574.
211. D. De la Calle García, S. Magnaghi, M. Reichenbacher, and K. Danzer, Systematic Optimization of the Analysis of Wine Bouquet Components by Solid-Phase Microextraction, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 19, 1996, pp. 257-262.
212. D. De la Calle García, M. Reichenbacher, and K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.-H. Feller, Investigations on Wine Bouquet Components By Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography (SPME-CGC) using Different Fibers, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 20, 1997, pp. 665-668.
213. D. De la Calle García, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.-H. Feller, Use of solid-phase microextraction-capillary-gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 360, 1998, pp. 784-787.
214. D. De la Calle García, M. Reichenbacher, K. Danzer, Classification of wines by means of multivariate data analysis using the SPME-CGC chromatograms and volatile aroma compounds, *Vitis*, vol. 37, 1998, pp. 181–188.
215. K. Danzer, D. De la Calle García, G. Thiel, and M. Reichenbacher, Classification of wine samples according to origin and grape varieties on the basis of inorganic and organic trace analyses, *American Laboratory*, October 1999, pp. 26-34.
216. G. Vas, L. Gál, J. Harangi, A. Dobó, and K. Vékey, Determination of Volatile Aroma Compounds of Bläufrankisch Wines Extracted by Solid-Phase Microextraction, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 36, 1998, pp. 505-510.
217. G.Y. Vas, K. Köteleky, M. Farkas, A. Dobó, and K. Vékey, Fast Screening Method for Wine Headspace Compounds Using Solid-Phase Microextraction (SPME) and Capillary GC Technique, *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 49, 1998, pp. 100-104.
218. S. Selli, M. Kürkçüoğlu, E. Kafkas, T. Cabaroğlu, B. Demirci K.H.C. Başer and A. Canbas, Volatile flavour components of mandarin wine obtained from clementines (*Citrus reticula* Blanco) extracted by solid-phase microextraction, *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 19, 2004; pp. 413–416.
219. M.P. Marti, M. Mestres, C. Sala, O. Busto, and J. Guasch, Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry Analysis of Successively Diluted Samples. A New Approach of the Aroma Extract Dilution Analysis Applied to the Characterization of Wine Aroma, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, 2003, pp. 7861-7865.
220. S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgado, and M.A. Coimbra, Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no.11, 2001, pp. 5142–5151.
221. L. Tat, P. Comuzzo, I. Stolfo, F. Battistutta, Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection, *Food Chemistry*, vol.93, 2005, pp. 361–369.

222. M. Liu, Z. Zeng, Y. Tian, Elimination of matrix effects for headspace solid-phase microextraction of important volatile compounds in red wine using a novel coating, *Analytica Chimica Acta*, vol. 540, 2005, pp. 341–353.
223. L. Setkova, S. Risticvic, J. Pawliszyn, Rapid headspace solid-phase microextraction–gas-chromatographic–time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction I. Method development and optimization, *Journal of Chromatography A*, vol. 1147, 2007, pp. 213–223.
224. A.L. Robinson, P.K. Boss, H. Heymann, P.S. Solomond, R.D. Trengovea, Development of a sensitive non-targeted method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, 2011, pp. 504–517.
225. J.C.R. Demyttenaere, C. Dagher, P. Sandra, S. Kallithraka, R. Verhé, N. De Kimpe, Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–mass spectrometry *Journal of Chromatography A*, vol. 985, 2003, pp. 233–246.
226. J. Torrens, M. Riu-Aumatell, E. López-Tamames, and S. Buxaderas, Volatile Compounds of Red and White Wines by Headspace–Solid-Phase Microextraction Using Different Fibers, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 42, 2004.
227. R.M. Peña, J. Barciela, C. Herrero and S. García-Martín, Optimization of solid-phase microextraction methods for GC-MS determination of terpenes in wine, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 85, 2005, pp. 1227–1234.
