



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ  
ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΟΣΧΑΤΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΑΣ ΜΕ LC-MS ΚΑΙ  
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN**

**ΛΙΒΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018**



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ  
ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΟΣΧΑΤΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΑΣ ΜΕ LC-MS ΚΑΙ  
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN**

**ΛΙΒΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ  
Α.Μ 161305**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018**

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ  
ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΜΟΣΧΑΤΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΑΣ ΜΕ LC-MS ΚΑΙ  
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN**

**ΛΙΒΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Επιβλέπουσα: Ασημοπούλου Ανδρέα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στην Εφαρμοσμένη Οργανική Χημεία – Φυσικά  
Προϊόντα

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών ΑΠΘ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Καθηγητής, Παπαδογιάννης Ιωάννης
2. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ασημοπούλου Ανδρέα
3. Επίκουρη Καθηγήτρια, Γκίκα Ελένη

*Η επιτυχία δεν μετριέται από αυτό που έχεις κατορθώσει, αλλά από την αντίσταση που συνάντησες και από το κουράγιο που έδειξες στη μάχη απέναντι σε αμέτρητες αντιξοότητες.*

*Orison Swet Marden, 1850-1924 , Αμερικανός συγγραφέας*

*Στην οικογένειά μου που πάντα με στηρίζει.  
Ευχαριστώ που είστε δίπλα μου σε κάθε βήμα μου.*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Διδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών σπουδών «Χημική ανάλυση – Έλεγχος ποιότητας». Το θέμα της εργασίας αυτής υποδείχθηκε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ανδρεάνα Ασημοπούλου, την οποία ευχαριστώ θερμά για τη εξαιρετική συνεργασία, την συνεχή επίβλεψη, την καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές συμβουλές της, καθώς και για την στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς η παρούσα εργασία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

- τον κ. Παπαδογιάννη Ιωάννη, Καθηγητή του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας ΑΠΘ και Υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος, για τις πολύτιμες γνώσεις που παρείχε κατά τη διάρκεια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος και τις χρήσιμες παρατηρήσεις του κατά τη διόρθωση της διπλωματικής
- την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ε. Γκίκα, την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερα τόσο για την πολύτιμη βοήθεια της όσο και για τις εξαιρετικές συμβουλές της στην εκπόνηση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στη διόρθωση της διπλωματικής, αλλά και για την παραχώρηση δεδομένων για την ταυτοποίηση ενώσεων με LC-MS.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω και τη Δρ. Χριστίνα Βιργιλίου του Τμήματος Χημείας για την ουσιαστική βοήθεια, τη συμβολή και την καθοδήγησή της στην επεξεργασία των δεδομένων LC-MS.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δ. Χριστόφιλο του Εργαστηρίου Φυσικής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών, με την βοήθεια και την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη της μεθόδου και η ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία Raman. Ευχαριστώ για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη τις υποψήφιες διδάκτορες του Τμήματος Φυσικής Αναστασία Τερζίδου και Νίκη Σορόγκα σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων αλλά και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων φασματοσκοπίας Raman.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω τα παρακάτω μέλη της πανεπιστημιακής κοινότητας για την εξίσου σημαντική συμβολή τους:

- ο τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Π. Μπαρμπαλέξη του Τμήματος Φαρμακευτικής του Α.Π.Θ. για την διεξαγωγή των μετρήσεων φασματοσκοπίας ATR-FT-IR,
- ο τον Δρ. Ε. Τζιμπιλί, Ε.ΔΙΠ του Εργαστηρίου Φυσικοχημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Α.Π.Θ. για την διεξαγωγή πειραμάτων LC-MS,
- ο την Δρ. Α. Μοσχονά του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ για την παραχώρηση προτύπων γλυκόζης και φρουκτόζης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την εξαιρετική συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν, και οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρινάκη Μαρία του τμήματος Χημικών Μηχανικών ΑΠΘ για την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας και τη συλλογή των δειγμάτων.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω το Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας και Καινοτομίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (ΚΕΔΕΚ-ΑΠΘ), για την πρόσβαση στις Μεγάλες Ερευνητικές Υποδομές και Όργανα (ΜΕΥΟ) του Εργαστηρίου Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μαζών του Κέντρου Έρευνας της Δομής της Ύλης στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών, καθώς και στο όργανο Φασματοσκοπίας Raman του Εργαστηρίου Φυσικής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών.

Ευχαριστώ, επίσης, των οινολόγο κ. Νικόλαο Βακιρτζή του οινοποιείου Λήμνου "Η Ένωση" για την ευγενική παραχώρηση των δειγμάτων γλεύκους και πρότυπων ζυμών, ζελατίνης, θρεπτικών υλικών και τρυγικού οξέος που προστίθενται στο γλεύκος κατά την αλκοολική ζύμωση, αλλά και για την βοήθειά του σε όσες απορίες προέκυψαν σχετικά με τα δείγματα και την επεξεργασία τους καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου καθώς με την συμπαράσταση, την εμπιστοσύνη και την αγάπη τους, με βοήθησαν στο να ολοκληρωθεί η διπλωματική μου εργασία επιτυχώς.

Θεσσαλονίκη 2018

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Θεωρητικό μέρος</b> .....	1
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ</b> .....	2
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	2
1.1.1 Η ιστορία του κρασιού .....	2
1.1.2 Η κατάσταση στην Ελλάδα σήμερα .....	3
1.1.3 Ελληνικές ποικιλίες .....	3
1.1.4 Η ποιότητα του κρασιού .....	5
1.1.5 Νομοθετική Κατάταξη των Κρασιών .....	6
1.1.6 Νοθεία κρασιού .....	8
1.2 ΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ .....	9
1.2.1 Η σύσταση του σταφυλιού.....	9
1.2.2 Ωρίμανση του σταφυλιού .....	12
1.2.3 Εξέλιξη των συστατικών του σταφυλιού κατά την ωρίμανση .....	14
1.2.4 Ωρίμανση από αμπελουργική σκοπιά .....	15
1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	16
1.3.1 Από το πιεστήριο στο κελάρι .....	16
1.4 ΘΟΛΩΜΑΤΑ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ .....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ</b> .....	21
2.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ.....	21
2.2 ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ .....	22
2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	22
2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ.....	23
2.5 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΟΤΕΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ.....	26
2.6 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ .....	26
2.6.1 Γενικά.....	26
2.6.2 Αρωματικά συστατικά.....	27
2.6.3 Γευστικά συστατικά .....	32
2.6.4 Συστατικά που καθορίζουν το χρώμα και τη γεύση στο κρασί.....	35
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ</b> .....	38
3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	38
3.1.1 Εισαγωγή.....	38

3.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ του οίνου και επίδραση αυτών των φαινομένων σε χαρακτηριστικούς μεταβολίτες .....	40
3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ .....	41
3.3 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	43
3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ NMR .....	46
3.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC).....	48
3.5.1 Βιβλιογραφική Επισκόπηση.....	48
3.5.2 Γενικά για την Υγρή Χρωματογραφία .....	53
3.5.3 Οργανολογία.....	55
3.5.4 Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS).....	59
3.6 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ .....	63
3.7 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN .....	71
3.8 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΟΡΑΤΟΥ .....	75
3.8.1 Γενικά για τη φασματοσκοπία UV-VIS .....	75
3.8.2 Νόμος των Lambert-Beer .....	76
3.8.3 Οργανολογία.....	77
3.9 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ FOURIER ΜΕ ΑΠΟΣΒΕΝΟΥΣΑ ΟΛΙΚΗ ΑΝΑΚΛΑΣΗ (ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE-FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, ATR-FT-IR).....	78
Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας.....	83
Πειραματικό Μέρος.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	85
4.1 ΥΛΙΚΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ- ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	85
4.1.1 Υλικά.....	85
4.1.2 Σκεύη και Συσκευές .....	90
4.1.3 Οργανολογία.....	91
4.2 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	93
4.2.1 Προκατεργασία δειγμάτων σταφυλιού.....	93
4.2.2 Προκατεργασία δειγμάτων γλεύκους .....	93
4.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ .....	94
4.3.1 Υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας (LC-MS).....	94
4.3.3 Φασματοσκοπία Raman .....	97
4.3.3 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis).....	100
4.3.4 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FT-IR) .....	103



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	106
5.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (UPLC-HRMS).....	106
5.1.1 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων σταφυλιού.....	106
5.1.2 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.....	109
5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΛΕΥΚΟΥΣ .....	133
5.2.1 Χρωματογραφήματα και ταυτοποίηση ενώσεων .....	133
5.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN .....	142
5.2.1 Αποτελέσματα δειγμάτων γλεύκους.....	147
5.2.2 Αποτελέσματα δειγμάτων σταφυλιών .....	149
5.2.3 Αποτελέσματα διαλυμάτων πρότυπων γλυκόζης, φρουκτόζης και αιθανόλης.....	153
5.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ – ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis) .....	158
5.3.1 Αποτελέσματα δειγμάτων σταφυλιού .....	158
5.2.1 Αποτελέσματα δειγμάτων γλεύκους.....	162
5.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ATR-FT-IR.....	165
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	169
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	172
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	178
ABSTRACT.....	180

# Θεωρητικό μέρος

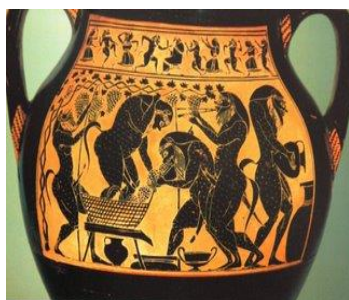
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ελληνικό κρασί έχει ιστορία και παράδοση χιλιετιών, παρόν γρήγορα εξελισσόμενο και μέλλον πολλά υποσχόμενο. Η Ελλάδα, παρά τις δύσκολες κοινωνικές και οικονομικές καταστάσεις που έχει περάσει ανά τους αιώνες, κατάφερε να διατηρήσει την οινική της κληρονομιά. Σε μια εποχή που το να είσαι διαφορετικός είναι το ίδιο σπουδαίο με το να είσαι ποιοτικός, το ελληνικό κρασί μπορεί επάξια να έχει σημαντική θέση στις οινικές αγορές του πλανήτη.

#### 1.1.1 Η ιστορία του κρασιού

Η ιστορία του ελληνικού κράτους είναι στενά συνδεδεμένη με τον πολιτισμό, τα έθιμα και την καθημερινή ζωή των Ελλήνων. Οι ιστορικοί κατατάσσουν την έναρξη της αμπελουργίας γύρω στο 3000 π.Χ., έχοντας όμως καταγεγραμμένες επιγραφές τον 7<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ., όπου αναφέρονται η παραγωγή και κατανάλωση του οίνου επίσημα. Υπάρχουν σύμβολα τόσο στη Γραμμική Γραφή Α όσο και στη Γραμμική Γραφή Β για το κρασί και τα αμπελοτόπια. Το κρασί είχε σημαντική θέση στην αρχαία Ελλάδα, σε βαθμό που ο Διόνυσος, θεός του θεάτρου, της γονιμότητας και της άγριας βλάστησης γενικά, λατρεύτηκε σχεδόν αποκλειστικά ως θεός του κρασιού και τον τιμούσαν με γιορτές σε κάθε ευκαιρία. Το τεχνικό επίπεδο, όσον αφορά την αμπελουργία στην Αρχαία Ελλάδα ήταν υψηλό. Το αρχαιότερο πατητήρι που υπάρχει στον κόσμο βρίσκεται στις Αρχάνες της Κρήτης και από αρχαία κείμενα δίνονται πολλές πληροφορίες για την αμπελουργία και τη διαδικασία οινοποίησης στην Αρχαία Ελλάδα [1].



**Σχήμα 1.1:** Αναπαράσταση πατήματος σταφυλιών σε αρχαίο αγγείο[2]

Το 146 π.Χ. που η Ελλάδα κατακτήθηκε από τους Ρωμαίους, το ελληνικό εμπόριο κρασιού παράκμασε και έδωσε τη θέση του στο ρωμαϊκό, παρόλο που τα ελληνικά κρασιά θεωρούνταν τα σπανιότερα κι ακριβότερα. Στην εποχή του Βυζαντίου, την οινική μας κληρονομιά διατήρησαν οι χριστιανοί ιερείς. Το πιο φημισμένο κρασί εκείνης της περιόδου ήταν της Μαλβαζίας (Μονεμβασιάς), η φήμη του οποίου διατηρήθηκε μέχρι κι τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Κατά την Τουρκοκρατία η αμπελουργία δεν παράκμασε σημαντικά, όπως θα περίμενε κανείς. Ύστερα, κατά τον 19<sup>ο</sup> αιώνα οι αμπελουργικές εκτάσεις αυξήθηκαν με γεωμετρική πρόοδο, με πιο επικερδή καλλιέργεια την σταφιδάμπελο, που εκείνη την περίοδο παραγόταν αποκλειστικά στην Ελλάδα σε παγκόσμιο επίπεδο. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, παρόλο που η Ελλάδα βρισκόταν σε εμπόλεμη κατάσταση, η ελληνική αμπελουργία γνώρισε την μεγαλύτερη άνθησή της. Ωστόσο, μετά τον 1920, τη χώρα έπληξε η φυλλοξήρα (έντομο της οικογένειας των αφιδών), καταστρέφοντας πολλές εκτάσεις και κυρίως τους μακεδονικούς αμπελώνες [3].

#### 1.1.2 Η κατάσταση στην Ελλάδα σήμερα

Τα τελευταία χρόνια οι Έλληνες παραγωγοί είχαν στρέψει, αρχικά, το ενδιαφέρον τους στην καλλιέργεια και οινοποίηση ξένων ποικιλιών, αλλά γρήγορα συνειδητοποίησαν ότι αν ήθελαν να ξεχωρίσουν στις διεθνείς αγορές η καλλιέργεια των γηγενών ποικιλιών ήταν το εισιτήριο. Έτσι, στην προσπάθεια αυτής της διάκρισης, οι επαγγελματίες οινολόγοι άρχισαν να εκπαιδεύονται και ενημερώνονται κατάλληλα και τα οινοποία αναβαθμίστηκαν, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η παραγωγή. Τα περιθώρια στον κλάδο της ελληνικής αμπελουργίας είναι μεγάλα και οι προοπτικές για το μέλλον των ελληνικών κρασιών στην διεθνή αγορά ευνοικότερες από όσο υπήρξαν τους τελευταίους αιώνες [1]

#### 1.1.3 Ελληνικές ποικιλίες

Όσον αφορά τις ερυθρές ποικιλίες, η πιο σημαντική και πιο διαδεδομένη στην αγορά είναι το Αγιωργήτικο και δίνει κρασιά με αρώματα κόκκινων φρούτων και γλυκών μπαχαρικών. Άλλη γνωστή ποικιλία για την Ελλάδα είναι το Ξινόμαυρο, που αποδίδει οίνους με υψηλή οξύτητα και ξεχωριστό άρωμα. Άλλες ποικιλίες που δίνουν οίνους εξίσου υψηλών προδιαγραφών είναι το Κοτσιφάλι, το Λιάτικο και το Λημνιό.

Από τις σημαντικότερες ελληνικές ποικιλίες λευκού σταφυλιού είναι φυσικά το Ασύρτικο, που καλλιεργείται σε μεγάλο ποσοστό στα νησιά των Κυκλάδων και δίνει κρασί σχετικά όξινο με αρώματα εσπεριδοειδών. Πολλές φορές αναμυγνύεται με μια

άλλη ποικιλία, το Αηδάνι, που απαλύνει τη μεταλλικότητα του Ασύρτικου. Το Αθήρι είναι μια άλλη ποικιλία που ευδοκμεί στα νησιά του Αιγαίου Πελάγους και δίνει κρασιά με ελαφρύ άρωμα. Η Ντεμπίνα καλλιεργείται κυρίως στην Ήπειρο, απ' την οποία προκύπτουν κρασιά αφρώδη και ημιαφρώδη. Ποικιλία ιδιαίτερα δημοφιλής είναι το Μοσχοφίλερο, καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο και δίνει κρασιά ιδιαίτερα αρωματικά. Σε όλη την ηπειρωτική Ελλάδα μπορεί να ευδοκιμήσει η ποικιλία Ροδίτης και συναντάται συχνά με την ποικιλία Σαββατιανό. Τα φυσικώς γλυκά κρασιά προκύπτουν από την ποικιλία Μοσχάτο Λευκό [4].

#### *Μοσχάτο Αλεξανδρείας Λήμνου*

Στο πλαίσιο αυτής τη διπλωματικής εργασίας εξετάστηκαν δείγματα σταφυλιού ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας που συλλέχθηκαν από αμπελώνες της Λήμνου. Η Λήμνος είναι ένα νησί με λίγους μόνο λόφους, που δεν ξεπερνούν τα 450 μέτρα και πολλές καλλιεργούμενες εκτάσεις. Τα εδάφη είναι ηφαιστειογενή και στην ανατολική πλευρά του καλλιεργείται από αρχαιοτάτων χρόνων η Λημνία σταφυλή, ποικιλία ερυθρή. Το ξηρό Λήμνος και το γλυκό Μοσχάτος Λήμνου, προκύπτουν από την ποικιλία Μοσχάτο Αλεξανδρείας, ποικιλία σταφυλιού που θέλει ιδιαίτερη προσοχή και φροντίδα τα θερμά καλοκαίρια της Λήμνου λόγω αυξημένου κινδύνου εμφάνισης υψηλών περιεκτικότητας σακχάρων σε βάρος της οξύτητας.

Η Λήμνος είναι μικρό, σχετικά, νησί με ομαλό ανάγλυφο που διαμορφώνουν χαμηλοί λόφοι. Στις πλαγιές και στις αβαθείς κοιλάδες των λόφων αυτών καλλιεργούνται τα αμπέλια και σε σημαντικό ποσοστό (περί το 30%) είναι πιστοποιημένα βιολογικά. Τα εδάφη στη Λήμνο είναι ηφαιστειογενή, λεπτόκοκκα και βαθειά, πλούσια σε μεταλλικά στοιχεία και κάλιο. Ακόμα και όταν οι κλίσεις είναι μικρές έχουν καλή στράγγιση. Τα αμπέλια στη Λήμνο κάνουν βαθύ ριζικό σύστημα. Στη Λήμνο, η μέση ηλιοφάνεια είναι υψηλή, η μέση βροχόπτωση χαμηλή με σχετική υγρασία, όμως, γύρω στο 75%, η μέση ετήσια θερμοκρασία είναι από τις χαμηλότερες στα ελληνικά νησιά και οι συνθήκες καύσωνα πολύ σπάνιες. Η Λήμνος είναι σήμερα γνωστή για το ξηρό λευκό κρασί, το οποίο είναι ιδιαίτερα αρωματικό, που θυμίζει έντονα τριαντάφυλλο και δυόσμο [5].

#### 1.1.4 Η ποιότητα του κρασιού

Η έννοια του κρασιού είναι συνυφασμένη με τα σταφύλια. Όσο πιο υγιή, ώριμα, συμπυκνωμένα και γευστικά είναι, τόσο καλύτερο και ποιοτικό θα είναι το κρασί που θα προκύψει.

##### *Οι παράγοντες της ποιότητας*

Η ποιότητα ενός κρασιού εξαρτάται από τρεις συγκεκριμένους παράγοντες: το *terroir*, το κλίμα και τη ποικιλία.

##### *Το *terroir**

Η έννοια του *terroir* γεννήθηκε στη Γαλλία και συνδέεται με τον γαλλικό αμπελώνα. Στην ουσία του, περιλαμβάνει όλες εκείνες τις παραμέτρους που συνδέονται με έναν αμπελώνα και που του προσδίδουν μοναδική ταυτότητα. Αυτές είναι η γεολογική φύση του εδάφους και του υπεδάφους, η γεωγραφική μορφολογία και το κοντινό φυσικό περιβάλλον. Ένα καλό *terroir* ευνοεί τη σωστή ανάπτυξη του αμπελιού και την παραγωγή ώριμων σταφυλιών. Τα πετρώδη ή τα αμμώδη εδάφη είναι καταλληλότερα για αυτό το σκοπό σε σχέση με τα λασπώδη, τις πλαγιές κάμπων και αυτά που είναι νότια ή νοτιοανατολικά, όπου επικρατεί αυξανόμενη ηλιοφάνεια. Το εγγύς φυσικό περιβάλλον δημιουργεί κι αυτό ευνοϊκότερες συνθήκες για το σταφύλι, καθώς για παράδειγμα αν δίπλα βρίσκεται ένα δάσος, αυτό μπορεί να λειτουργήσει ως φυσικό φράγμα και να παρέχει προστασία από τους ανέμους ή αν βρίσκεται κοντά μια έκταση με νερό, αυτή να μετριάζει τις διαφορές στη θερμοκρασία.

##### *Το κλίμα*

Για να αναπτυχθεί σωστά το φυτό και οι καρποί να ωριμάσουν κατάλληλα, το αμπέλι απαιτεί θερμότητα, φως, νερό, όλα σε σωστή δόση. Τα όρια της γεωγραφικής καλλιέργειας του αμπελιού είναι ανάμεσα στις 35<sup>0</sup> και 50<sup>0</sup> γεωγραφικού πλάτους, καθιστώντας έτσι την Ευρώπη με το εύκρατο κλίμα της, κατάλληλη περιοχή. Το καλοκαίρι πρέπει να είναι επαρκώς μακρύ και ξηρό για την μακρόχρονη ωρίμανση των σταφυλιών. Αναφορικά με το νερό, το αμπέλι το έχει ανάγκη αλλά κατά διαστήματα και όχι σε υπερβολικό βαθμό (500-700 χιλιοστόμετρα το χρόνο).