228. J.S. Câmara, M. Arminda Alves, J.C. Marques, Review: Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines, *Analytica Chimica Acta*, vol. 555, 2006, pp. 191–200.
229. J.S. Câmara, M.A. Alves, & J.C. Marques, Classification of Boal, Malvazia, Sercial and Verdelho wines based on terpenoid patterns, *Food Chemistry*, vol. 101, 2007, pp. 475–484.
230. E.P. Barros, N. Moreira, G.E. Pereira, S.G. Ferreira Leite, C. Moraes Rezende, P. Guedes de Pinho, Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry for analysis of volatiles in wines, *Talanta*, vol. 101, 2012, pp. 177–186.
231. V. Canuti, M. Conversano, M.L. Calzi, H. Heymann, M.A. Matthews, S.E. Ebeler, Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines, *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, 2009, pp. 3012–3022.
232. R. Perestrelo, A.S. Barros, S.M. Rocha, J.S. Câmara, Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties, *Talanta*, vol. 85, 2011, pp. 1483–1493.
233. R.M. Peña, J. Barciela, C. Herrero, S. García-Martín, Comparison of ultrasound-assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine, *Talanta*, vol. 67, 2005, pp. 129–135.
234. J.C. Bohlscheid, X. Wang, and C.G. Edwards, Comparison of headspace solid phase microextraction and XAD-2 methods to extract volatile compounds produced by *Saccharomyces* during wine fermentation, *Journal of Food Quality*, vol. 29, 2006, pp. 1–15.
235. A. Gamero, W. Wesselink, C. de Jong, Comparison of the sensitivity of different aroma extraction techniques in combination with gas chromatography–mass spectrometry to



- detect minor aroma compounds in wine, *Journal of Chromatography A*, vol. 1272, 2012, pp. 1-7.
236. Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation, 2002, [http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/CITAC\\_EURACHEM\\_GUIDE.pdf](http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/CITAC_EURACHEM_GUIDE.pdf) (τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2013).
237. M. Thompson, S.L.R. Ellison, A. Fajgelj, P. Willetts, R. Wood, Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement, (Technical Report), 1996, <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/recovery.pdf> (τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2013).
238. V.J. Barwick and S.L.R. Ellison, Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, 2000 Report No: LGC/VAM/1998/088LGC/VAM/1998/088, Version 5.1, [http://www.sadcmet.org/SADCWaterLab/Reports/November%202006/at01\\_VAM.pdf](http://www.sadcmet.org/SADCWaterLab/Reports/November%202006/at01_VAM.pdf) (τελευταία επίσκεψη Νοέμβριος 2013).
239. A.G. González, M.A. Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, no. 3, 2007, pp. 227-238.
240. M. Thompson, Towards a unified model of errors in analytical measurement, *Analyst*, vol. 125, 2000, pp. 2020-2025.
241. A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, D. Tsiipi, Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, 2009, pp. 5856–5867.
242. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1990R2676—EL—13.08.2005—011.001—36), 2005, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/el/consleg/1990/R/01990R2676-20050813-el.pdf> (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).
243. Analytical Methods Committee Technical Brief No.55, Experimental design and optimisation (4): Plackett–Burman designs, *Analytical Methods*, vol. 5, 2013, pp. 1901-1903.
244. Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste and D.L. Massart; Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 24, 2001, pp. 723-753.
245. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chemometrics> (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).
246. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"), Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org>, 2006, created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins, ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
247. D.R. Erney, A.M. Gillespie and D.M. Gilvydis, Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection, *Journal of Chromatography*, vol. 638, 1993, pp. 57-63.
248. D.R Erney., C.F. Poole, A study of single compound additives to minimize the matrix induced chromatographic response enhancement observed in the gas chromatography of pesticide residues, *Journal of High Resolution Chromatography*, vol. 16, no. 8, 1993, pp. 501-503.