##### *Η ποικιλία*

Κάθε ποικιλία έχει τα δικά της ξεχωριστά αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά. Κάποιες ξεχωρίζουν για τη φρουτώδη γεύση τους όπως είναι το ερυθρό Pinot noir,

και άλλες είναι πλούσιες σε ταννίνες που δίνουν προσωπικότητα στο κρασί, όπως στο Cabernet-Sauvignon.

Ένας παράγοντας που αξίζει, τέλος, να αναφερθεί είναι ο φυσικά ο *άνθρωπος*. Είναι εκείνος που θα φροντίσει τον αμπελώνα μέχρι να ωριμάσει ο καρπός και θα μετατρέψει το σταφύλι από την αρχική του μορφή σε κρασί. Το κρασί που θα παραγάγει θα φέρει τη σφραγίδα του και θα είναι σύμφωνο με τη προσωπικότητά του. Ένας επαγγελματίας αμπελουργός συνδυάζει ταυτόχρονα το ρόλο του κηπουρού και αυτού του μάγειρα [3].

### 1.1.5 Νομοθετική Κατάταξη των Κρασιών

Σύμφωνα με την εθνική νομοθεσία, αλλά και αυτή της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα κρασιά κατατάσσονται σε Οίνους Ονομασίας Προέλευσης και Επιτραπέζιους.

Όσον αφορά τους *Οίνους Ονομασίας Προέλευσης*, κατά την διεθνή νομολογία, το προϊόν αυτό πρέπει να προέρχεται από την περιοχή της οποίας φέρει το όνομα και οι ποιοτικοί χαρακτήρες του πρέπει να οφείλονται σε φυσικούς (π.χ. το οικοσύστημα της περιοχής παραγωγής) και τεχνικούς παράγοντες (τεχνολογία παραγωγής) της περιοχής αυτής [6].

Συνεπώς, ένα κρασί που κυκλοφορεί στην αγορά με το τοπωνύμιο της περιοχής:

- προέρχεται από αμπελουργική ζώνη οριοθετημένη νομοθετικά, της οποίας το όνομα αναφέρεται στην ετικέτα του και μέσα στα όρια της οποίας καλλιεργούνται οι ποικιλίες σταφυλιών από τις οποίες παράγεται,
- παράγεται από μία ή περισσότερες εκλεκτές ποικιλίες οιναμπέλου (πάντα τις ίδιες) οι οποίες είναι απόλυτα προσαρμοσμένες στις εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι δίνουν κρασιά υψηλής ποιότητας
- παρασκευάζεται με βάση την παραδοσιακή οινολογική τεχνική της περιοχής, προσαρμοσμένη στις σύγχρονες τεχνολογίες,
- ωριμάζει ή και παλιώνει κάτω από ειδικές συνθήκες που αξιοποιούν και διαμορφώνουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους, έχει ξεχωριστά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και δική του προσωπικότητα που εξαρτάται από το οικοσύστημα της περιοχής

Στην Ελλάδα παράγονται 27 κρασιά Ονομασίας Προέλευσης. Όταν μια ετικέτα κρασιού αναγράφει Οίνος ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης), το περιεχόμενο υπόκειται σε σειρά υποχρεώσεων, η εκπλήρωση των οποίων ελέγχεται [7].

Στο πλαίσιο αυτής τη διπλωματικής εργασίας εξετάστηκαν δείγματα γλεύκους «Μοσχάτος Λήμνου» (Β.Δ. 502/1971, ΦΕΚ 150/Α/26-4-71). Απαραίτητες προϋποθέσεις για την παρασκευή αυτού του κρασιού είναι η λευκή ποικιλία *Μοσχάτο Αλεξανδρείας* που καλλιεργείται σε περιοχές της νήσου της Λήμνου [8].



**Σχήμα 1.2:** Λευκός ξηρός οίνος "Μοσχάτος Λήμνου" [5].

Αναφορικά με τους *επιτραπέζιους οίνους*, αυτοί χωρίζονται στις εξής τρεις κατηγορίες: στους Τοπικούς Οίνους, τα κρασιά με Ονομασία Κατά Παράδοση και τα κρασιά Μάρκας.

Τοπικοί Οίνοι: αφορούν τα κρασιά που φέρουν ένδειξη για τη Γεωγραφική προέλευση σε επίπεδο επαρχίας, νομού ή διαμερίσματος. Κατά το νομοθετικό πλαίσιο, οι Τοπικοί Οίνοι ανταποκρίνονται σε όρους παραγωγής που σχετίζονται με τις ποικιλίες οινάμπελου από τις οποίες παράγονται, τον ελάχιστο αλκοολικό τίτλο και τους τρόπους οινοποίησης των σταφυλιών.



**Σχήμα 1.3:** Επιτραπέζιοι Οίνοι [9].

Οίνοι με Ονομασία Κατά Παράδοση: παράγονται σύμφωνα με παραδοσιακές μεθόδους μιας συγκεκριμένης περιοχής ή χώρας. Είναι κρασιά των οποίων το όνομα



χρησιμοποιείται αποκλειστικά και παραδοσιακά για αυτά τα κρασιά που παράγονται σε μία και μόνο χώρα ή περιοχή της χώρας. Ένα παράδειγμα κρασιού Ονομασίας Κατά Παράδοση είναι η Ρετσίνα, το λευκό ξηρό ελληνικό κρασί που παράγεται με την προσθήκη ρετσινιού πεύκου στο γλεύκος.

Κρασιά Μάρκας: αυτά έρχονται στην αγορά με ποικίλες εμπορικές ονομασίες. Για την παραγωγή τους, σημαντικό ρόλο έχουν η τεχνολογία, ο αυστηρός ποιοτικός έλεγχος και η τέχνη του οινοποιού να δημιουργεί ένα κρασί το οποίο διατηρεί τους ίδιους πάντα χαρακτήρες, σύμφωνα με τις προτιμήσεις των καταναλωτών [10].

Κρασιά παλαίωσης: για να εκφραστεί και να αναδειχτεί ακόμα περισσότερο ο χαρακτήρας ορισμένων κρασιών αφήνονται αυτά να ωριμάσουν μέσα σε βαρέλια ή στις φιάλες τους, μια διαδικασία που ονομάζεται παλαίωση. Γι' αυτά τα κρασιά παλαίωσης υπάρχει νομοθεσία, σύμφωνα με την οποία θεσπίζονται ειδικές ενδείξεις που είναι ανάλογες με την κατηγορία στην οποία ανήκουν, καθώς και με το χρόνο και τον τρόπο παλαίωσής τους.

#### 1.1.6 Νοθεία κρασιού

Νοθεία είναι η μεταβολή της σύστασης του κρασιού με την προσθήκη συστατικών που δεν επιτρέπονται από την νομοθεσία ή σε δόσεις μεγαλύτερες από τις επιτρεπόμενες, με σκοπό κυρίως την μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και την ελάττωση του κόστους. Νοθεία στην περίπτωση του κρασιού, μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει από την προσθήκη νερού ως τη χρήση ουσιών, πιθανώς επικίνδυνες για την υγεία.

Έχουν καταγραφεί και περιπτώσεις όπου οινοποιοί δε διστάζουν να χρησιμοποιήσουν διαιθυλνογλυκόλη και τοξική μεθανόλη προκειμένου να αυξηθεί η γλυκύτητα και το αλκοόλ αντίστοιχα. Ο θειώδης ανυδρίτης προστίθεται σε αυστηρά συγκεκριμένες ποσότητες σε όλους τους εμφιαλωμένους οίνους και είναι απαραίτητο να αναγράφεται υποχρεωτικά ως ένδειξη «περιέχει θειώδη» στην ετικέτα σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία του 2005 [11].

Η προσθήκη νερού είναι μια από τις συχνότερες περιπτώσεις νοθείας. Οι αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι ήταν βάρβαρο να πιούνε ανέρωτο κρασί επειδή η μέθη τους οδηγούσε στην παραφροσύνη. Σήμερα, το νερό χρησιμοποιείται συχνά για να επιτευχθεί η ισορροπία στη γεύση ενός κρασιού από πολύ ώριμα σταφύλια. Κάποιοι, όμως, χρησιμοποιούν αυτή την τεχνική για να μειωθούν τα υψηλά επίπεδα του αλκοόλ κι έτσι ο παραγωγός να αποφύγει τους κρατικούς δασμούς και φόρους [12].

Παράνομη επίσης είναι και η προσθήκη μη επιτρεπόμενων γλυκαντικών ουσιών για την βελτίωση της γεύσης ή προσθήκη σακχάρων που δεν έχουν προέλευση το σταφύλι. Έχει καταγραφεί, ακόμη, προσθήκη βανιλίνης, που προσδίδει στο κρασί αρώματα βανίλιας και βουτύρου, χαρακτηριστικά δηλαδή που μαρτυρούν την ύπαρξη βαρελιού για να δώσουν την ψευδαίσθηση της παλαιώσης στον καταναλωτή.

Άλλες περιπτώσεις νοθείας είναι η προσθήκη οινοκυανίνης (εκχύλισμα ερυθρών χρωστικών σταφυλιού) στο λευκό κρασί για να εμφανισθεί ερυθρό και προσθήκη συντηρητικών ουσιών που εμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών [11].

Η αναγραφή, τέλος, στην ετικέτα ενός κρασιού, στοιχείων που δεν είναι αληθή είναι παραπλάνηση και θεωρείται νοθεία. Μια τέτοια περίπτωση είναι, πλαστές ετικέτες από πανάκριβα και σπάνια κρασιά να τοποθετούνται σε φιάλες με κατώτερο περιεχόμενο και στη συνέχεια να μεταπωλούνται [13].

## 1.2 ΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ

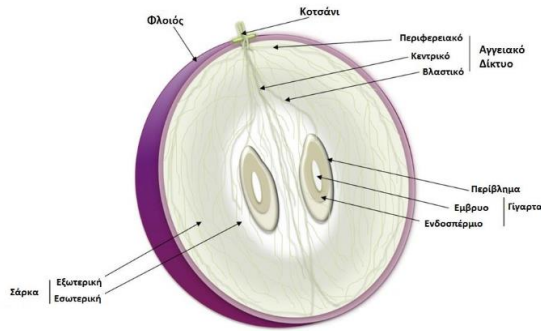
### 1.2.1 Η σύσταση του σταφυλιού

Το σταφύλι είναι ο καρπός του ξυλώδους φυτού της αμπέλου, του γένους *Vitis*. Το σταφύλι από το είδος *Vitis vinifera* είναι αυτό που κατά κύριο λόγο αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή κρασιού σε παγκόσμιο επίπεδο [13].

Ο βότρυς του σταφυλιού (τσαμπί) αποτελείται από:

- Το ξυλώδες μέρος που ονομάζεται βόστρυχας, κοινώς κοτσάνι ή τσάμπουρο και
- τις ράγες ή αλλιώς ρόγες, που είναι και το εδάδιμο και οινοποιήσιμο κομμάτι του σταφυλιού.

Η επί τοις % αναλογία των δύο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή αλλά εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η ποικιλία, οι κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, ο χρόνος του τρυγητού.



**Σχήμα 1.4:** Τα βασικά μέρη της ράγας του σταφυλιού [14]

Ο βότρυς αποτελείται από τον κύριο άξονα (ράχη) από τον οποίο ξεκινούν δευτερεύουσες και τριτεύουσες διακλαδώσεις. Από τις τελευταίες διακλαδώσεις εκφύονται 2-5 μίσχοι (ποδίσκοι), στην άκρη των οποίων βρίσκεται ο καρπός (ράγα) της σταφυλής. Το μέγεθος που θα αποκτήσει η σταφυλή εξαρτάται από το τελικό μέγεθος του βόστρυχα (κοτσανιού). Ο βόστρυχας αποκτά το τελικό του μέγεθος κατά την έναρξη της ωρίμανσης των ραγών.

Κατά μέσο όρο, η σύνθεση του σταφυλιού κυμαίνεται στις παρακάτω αναλογίες:

- ✓ Βόστρυχοι 3-7 % κ.β. και 30 % κ.ο.
- ✓ Ράγες 93-97 % κ.β. και 70 % κ.ο.

Οι βόστρυχοι περιέχουν κυρίως νερό σε ποσοστό έως και 90% κ.β. αρχικά, αλλά στη συνέχεια κατά την ξυλοποίηση το ποσοστό αυτό μειώνεται σε 70-80%, ενώ παράλληλα αυξάνεται το ποσοστό ξηρής ουσίας (φτάνει στο 25-30%). Το μεγαλύτερο μέρος της ξηράς ουσίας αποτελείται από τις ξυλώδεις ουσίες (μέχρι 15%), ενώ το υπόλοιπο από τις ουσίες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1 [8].

**Πίνακας 1.1:** Συστατικά που περιέχονται στους βόστρυχους εκτός των ξυλωδών ιστών και η περιεκτικότητά τους [14].

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΟΥΣ ΒΟΣΤΡΥΧΟΥΣ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ % Κ.Β
ΡΗΤΙΝΕΣ	1%
ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	2,5%
ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	5-6%

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ	1-3%
ΆΛΑΤΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	2-3%

Η χημική σύσταση του βόστρυχα προσομοιάζει αυτή του φύλλου. Η περιεκτικότητα των βοστρύχων σε νερό, ταννίνες και ανόργανα άλατα επηρεάζουν το κρασί που θα παραχθεί, κυρίως κατά την ερυθρή οινοποίηση, όπου η ζύμωση του γλεύκους γίνεται παρουσία των στέμφυλων.

Η ράγα αποτελείται από τα παρακάτω μέρη:

- Τον φλοιό (σε ποσοστό 10-20 % κ.β.)
- Τη σάρκα (σε ποσοστό 74-87 % κ.β.)
- Τα γίγαρτα σε ποσοστό 3-6 % κ.β. (τα οποία όμως κάποιες φορές απουσιάζουν εντελώς).

Ο φλοιός αποτελείται από την επιδερμίδα και την υποδερμίδα. Η επιδερμίδα αποτελείται από μια-δυο στιβάδες λεπτών πεπλατυσμένων κυττάρων με παχίες και ανθεκτικές μεμβράνες (Κουράκου, 1998). Το εξωτερικό τοίχωμα των κυττάρων της επιδερμίδας λέγεται εφυμενίδα. Στα χυμοτόπια αυτών των κυττάρων βρίσκονται οι ανθοκυάνες. Ο φλοιός περιέχει ελάχιστη ποσότητα σακχάρων και είναι πλούσιος σε αδιάλυτες πηκτίνες, σε κυτταρίνη και σε πρωτεΐνες. Το μηλικό και τρυγικό οξύ βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ το κιτρικό οξύ υπερέχει ποσοτικά σε σχέση με τα άλλα οξέα.

**Πίνακας 1.2:** Η περιεκτικότητα των συστατικών του φλοιού της ράγας των σταφυλιών [14].

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΦΛΟΙΩΝ	% Κ.Β. ΣΥΣΤΑΣΗ
ΝΕΡΟ	75-80 %
TANNINES	1-2 %
ΌΞΙΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	1-1,5 %
ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	1,5-2 %

ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	1,5-2 %
ΛΟΙΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	10-15 %

Η *σάρκα* είναι εκείνο το τμήμα της ράγας, στο οποίο περιέχεται αποκλειστικά σχεδόν ο χυμός του σταφυλιού, ο οποίος με κατάλληλη επεξεργασία θα αποτελέσει το προς οινοποίηση γλεύκος. Γι' αυτό η χημική σύσταση του γλεύκους είναι κατά κύριο λόγο ίδια με αυτή του κρασιού [15]. Η *σάρκα* αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο και περικλείει τα γίγαρτα. Τα κυριότερα συστατικά της σάρκας είναι τα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα. Η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι υψηλότερη στο μεσοκάρπιο και σε οξέα στο ενδοκάρπιο.

Το *γίγαρτο* είναι ο σπόρος της αμπέλου. Κάθε ράγα μπορεί να περιέχει από 1-4 γίγαρτα (εκτός από τις αγίγαρτες ποικιλίες). Κάθε γίγαρτο είναι πλούσιο σε ελαιώδεις ουσίες (που υποβαθμίζουν το κρασί σε περίπτωση που διαλυθούν στο γλεύκος), φαινολικά παράγωγα και ταννίνες.

**Πίνακας 1.3:** Περιεκτικότητα των συστατικών των γιγάρτων της ράγας του σταφυλιού [14].

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΓΙΓΑΡΤΩΝ	% Κ.Β. ΣΥΣΤΑΣΗ
ΝΕΡΟ	25-45 %
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ	34-36 %
ΕΛΑΙΩΔΗΣ ΟΥΣΙΕΣ	13-20 %
ΤΑΝΝΙΝΕΣ	4-6 %
ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	4-6,5 %
ΑΝΟΡΓΑΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	2-4 %
ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	1 %

### 1.2.2 Ωρίμανση του σταφυλιού

Ιδανικά, το αμπέλι θα ήταν επιθυμητό να δίνει από μόνο του μικρή παραγωγή καλά ώριμων σταφυλιών (μικρή παραγωγή για να επιτευχθεί αύξηση της σχέσης στερεών

προς το χυμό της ρόγας). Κατά την πρώτη περίοδο, όπου σχηματίζεται ο καρπός, η ράγα είναι πράσινη εξαιτίας της χλωροφύλλης που περιέχει, ενώ η σάρκα σκληρή και συνεκτική. Ο καρπός είναι μικρός και συμπεριφέρεται σαν ένα είδος φύλλου, παράγοντας σάκχαρα, άμυλο, οξέα, φαινολικά συστατικά. Κατά την δεύτερη περίοδο (περκασμός), η ράγα αλλάζει χρώμα, διογκώνεται και γίνεται πιο ελαστική και τα κουκούτσια αλλάζουν όψη. Επίσης, οι ράγες αρχίζουν να αποκτούν χρώμα (οι ερυθρές και λευκές χρωστικές εμφανίζονται στις ράγες των ερυθρών και λευκών ποικιλιών αντίστοιχα).

Κατά την περίοδο της ωρίμανσης, που ξεκινά από την αλλαγή του χρώματος της ρόγας, μειώνεται η οξύτητα και αυξάνεται η περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Πιο συγκεκριμένα, αυξάνεται η φρουκτόζη, μειώνεται η γλυκόζη και η σχέση γλυκόζης προς φρουκτόζη φτάνει κοντά στο 0,95 [16].

Η περίοδος αυτή διαρκεί 40-50 ημέρες. Η ρόγα αυξάνει σε μέγεθος και μαλακώνει.

Ο καρπός του σταφυλιού φτάνει στη βιολογική ωρίμανση, όταν τα κουκούτσια αποκτήσουν την ικανότητα να βλαστήσουν.

Ανάλογα με το κρασί που θέλει κανείς να παράγει και την ομάδα των συστατικών που στοχεύει, υπάρχουν διάφορες θεωρίες που καθορίζουν αν το σταφύλι έχει ωριμάσει ή όχι. *Βιομηχανική ωρίμανση* ορίζεται ως η χρονική στιγμή που η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι η μέγιστη. Σε θερμές περιοχές, όπου επιδιώκονται υψηλές περιεκτικότητες σε οξέα ο τρύγος ξεκινάει πρώιμα (πριν τα σάκχαρα φτάσουν στο μέγιστο), ενώ σε ψυχρές περιοχές συχνά τρυγίζουν όψιμα, με σκοπό να επιτευχθεί συμπύκνωση των σακχάρων από τη μερική εξάτμιση του νερού της ρόγας και μείωση της οξύτητας από τη μερική καύση του μηλικού οξέος. Αυτή είναι η *τεχνολογική ωρίμανση* (η περίοδος συγκομιδής ορίζεται από τον υπεύθυνο, ανάλογα με το κρασί που πρόκειται να παραχθεί). Τέλος, υπάρχει ωρίμανση που γίνεται με βάση την περιεκτικότητα των φαινολικών συστατικών ή και των αρωματικών.

### *Έναρξη τρύγου*

Τα σταφύλια όσο ωριμάζουν αποκτούν χρώμα και γλυκύτητα. Η εποχή του τρύγου ορίζεται όταν τα σταφύλια αποκτήσουν το επιθυμητό χρώμα, άρωμα καθώς και την κατάλληλη αναλογία σε σάκχαρα και οξέα. Με άλλα λόγια, πρόκειται για την τεχνολογική ωριμότητα που αντιστοιχεί στη στιγμή κατά την οποία το σταφύλι μιας ποικιλίας δίνει γλεύκος, του οποίου η χημική σύσταση είναι κατάλληλη για τον τύπο

του κρασιού που πρόκειται να παρασκευασθεί. Για το λόγο αυτό γίνονται συνεχείς έλεγχοι σε αντιπροσωπευτικά δείγματα σταφυλιών κατά την περίοδο της ωριμότητας. Η εποχή του τρύγου είναι συνήθως ο Σεπτέμβριος, ο μήνας τρυγητής. Επειδή βασικός παράγοντας της ποιότητας του κρασιού είναι η ποιότητα του σταφυλιού, είναι καθοριστικής σημασίας οι άνθρωποι που πραγματοποιούν τον τρύγο να συλλέγουν μόνο τα σταφύλια που μακροσκοπικά δεν έχουν ίχνη αλλοιώσεων.

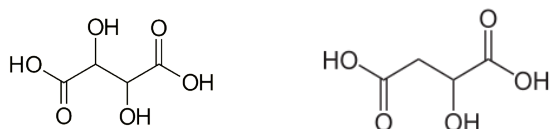
### 1.2.3 Εξέλιξη των συστατικών του σταφυλιού κατά την ωρίμανση

#### *Σάκχαρα*

Η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που είναι τα κύρια σάκχαρα του σταφυλιού, σχηματίζονται κατά τη φωτοσύνθεση που γίνεται στα πράσινα μέρη του φυτού και κυρίως στα φύλλα. Η περιεκτικότητά τους ποικίλλει ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσης και την ποικιλία. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται στα 150-250 g/L. Τα άλλα σάκχαρα υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες.

#### *Οργανικά οξέα*

Τα κυριότερα οξέα του σταφυλιού που είναι το τρυγικό και το μηλικό οξύ παράγονται από τη γλυκόζη στις ρίζες και στα φύλλα. Η εξέλιξή τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και σχετίζεται με τα αναπνευστικά φαινόμενα της ρόγας. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30° C το τρυγικό οξύ μειώνεται, ενώ το μηλικό οξύ μειώνεται σε θερμοκρασίες λίγο χαμηλότερες (20-30° C). Καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης το μηλικό οξύ μειώνεται, μείωση που είναι γρήγορη στα πρώτα στάδια και αργή στο τελευταίο. Το τρυγικό οξύ ελαττώνεται με ανώμαλο τρόπο, ανάλογα με τη θερμοκρασία και τις βροχοπτώσεις. Η σχέση τρυγικού προς μηλικού οξέος είναι μεγαλύτερη της μονάδας κατά την περίοδο της ωρίμανσης. Η περιεκτικότητά σε κιτρικό οξύ είναι σταθερή, ωστόσο, κατά την ωρίμανση.



**Σχήμα 1.5:** δομή τρυγικού οξέος (αριστερά) και μηλικού οξέος (δεξιά)

### *Ανόργανα συστατικά*

Τα ανόργανα συστατικά προκύπτουν από το έδαφος και η περιεκτικότητά τους αυξάνει από την περίοδο αλλαγής του χρώματος της ρόγας μέχρι την ωρίμανση.

### *Φαινολικά συστατικά (ανθοκυάνες, ταννίνες)*

Οι ανθοκυάνες σχηματίζονται στη ρόγα κατά την περίοδο αλλαγής του χρώματος. Στη φλούδα παρατηρείται φυσιολογική αύξηση κατά την περίοδο της ωρίμανσης που φτάνει στο μέγιστο πριν από την ωρίμανση των σταφυλιών. Η περιεκτικότητα της φλούδας σε ταννίνες είναι σταθερή στην περίοδο που αλλάζει το χρώμα της ρόγας και αυξομειώνεται κατά την ωρίμανση, γεγονός που οφείλεται στις μεταβολές στην ηλιοφάνεια και τη θερμοκρασία.

#### 1.2.4 Ωρίμανση από αμπελουργική σκοπιά

Οι κατάλληλες για οινοποίηση ποικιλίες σταφυλιών χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογο με την περίοδο ωρίμανσης: τις πρώιμες, τις μεσοπρώιμες και τις όψιμες. Για να επιτευχθεί η μέγιστη ποιότητα κρασιού χρησιμοποιούνται όσο το δυνατό πιο όψιμες ποικιλίες. Ανάλογο με τις κλιματολογικές συνθήκες κάθε περιοχής γίνεται η επιλογή των κατάλληλων ποικιλιών.

### *Υπερωρίμανση*

Αποτελεί την περίοδο μετά την πλήρη ωρίμανση, κατά τη διάρκεια της οποίας δεν γίνονται ανταλλαγές συστατικών της ρόγας με το υπόλοιπο φυτό, χάνεται νερό και συμπυκνώνεται ο χυμός της ρόγας.

Η υπερωρίμανση κατηγοριοποιείται σε φυσική, τεχνητή και βιολογική.

#### ○ Φυσική υπερωρίμανση

Γίνεται με την επίδραση του ήλιου. Το σταφύλι (σταφυλή, τσαμπί, βότρυς) αφήνεται όσο το δυνατό πάνω στο κλίμα, τσακίζοντας το κοτσάνι του σταφυλιού, για να εμποδιστεί η επικοινωνία με το υπόλοιπο φυτό. Αυτό γίνεται συνήθως, σε θερμές περιοχές, χωρίς πολλή υγρασία (η υγρασία αποτελεί αιτία σαπίσματος). Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται αύξηση των σακχάρων κατά 10-15%. Σε κάποιες περιοχές, η έκθεση στον ήλιο γίνεται αφού πρώτα κοπούν τα σταφύλια και απλωθούν σε χώρους κατάλληλα διαμορφωμένους για το σκοπό αυτό.

#### ○ Τεχνητή υπερωρίμανση

Στη τεχνητή υπερωρίμανση χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι μηχανημάτων. Θερμοκρασία κάτω των 45 °C προκαλεί υπερωρίμανση, ενώ σε θερμοκρασία



μεγαλύτερη των 50 °C προκαλείται αύξηση των σακχάρων και των οξέων λόγω συμπύκνωσης.


- ο Βιολογική υπερωρίμανση

Πραγματοποιείται με τη δράση του μύκητα *Botrytis cinerea*, που αναπτύσσεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες πάνω στη ρόγα κατά το τέλος της περιόδου ωρίμανσης. Δημιουργούνται αρχικά κηλίδες, εστίες μυκήτων, από τις οποίες οι μύκητες διεισδύουν στη φλούδα και σχηματίζουν ένα ενδοκυτταρικό μυκήλιο στο πρώτο στρώμα κυττάρων. Έτσι η ρόγα τυλίγεται όλη και αλλάζει χρώμα. Η χαμηλή υγρασία και η υψηλή θερμοκρασία την περίοδο αυτή προκαλεί αποξήρανση της ρόγας (ευγενή σήψη). Αυτό μπορεί να συμβεί σε ελάχιστα μέρη του κόσμου όπου η υγρασία, που βοηθά στην ανάπτυξη του μύκητα, οφείλεται σε πρωινή ομίχλη κι όχι βροχή [13].

### 1.3 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

#### 1.3.1 Από το πιεστήριο στο κελάρι

Μετά τον τρύγο αναλαμβάνει ο οινοποιός να μετατρέψει το σταφύλι στο κρασί [4].

-  Λευκή οινοποίηση

Τα λευκά κρασιά φτιάχνονται κατά κύριο λόγο από λευκά σταφύλια. Η αρχή της οινοποίησης των λευκών, η οποία μπορεί να έχει διάφορες παραλλαγές, στηρίζεται στη ζύμωση του καθαρού χυμού σταφυλιού, χωρίς να γίνεται συνήθως αλκοολική εκχύλιση των στερεών τμημάτων των καρπών (στέμφυλων). Αυτό πραγματοποιείται χάρη στη γρήγορη εξαγωγή του γλεύκους από τα σταφύλια με τη χρήση πιεστηρίων. Στη συνέχεια το γλεύκος διαχωρίζεται σε κλάσματα πριν ξεκινήσει η ζύμωση.

Η διαδικασία από την αρχή έχει ως εξής:

Το σταφύλι από τη στιγμή που θα κοπεί από το φυτό είναι απαραίτητο να μεταφερθεί γρήγορα και ανέπαφα, προκειμένου να αποφευχθούν οι διάφορες χημικές και βιολογικές μεταβολές, όπως η οξειδωση (αποτέλεσμα της δράσης ενζύμων παρουσία οξυγόνου που οδηγεί σε εμφάνιση καφετί αποχρώσεων στο γλεύκος). Τοποθετούνται σε υποδοχείς, όπως πλαστικά τελάρα με ανοίγματα (για να επιτρέπεται η κυκλοφορία του αέρα και να αναπνέουν) και κασονάκια και ύστερα μεταφέρονται στο οινοποιείο σε διατάξεις υποδοχής σταφυλιών (σταφυλοδόχος), κατασκευές από ανοξείδωτο χάλυβα σχήματος V. Στη συνέχεια οδηγούνται με πτώση στον απορραγιστήρα - σπαστήρα για τον απορραγισμό και σπάσιμο τους (έκθλιψη) και τελικά υπό μορφή σταφυλοπολλτού οδηγούνται στο πιεστήριο με τη βοήθεια αντλίας. Η μεταφορά αυτή

μπορεί να γίνει απευθείας, πλέον, χωρίς τον σταφυλοδόχο με τη βοήθεια μεταφορικής ταινίας.

#### *Επιδερμική εκχύλιση*

Η επιδερμική ή προζυμωτική εκχύλιση χρησιμοποιείται σε ορισμένες μόνο ποικιλίες για την εξαγωγή των μέγιστων των αρωμάτων από τις φλούδες των καρπών. Έτσι, ο οινοποιός αφήνει τα συνθλιμμένα σταφύλια να μουσκέψουν εν ψυχρώ για λίγες ώρες σε μια δεξαμενή. Η τεχνική αυτή έχει, όμως, το μειονέκτημα να σκουραίνει το χρώμα του εμφιαλωμένου κρασιού μετά από λίγα χρόνια, γι' αυτό και αποφεύγεται.

#### *Πίεση*

Στα πιεστήρια γίνεται συμπίεση των σταφυλιών με σκοπό την παραλαβή του χυμού της ράγας. Στην οινοποίηση των λευκών σταφυλιών, η πίεση είναι μία από τις πιο δύσκολες ενέργειες και η διάρκειά της είναι αρκετά σύντομη. Η μάζα του γλεύκους, που είναι σε ημίρευστη μορφή, πρέπει να διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία για να αποφευχθεί πρόωμη έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (αυτή πραγματοποιείται μόνο σε θερμοκρασίες 12-36 °C).

#### *Φυγοκεντρική διαύγαση ή Σταθεροποίηση*

Το γλεύκος όταν βγαίνει από το πιεστήριο περιέχει στερεά κατάλοιπα, τα οποία και πρέπει να αφαιρεθούν. Γι' αυτό, κατόπιν περνάει συνήθως από συσκευή φυγοκέντρισης, η οποία κατηγορείται ότι αποδυναμώνει το κρασί που θα προκύψει και πλέον η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις που παράγουν μεγάλο όγκο κρασιών.

Η άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η σταθεροποίηση με ψύχος (οριακά 0°C) έχει το πλεονέκτημα ότι με αυτήν το γλεύκος προστατεύεται όσο τα στερεά κατάλοιπα πέφτουν με φυσικό τρόπο στον πάτο της δεξαμενής.

#### *Θείωση*

Στο σημείο αυτό, γίνεται θείωση, δηλαδή προσθήκη διοξειδίου του θείου στο γλεύκος για να αποφευχθεί η οξείδωση και να εξουδετερωθεί οποιαδήποτε ανάπτυξη μικροοργανισμού. Πρέπει να δίνεται προσοχή, όμως, γιατί σε περίπτωση κατάχρησης καλύπτονται τα αρώματα του κρασιού από το δυσάρεστο άρωμα του θείου.

#### *Η αλκοολική ζύμωση*

Το γλεύκος, ύστερα, οδηγείται σε δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα, που είναι θερμορρυθμιζόμενες, και πραγματοποιείται αργά η ζύμωση σε θερμοκρασία 12-15 °C. Κάποιες φορές γίνεται χρήση ζυμομυκήτων, για την επιτάχυνση της ζύμωσης.



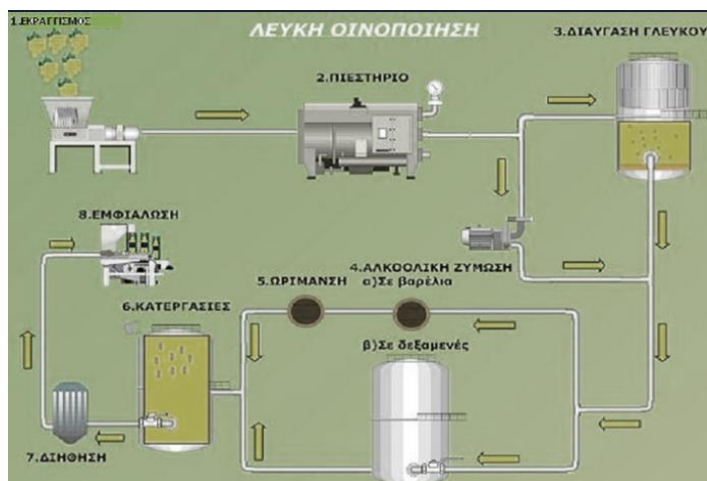
**Σχήμα 1.6:** Αντίδραση αλκοολικής ζύμωσης

### Μηλογαλακτική ζύμωση

Η μηλογαλακτική ζύμωση δεν είναι υποχρεωτική για τα λευκά κρασιά και ο οινοποιός για να την αποφύγει, επεξεργάζεται το κρασί κάνοντας ελαφρώς θείωση ή φυγοκέντριση ή μικροφιλτράρισμα του κρασιού, προκειμένου να εξαλείψει τα βακτήρια που την προκαλούν.

### Λαμπικάρισμα

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης μεταγγίζεται το κρασί από τη δεξαμενή και αφήνονται οι οινολάσπες στον πάτο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται λαμπικάρισμα και επαναλαμβάνεται πολλές φορές κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και σε κάποιες περιοχές αφήνεται το κρασί μαζί με τις οινολάσπες μέχρι την εμφιάλωσή του προκειμένου να τροποποιήσουν γευστικά το λευκό κρασί.



**Σχήμα 1.7:** Συνοπτικά η διαδικασία της λευκής οινοποίησης[17]

### ✚ Ερυθρή οινοποίηση

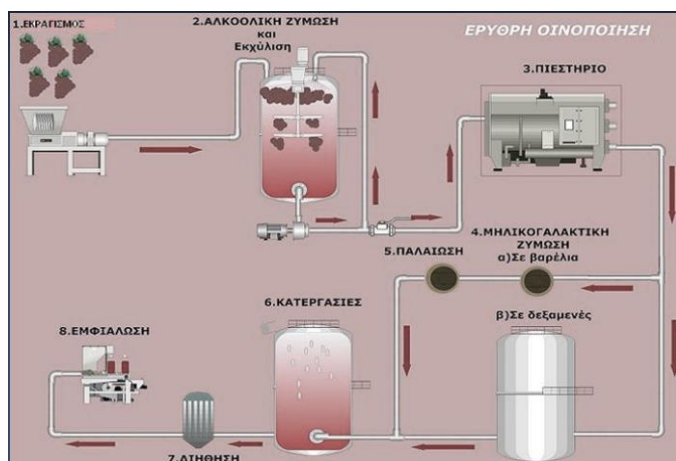
Η ερυθρή οινοποίηση διαθέτει πολλές παραλλαγές ανάλογα με την αμπελοοινική περιοχή και είναι πιο εύκολη από την λευκή οινοποίηση. Η ιδιαιτερότητά της βασίζεται στην εκχύλιση. Στο στάδιο αυτό, η χρωστική ύλη, οι ταννίνες και τα αρωματικά συστατικά που περιέχονται στα στερεά μέρη του σταφυλιού, περνούν στο γλεύκος με εκχύλιση. Έτσι, το κρασί αποκτά το χρώμα και το χαρακτήρα του.

Αρχικά, τα κόκκινα σταφύλια συνθλίβονται και εκραγίζονται και σχηματίζεται το γλεύκος. Αυτή η μάζα των πολτοποιημένων σταφυλιών οδηγείται σε δεξαμενές θερμορρυθμιζόμενες από ανοξείδωτο χάλυβα ή και ξύλο. Τα στερεά μέρη συγκεντρώνονται στο πάνω μέρος της δεξαμενής και σχηματίζουν το «καπέλο». Κατά

την εκχύλιση που πραγματοποιείται παράλληλα με την αλκοολική ζύμωση οι χρωστικές ουσίες και τα υπόλοιπα συστατικά θα διαλυθούν στο γλεύκος. Η εκχύλιση και η ζύμωση πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 30°C περίπου. Για τη διευκόλυνση της εκχύλισης χρησιμοποιούνται δύο τεχνικές: παρακέντηση ή ανακύκλωση. Η παρακέντηση πραγματοποιείται βυθίζοντας το «καπέλο» μέσα στο γλεύκος με τη χρήση ράβδου. Στην ανακύκλωση απ'την άλλη βυθίζεται το καπέλο και γίνεται ελαφριά ανακύκλωση του γλεύκους από τον πάτο της δεξαμενής με αποτέλεσμα να διαβρέχεται το καπέλο με τα στερεά κατάλοιπα.

Ανάλογα με το είδος του κρασιού που επιθυμείται να παραχθεί, η διάρκεια ζύμωσης στις δεξαμενές μπορεί να είναι από λίγες μέρες έως τρεις εβδομάδες. Όταν ο οινοποιός θεωρήσει ότι η εκχύλιση έχει φτάσει στο σημείο που κρίνει ιδανικό, κάνει διαχωρισμό του γλεύκους από τα στέμφυλα. Ανοίγει τη στρόφιγγα που βρίσκεται στο κάτω μέρος τη δεξαμενής προκειμένου να διαφύγει το ρευστό μέρος. Ο οίνος που προκύπτει από αυτό τον διαχωρισμό ονομάζεται οίνος από πρόρρωγο. Κατόπιν, τα στέμφυλα και οι οινολάσπες που περιέχουν ακόμα υγρό, πατιούνται για να εξαχθεί το γλεύκος που απομένει. Ο οίνος που προκύπτει μ'αυτόν τον τρόπο ονομάζεται οίνος πίεσης. Οι δύο αυτοί τύποι οίνου τοποθετούνται σε άλλες δεξαμενές.

Την αλκοολική ζύμωση διαδέχεται η μηλογαλακτική ζύμωση. Είναι δε τόσο σημαντική για την εξέλιξη των ερυθρών κρασιών ώστε αν δεν εκδηλωθεί από μόνη της, ο οινοποιός προσπαθεί να την προκαλέσει.



Σχήμα 1.8: Συνοπτικά η διαδικασία της ερυθρής οινοποίησης[17].

#### 1.4 ΘΟΛΩΜΑΤΑ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ

Στο κρασί δημιουργούνται θολώματα και προκαλείται καταβύθιση διαφόρων ενώσεων όπως των χρωστικών στα ερυθρά κρασιά, που οφείλονται στην ένωση των χρωστικών με πρωτεΐνες, στην υδρόλυση των χρωστικών και στην ένωση των

χρωστικών με ακεταλδεΐδη. Καταβύθιση μπορεί, επίσης, να προκληθεί από τη δράση οξειδωτικών ενζύμων, όπως της λακάσης που προέρχεται από τη δράση του *Botrytis cinerea* (προκαλεί το σάπισμα στη ρόγα του σταφυλιού). Ακόμη, γίνεται καταβύθιση πρωτεϊνών στα λευκά κρασιά, στα οποία δεν έχει προηγηθεί αφαίρεση τους με μπετονίτη, καθώς με τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων που βρίσκονται στο κρασί, οι πρωτεΐνες δίνουν αμινοξέα και εξαφανίζονται. Το ίζημα περιέχει 50-80% πρωτεΐνες, 1-15% τέφρα και προσροφημένες φαινόλες.

Επιπλέον, καταβύθιση υφίστανται και τα τρυγικά άλατα καλίου και ασβεστίου σε κρασιά που εμφιαλώθηκαν νωρίς και χωρίς να υποστούν την κατάλληλη επεξεργασία. Ιζήματα από ενώσεις μεταλλικών ιόντων σιδήρου και χαλκού (θολώματα χαλκού έχουμε μόνο στα λευκά κρασιά).

Οι κατεργασίες που γίνονται για την προστασία του κρασιού από θολώματα είναι (Τσακίρης 2018):

- ✓ Θέρμανση
- ✓ Ψύξη
- ✓ Τρυγική σταθεροποίηση με καταβύθιση του όξινου τρυγικού καλίου μετά από ψύξη ή με κατιοανταλλακτικές ρητίνες
- ✓ Προσθήκη σιδηροκυανιούχου καλίου
- ✓ Αποσιδήρωση
- ✓ Κατεργασία με μπετονίτη

Οι κατεργασίες διαύγασης είναι:

- Φυγοκέντριση: αυξάνεται η ταχύτητα πτώσης των σωματιδίων που αιωρούνται στο κρασί
- Διαύγαση με προσθήκη ουσιών: προστίθεται κόλλα (ζελατίνη, καζεΐνη) σε ένα θολό κρασί για να κροκιδωθεί και να καταβυθιστεί συμπαρασύροντας τα σωματίδια που αιωρούνται
- Διήθηση για το διαχωρισμό της στερεής και υγρής φάσης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

### 2.1 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Με την αλκοολική ζύμωση ο χυμός από τα σταφύλια γίνεται κρασί. Η ζύμωση είναι μια καθαρά φυσική διαδικασία, αλλά είναι και αρκετά πολύπλοκη χημική αντίδραση. Αυτή προκαλείται από τις ζύμες (μονοκύτταρους οργανισμούς που βρίσκονται στη φλούδα του σταφυλιού), που έχουν πλέον περάσει στο σταφυλοπολτό. Τα σάκχαρα που περιέχονται στο εσωτερικό του καρπού έρχονται σε επαφή με τους ζυμομύκητες και η ζύμωση ξεκινά. Η κυριότερη δουλειά τους είναι να μετατρέψουν τα σάκχαρα του σταφυλιού σε αιθανόλη. Ταυτόχρονα απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα που δημιουργεί φυσαλίδες. Αυτές ανεβάζουν τους φλοιούς στην επιφάνεια των δεξαμενών όπου σχηματίζουν πυκνό «καπέλο» [16].