249. K. Maštovská, S.J. Lehotay, and M. Anastassiades, Combination of Analyte Protectants To Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes, *Analytical Chemistry*, vol. 77, 2005, pp. 8129-8137.



250. J. Hajšlová, J. Zrostlíkova, Review: Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *Journal of Chromatography A*, vol. 1000, 2003, pp. 181–197.
251. L. Castro-Vázquez, M.E. Alañón, E. Calvo, M.J. Cejudo, M.C. Díaz-Maroto, M.S. Pérez-Coello, Volatile compounds as markers of ageing in Tempranillo red wines from *La Mancha* D.O. stored in oak wood barrels, *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, 2011, pp. 4910–4917.
252. E. Wuryatmo, *Application of citral to control postharvest diseases of oranges, doctoral dissertation*, School of Agriculture, Food and Wine, Univ. Adelaide, Waite Campus, 2011.
253. CliffsNotes: Reactions of Aldehydes and Ketones, <http://www.cliffsnotes.com/sciences/chemistry/organic-chemistry-ii/aldehydes-and-ketones/reactions-of-aldehydes-and-ketones> (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).
254. R.A. Andersen, T.R. Hamilton-Kemp, D.F. Hildebrand, C.T. McCracken, R.W. Collins, and P.D. Fleming, Structure-antifungal activity relationships among volatile C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones, and alcohols, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 42, 1994, pp. 1563-1568.
255. A. Calogirou, B.R. Larsen, C. Brussel, M. Duane, D. Kotzias, Decomposition of terpenes by ozone during sampling on tenax, *Analytical Chemistry*, vol. 68, no. 9, 1996, pp. 1499-1506.
256. D. Darinka, L. Cercaci, J. Alamed, D.J. McClements, and E.A. Decker, Chemical and Physical Stability of Citral and Limonene in Sodium Dodecyl Sulfate-Chitosan and Gum Arabic-Stabilized Oil-in-Water Emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 2007, pp. 3585-3591.
257. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem Working group, 1998, [URL:http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf](http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf) (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).
258. International Conference on Harmonization, Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability, *Federal Register*, vol. 60, no.40, 1995, pp. 11260-11262.
259. A. Falgelj, A. Ambrus, *Principles and Practices of Method Validation*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000.
260. I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, no. 8, 2004, pp. 535-552.
261. I. Taverniers, E. Van Bockstaele, M. De Loose, Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results, *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 23, no. 7, 2004, pp. 480-490.
262. B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS, *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 13, 2003, pp. 3019-3030.
263. M. Sulyok, F. Berthiller, R. Krska, R. Schuhmacher, Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 20, 2006, pp. 2649-2659.
264. Μ. Κουππάρης, Επικύρωση/Επαλήθευση Αναλυτικών Μεθόδων, εκπαιδευτικό υλικό - σημειώσεις από τις παραδόσεις, [www.chem.uoa.gr/courses/chemometrics/ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ-2.ppt](http://www.chem.uoa.gr/courses/chemometrics/ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ-2.ppt) (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).

265. ISO/IEC 17025, *General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories*, ISO, Geneva, Switzerland, 1999.
266. Eurachem/CITAC Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd edition, 2000. Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org) (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).
267. Μ. Κωστάκης, Ν. Θωμαΐδης, Μ. Κουππάρης, *Εκτίμηση Αβεβαιότητας στις Χημικές Μετρήσεις*, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμ. Χημείας, ΕΚΠΑ, [http://trams.chem.uoa.gr/docs/U\\_new\\_2012.pdf](http://trams.chem.uoa.gr/docs/U_new_2012.pdf) (τελευταία επίσκεψη Δεκέμβριος 2013).
268. E. Falqueä, E.F. Ndez, and D. Dubourdiu, Volatile Components of Loureira, Dona Branca, and Treixadura wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, 2002, pp. 538-543.
269. M.T.O Jonker, B. Muijs, Using solid phase micro extraction to determine salting-out (Setschenow) constants for hydrophobic organic chemicals, *Chemosphere*, vol. 80, no. 3, 2010, pp. 223-227.