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης αυξάνεται η θερμοκρασία, γιατί οι ζύμες επίσης παράγουν ενέργεια. Όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 12°C τότε το γλεύκος υφίσταται ζύμωση. Όταν οι ζυμομύκητες μετατρέψουν όλα τα σάκχαρα σε αλκοόλη, τότε η ζύμωση σταματά. Αν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος δεν είναι η κατάλληλη τότε οι ζυμομύκητες μπορούν να σταματήσουν τη δράση τους πριν μετατρέψουν τα σάκχαρα.

Η αλκοολική ζύμωση, γενικά, ολοκληρώνεται στις 2-3 εβδομάδες. Σε εκείνη τη φάση το κρασί είναι πολύ θολό, καθώς είναι γεμάτο με οινολάσπες που εξακολουθούν να αιωρούνται χάρη στην παρουσία του ανθρακικού οξέος.

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που δρουν στην αλκοολική ζύμωση είναι μύκητες της κλάσεως των ασκομυκήτων του γένους των σακχαρομυκήτων. Τα κυριότερα είδη που συναντώνται στην παραγωγή οίνου είναι:

- Σακχαρομύκητας ο ελλειψοειδής (*Sacharomyces ellipsoideus*). Παράγει το μεγαλύτερο ποσό της αλκοόλης και είναι ο πιο ανθεκτικός σ' αυτήν.
- Σακχαρομύκητας ο βραχυαίχμος (*S. apiculata*)
- Σακχαρομύκητας ο παστεριανός (*S. pastorianus*)

Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του γλεύκους. Σε χαμηλές θερμοκρασίες οι ζυμομύκητες εργάζονται αργά, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 35 °C, αδρανοποιούνται. Καταλληλότερη θερμοκρασία διεξαγωγής της

ζύμωσης είναι 20-30 °C. Η ζύμη μπορεί να ζει και να δρα παρουσία, αλλά κι απουσία οξυγόνου.

Τα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι:

- Αιθυλική αλκοόλη (οινόπνευμα). Είναι ο κύριος παράγοντας συντήρησης των οίνων.
- Διοξείδιο του άνθρακα
- Γλυκερόλη (κάνει το κρασί παχύρευστο),
- μονοσθενείς αλκοόλες,
- λιπαρά οξέα,
- οργανικά οξέα,
- αλδεΐδες και λοιπά προϊόντα.

## 2.2 ΜΗΛΟΓΑΛΑΚΤΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

Τα σταφύλια γενικά περιέχουν μηλικό οξύ (μεγαλύτερη περιεκτικότητα έχουν τα πράσινα σταφύλια). Αφού σταματήσει η αλκοολική ζύμωση, το μηλικό οξύ μετατρέπεται με τη βοήθεια της δράσης των γαλακτικών βακτηρίων, σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτή η μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ επιδιώκεται συστηματικά για τη δημιουργία ενός ποιοτικού κόκκινου κρασιού και κάποιων ελάχιστων λευκών. Για να πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση πρέπει η θερμοκρασία να είναι στους 20 °C.



Σχήμα 2.1: Αντίδραση μηλογαλακτικής ζύμωσης

## 2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι ζυμομύκητες για να τραφούν και να συντηρηθούν, χρειάζονται κάποια απαραίτητα συστατικά (για παράδειγμα στοιχεία όπως το υδρογόνο, ο άνθρακας, το οξυγόνο, το άζωτο, θείο, κάλιο, μαγνήσιο, φωσφόρος ασβέστιο και σίδηρος) και σχετική υγρασία 90-95% (Τσακίρης, 2017).

Οι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των ζυμών και την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης είναι:

- Η δράση του οξυγόνου. Ζύμωση με απουσία αέρα, με αερισμό τη 2<sup>η</sup>-3<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης οδηγεί στο διπλασιασμό του πληθυσμού των ζυμών και την ενεργοποίηση της ζύμωσης.
- Χημικοί δραστηριοποιητές. Ως χημικοί δραστηριοποιητές μπορούν να δράσουν αζωτούχες ενώσεις (πχ θειικό αμμώνιο) και σε δόσεις που προβλέπονται από την νομοθεσία προστίθενται στο γλεύκος με σκοπό την ανάπτυξη των ζυμών.
- Θερμοκρασία και pH. Όσο πιο χαμηλή η θερμοκρασία ζύμωσης, τόσο πιο πολύ ευνοείται ο σχηματισμός των δευτερευόντων προϊόντων της ζύμωσης και άρα τόσο πιο πλούσιο είναι το άρωμα των κρασιών. Επίσης, οι ζύμες αναπτύσσονται σε pH 2-7 με βέλτιστες τις τιμές 4-5.

## **2.4 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΕΣ**

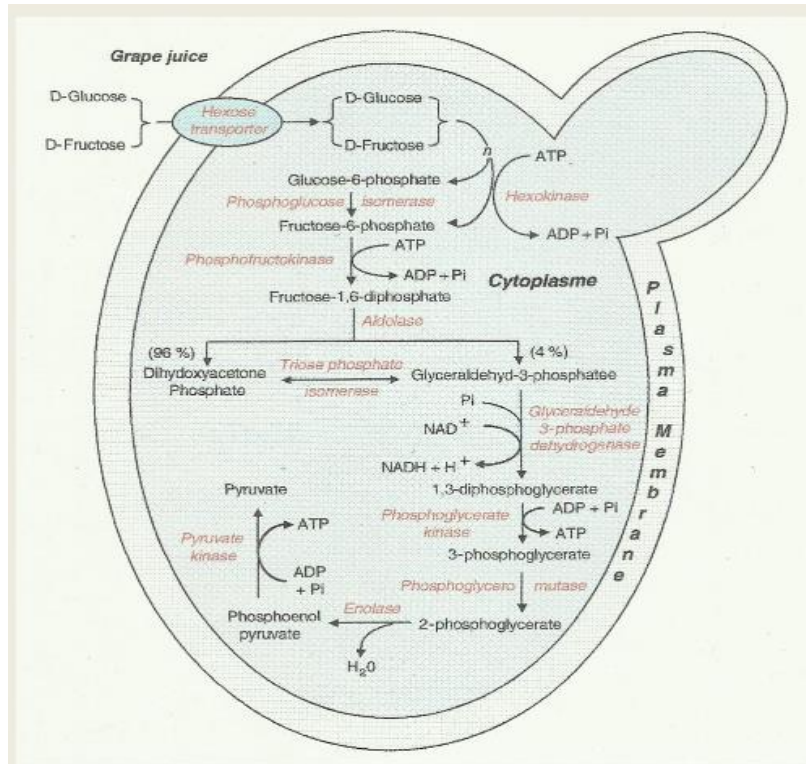
### *Γλυκόλυση*

Γλυκόλυση είναι ένα σύνολο αντιδράσεων όπου ουσιαστικά μεταβολίζεται ένα μόριο γλυκόζης (ή και φρουκτόζης) σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος με ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων ATP. Αυτή η πορεία δεν χρειάζεται οξυγόνο, είναι δηλαδή αναερόβια. Παρουσία οξυγόνου το πυροσταφυλικό μεταβολίζεται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό.

### *Αναερόβια μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος*

Στην αναερόβια περίπτωση το πυροσταφυλικό οξύ δεν οξειδώνεται μέσω των αντιδράσεων του κύκλου του Krebs. Λειτουργεί ως δέκτης για να προσλάβει το υδρογόνο που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης υπό μορφή NADH<sub>2</sub>, οπότε και ανάγεται σε γαλακτικό οξύ (ομογαλακτική ζύμωση) ή σε αιθανόλη με αποκαρβοξυλίωση. Στην περίπτωση που τα δύο υδρογόνα χρησιμοποιούνται αλλού το πυροσταφυλικό δεν ανάγεται οπότε δίνει κι ένα πλήθος δευτερευόντων προϊόντων.

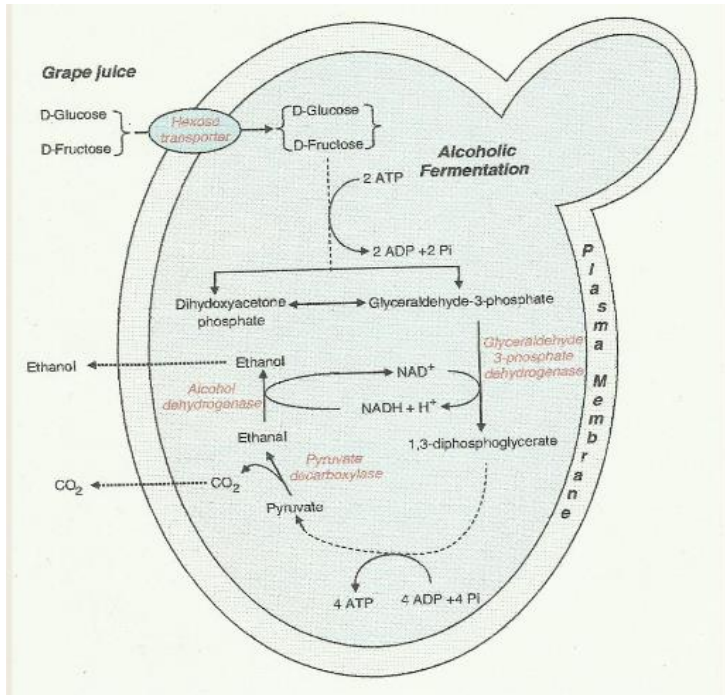




Σχήμα 2.2: Βιοχημικός μηχανισμός της γλυκόλυσης [18].

### Αλκοολική ζύμωση

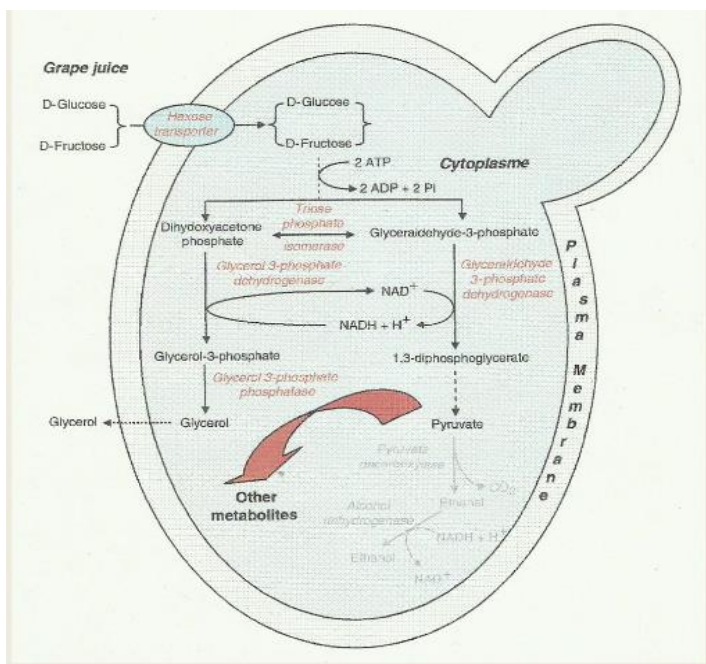
Κατά την αλκοολική ζύμωση σχηματίζονται δύο μόρια ATP και ελευθερώνονται υπό τη μορφή θερμότητας προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας του γλεύκους που βρίσκεται σε ζύμωση. Η επανοξείδωση του  $\text{NADH}_2$  με κατανάλωση οξυγόνου και η οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος μέσω του κύκλου του Krebs οδηγούν στον σχηματισμό 38 μορίων ATP ανά μόριο σακχάρου. Επίσης, η ζύμωση των σακχάρων από τις ζύμες παράγουν και λίγο γαλακτικό οξύ.



Σχήμα 2.3: Πορεία της αλκοολικής ζύμωσης [18].

### Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Η ακεταλδεΐδη είναι ο τελικός αποδέκτης του υδρογόνου που προέρχεται από τη γλυκόλυση. Η επανοξειδωση του  $\text{NADH}_2$  γίνεται καταναλώνοντας ένα μόριο διυδροξυακετόνης-P, η οποία με αναγωγή δίνει γλυκερόλη. Ταυτόχρονα η γλυκεριναλδεΐδη-3P οξειδώνεται σε γλυκερινικό οξύ-3P, το οποίο δίνει πυροσταφυλικό οξύ που με αποκαρβοξυλίωση γίνεται ακεταλδεΐδη. Αυτή όμως δεν μπορεί να αναχθεί σε αιθανόλη.



**Σχήμα 2.4:** Πορεία γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης [18].

### *Άλλες μεταβολές*

Οι ζυμομύκητες μπορούν να προκαλέσουν την περίοδο της αλκοολικής ζύμωσης ζύμωση του μηλικού οξέος σε αιθανόλη. Επιπλέον, μεταβολίζουν αζωτούχα συστατικά, σχηματίζουν ανώτερες αλκοόλες και ανάγουν τα θειικά ιόντα σε υδρόθειο.

## **2.5 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΟΤΕΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ**

Η δράση των ζυμών στο τρυγικό οξύ έχει έμμεσο αποτέλεσμα στην περιεκτικότητά του. Το μηλικό οξύ ζυμώνεται από τις ζύμες κατά τα 1/3. Οι ζύμες παράγουν ακόμη κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Το γλυκονικό οξύ παράγεται χάρη στη δράση φαιάς σήψης και των οξικών βακτηρίων που βρίσκονται πάνω στο σταφύλι. Δεν μεταβολίζεται από τις ζύμες και βρίσκεται στο κρασί, δίνοντας τη δυνατότητα εκτίμησης της προσβολής από φαιά σήψη.

## **2.6 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ**

### **2.6.1 Γενικά**

Το γλεύκος αποτελείται από το περιεχόμενο της ράγας με αφαίρεση του φλοιού κι των γιγάρτων.

Η σύνθεση του γλεύκους συνοπτικά είναι:

- Νερό 65-80%
- Σάκχαρα 17-25%
- Διάφορες άλλες ουσίες διαλυμένες, σε ποσοστό 5-6% είναι:
- Οργανικά οξέα: τρυγικό, μηλικό, κιτρικό,
- Ανόργανα οξέα: ανθρακικό, φωσφορικό
- Ανόργανες ουσίες, όπως άλατα των παραπάνω οξέων με μέταλλα του ασβεστίου, του καλίου, σιδήρου, αργιλίου, νατρίου, μαγνησίου, μαγγανίου
- Αζωτούχες ενώσεις
- Πηκτινικές ουσίες
- Ταννίνες

- Χρωστικές ουσίες
- Αρωματικές ουσίες
- Ένζυμα και βιταμίνες
- Ενώσεις που δεν έχουν ακόμη ανιχνευτεί κι ταυτοποιηθεί

Τα σάκχαρα του γλεύκους είναι κυρίως η φρουκτόζη κι η γλυκόζη.

Συνοπτικά το κρασί περιέχει τα εξής συστατικά [8]:

- Νερό
- Οργανικά συστατικά
  - ✓ Οργανικά οξέα
  - ✓ Αλκοόλες
  - ✓ Αρωματικές ενώσεις
  - ✓ Σάκχαρα
  - ✓ Πολυσακχαρίτες
  - ✓ Φαινολικές ενώσεις
  - ✓ Αζωτούχες ενώσεις
- Ένζυμα
  - ✓ Βιταμίνες
  - ✓ Ανόργανα συστατικά
- Ανιόντα
  - ✓  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{BO}_3^-$ , κ.α.
- Κατιόντα
  - ✓  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Al}^{+++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{As}^{+++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ , κ.α.

### 2.6.2 Αρωματικά συστατικά

Στους οίνους διακρίνονται τρεις κατηγορίες ενώσεων αρωματικών. Η πρώτη κατηγορία αφορά το πρωτογενές άρωμα, που οφείλεται σε χημικές ενώσεις που προέρχονται από τα σταφύλια και είναι χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία. Η δεύτερη κατηγορία αφορά το δευτερογενές άρωμα ή αλλιώς «μπουκέτο» και οφείλονται σε ενώσεις που σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση με τη βοήθεια και δράση των ζυμών και των βακτηρίων και τέλος, η τρίτη κατηγορία αφορά το τριτογενές άρωμα από ενώσεις που προκύπτουν κατά την παλαίωση των οίνων.

Το άρωμα του οίνου προέρχεται από εκατοντάδες ενώσεις, σε συγκεντρώσεις που μπορεί να κυμαίνονται από κάποια mg/l έως λίγα ng/l. Γι' αυτό είναι και δύσκολη η μελέτη τους με τις διάφορες αναλυτικές μεθόδους [13].

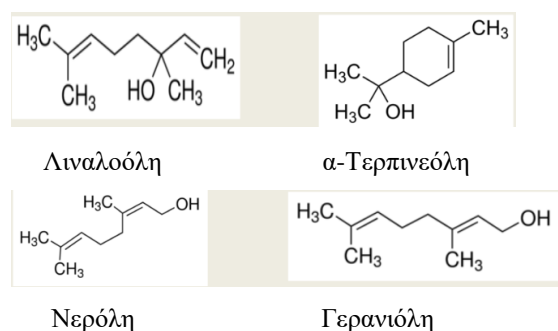
*Αρωματικά συστατικά που προέρχονται από το σταφύλι*

#### ✚ Τερπένια

Με τις τεχνικές της υγρής, της αέριας χρωματογραφίας αλλά και της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας έχουν ανιχνευτεί πάνω από 70 ενώσεις, κατά κύριο λόγο μονοτερπένια, που μπορεί να είναι

- Υδρογονάνθρακες
- Αλδεΐδες
- Αλκοόλες
- Εστέρες
- Σεσκιτερπένια

Οι ενώσεις αυτές έχουν έντονο και ευχάριστο άρωμα και σε αυτές αποδίδεται το άρωμα των λουλουδιών. Στο σταφύλι εντοπίζονται στη ρόγα των μοσχάτων ποικιλιών, κυρίως στη φλούδα. Στην ποικιλία ωστόσο, Μοσχάτο Αλεξανδρείας εντοπίζονται στην σάρκα. Το άρωμα των αρωματικών ποικιλιών οφείλεται σε ενώσεις όπως η λιναλοόλη, γερανιόλη, νερόλη και παράγωγα αυτών. Οι ενώσεις αυτές καταστρέφονται κατά ένα μέρος κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και στην παλαίωση του οίνου οξειδώνονται σε λιγότερο αρωματικές.



**Σχήμα 2.5:** Δομή σημαντικότερων τερπενίων [19].

### ✚ Πυραζίνες

Οι μεθοξυπυραζίνες ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι προσδίδουν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στα κρασιά και πιο συγκεκριμένα στην ποικιλία *Cabernet Sauvignon* και δίνουν χαρακτηριστική φυτική οσμή.

**Πίνακας 2.1:** Συγκεντρώσεις των γνωστών πυραζινών στο κρασί [20].

ΕΝΩΣΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ (NG/L)
ΙΣΟΒΟΥΤΥΛΟ-ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ	5-30
ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟ-ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ	<10
ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ ΒΟΥΤΥΛΟ- ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ	<10

### ✚ Πτητικές φαινολικές ενώσεις

Το φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό οξύ, μετατρέπονται μετά από μια σειρά χημικών αντιδράσεων σε άλλες που έχουν άρωμα ξύλου, δέρματος ή καπνού. Κάποια εστεροποιούνται με το τρυγικό οξύ, κι άλλα ενώνονται με γλυκόζη. Διαφοροποιούνται ανάλογα με την ποικιλία του σταφυλιού. Ένα μέρος τους καταστρέφεται με οξειδώσεις και άλλες φορές οι ζύμες τα αποκαρβοξυλιώνουν και δίνουν πτητικά παράγωγα. Πτητικές φαινόλες παράγονται κι με ενζυμική υδρόλυση.

### ✚ Μεθανόλη-εξανόλη

Η μεθανόλη προκύπτει από την απομεθυλίωση των πηκτινών από τα πηκτινολυτικά ένζυμα, αλλά είναι τοξική. Η συγκέντρωσή της αυξάνεται σε συνθήκες που είναι ευνοϊκές για τη δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων. Ακόμη, προσδίδει στο κρασί μια χαρακτηριστική οσμή χόρτου.

### ✚ Υδρογονάνθρακες

Προέρχονται από συστατικά που βρίσκονται στο κηρώδες της επιδερμίδας του σταφυλιού [13].

### *Αρωματικά συστατικά κατά την αλκοολική ζύμωση*

### ✚ Αιθανόλη και ανώτερες αλκοόλες

Η αιθανόλη είναι το βασικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης και έχει δριμεία οσμή. Οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται από τα σάκχαρα με σύνθεση από τις ζύμες των

αντίστοιχων α-κετονοξέων, τα οποία ύστερα αποκαρβοξυλιώνονται και ανάγονται σε αλκοόλες. Ακόμη, σχηματίζονται από τα αμινοξέα με απαμίνωση και μετά αποκαρβοξυλίωση.

**Πίνακας 2.2:** Κυριότερες ανώτερες αλκοόλες που βρίσκονται στο κρασί [21].

ΈΝΩΣΗ	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ
3-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΛΗ:	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH
2-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΛΗ:	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -OH
2-ΜΕΘΥΛΟΠΡΟΠΑΝΟΛΗ:	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -OH
1-ΠΡΟΠΑΝΟΛΗ:	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH

✚ Πολυαλκοόλες προερχόμενες από σάκχαρα

- Μανιτόλη
- Σορβιτόλη
- Αραβιτόλη
- Ερυθριτόλη
- Μεσοϊνοσιτόλη

✚ Πτητικά οξέα

Ουσιαστικά πρόκειται για μονοκαρβονικά οξέα (λιπαρά οξέα) με 2–12 άτομα άνθρακα. Το βουτυρικό και το ισοβαλεριανικό οξύ έχουν οσμή τυριού. Το λινολενικό και το λινελαϊκό οξύ προέρχονται από την εξανόλη και την εξανάλη και είναι υπεύθυνες για την φυτική οσμή που έχουν τα άγουρα σταφύλια. Τα οξέα με μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχουν μικρή οργανοληπτική σημασία. Τα οξέα γενικά έχουν δυσάρεστο άρωμα, αλλά ισορροπούν σφρητικά το συνολικό άρωμα του οίνου.

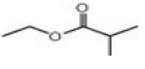
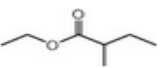
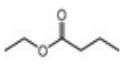
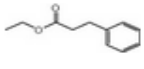


**Σχήμα 2.6:** Δομή του οξικού οξέος (αριστερά) και του οξικού αιθυλεστέρα (δεξιά)

### ✚ Εστέρες

Τα σταφύλια περιέχουν πολύ λίγους εστέρες και σχηματίζονται με ενζυμική εστεροποίηση κατά την αλκοολική ζύμωση ή χημική εστεροποίηση κατά την παλαίωση του κρασιού. Η παραγωγή τους ευνοείται από τη χαμηλή θερμοκρασία, το είδος των ζυμών και την παρουσία στερεών αιωρημάτων κατά την αλκοολική ζύμωση.

**Πίνακας 2.3:** Δομές των συχνότερων εστέρων που προσδιορίζονται στο κρασί [22]

ΈΝΩΣΗ	ΔΟΜΗ
2-ΜΕΘΥΛΟΠΡΟΠΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	
2-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	
ΒΟΥΤΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	
3- ΦΑΙΝΥΛΟΠΡΟΠΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	

### ✚ Θειούχες ενώσεις

Οι θειούχες ενώσεις των κρασιών περιλαμβάνουν υδρόθειο, θειόλες, θειοεστέρες, σουλφίδια και ετεροκυκλικές ενώσεις. Το υδρόθειο και οι θειόλες δίνουν οσμή αυγού αλλά στα κρασιά βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες και δε δίνουν οσμή.

#### *Πτητικές φαινόλες που δημιουργούνται κατά την οινοποίηση*

Με αποκαρβοξυλίωση των αντίστοιχων φαινολικών οξέων από τις ζύμες παράγονται η 4-βινυλο-φαινόλη και η 4-βινυλο-βουαϊκόλη (που δίνει άρωμα γαρύφαλλου). Ενισχύουν το άρωμα των κρασιών και σχηματίζονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα λευκά κρασιά έναντι των ερυθρών.



### 2.6.3 Γευστικά συστατικά

#### *Οξέα του γλεύκους*

Στο γλεύκος και στο κρασί περιέχονται ανόργανα και οργανικά οξέα, μικρή ποσότητα βάσεων και άλατά τους. Σε μικρές ποσότητες υπάρχουν το θειικό, το υδροχλωρικό, το φωσφορικό. Οργανικά οξέα στο κρασί περιλαμβάνουν το τρυγικό, μηλικό, κιτρικό, οξικό και άλλα πολλά. Στο γλεύκος και στο κρασί τα οξέα βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα από τις βάσεις με αποτέλεσμα μέρος των οργανικών οξέων να είναι ελεύθερο και το γλεύκος- κρασί να έχουν ξινή γεύση.

Κυριότερα οξέα του σταφυλιού είναι:

- τρυγικό
- μηλικό
- κιτρικό
- οξαλικό
- ασκορβικό
- γαλακτουρονικό
- γλυκουρονικό

Σταφύλια με φαιά σήψη περιέχουν και τα εξής οξέα:

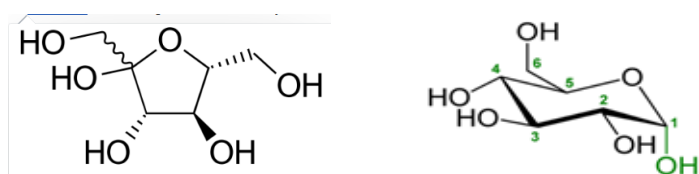
- γλυκονικό
- βλεννικό
- κετο-2-γλυκονικό
- δικετο-2,5-γλυκονικό

Οξέα κατά τη ζύμωση:

- ηλεκτρικό
- γαλακτικό
- κιτρομηλικό
- διμέθυλο-2,3-γλυκερινικό
- μυρμηκικό
- οξικό
- προπιονικό
- βουτυρικό

## Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι ετεροκυκλικές ενώσεις και έχουν πολλές στερεοχημικές μορφές. Τα σάκχαρα του γλεύκους χωρίζονται σε αλδόζες με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη, γαλακτόζη, μανόζη), αλδόζες με 5 άτομα άνθρακα (αραβινόζη, ξυλόζη), κετόζες με 5 άτομα άνθρακα (ξυλουλόζη, ριβουλόζη) και σε κετόζες με 6 άτομα άνθρακα (φρουκτόζη). Τα σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα μπορούν να ζυμωθούν και τα σάκχαρα που έχουν αναθθεί έχουν ελεύθερη κετονική ή αλδεϋδική ομάδα, με την οποία μπορούν να δεσμεύσουν τον θειώδη ανυδρίτη.



**Σχήμα 2.7:** Δομή φρουκτόζης (αριστερά) και γλυκόζης (δεξιά) [23].

## Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή των σακχάρων, έχουν κολλοειδείς ιδιότητες, σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος, χαρακτηριστικά που εμποδίζουν την διήθηση του κρασιού και λειτουργούν ως προστατευτικά κολλοειδή. Διακρίνονται στους ομογενείς, όταν έχουν ένα μόνο είδος σακχάρου στην αλυσίδα τους και σε ετερογενείς, όταν περιέχουν περισσότερα από ένα. Δίνουν σάκχαρα με όξινη υδρόλυση ή μεθανόλυση. Ακόμη, χαρακτηρίζονται σε πολυσακχαρίτες που προέρχονται από το σταφύλι, πολυσακχαρίτες που προέρχονται από την αυτόλυση των ζυμών, πολυσακχαρίτες που προέρχονται από βακτήρια, πολυσακχαρίτες που παράγονται από βακτήρια κατά την μηλογαλακτική ζύμωση και πολυσακχαρίτες που παράγονται από τον μύκητα *Botrytis cinerea* [13].

Οι πολυσακχαρίτες του γλεύκους προέρχονται από την φλούδα της ρόγας. Το γλεύκος από υγιή σταφύλια έχει δύο είδη πολυσακχαριτών, τις πηκτίνες και τα κόμμεα. Το γλεύκος των σάπιων σταφυλιών περιέχει τη γλυκάνη και άλλους διάφορους πολυσακχαρίτες.

Πηκτίνες είναι πολυμερή γαλακτουρονικού οξέος, εστεροποιημένου με μεθανόλη σε ορισμένα σημεία της αλυσίδας, ενώ κόμμεα είναι πολυμερή που στο μόριό τους συμμετέχουν ανυδρίτες σακχάρων όπως γαλακτουρονικό οξύ, μανόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, αραβινόζη. Τέλος, γλυκάνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, μια δεξτράνη και προκύπτει από του μύκητες της φαιάς σήψης.

### *Αζωτούχα συστατικά*

Στο κρασί το άζωτο βρίσκεται σε μορφή οργανική κατά 95% και σε ανόργανη κατά 5%. Την οργανική μορφή αποτελούν τα αμινοξέα, τα αμίδια, πολυπεπτίδια, αμίνες, πρωτεΐνες. Το ανόργανο άζωτο χρησιμοποιείται από τους ζυμομύκητες κατά την αλκοολική ζύμωση και μειώνεται η περιεκτικότητά του, ενώ τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα αμινοξέα. Στην μηλογαλακτική ζύμωση η περιεκτικότητα σε άζωτο αυξάνεται.

### *Ανόργανα ιόντα*

Στο κρασί περιέχεται μια μικρή ποσότητα θεικών που αυξάνει με την οξείδωση του θειώδους οξέος. Το επιτρεπτό όριο είναι 2 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Τα χλωριούχα βρίσκονται σε μικρές ποσότητες στα κρασιά 20-200 mg/L (επιτρεπτό όριο 1g/L), εκτός αν τα αμπέλια βρίσκονται κοντά στην θάλασσα. Τα φωσφορικά βρίσκονται σε ποσότητες 0,05-1 g/L και αυξάνονται με προσθήκη φωσφορικών αλάτων στο γλεύκος, κάτι που πρέπει να αποφεύγεται γιατί σχηματίζονται θολώματα φωσφορικού σιδήρου.

Άλλα ανιόντα στο κρασί σε μικρές ποσότητες είναι:

- Φθοριούχα
- Βρωμιούχα
- Ιωδιούχα
- Βορικά

Κατιόντα που βρίσκονται στο κρασί είναι:

- Κάλιο, μεγάλο ρόλο παίζει για την καταβύθιση του υδρογόνου του τρυγικού καλίου, όπως και νάτριο και ασβέστιο
- Σίδηρος, χαλκός που είναι υπεύθυνα για τα διάφορα θολώματα σιδήρου και χαλκού αντίστοιχα στο κρασί
- Ψευδάργυρος που είναι τοξικός
- Μαγγάνιο που βρίσκεται στα κουκούτσια του σταφυλιού
- Αρσενικό που έχει βρεθεί σε κρασιά από αμπελώνες που έχει γίνει χρήση παραγώγων του αρσενικού για λόγους φυτοπροστασίας.
- Μόλυβδος.

## 2.6.4 Συστατικά που καθορίζουν το χρώμα και τη γεύση στο κρασί

### *Φαινολικά συστατικά*

Τα φαινολικά συστατικά έχουν σημαντικό ρόλο οργανοληπτικό, καθώς είναι κύρια πηγή του χρώματος του οίνου, αλλά και της στυφής αίσθησης, άρα και υπεύθυνα για τις διαφορές χρώματος και γεύσης μεταξύ τους [14].

Η διερεύνηση της σύστασης και της δομής τους ακόμη και με τεχνικές όπως η HPLC είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν.

Οι φαινολικές ενώσεις σχηματίζονται 1) από τη γλυκόζη ή 2) με τη συμπύκνωση τριών μορίων οξικού οξέος με πιθανό ενδιάμεσο μια χαλκόνη. Σε σύγκριση με άλλα φρούτα, τα σταφύλια του γένους *Vitis* είναι πιο πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Το είδος των φαινολικών συστατικών εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία, ενώ επηρεάζεται από το αμπέλι, τις κλιματολογικές συνθήκες, την παραγωγικότητα και την οινοποιητική τεχνική.

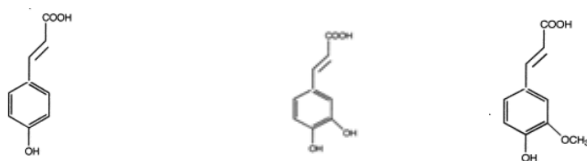
Τα φαινολικά συστατικά στο κόκκινο κρασί είναι υπεύθυνα για το χρώμα, τη γεύση (λιπαρότητα), αλλά και άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η προέλευση του χρώματος των κρασιών δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, αλλά οφείλεται κατά κύριο λόγο στις πολυφαινόλες που ευθύνονται για το κιτρίνισμα του κρασιού μετά την οξείδωσή του.

### *Φαινολικά οξέα (μη φλαβονοειδείς φαινόλες)*

Στον πολτό του σταφυλιού, βρίσκονται πολυφαινόλες τόσο στα κόκκινα όσο και στα λευκά σταφύλια. Σε γενικές γραμμές, αυτά απαντώνται στα σταφύλια και στους οίνους σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με μια εξαίρεση: τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι τα φαινολικά οξέα που βρίσκονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο λευκό κρασί, αλλά υπάρχουν και στο κόκκινο. Μια άλλη ομάδα είναι τα βενζοϊκά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ. Τα κινναμωνικά και τα βενζοϊκά οξέα, επίσης γνωστά ως «όξινες φαινόλες», είναι μικρά μόρια και συχνά υπάρχουν στα σταφύλια σε συζευγμένη μορφή (π.χ. ως εστέρες ή γλυκοζίδια). Αυτά εξαγονται εύκολα από τον πολτό των σταφυλιών κατά τη διάρκεια της συμπίεσης και εμφανίζονται σε επίπεδα 50-250 mg/L.

Άλλες μη φλαβονοειδείς φαινόλες που βρίσκονται στο κρασί περιλαμβάνουν τις υδρολυόμενες ταννίνες (όπως το γαλλικό και το εξαλλικό οξύ) που προέρχονται από δρύινα βαρέλια, τις πτητικές φαινόλες (όπως η 4-αιθυλοφαινόλη, που παράγεται από *Brettanomyces*) και στυλβένια συμπεριλαμβανομένης της ρεσβερατρόλης

(φυτοαλεξίνη).



π-κουμαρικό οξύ

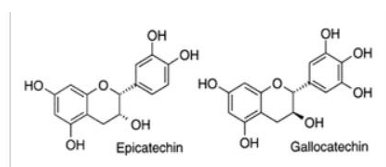
καφεϊκό οξύ

φερουλικό οξύ

**Σχήμα 2.8:** Δομή ορισμένων κινναμωνικών οξέων [24].

### Φλαβονοειδείς φαινόλες

Οι φλαβονοειδείς ενώσεις βρίσκονται στο δέρμα και τους σπόρους των σταφυλιών (για αυτό και σε κανονικές συνθήκες δεν υπάρχουν στα λευκά κρασιά). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι δύο πιο γνωστοί τύποι πολυφαινολών – των ανθοκυανών και των ταννινών. Τα φαινολικά φλαβονοειδή κατανέμονται σε δύο ομάδες: φλαβάν-3-ολες και φλαβονόλες.



**Σχήμα 2.9:** Δομή δύο φλαβαν-3-ολών: της επικατεχίνης (αριστερά) και της γαλλοκατεχίνης (δεξιά)

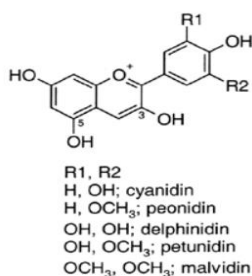
### Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία των φαινολικών συστατικών του σταφυλιού, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το ερυθρό, πορτοκαλί ή ιώδες χρώμα τους. Επίσης έχουν την ικανότητα να συνδυάζονται με τις ταννίνες δίνοντας έτσι διάφορες αποχρώσεις στο κρασί.

Οι ανθοκυάνες αρχίζουν να εμφανίζονται στο στάδιο του περκασμού. Τη στιγμή εκείνη, οι πράσινοι καρποί χάνουν τη χλωροφύλλη και αρχίζουν να χρωματίζονται. Καθώς οι σταφυλές ωριμάζουν καταλαμβάνουν αυξανόμενο χώρο στο κυτόπλασμα [25].

Κατά τα τελευταία στάδια ωρίμανσης της σταφυλής, σχηματίζονται και οι ακυλιωμένες μορφές των ανθοκυανών, που είναι αρκετά διαδεδομένες στη φύση. Σε αυτές τις χρωστικές, το -OH της θέσης 6 του σακχάρου, είναι εστεροποιημένο με ένα οργανικό οξύ της αλειφατικής σειράς (π.χ. οξικό οξύ) ή της αρωματικής (π.χ. π-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ). Συνήθης στις ελληνικές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου είναι η παρουσία του μονογλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης, ακυλιωμένου με οξικό οξύ, κυρίως όμως με π-κουμαρικό οξύ [26].

Όλες οι ανθοκυάνες είναι ασταθείς εκτός από την μαλβιδίνη και την παιονιδίνη



**Σχήμα 2.10:** Δομή ορισμένων ανθοκυανών

### Ταννίνες

Οι ταννίνες απαντώνται στα στερεά μέρη του σταφυλιού (γίγαρτα, βόστρυχοι, φλοιοί, σάρκα) και πρόκειται για μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα. Εξ ορισμού, είναι ουσίες ικανές να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες [27].

Οι ταννίνες των σταφυλών διαχωρίζονται σε αυτές των γιγάρτων και σε αυτές του φλοιού. Ανάλογα με τη φύση της βασικής μονάδας, οι ταννίνες διακρίνονται σε συμπυκνωμένες (ή ταννίνες της κατεχίνης) και σε υδρολύμενες (ή ταννίνες του γαλλικού οξέος) [8].

### Στιλβένια

Τα στιλβένια είναι ενώσεις με δύο βενζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται συνήθως με ένα αιθάνιο ή με μια αιθυλενική αλυσίδα. Η ρεσβερατρόλη (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>) αποτελεί τη σημαντικότερη ένωση της κατηγορίας αυτής (3,5,4-τρι-υδροξυ-στιλβένιο) και συναντάται με τη *trans* μορφή της, καθώς και με το παράγωγό της με τη γλυκόζη. Στη συγκεκριμένη ένωση αποδίδονται θεραπευτικές, αντικαρκινικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται μόνο στους φλοιούς της σταφυλής, συνεπώς κυρίως σε ερυθρούς οίνους και λιγότερο σε λευκούς και εκχυλίζεται κυρίως κατά την αλκοολική τους ζύμωση σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 - 3 mg/L, ανάλογα την ποικιλία [16].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΝ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

### **3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

#### **3.1.1 Εισαγωγή**

##### *Ανάπτυξη της μεταβολομικής ανάλυσης*

Τα δικαιώματα των καταναλωτών να λαμβάνουν αληθείς πληροφορίες σχετικά με τα τρόφιμα που αγοράζουν, ορίζονται στον κανονισμό με αριθμό 178/2002 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2002) Ο στόχος είναι η πρόληψη από: (α) δόλιες ή παραπλανητικές πρακτικές, (β) τη νόθευση των τροφίμων και (γ) κάθε είδους πρακτική που μπορεί να παραπλανήσει τον καταναλωτή. Ένα παράδειγμα μιας κοινής απάτης είναι η υποκατάσταση ενός συστατικού από ένα παρόμοιο φθηνότερο το οποίο είναι δύσκολο να αναγνωριστεί από τον καταναλωτή όπως επίσης και να ανιχνευτεί με τις τρέχουσες τεχνικές ανάλυσης. Εκτός αυτού, ανάλογα με την φύση των προσμίξεων, τα μίγματα αυτά μπορούν επίσης να αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή και επομένως, η δυνατότητα να εντοπιστούν και να επικυρωθούν προϊόντα διατροφής προκαλεί μεγάλη ανησυχία στη βιομηχανία τροφίμων, όχι μόνο για οικονομικούς αλλά και για λόγους ασφαλείας.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών εκτός από τις παραδοσιακές αναλυτικές μεθόδους, που χρησιμοποιούνται ακόμα στην παραγωγική διαδικασία και ιδιαίτερα στον έλεγχο ποιότητας, νέες προσεγγίσεις έχουν έρθει στο προσκήνιο, που θα μπορούσαν να βελτιώσουν την ακρίβεια και το χρόνο που απαιτείται για τον έλεγχο. Μια τέτοια νέα προσέγγιση είναι η μεταβολομική ανάλυση στα τρόφιμα. Αυτές οι νέες μεθοδολογίες εφαρμόζονται προκειμένου να λυθούν προβλήματα που αφορούν την απάτη στον τομέα των τροφίμων καθώς οι ήδη υπάρχουσες τεχνικές αποτυγχάνουν να τις ανιχνεύσουν [28].

##### *Ορισμός*

Η μεταβολομική ορίζεται ως η συλλογή και η μελέτη όλων των μικρών μορίων μεταβολιτών (<1500 Da) ή των χημικών ενώσεων που μπορούν να βρεθούν σε ένα κύτταρο, όργανο (ιστό) ή οργανισμό [29].

Αυτά τα μικρά μόρια μπορούν να είναι ενδογενείς και εξωγενείς χημικές ενώσεις ή και βιοπολυμερή όπως είναι τα πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, βιταμίνες, πολυφαινόλες, αλκαλοειδή, μέταλλα και οποιοδήποτε

άλλη χημική ουσία μπορεί να χρησιμοποιηθεί και να συντεθεί σε ένα δεδομένο κύτταρο ή οργανισμό [29]. Σε αντίθεση, η πληροφοριακή μεταβολομική ανάλυση έχει επικεντρωθεί στην αναγνώριση και στην ποσοτικοποίηση των στοχευμένων ή μη στοχευμένων μεταβολιτών για την απόκτηση εγγενών πληροφοριών του δείγματος. Η πληροφοριακή μεταβολομική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη και συνεχή ενημέρωση των βάσεων δεδομένων μεταβολιτών [30].

Η λέξη μεταβιομική χρησιμοποιείται συχνά ως συνώνυμο της μεταβολομικής. Η μεταβολομική ανάλυση έχει ως στόχο να χαρακτηρίσει το σύνολο των μεταβολιτών στα υπό μελέτη δείγματα και στη συνέχεια να συσχετιστούν οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν με τα χαρακτηριστικά ή τις ιδιότητες του δείγματος [31]. Από την άλλη η μεταβιομική ανάλυση σχετίζεται περισσότερο με την ποσοτική μέτρηση μεταβολικών αποκρίσεων, εξαρτημένων από το χρόνο, σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα και γενετικές τροποποιήσεις σε συστήματα εν ζώη [32].