270. J.J Rodríguez-Bencomo, C. Muñoz-González, I. Andújar-Ortiz, P.J. Martín-Álvarez, M.V. Moreno-Arribas, M.Á. Pozo-Bayón, Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 91, no. 13, 2011, pp. 2484-2494.
271. Α. Μητροπούλου, *Μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ επιλεγμένων οσμηρών πτητικών ενώσεων και πολυσακχαριτών σε μοντέλο οίνου*, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2007.
272. Α. Mitropoulou, E. Hatzidimitriou, Α. Paraskevopoulou, Aroma release of a model wine solution as influenced by the presence of non-volatile components. Effect of commercial tannin extracts, polysaccharides and artificial saliva, *Food Research International*, vol. 44, 2011, pp. 1561-1570.
273. A.L. Robinson, *Environmental Influences on Grape Aroma Potential*, doctoral dissertation, School of Pharmacy, Murdoch University, 2011.
274. A.L. Robinson, S.E. Ebeler, H. Heymann, P.K. Boss, P.S. Solomon, and R.D. Trengove, Interactions between Wine Volatile Compounds and Grape and Wine Matrix Components Influence Aroma Compound Headspace Partitioning, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, 2009, pp. 10313–10322.
275. Α. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Saiz, and C. Pizarro, Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation: Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork taint in wine, *Journal of Chromatography A*, vol. 1089, no. 1–2, 2005, pp. 31–38.
276. L. Rebière, A.C. Clark, L.M. Schmidtke, P.D. Prenzler, G.R. Scollary, A robust method for quantification of volatile compounds using headspace-solid-phase micro-extraction coupled with GC–MS – Application on Semillon wines, *Analytica Chimica Acta*, vol. 660, 2010, pp. 149–157.
277. F. Benkwitz, L. Nicolau, C. Lund, M. Beresford, M. Wohlers, and P.A. Kilmartin, Evaluation of Key Odorants in Sauvignon Blanc Wines Using Three Different Methodologies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, 2012, pp. 6293–6302.
278. R. Noguero-Pato, M. González-Álvarez, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Aroma profile of Garnacha Tintorera-based sweet wines by chromatographic and sensorial analyses, *Food Chemistry*, vol. 134, no. 4, 2012, pp. 2313-2325.

279. M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing, *Journal of Chromatography A*, vol. 1057, 2004, pp. 211-217.
280. M. Gerogiannaki-Christopoulou, T. Masouras, I. Provolisianou-Gerogiannaki and M. Polissiou, Head Space GC-MS Determination of Volatile Constituents in Wines (Appellation of Origin Controlled (AOC)) and Wine Distillates from Two Different Hellenic Native Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.), *Journal of Food Technology*, vol. 6, no. 3, 2008, pp. 120-124.
281. T. Cabaroglu, S. Selli, A. Canbas, J.P. Lepoutre, Z. Günata (2003) Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases, *Enzyme and microbial technology*, vol. 33, pp. 581–587.
282. I.L. Francis, M. A. Sefton, P.J. Williams, Sensory descriptive analysis of the aroma of hydrolysed precursor fractions from semillon, chardonnay and sauvignon blanc grape juices, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 59, 1992, pp. 511-520.
283. R. Noguero-Pato, M. González-Álvarez, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Evolution of the aromatic profile in *Garnacha Tintorera* grapes during raisining and comparison with that of the naturally sweet wine obtained, *Food Chemistry*, vol. 139, 2013, pp. 1052-1061.
284. R. Noguero-Pato, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, M.C. Martínez, J.L. Santiago, J. Simal-Gándara, Floral, spicy and herbaceous active odorants in Gran Negro grapes from shoulders and tips into the cluster, and comparison with Brancellao and Mouratón varieties, *Food Chemistry*, vol. 135, 2012, pp. 2771-2782.