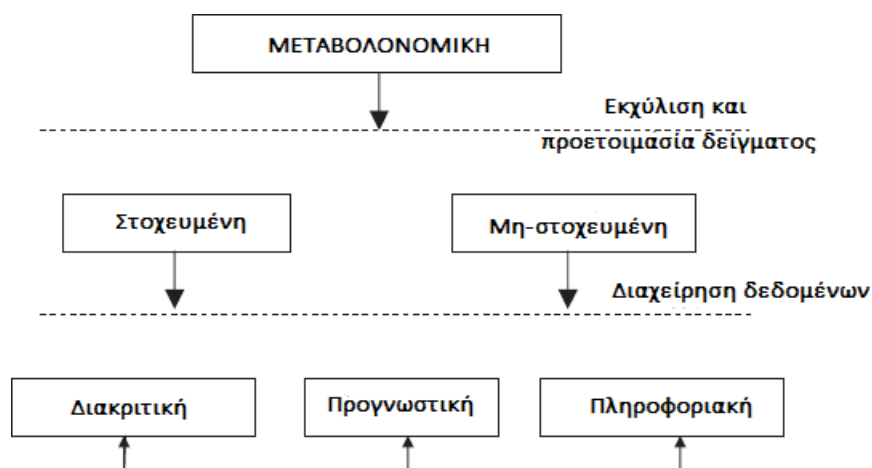
Οι μεταβολομικές αναλύσεις γενικά ταξινομούνται σε στοχευμένες (targeted) και μη στοχευμένες (untargeted) αναλύσεις. Οι στοχευμένες αναλύσεις εστιάζουν σε μια συγκεκριμένη ομάδα μεταβολιτών οι οποίοι είναι γνωστοί και απαιτείται ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός αυτών [30].

Οι στοχευμένες αναλύσεις είναι σημαντικές για την εκτίμηση της συμπεριφοράς μιας συγκεκριμένης ομάδας ενώσεων στο δείγμα που βρίσκεται υπό προσδιορισμό και συνήθως για τη διεξαγωγή τους απαιτείται εκλεκτική εκχύλιση των μεταβολιτών. Σε αντίθεση, η μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση επικεντρώνεται στον εντοπισμό των όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών, ώστε να λαμβάνονται τα πρότυπα χωρίς να χρειάζεται η αναγνώριση ή η ποσοτικοποίηση μιας συγκεκριμένης ένωσης.

Με βάση τον στόχο της ανάλυσης και την διαχείριση των δεδομένων, οι περισσότερες μεταβολομικές μελέτες μπορούν επίσης να χαρακτηριστούν ως μελέτες διάκρισης (discriminative), πληροφοριακές (informative) και προγνωστικές (predictive). Οι αναλύσεις διάκρισης έχουν ως στόχο να βρεθούν διαφορές μεταξύ δειγμάτων πληθυσμών χωρίς να είναι απαραίτητη η δημιουργία στατιστικών μοντέλων.

Τέλος, κάποιες αναλύσεις στην μεταβολομική έχουν αναφερθεί ως προγνωστικές. Σε αυτήν την περίπτωση, δημιουργούνται στατιστικά μοντέλα που βασίζονται στο προφίλ του μεταβολίτη και την αφθονία που συναντάται για να υπολογιστεί μια μεταβλητή που είναι δύσκολο να προβλεφθεί από άλλα μέσα [30].





Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση μεταβολομικής ανάλυσης

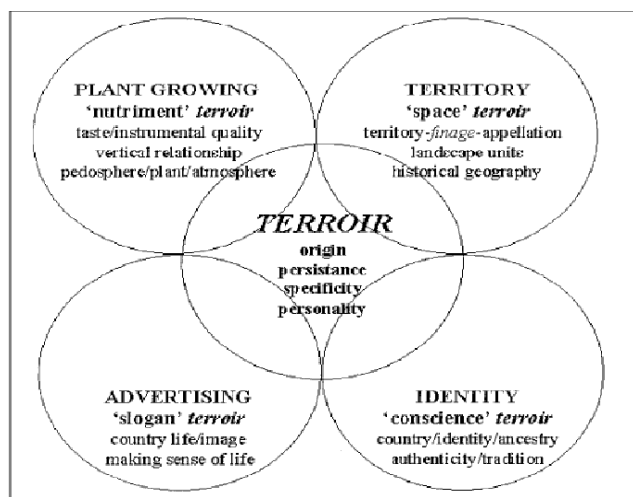
Οι μεταβολομικές αναλύσεις στα τρόφιμα είναι κυρίως διάκρισης και πρόγνωσης. Δύο συμπληρωματικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται για μεταβολομική ανάλυση είναι: το μεταβολικό προφίλ και μεταβολικά αποτυπώματα. Το μεταβολικό προφίλ εστιάζεται στην ανάλυση μιας ομάδας μεταβολιτών. Στις περισσότερες των περιπτώσεων το μεταβολικό προφίλ είναι μία ομάδα μεταβολιτών που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο μονοπάτι. Η δεύτερη προσέγγιση είναι τα μεταβολικά αποτυπώματα. Αρχικά σε αυτή την προσέγγιση, η πρόθεση δεν είναι να εντοπιστούν μεταβολίτες που έχουν παρατηρηθεί, αλλά να συγκριθούν οι μεταβολίτες που αλλάζουν ως απόκριση σε ασθένεια και περιβαλλοντικές ή γενετικές αλλοιώσεις [28].

### 3.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολικό προφίλ του οίνου και επίδραση αυτών των φαινομένων σε χαρακτηριστικούς μεταβολίτες

#### *Περιβαλλοντικοί παράγοντες, Terroir φαινόμενο*

Η επίδραση του κλίματος στην αμπελουργία παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 1. Οι κλιματολογικές συνθήκες της κάθε χρονιάς επηρεάζουν σημαντικά τη σύνθεση των σταφυλιών και είναι πλέον αποδεκτό ότι οι μεταβολίτες στο κρασί μπορούν να επηρεαστούν από το φαινόμενο terroir. Οι περισσότερες αναλυτικές μελέτες έχουν αντιμετωπίσει το θέμα " terroir " από την αμπελουργική άποψη, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση των παραγόντων (σύνθεση του περιβάλλοντος, έδαφος, κλιματικές αλλαγές, φαινότυπος του

αμπέλου) όσον αφορά την ποιότητα των σταφυλιών ή το κρασί. Το *terroir* φαινόμενο είναι ο καθοριστικότερος παράγοντας και ασχολείται με την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενός γεωργικού προϊόντος σε σχέση με τη γεωγραφική του προέλευση [33].



Σχήμα 3.2: Παράγοντες με τους οποίους αλληλοεπιδρά το *terroir* φαινόμενο[34].

*Περιβαλλοντικοί παράγοντες, θερμοκρασία, βροχόπτωση και έκθεση στον ήλιο*

Τρεις παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του σταφυλιού: το φως, η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα του νερού. Γενικά αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη της μεταβολικής δραστηριότητας του αμπελιού και ποικίλλουν σημαντικά από χρόνο σε χρόνο και από περιοχή σε περιοχή. Για να εξεταστεί η επίδραση αυτών των παραγόντων η δειγματοληψία γίνεται την περίοδο Απριλίου-Σεπτεμβρίου όπου είναι η περίοδος άνθισης και ωρίμανσης των αμπελιών. Οι ολοκληρωμένες αναλύσεις πραγματοποιούνται σε σταφύλια (πολτό, φλοιό, σπόρο) και στον μούστο [32].

### 3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

Το κρασί αποτελείται από μόρια διαφορετικής φύσης και δομής (π.χ., πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, φαινολικές ενώσεις, πτητικά συστατικά και ανόργανες ενώσεις), που υπάρχουν σε ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων, γεγονός που καθιστά το κρασί πολύπλοκο μητρικό υλικό. Η χημική σύσταση του κρασιού, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ποικιλίας των σταφυλιών, του κλίματος, των βιολογικών καλλιεργειών, τη γεωγραφική θέση, την παλαιώση, τα στελέχη των ζυμομυκήτων και

τις διαδικασίες ζύμωσης [35]. Αυτή η πολυπλοκότητα καθιστά τα κρασιά ευαίσθητα στη νοθεία και η γνησιότητά τους είναι ένα επίπονο, αλλά απαραίτητο έργο. Η χρήση της μεταβολομικής ανάλυσης στο κρασί άνοιξε νέες ευκαιρίες για την αξιολόγηση ολόκληρης της καλλιέργειας σταφυλιών και της οινοποιητικής διαδικασίας από μια πιο ολιστική οπτική για να εξασφαλιστεί η ποιότητα του οίνου και η ιχνηλασιμότητα.

Μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών εξελιγμένων αναλυτικών τεχνολογιών έχει χρησιμοποιηθεί στην οινολογία για τη διεξαγωγή μελετών μεταβολομικής ανάλυσης. Οι πιο δημοφιλείς αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για μελέτες σε οίνο είναι: η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία (LC). Σε μικρότερο βαθμό, τεχνικές που βασίζονται στον μετασχηματισμό Fourier (FT) ή στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) έχουν επίσης εφαρμοστεί. Ορισμένες από αυτές τις τεχνικές διαχωρισμού χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS), η οποία είναι η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στην μεταβολομική, καθώς παρέχει ένα μίγμα γρήγορων, ευαίσθητων ποιοτικών και ποσοτικών αναλύσεων με δυνατότητα ταυτοποίησης των μεταβολιτών, ιδιαίτερα εάν χρησιμοποιείται διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS).

Τα φασματόμετρα μάζας λειτουργούν με σχηματισμό ιόντων και ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ), σύμφωνα με τον οποίο γίνεται και η ανίχνευση των διαχωρισμένων ιόντων. Επιπλέον, η περαιτέρω ανάπτυξη και η πλέον οικονομικά προσιτή, σύγχρονη, υψηλής ανάλυσης φασματόμετρα μάζας, όπως αυτή με αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF), με τετραπόλο TOF (Q-TOF) και ανιχνευτές Orbitrap, βελτιώσουν σημαντικά τις δυνατότητες ταυτοποίησης. Οι ανιχνευτές TOF, QTOF και Orbitrap είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για τις μελέτες σε οίνους, με την υψηλή ανάλυση μάζας και την ακρίβεια που παρέχουν. Ο προσδιορισμός των μοριακών μαζών με μεγάλη ακρίβεια είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο προκειμένου να αναγνωριστούν οι άγνωστοι μεταβολίτες.

Η ταυτοποίηση του μεταβολιτών στη χρωματογραφία γίνεται με την αντιστοίχιση του χρόνου συγκράτησης και του φάσματος μάζας της κορυφής του δείγματος με εκείνα που έχουν προκύψει από καθαρή ένωση που προηγουμένως έχει αναλυθεί με το ίδιο όργανο και στις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, πολλοί μεταβολίτες δεν είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο και έτσι οι βάσεις δεδομένων φασμάτων μάζας δεν περιέχουν όλους τους μεταβολίτες που θα αναμενόταν να βρεθούν από μια τέτοια μελέτη.

Η προκατεργασία των δειγμάτων γίνεται με βάση την τεχνική που θα αναλυθούν τα δείγματα και τις ενώσεις που θα προσδιοριστούν ανάλογα με το σκοπό και τις απαιτήσεις της εκάστοτε μελέτης (στοχευμένη ή μη- στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση). Στη στοχευμένη ανάλυση η προκατεργασία του δείγματος συχνά περιλαμβάνει ένα στάδιο για την απομόνωση και τον εμπλουτισμό των στοχευμένων ενώσεων και την απομάκρυνση των συστατικών που προέρχονται από το μητρικό υλικό (παρεμβολές της μήτρας). Αντίθετα, σε μη στοχευμένες μελέτες μεταβολομικής ανάλυσης, το δείγμα θα πρέπει κατά προτίμηση να αναλύεται με ελάχιστη προκατεργασία, ώστε να αποτραπούν πιθανές απώλειες μεταβολιτών [36].

### **3.3 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η επεξεργασία δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης στοχευμένης και μη στοχευμένης μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια: την προεπεξεργασία δεδομένων και την ανάλυση δεδομένων [36]. Η προεπεξεργασία δεδομένων αφορά διαφορετικές στρατηγικές (π.χ. απομάκρυνση των αρχικών τεκμηρίων, συλλογή κορυφών, ευθυγράμμιση και εξομάλυνση και κλιμάκωση) προκειμένου να μετατραπούν τα αρχικά δεδομένα σε μορφή που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα βήματα για την επακόλουθη ανάλυση δεδομένων [37]. Στη στοχευμένη ανάλυση, ελάχιστα δεδομένα προκατεργασίας απαιτούνται. Ωστόσο, σε μη στοχευμένες μελέτες, η εφαρμογή στρατηγικών προκατεργασίας για τη μεγάλη ποσότητα των δεδομένων που λαμβάνονται είναι ουσιαστικής σημασίας για την εξαγωγή πολύτιμων πληροφοριών. Γι αυτό το σκοπό γίνεται χρήση προχωρημένων χημειομετρικών εργαλείων και αποτελεσματικά στατιστικά εργαλεία λογισμικού ικανά να αντλούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες αναλύσεων που σχετίζονται με το σκοπό μιας μελέτης μεταβολομικής:

- η διερευνητική ανάλυση,
- η ανάλυση ταξινόμησης / ανάλυση διακρίσεων και
- ανάλυσης παλινδρόμησης / μοντέλα πρόβλεψης.

Οι ερευνητικές εφαρμογές στη μεταβολομική βασίζονται σε μη επιτηρούμενες μεθόδους. Αποτελούνται από αλγόριθμους που συσσωρεύουν τους μεταβολίτες σε ομάδες χωρίς προηγούμενη γνώση της ιδιότητας μέλους της ομάδας και απεικονίζουν τα δεδομένα για να τονίσουν τις ομοιότητές τους και τις διαφορές. Η πιο κοινή χωρίς

επιτήρηση προσέγγιση που χρησιμοποιείται στις μελέτες οίνου είναι η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), η οποία βασίζεται στη μείωση των διαστάσεων και συχνά χρησιμοποιείται ως στάδιο προεπεξεργασίας πριν από την εφαρμογή των εποπτευόμενων μεθόδων.

Οι εποπτευόμενες μέθοδοι για την διαχωρισμό των δειγμάτων ή την ταξινόμησή τους, περιλαμβάνουν: τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (ANN), γραμμική διακριτική ανάλυση (LDA), ανάλυση διαφορών μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA), κανονική ανάλυση ποικιλίας (CVA), και, ανάλυση παλινδρόμησης, όπως τα μερικά ελάχιστα τετράγωνα (PLS) και τα ορθογώνια μερικά ελάχιστα τετράγωνα (OPLS).

Παρά τη σημαντική πρόοδο που επιτεύχθηκε στον τομέα αυτό, η μεταβολομική ανάλυση στο κρασί εξακολουθεί να είναι πεδίο έρευνας σχετικά πρόσφατο, γι αυτό εξακολουθούν να υπάρχουν αρκετά θέματα - προκλήσεις που πρέπει να λυθούν. Προς το παρόν, πολλές μελέτες βασίζονται σε σχετικά μικρό αριθμό δειγμάτων. Πράγματι, αν και μερικές από αυτές τις διαδικασίες είναι πολλά υποσχόμενες, απαιτούνται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για να ληφθούν υπόψη παράγοντες με μεγάλη μεταβλητότητα και να ληφθούν μοντέλα ευρύτερης εφαρμογής. Μετά την προηγούμενη επισκόπηση των εφαρμοζόμενων αναλυτικών τεχνικών σε μελέτες οίνου, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει μια ενιαία αναλυτική μέθοδος ικανή να ανιχνεύσει όλα τα μόρια ταυτόχρονα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε στατιστική επεξεργασία των των δεδομένων που προέκυψαν από ανάλυση μη στοχευμένη δειγμάτων σταφυλιού με PCA και PLS-DA.

#### *Λίγα λόγια για την PCA*

Η μέθοδος PCA (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών), αποτελεί μία γραμμική μέθοδο συμπίεσης δεδομένων η οποία συνίσταται από τον επαναπροσδιορισμό των συντεταγμένων ενός συνόλου δεδομένων σε ένα άλλο σύστημα συντεταγμένων το οποίο θα είναι καταλληλότερο στην επικείμενη ανάλυση δεδομένων. Αυτές οι νέες συντεταγμένες είναι το αποτέλεσμα ενός γραμμικού συνδυασμού προερχόμενου από τις αρχικές μεταβλητές και εκπροσωπούνται σε ορθογώνιο άξονα, ενώ τα επικείμενα σημεία διατηρούν μια φθίνουσα σειρά όσο αφορά στη τιμή της διακύμανσής τους. Για το λόγο αυτό, το πρώτο κύριο συστατικό (principal component) διατηρεί περισσότερες πληροφορίες δεδομένων σε σύγκριση με το δεύτερο το οποίο δεν διατηρεί πληροφορίες οι οποίες έχουν εισέλθει νωρίτερα (στο πρώτο συστατικό). Τα

principal Components δεν συσχετίζονται. Η συνολική ποσότητα των principal components είναι ίση με τη ποσότητα των αρχικών μεταβλητών και παρουσιάζει τις ίδιες πληροφορίες στατιστικής. Εντούτοις, η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την μείωση του συνόλου των μεταβλητών, καθώς τα πρώτα συστατικά (principal components) διατηρούν περισσότερο από το 90% των στατιστικών δεδομένων από τα αρχικά δεδομένα. Λόγω αυτών των σημαντικών πλεονεκτημάτων, η μέθοδος αυτή είναι ευρέως διαδεδομένη στην συμπίεση εικόνας.

Όσον αφορά την *PLS-DA*, κάποια από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της συνοψίζονται στα εξής:

- Είναι μέθοδος ταξινόμησης εποπτευόμενη
- Τα αντικείμενα χωρίζονται σε σειρά εκμάθησης και σειρά ελέγχου.
- Ακολουθεί κατάταξη σε τάξεις ανάλογα με την ιδιότητα στη βάση της οποίας θα γίνει η κατάταξη και ακολουθεί ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS.
- Δίνονται οι πιθανότητες κάθε αντικειμένου της σειράς εκμάθησης και της σειράς ελέγχου να ανήκει στη μία ή την άλλη τάξη

Το OPLS-DA είναι επίσης μια εποπτευόμενη προσέγγιση μοντελοποίησης και βασίζεται στην προβολή των δεδομένων  $X$  που καθοδηγούνται από γνωστές πληροφορίες κλάσης.

Με την ταξινόμηση SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogies), για τα δείγματα που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και για κάθε κλάση υπολογίζεται μια τοπική ανάλυση κύριου στοιχείου με ένα πλήρες σύνολο παραμέτρων του μοντέλου PCA. Έτσι για κάθε κλάση γίνονται τοπικά μοντέλα και στη συνέχεια μπορούν να ταξινομηθούν οι παρατηρήσεις του συνόλου πρόβλεψης από την εγγύτητα σε ένα από τα μοντέλα κλάσης. Η SIMCA είναι κατάλληλη σε περιπτώσεις πολλών ομάδων («τάξεων»), μερικές από τις οποίες μπορεί να επικαλύπτονται και όπου ο αριθμός των δειγμάτων στις ομάδες («τάξεις») μπορεί να ποικίλει σημαντικά.

### 3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ NMR

#### Βιβλιογραφική Επισκόπηση

Η φασματοσκοπία NMR είναι μία από τις κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην μεταβολομική ανάλυση κρασιού. Η ευρεία χρήση της στο πεδίο αυτό οφείλεται στο ότι είναι μια τεχνική γρήγορη, υψηλής απόδοσης, μη καταστρεπτική και απαιτεί ελάχιστη προκατεργασία δείγματος. Η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του κρασιού δεν απαιτεί συνήθως εκχύλιση ή άλλες διαδικασίες προκατεργασίας. Τα δείγματα ή τα προσυμπυκνωμένα δείγματα υποβάλλονται απευθείας σε ανάλυση NMR με την προσθήκη δευτεριωμένου διαλύτη ή λυοφιλοποιούνται για να απομακρυνθεί το νερό και στη συνέχεια αραιώνονται σε διαλύτη NMR. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην ανάλυση των φαινολικών ενώσεων, θα μπορούσε να γίνει εκχύλιση πριν την ανάλυση. Καθώς δεν απαιτείται σχεδόν καμία προεπεξεργασία δείγματος, οι εγγενείς ιδιότητες του δείγματος διατηρούνται καλά. Η πλειονότητα των εφαρμογών χρησιμοποιεί  $^1\text{H}$  (πρωτόνιο), το οποίο είναι παρόν στην πλειοψηφία των μεταβολιτών και έτσι το NMR δεν είναι επιλεκτικό και είναι ένα ιδανικό εργαλείο για τον προσδιορισμό ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών, όπως τα οργανικά οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα, αρωματικές ενώσεις και πολυφαινόλες. Η διάκριση με βάση τη γεωγραφική θέση και το έδαφος και η παρακολούθηση της αλκοολικής ζύμωσης είναι οι κύριοι στόχοι που επιτυγχάνονται με τεχνικές NMR [36].

Οι ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί με NMR φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 3.1:** Ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί με NMR

ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ NMR ΑΝΑΦΟΡΕΣ [38-41]	ΕΙΔΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ	ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ NMR	ΕΙΔΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ
ΑΛΑΝΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΤΡΥΓΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΘΡΕΟΝΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	CIS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ
ΒΑΛΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΠΡΟΛΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ

ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	ΒΑΝΙΛΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΤΥΡΟΣΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	Π-BENZOΪΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΦΑΙΝΥΛΛΑΝΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	Π-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΟ	ΛΕΥΚΟ	ΚΑΤΕΧΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΑΡΓΙΝΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΑΣΠΑΡΤΙΚΟ	ΛΕΥΚΟ	ΚΕΡΣΕΤΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
Β-ΓΛΥΚΟΖΗ, Α-ΓΛΥΚΟΖΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΚΑΜΠΦΕΡΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΣΟΥΚΡΟΖΗ	ΛΕΥΚΟ	TRANS-ΚΑΦΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
Γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ	TRANS-Π-ΚΟΥΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΧΟΛΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	CIS-ΚΑΦΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	CIS-Π-ΚΟΥΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ
2,3- ΒΟΥΤΑΝΟΔΙΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΒΟΥΤΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ,ΚΟΚΚΙΝΟ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΣΕΡΙΝΗ	ΚΟΚΚΙΝΟ
ΦΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ	ΓΛΟΥΤΑΜΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΦΟΡΜΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ	ΓΑΛΑΚΤΟΥΡΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	ΚΟΚΚΙΝΟ
ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ	ΡΑΜΝΟΖΗ	ΚΟΚΚΙΝΟ



ΜΗΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ	ΑΡΑΒΙΝΟΖΗ	ΚΟΚΚΙΝΟ
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΑΙΘΑΝΑΛΗ	ΛΕΥΚΟ
ΜΕΘΑΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ	ΙΣΤΙΔΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ
ΛΕΥΚΙΝΗ	ΛΕΥΚΟ	2-ΦΑΙΛΥΛΛΑΙΘΑΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ
ΙΣΟΒΟΥΤΑΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ	Α,Β-ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	ΛΕΥΚΟ
ΙΣΟΠΕΝΤΑΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ	1-ΠΡΟΠΑΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ

### 3.5 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LC)

#### 3.5.1 Βιβλιογραφική Επισκόπηση

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια χρωματογραφική τεχνική που βασίζεται στον διαχωρισμό των στοχευμένων ενώσεων που περιέχονται στην υγρή κινητή φάση, χρησιμοποιώντας τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και της στατικής φάσης. Ένα συνδυασμένο σύστημα LC-MS διαχωρίζει τους μεταβολίτες με υγρή χρωματογραφία ακολουθούμενη συνήθως με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI). Αυτή η τεχνική λειτουργεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από την GC-MS και η περιοχή των ανιχνευθέντων μεταβολιτών είναι ευρύτερη. Το LC είναι επομένως πιο ευπροσάρμοστο από άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η αέρια χρωματογραφία GC.

Επί του παρόντος, υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία σε χρωματογραφικές στήλες. Ωστόσο, οι πιο συνηθισμένες που χρησιμοποιούνται είναι η αντίστροφη φάση C18 ή C8. Η χημεία και οι διαστάσεις της στήλης καθορίζουν την χρωματογραφική ανάλυση και την ευαισθησία. Καλύτερη ανάλυση και ευαισθησία μπορούν να επιτευχθούν σε βάρος, όμως, του χρόνου. Εναλλακτικά, βελτιώνεται αυτό με εφαρμογή ενός συστήματος υπερυψηλής HPLC (UHPLC) χρωματογραφικής ανάλυσης που παρέχει μέγιστη χωρητικότητα ταυτόχρονα, ενώ ο χρόνος της ανάλυσης μειώνεται χάρη στη χρήση μικρότερων σωματιδίων στη στατική φάση.

Η βασική αρχή της UHPLC αναφέρει ότι με τη χρήση μικρότερων σωματιδίων αδρανούς υλικού ως στατική φάση μπορούν να βελτιωθούν τα όρια της ανάλυσης. Τα μη πορώδη σωματίδια με μέγεθος κάτω από 2 μm και μέχρι 1,5 μm διατίθενται εμπορικά και χαρακτηρίζονται από μικρή επιφάνεια. Αυτό έχει ως συνέπεια μικρή ικανότητα συγκράτησης. Για το λόγο αυτό προτιμάται η χρήση πορωδών σωματιδίων

πυριτίου με μέγεθος μικρότερο από 2 μm, με καλή ομοιομορφία στην κατανομή τους εντός της στήλης, τα οποία αντέχουν σε υψηλές πιέσεις. Η κύρια εφαρμογή του UHPLC συστήματος στις μελέτες οίνου είναι η ανάλυση φαινολικών ενώσεων για διακρίση, χαρακτηρισμό ή παρακολούθηση των δειγμάτων.

Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων συνήθως βρίσκεται σε σχετική αφθονία. Κατά συνέπεια, δεν χρειάζεται κάποια προκατεργασία, απλά μερικές φορές χρειάζεται κάποια απλή αραιώση, διήθηση ή προσυγκέντρωση. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ή η εκχύλιση υγρού υγρού (LLE).

Ο ηλεκτροψεκασμός ιόντων ESI ανιχνεύει μόνο αυτούς τους μεταβολίτες που μπορούν να ιοντιστούν με προσθήκη ή απομάκρυνση ενός πρωτονίου ή με την προσθήκη ενός άλλου ιοντικού είδους. Ο ηλεκτροψεκασμός μπορεί να ρυθμιστεί να είναι θετικός ή αρνητικός ή και τα δύο. Οι μεταβολομικές αναλύσεις πραγματοποιούνται συνήθως και στους δύο τρόπους προκειμένου να καλυφθεί ευρύτερο φάσμα μεταβολιτών.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί με υγρή χρωματογραφία στο κρασί τα τελευταία χρόνια.

**Πίνακας 3.2:** Συνήθεις ενώσεις που προσδιορίζονται με LC-MS σε δείγματα οίνου (πηγές [42-47])

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΕΙΔΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ	ΕΝΩΣΕΙΣ	ΕΙΔΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ	ΕΝΩΣΕΙΣ	ΕΙΔΟΣ ΚΡΑΣΙΟΥ
ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΑ ΟΞΕΑ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	Ο-ΚΡΕΣΟΛΗ		4-ΥΔΡΟΞΥ-3,5- ΔΙΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΑΚΕΤΟΝΗ	
ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ		Μ-ΚΡΕΣΟΛΗ		<b>ΦΛΑΒΟΝΟΛΕΣ</b>	ΚΟΚΚΙΝΟ,  ΛΕΙΚΟ ΣΕ ΜΙΚΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ		Π-ΚΡΕΣΟΛΗ		ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ	
ΕΛΑΓΙΚΟ ΟΞΥ		4-ΑΙΘΕΝΥΛΟΦΑΙΝΟΛΗ	(ΜΟΝΟ ΛΕΥΚΟ)	ΚΑΤΕΧΙΝΗ	
ΒΑΝΙΛΛΙΚΟ ΟΞΥ		<b>ΜΕΘΟΞΥ ΚΑΙ ΑΛΚΥΛΟΜΕΘΟΞΥ ΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΜΥΡΙΚΙΤΡΙΝΗ	
2,5-ΔΙΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟ ΟΞΥ		4-ΑΙΘΥΛ-2-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΟΛΗ		ΚΕΡΚΤΙΝΗ	
ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟ ΛΙΘΙΟ		2-ΜΕΘΟΞΥ-4-ΜΕΘΥΛΟΦΑΙΝΟΛΗ		ΚΑΙΜΠΦΕΡΟΛΗ	
4-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟ ΟΞΥ		4-ΑΙΘΕΝΥΛΟ-2-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΟΛΗ		ΓΑΛΛΟΚΑΤΕΧΙΝΗ	
3,4-ΔΙΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟ ΟΞΥ		4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΟΛΗ		ΕΠΙΓΑΛΛΟΚΑΤΕΧΙΝΗ	
ΠΡΩΤΟΚΑΤΕΚΙΝΙΚΟ ΟΞΥ		<b>ΑΛΚΥΛΟΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΛΚΥΛΟΦΑΙΝΥΛΟΜΕΘΟΞΥ ΑΛΚΟΟΛΕΣ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΚΕΡΚΙΤΡΙΝΗ	

<b>ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛΑΚΕΤΙΚΑ ΟΞΕΑ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	4-(3-ΥΔΡΟΞΥ-1-ΠΡΟΠΕΝΥΛΟ)-2- ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΟΛΗ		<b>ΦΛΑΒΑΝΟΝΕΣ</b>	ΚΟΚΚΙΝΟ, ΛΕΥΚΟ ΣΕ ΜΙΚΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
ΟΜΟΒΑΝΙΛΛΙΚΟ ΟΞΥ		ΟΜΟΒΑΝΙΛΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ		ΝΑΡΡΙΓΕΤΙΝΗ	
<b>ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΒΑΛΛΕΪΔΕΣ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ		ΕΣΠΕΡΙΤΙΝΗ	
Ο-ΒΑΝΙΛΛΙΝΗ		ΤΡΥΠΤΟΦΟΛΗ		<b>ΣΤΙΑΒΕΝΙΑ</b>	ΚΟΚΚΙΝΟ, ΛΕΥΚΟ ΜΙΚΡΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ
ΠΡΩΤΟΚΑΤΕΚΙΝΙΚΗ ΑΛΔΕΪΔΗ		ΤΥΡΟΣΟΛΗ	(ΜΟΝΟ ΚΟΚΚΙΝΟ)	TRANS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ	
<b>ΥΔΡΟΞΥΚΙΝΝΑΜΩΝΙΚΕΣ ΑΛΔΕΪΔΕΣ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ  ΣΕ ΙΧΝΗ	<b>ΥΔΡΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟΠΡΟΠΕΝΙΑ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ ΣΕ ΙΧΝΗ	CIS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ	
3- (4-ΥΔΡΟΞΥ-3- ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ) ΠΡΟΠ-2- ΕΝΑΛΗ		4-ΑΛΛΥΛΟ-2,6-ΔΙΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΟΛΗ		<b>ΣΑΚΧΑΡΑ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΣΙΝΑΠΙΝΑΛΔΕΪΔΗ		ΕΥΓΕΝΟΛΗ		ΓΛΥΚΟΖΗ	

<b>ΑΠΛΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>		ΙΣΟΕΥΓΕΝΟΛΗ		ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	
ΦΑΙΝΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ, ΣΕ ΙΧΝΗ	<b>ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΚΕΤΟΝΕΣ</b> <b>ΚΑΙ</b> <b>ΠΑΡΑΓΩΓΑ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	<b>ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ
ΚΑΤΕΧΟΛΗ	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	4'-ΥΔΡΟΞΥ-3',5'- ΔΙΜΕΘΟΞΥΑΚΕΤΟΦΑΙΝΟΝΗ		ΠΡΟΛΙΝΗ	
<b>ΑΛΚΥΛΟΦΑΙΝΟΛΕΣ</b>	ΛΕΥΚΟ, ΚΟΚΚΙΝΟ	1-(4-ΥΔΡΟΞΥ-3-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ) ΑΙΘΑΝΟΝΗ			
4-ΜΕΘΥΛΟΚΑΤΕΧΟΛΗ		4-ΥΔΡΟΞΥ-3-ΜΕΘΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟ ΑΙΘΥΛΙΟ			

### 3.5.2 Γενικά για την Υγρή Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές και ο διαχωρισμός των ενώσεων είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Ο χρόνος ανάλυσης είναι συνήθως μικρός (της τάξης των μερικών λεπτών) και παράλληλα η ακρίβεια, η ευαισθησία, η διαχωριστική ικανότητα και η επαναληψιμότητα είναι πολύ καλές. Γενικά, η υγρή χρωματογραφία είναι μια ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική, που υπερέχει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Για το λόγο αυτό βρίσκει χρήση στον προσδιορισμό πολλών χημικών ενώσεων, όπως αντιβιοτικών, βαρβιτουρικών, αμινοξέων, αλκαλοειδών, υδατανθράκων, βιταμινών, πρωτεϊνών, ενζύμων κ.τ.λ [48].

Το δείγμα εισάγεται στην αρχή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης πραγματοποιείται η κατανομή των αναλυόμενων ουσιών μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης [49].

Κατά μήκος της στήλης εμφανίζονται ζώνες των διαφόρων συστατικών του μίγματος όταν οι πειραματικές συνθήκες είναι οι κατάλληλες και εξέρχονται από αυτήν ανάλογα με την πολικότητά τους σε σχέση με το εκλουστικό σύστημα. Όταν οι συνθήκες είναι ιδανικές, τότε ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή οι ταινίες των διάφορων συστατικών και αποτυπώνονται στο καταγραφικό σύστημα ως καμπύλες Gauss [50].

#### *Μηχανισμοί και είδη*

Στην υγρή χρωματογραφία είναι δυνατόν να εφαρμοστούν όλα τα είδη των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ακολουθώντας τον κατάλληλο συνδυασμό υλικού πλήρωσης της στήλης (στατική φάση) και του διαλύτη έκλουσης (κινητή φάση) [51].

Με βάση τους συνδυασμούς στατικής/κινητής φάσης, που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ενός μίγματος, τα είδη χρωματογραφίας ταξινομούνται σε:

- *Χρωματογραφία προσρόφησης (Absorption Chromatography)* που βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα [52].

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης [52]:

- ✓ *Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase Chromatography)*: Στη Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης, η στατική φάση αποτελείται συνήθως από  $\text{SiO}_2$  ή  $\text{Al}_2\text{O}_3$  και είναι πολικότερη από την κινητή. Στην περίπτωση αυτή, η κινητή φάση αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο.
- ✓ *Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase Chromatography)*: Η Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική Υγρής Χρωματογραφίας, αφού χρησιμοποιείται στο 80% περίπου των αναλυτικών εφαρμογών. Η στατική φάση είναι λιγότερο πολική της κινητής και αποτελείται από  $\text{SiO}_2$ , συζευγμένο με διάφορες ομάδες (bonded phase), όπως αλκύλια, φαινύλια, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.ά. Η κινητή φάση αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.
- ✓ *Στη χρωματογραφία κατανομής (Partition ή Liquid – Liquid Chromatography)*: ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων μη ιονικών ενώσεων [51].
- *Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής*: στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography) ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστηκής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία [51].
- *Χρωματογραφία συγγένειας*. Στη χρωματογραφίας συγγένειας (Affinity Chromatography) οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκατάστατες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου [51].
- *Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή πηκτής*: στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή πηκτής (Size Exclusion SEC ή Gel Permeation Chromatography GPC) ο διαχωρισμός πραγματοποιείται βάσει σχήματος και μεγέθους των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων και εφαρμόζεται στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πολυμερών. Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα απ' τη

στήλη, τα μικρά μόρια, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, καθυστερούν και εξέρχονται αργότερα [52].

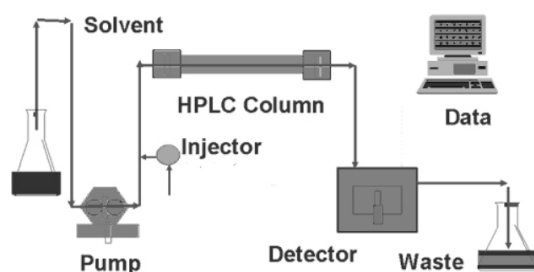
### 3.5.3 Οργανολογία

Ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας, όπως αυτό που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3, περιλαμβάνει [53]:

- ✓ Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- ✓ Αντλία
- ✓ Μονάδα εισαγωγής του δείγματος
- ✓ Χρωματογραφική στήλη
- ✓ Σύστημα συλλογής και καταγραφής των αποτελεσμάτων

Η ανίχνευση των εκλούμενων συστατικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο και μπορεί να είναι είτε εκλεκτική είτε όχι, ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Η απόκριση του ανιχνευτή για κάθε ένα από τα συστατικά του δείγματος είτε καταγράφεται σε χαρτί είτε απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή και αποτελεί το χρωματογράφημα του διαχωρισμού. Τα αναλυτικά δεδομένα αποθηκεύονται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή [53].

#### HPLC System



Σχήμα 3.3: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας HPLC (πηγή: [www.globalcompliancepanel.com](http://www.globalcompliancepanel.com))

#### Διαλύτες κινητής φάσης

Η κινητή φάση στην Υγρή Χρωματογραφία, στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης, είναι συνήθως μίγμα διαφόρων αναλογιών κατ' όγκο, ενός ή περισσότερων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος, στην κατάλληλη τιμή pH, ενώ στην περίπτωση της κανονικής φάσης, είναι μίγμα μη πολικών διαλυτών [50].

Για να μπορέσει ένας οργανικός διαλύτης να χρησιμοποιηθεί στην Υγρή Χρωματογραφία πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις [50]:

- ✓ Να είναι υψηλής καθαρότητας και ειδικός για χρωματογραφία



- ✓ Να είναι σχετικά φθηνός
- ✓ Να έχει χαμηλή τοξικότητα
- ✓ Να μην απορροφάει στο UV, σε περίπτωση που χρησιμοποιείται αντίστοιχος ανιχνευτής
- ✓ Να είναι δραστικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις
- ✓ Να μην καταστρέφει το δείγμα
- ✓ Να μην αποσυντίθεται εύκολα
- ✓ Να μην είναι πτητικός
- ✓ Να έχει χαμηλό ιξώδες
- ✓ Να έχει χαμηλή πίεση επαναφοράς
- ✓ Να έχει μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού

Ο οργανικός διαλύτης που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η μεθανόλη, η οποία είναι πιο οικονομική συγκριτικά με το ακετονιτρίλιο και έχει μικρότερο ιξώδες από την αιθανόλη [53].

Όταν λαμβάνει χώρα ανάμιξη διαλυτών ή όταν χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών, είναι απαραίτητη η απαέρωσή τους, γιατί δημιουργούνται φυσαλίδες αέρα από το διαλυμένο οξυγόνο και άζωτο του αέρα. Οι φυσαλίδες αυτές είναι δυνατόν να προκαλέσουν θόρυβο στην ανίχνευση και να μειωθεί η διαχωριστική ικανότητα της στήλης. Η απαέρωση γίνεται με διαβίβαση ηλίου, χρήση υπερήχων ή εφαρμογή κενού [53].

Η έκλυση των αναλυόμενων συστατικών μπορεί να είναι ισοκρατική ή βαθμωτή.

- ✓ Ισοκρατική έκλυση: Ονομάζεται η έκλυση, κατά την οποία διατηρείται σταθερή η σύσταση της κινητής φάσης σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.
- ✓ Βαθμωτή έκλυση: Χαρακτηρίζεται από μεταβολή της κινητής φάσης με το χρόνο για το διαχωρισμό μιγμάτων ενώσεων, οι οποίες συνήθως παρουσιάζουν παρόμοια δομή και ιδιότητες.

#### *Αντλίες*

Οι αντλίες που χρησιμοποιούνται στην Υγρή Χρωματογραφία είναι υψηλής πίεσης. Ο ρόλος τους είναι η άντληση της κινητής φάσης από το δοχείο της και η διαβίβασή της κάτω από μεγάλη πίεση στη στήλη.

Οι αντλίες Υγρής Χρωματογραφίας που διατίθενται στο εμπόριο είναι συνήθως δύο τύπων:

- ✓ Αντλίες σταθερής ροής (constant flow pumps)

- ✓ Αντλίες σταθερής πίεσης (constant pressure pumps)

#### *Εισαγωγή δείγματος*

Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με τους εξής τρόπους [50]:

- ✓ Με μικροσύριγγα
- ✓ Με ειδική βαλβίδα εισαγωγής δείγματος
- ✓ Με αυτόματο δειγματολήπτη

Η μονάδα εισαγωγής του δείγματος σ' ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης. Η μικροσύριγγα, με την οποία γίνεται απ' ευθείας εισαγωγή του δείγματος στην αναλυτική στήλη, χρησιμοποιείται ελάχιστα εξαιτίας των προβλημάτων που παρουσιάζει, όπως φραγή της βελόνας από μικρά σωματίδια και αστάθεια στη βασική γραμμή (η εισαγωγή του δείγματος συνοδεύεται από διακοπή της ροής του εκλουστικού, γίνεται δηλαδή υπό χαμηλή πίεση) [52].

Η ειδική βαλβίδα εισαγωγής είναι συνήθως έξι θέσεων. Αποτελείται από ένα βρόχο (loop), οπότε το δείγμα εισάγεται στο βρόχο και μεταφέρεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης, με περιστροφή της βαλβίδας και οδηγείται στη στήλη. Όταν η βαλβίδα είναι στη θέση «πλήρωσης» (load), η μέγιστη ποσότητα δείγματος που μπορεί να δεχθεί συγκρατείται στο loop και το υπόλοιπο δείγμα αποβάλλεται από ειδική έξοδο. Στη συνέχεια, με την περιστροφή της βαλβίδας στη θέση «εισαγωγής» (inject), το δείγμα εισάγεται στο εκλουστικό σύστημα, το οποίο διαβιβάζεται συνεχώς και κάτω από υψηλή πίεση στην αναλυτική στήλη [48].

Η εισαγωγή ενός δείγματος σ' ένα σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας μπορεί να γίνει χειροκίνητα ή με αυτόματους δειγματολήπτες. Οι αυτόματοι δειγματολήπτες αποτελούνται από τη βαλβίδα εισαγωγής, το βρόχο δείγματος, τη σύριγγα, τα φιαλίδια που περιέχουν τα δείγματα και τον περιστρεφόμενο δίσκο, όπου τοποθετούνται τα δείγματα. Κατά την εισαγωγή του δείγματος, ο δίσκος περιστρέφεται, μέχρις ότου το προγραμματισμένο φιαλίδιο βρεθεί κάτω από τη μικροσύριγγα. Στη συνέχεια, η μικροσύριγγα εισέρχεται στη φιάλη του δείγματος, λαμβάνει ορισμένη ποσότητα από αυτό, το οποίο και το διοχετεύει στο βρόχο της βαλβίδας [48, 52].

### Στήλες

Η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά ενός χρωματογραφικού συστήματος και αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης. Ο εξωτερικός κύλινδρος μπορεί να είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές. Το υλικό πλήρωσης (ή στατική φάση) βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που θα διαχωριστούν (Skoog, 2000). Τα διάφορα υλικά πλήρωσης που υπάρχουν στο εμπόριο παρέχουν διαφορετικής απόδοσης διαχωρισμούς, εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του υλικού πλήρωσης. Η στήλη πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας, ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα [51].

### *Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην Υγρή Χρωματογραφία*

Ένας ανιχνευτής Υγρής Χρωματογραφίας, ανεξάρτητα από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις [52]:

- ✓ Χαμηλό επίπεδο θορύβου
- ✓ Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής
- ✓ Μικρό χρόνο απόκρισης
- ✓ Μικρό νεκρό όγκο
- ✓ Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής
- ✓ Ευελιξία σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης
- ✓ Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
- ✓ Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους
- ✓ Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος.

Ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην υγρή χρωματογραφία είναι οι εξής [52]:

- ✓ Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους
- ✓ Ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων
- ✓ Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές
- ✓ Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης
- ✓ Φασματόμετρο μάζας
- ✓ Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
- ✓ Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές

- ✓ Ανιχνευτές ραδιενέργειας
- ✓ Ανιχνευτές σκέδασης του φωτός
- ✓ Ανιχνευτές φλόγας

#### **3.5.4 Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS)**

Η χρήση της τεχνικής αυτής ξεκίνησε τη δεκαετία του '70 με επιδίωξη την ανάλυση θερμοευαίσθητων ενώσεων και την εκμετάλλευση της αυξημένης ευαισθησίας του ανιχνευτή MS. Χαρακτηριστικό της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών είναι η εκλεκτικότητά της και οι άπειρες δυνατότητες.

Η πρόσφατη εισαγωγή στην αγορά ανθεκτικών και εύχρηστων οργάνων LC- MS/MS εξασφαλίζουν ένα νέο τρόπο πιο ολοκληρωμένης ανάλυσης των πολικών συστατικών. Η οργανολογία της, ωστόσο, είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και δαπανηρή.

Οι τεχνικές που χρησιμοποιεί η LC-MS είναι οι εξής: Ιονισμός πεδίου (FI), Εκρόφηση πεδίου (FD), Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI), Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI), Εκρόφηση πλάσματος (PD), Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB), Δευτερογενούς ιόντος (SIMS), Ιονισμός με θερμοψεκασμό. Ο θερμοψεκασμός (Thermospray) έχει πλέον αντικατασταθεί από το χημικό ιονισμό και τον ηλεκτροψεκασμό [54].

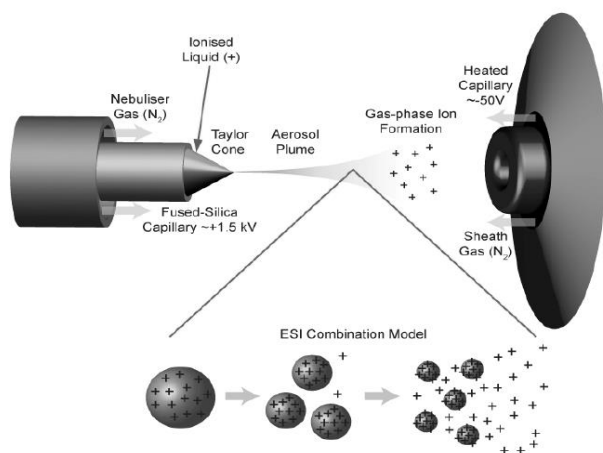
Προκειμένου να επιτευχθεί ο ιονισμός με την τεχνική LC-MS, χρησιμοποιούνται δύο τύποι πηγών:

- ✓ Πηγές αέριας φάσης, όπου τα δείγματα πρώτα εξαερώνονται και μετά ιονίζονται (π.χ. chemical ionization)
- ✓ Πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα σε υγρή ή στερεή κατάσταση μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα (πχ. FAB, MALDI)

#### *Electron Spray Ionization (Ιονισμός με ηλεκτροδιάχυση)*

Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών. Μετατρέπει τα μόρια ή τα ιόντα που βρίσκονται σε διάλυμα, σε ιόντα σε αέρια φάση, με εξάτμιση των φορτισμένων σταγονιδίων του διαλύματος. Τα φορτισμένα σταγονίδια παράγονται από μια τριχοειδή ακίδα κάτω από την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Με τη βοήθεια ενός αερίου εκνέφωσης, το οποίο είναι συνήθως το N<sub>2</sub>, επιτυγχάνεται η δημιουργία νέφους σταγονιδίων. Παράλληλα με τον τριχοειδή, βρίσκεται εξωτερικός σωλήνας μέσα από τον οποίο διαβιβάζεται αέριο που σκοπό έχει τη δημιουργία εκνεφώματος στην άκρη του τριχοειδούς. Ο τριχοειδής είναι

γειωμένος, ενώ στο απέναντι ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται δυναμικό της τάξης 3.5-5 KV. Ανάλογα με την πολικότητα του δυναμικού που εφαρμόζεται στο τριχοειδές, η επιφάνεια των σταγόνων που σχηματίζονται στο άκρο του τριχοειδούς και περιέχουν την ιοντιζόμενη ένωση φορτίζεται είτε θετικά είτε αρνητικά. Στη συνέχεια τα σταγονίδια εξατμίζονται. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξάτμιση με ιοντισμό (ion evaporation) και παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4. Η εξάτμιση των σταγονιδίων απαιτεί θέρμανση και ένα αέριο ξήρανσης, το οποίο είναι επίσης το N<sub>2</sub> [51].



Σχήμα 3.4 Αρχή λειτουργίας ηλεκτροψεκασμού [55.]

Καθώς το μέγεθος των σταγόνων μειώνεται, αυξάνεται η πυκνότητα των φορτίων στην επιφάνεια της σταγόνας. Τελικά, οι απωστικές δυνάμεις των φορτίων υπερνικούν τις δυνάμεις συνοχής (όριο Rayleigh) και προκαλούν την έκρηξη της σταγόνας (Κουλομπική έκρηξη) [51].

#### Χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)

Ο χημικός ιονισμός βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα μόρια του αναλύτη και ενός αερίου αντιδραστήριου, όταν και τα δύο βρίσκονται σε αέρια φάση. Το αέριο αντιδραστήριο είναι το μεθάνιο, η αμμωνία και το ισοβουτάνιο ή η κινητή φάση της υγρής χρωματογραφίας στο χημικό ιονισμό με μεσολάβηση διαλύτη (solvent mediated chemical ionization). Το αέριο αντιδραστήριο βομβαρδίζεται με ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν ιόντα του αερίου. Τα ιόντα αυτά δρουν ως δότες πρωτονίων, αντιδρούν με τα μόρια του αναλύτη M και σχηματίζουν μοριακά ιόντα MH. Ο χημικός ιονισμός κατατάσσεται στις ήπιες τεχνικές ιονισμού με μεγάλη ευαισθησία, η οποία συνήθως δίνει το μοριακό ιόν του αναλύτη. Όταν ο χημικός ιονισμός λαμβάνει χώρα σε ατμοσφαιρική πίεση, η τεχνική ονομάζεται (atmospheric

pressure chemical ionization). Η νεφελοποίηση και τελικά η εξαέρωση του δείγματος επιτυγχάνεται με το συνδυασμό αερίου αζώτου (nebulizer gas) και θέρμανσης. Στο άκρο του APCI probe, μεταλλική ακίδα προκαλεί τον ιονισμό των μορίων. Έτσι, σχηματίζονται τα πρωτονιωμένα μόρια.

#### *Παγίδα ιόντων (Ion Trap)*

Η παγίδα ιόντων είναι μικρό, συμπαγές όργανο που μπορεί να εφαρμοσθεί άμεσα και να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για αναλύσεις μαζών έως 1,000 dalton. Η διαχωριστική του ικανότητα περιορίζεται κάτω της τιμής των 10,000, είναι όμως, οικονομικό και αξιόπιστο και λειτουργεί πολύ ικανοποιητικά ως ανιχνευτής αέριας και υγρής χρωματογραφίας. Ακόμη, επιτυγχάνει καλύτερη ευαισθησία σε πλήρη σάρωση και επιτρέπει την ανακατασκευή του χρωματογραφήματος ιόντων (ion extract) αυξάνοντας σημαντικά την εξειδίκευση. Παρέχει, επιπλέον, τη δυνατότητα για δευτερογενή θραυσματοποίηση (MS/MS) που αυξάνει ακόμη περισσότερο την εξειδίκευση.

Η παγίδα ιόντων λειτουργεί με τη δημιουργία τρισδιάστατου πεδίου, στο οποίο παγιδεύονται τα προσδιοριζόμενα ιόντα και εστιάζονται σ' ένα επίπεδο. Τα ιόντα ουσιαστικά περιορίζονται από ηλεκτρομαγνητικό πεδίο τεσσάρων πόλων. Τα εισερχόμενα ιόντα κυκλοφορούν στον τρισδιάστατο χώρο που ορίζεται από τα τέσσερα ηλεκτρόδια και εστιάζονται στο επίπεδο που ορίζεται από τον ανιχνευτή και το πλέγμα ιοντισμού. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται δυναμικό ραδιοσυχνότητας που αυξάνει γραμμικά για να αυξηθεί η κινητική ενέργεια των ιόντων. Όλα τα ιόντα του ίδιου φορτίου λαμβάνουν την ίδια ενέργεια, αλλά ιόντα μικρού λόγου μάζας/φορτίου επιταχύνονται περισσότερο σε σχέση με τα βαρύτερα ιόντα. Με αυτόν τον τρόπο, τα μικρότερα ιόντα αρχίζουν να ξεφεύγουν από την παγίδα και να οδηγούνται στον ανιχνευτή και στη συνέχεια να ακολουθούν τα μεγαλύτερα ιόντα ανάλογα με τη μάζα τους.

#### *UPLC-HRMS*

Το φασματόμετρο μαζών, που είναι συνδεδεμένο με το όργανο που χρησιμοποιείται σε αυτήν την διπλωματική εργασία, αποτελείται από την πηγή παραγωγής ιόντων με την τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (Electron Spray Ionization-ESI), τον αναλυτή μαζών ο οποίος διαχωρίζει τα παραγόμενα ιόντα ανάλογα με το λόγο  $m/z$ , τον ανιχνευτή των ιόντων και τον καταγραφέα – επεξεργαστή φασμάτων. Ο υβριδικός

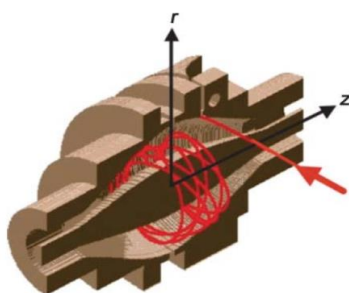
αναλυτής μάζας Orbitrap είναι συνδυασμός γραμμικής και ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων. Πρόκειται Για καινοτόμο αναλυτή μαζών που κατασκεύασε η Thermo Electron παρουσιάζοντας το σύστημα LTQ Orbitrap.

Κάποια από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του είναι τα εξής:

- Υψηλή ευαισθησία
- Διαχωριστική ικανότητα
- Ακρίβεια μάζας
- Δυναμικό εύρος
- Υψηλή σταθερότητα
- Είναι Ιδανικός για ανάλυση μεταβολιτών και αγνώστων ενώσεων

Τα ιόντα συσσωρεύονται στη γραμμική παγίδα ιόντων (linear ion trap), επιταχύνονται ευθύγραμμα και οδηγούνται στην C- Παγίδα ιόντων (C-trap) όπου παγιδεύονται. Στη συνέχεια, συμπιέζονται σε ένα μικρό νέφος και εισέρχονται στο Orbitrap. Τα συμμετρικά αξονικά ηλεκτρόδια του Orbitrap δημιουργούν ένα ηλεκτροστατικό δυναμικό με αποτέλεσμα τα ιόντα να πραγματοποιούν περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταυτόχρονα ταλάντωση στην κατεύθυνση του άξονα ζ. Τα ταλαντευόμενα ιόντα προκαλούν ένα ρεύμα το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί με ένα διαφοροποιημένο ενισχυτή. Ιόντα συγκεκριμένης μάζας παράγουν ένα κυματικό σήμα. Πολλά ιόντα διαφορετικής μάζας παράγουν ένα σύνθετο σήμα των οποίων οι συχνότητες προσδιορίζονται με μετασχηματισμούςfourier. Ο Ιοντισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί με σχηματισμό θετικών και αρνητικών ιόντων. Συνήθως Τα θετικά ιόντα παράγουν ένα ισχυρότερο σήμα, ιδιαίτερα για μόρια που περιέχουν μία ή περισσότερες βασικές ομάδες (άζωτο).

Η σύζευξη UHPLC και φασματομετρίας ιοντισμού-ηλεκτροψεκασμού προσφέρει ιδιαίτερα αναλυτικά χαρακτηριστικά σε πεδία έρευνας και βιομηχανικής εφαρμογής. [56].



Σχήμα 3.5: Αναλυτής μάζας Orbitrap

Ο αναλυτής μάζας Orbitrap αποτελείται από μια άτρακτο για κεντρικό ηλεκτρόδιο και ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο τύπου κυλίνδρου. Τάση DC εφαρμόζεται μεταξύ των δύο αξονικά συμμετρικών ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα την ακόλουθη κατανομή ηλεκτροστατικού δυναμικού, όπως φαίνεται στο *Σχήμα 3.5* [57]

### 3.6 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

#### *Βιβλιογραφική Επισκόπηση*

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια άλλη χρωματογραφική τεχνική που βασίζεται στο διαχωρισμό των ενώσεων-στόχων που περιέχονται στην κινητή φάση (φορέας φυσικό αέριο) που προκύπτει από τη διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ τους και της σταθερής φάσης. Η σύζευξη με φασματογράφο μάζας MS, με ανιχνευτή τετραπόλων, την καθιστά τεχνική εξαιρετικά ευαίσθητη. Στην GC-MS, οι αναλύτες πρέπει να είναι πτητικοί και θερμικά σταθεροί. Είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά λόγω της υψηλής ικανότητας διαχωρισμού και αναπαραγωγιμότητας. Η GC-MS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στις μελέτες οίνου, η πλειοψηφία των οποίων είναι μη στοχευμένες. Τα φασματόμετρα μάζας υψηλότερης ανάλυσης, όπως τα Time of Flight (TOF), βελτιώνουν την ευαισθησία και την ακρίβεια. Η χρήση του GC-MS περιορίζεται στην ανίχνευση πτητικών και ημίπτητικών ενώσεων, οι οποίες συνήθως βρίσκονται σε χαμηλή αφθονία στο δείγμα. Το κύριο μειονέκτημα του GC-MS είναι ο χειρισμός του δείγματος πριν από την ανάλυση, το οποίο αποσκοπεί στη δημιουργία συμβατών εκχυλισμάτων με την τεχνική GC.

Έτσι, λοιπόν, απαιτείται προκαταρκτική επεξεργασία του δείγματος για την καλύτερη ανίχνευση των μεταβολιτών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Μία από τις διαδικασίες προκατεργασίας που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση με GC-MS είναι η παραγωγοποίηση. Υπάρχει ένα πλήθος διαφορετικών αντιδραστηρίων για παραγωγοποίηση. Η παραγωγοποίηση σε δύο βήματα (οξείδωση και τριμεθυλοσιλυλίωση) εφαρμόζεται πιο συχνά. Οι λειτουργικές ομάδες που περιέχουν καρβονύλιο μετατρέπονται σε οξίμες με διαλύματα Ο-αλκυλοδροξυλαμίνης και ακολουθεί σχηματισμός εστέρων τριμεθυλοσιλυλίου (TMS) με αντιδραστήρια σιλυλίωσης για την αντικατάσταση των ανταλλάξιμων πρωτονίων με ομάδες TMS. Απαιτείται σχηματισμός οξίμης για την εξάλειψη ανεπιθύμητων αργών, αναστρέψιμων αντιδράσεων σιλυλίωσης με ομάδες καρβονυλίου, των οποίων τα προϊόντα μπορούν να είναι θερμικά ασταθή. Καθώς η εστεροποίηση είναι μια



αναστρέψιμη αντίδραση, είναι σημαντική για να αποφευχθεί η παρουσία νερού που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την κατανομή των εστέρων του TMS. Συνεπώς, το δείγμα πρέπει να ξηρανθεί και το αντιδραστήριο σιλυλιώσεως θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε περίσσεια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η εκτεταμένη ξήρανση του δείγματος μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια των πτητικών μεταβολιτών. Ένα αυτοματοποιημένο σύστημα είναι επιθυμητό για να εξασφαλιστεί μέγιστη σταθερότητα του δείγματος. Ωστόσο, αν η αυτοματοποιημένη on-line παραγωγοποίηση δεν είναι εφικτή, τα παραγοντοποιημένα δείγματα δεν πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες δωματίου για μεγάλες περιόδους [36].

Ακόμη, η ανάλυση με GC-MS απαιτεί εκχύλιση προκειμένου να απομονωθούν οι μεταβολίτες και να ενισχυθεί η συγκέντρωση. Η εκχύλιση των μεταβολιτών είναι πιθανόν το πιο κρίσιμο βήμα στη μεταβολομική, αφού εξαρτώνται από αυτή διάφορες παράμετροι [30]. Η απομόνωση των μεταβολιτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από τη φύση και τις ιδιότητες των στόχων-ενώσεων. Παρόλο που η εκχύλιση υγρού υγρού LLE έχει χρησιμοποιηθεί σε κάποιες εργασίες πάνω σε οίνους, μέθοδοι εκχύλισης, όπως η SPE, είναι οι μέθοδοι που συνήθως εφαρμόζονται στην ανάλυση με GC-MS. Η SPE είναι αποτελεσματική μέθοδος για την απομάκρυνση παρεμβαλλόμενων ουσιών και για τον εμπλουτισμό των αναλυτών, δεδομένου ότι είναι διαθέσιμοι μια ποικιλία διαφορετικών διαλυτών εκχύλισης. Επομένως, η SPE είναι πιο επιλεκτική από την LLE. Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), στην οποία μια ίνα είναι επικαλυμμένη με ένα λεπτό στρώμα προσροφητικού υλικού, επίσης πολύ συχνά χρησιμοποιείται στην ανάλυση με GC-MS. Μπορεί να συνδεθεί εύκολα σε GC, επειδή η θύρα έγχυσης του αέριου χρωματογράφου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θερμική εκρόφιση (TD) αναλύμενων ουσιών από την ίνα. Επιπλέον, η ροή του φέροντος αερίου μέσα σε ένα εγχυτήρα GC βοηθά επίσης να αφαιρεθούν οι αναλύτες από την ίνα και να μεταφερθούν στη στήλη GC. Η απορρόφηση επιτυγχάνεται συνήθως σε λιγότερο από δύο λεπτά για τις περισσότερες ενώσεις. Το κύριο πλεονέκτημα των μικροτεχνικών είναι ότι είναι αυτοματοποιημένες και γίνονται με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη που ελέγχουν τη θερμοκρασία και την ανάδευση στη διαδικασία εκχύλισης καλύτερα και παρέχουν περισσότερα αναπαραγώγιμα αποτελέσματα απ'ότι οι χειροκίνητες συσκευές. Δύο βασικοί τύποι δειγματοληψίας πραγματοποιούνται στην SPME: άμεση εκχύλιση και εκχύλιση υπερκείμενου χώρου (HS-SPME). Στην άμεση δειγματοληψία, οι ίνες απευθείας

βυθίζονται στο υγρό ή αέριο δείγμα, ενώ στη HS-SPME, η ίνα αφήνεται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Αν και η HS-SPME περιορίζεται στην ανάλυση των πιο πτητικών ενώσεων, χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάλυση GC-MS γιατί είναι ταχύτερη και πιο βολική. Άλλες επιλογές εκχύλισης είναι η εκχύλιση με ράβδο ανάδευσης (SBSE) και/ή HS-SBSE. Το κύριο πλεονέκτημα της SBSE έναντι της SPME είναι η υψηλότερη ευαισθησία που μπορεί να επιτυγχάνεται λόγω του μεγαλύτερου όγκου κατά τη φάση ρόφησης. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα είναι η έλλειψη πλήρους αυτοματοποίησης της διαδικασίας και το στενό εύρος των τύπων στατικής φάσης, που συνεπάγεται χαμηλότερη εκλεκτικότητα για τις ενώσεις που έχουν ενδιαφέρον [28].

Ορισμένα στάδια απαιτούνται κάποιες φορές μετά την προκατεργασία με ορισμένες τεχνικές εκχύλισης, όπως οι SPE ή LLE. Ένα στάδιο εξάτμισης ή συγκέντρωσης είναι απαραίτητο για να μειωθεί η ποσότητα του διαλύτη και να αυξηθεί ο μεταβολίτης πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση. Η υψηλή χρωματογραφική ανάλυση των ενώσεων και η υψηλή ευαισθησία επιτρέπει χαμηλά LOD (pmol ή nmol). Τα χρωματογραφήματα είναι πολύπλοκα και περιέχουν εκατοντάδες μεταβολίτες, οι αιχμές και οι χρόνοι εκτέλεσης είναι μεγάλοι. Η χρήση κατάλληλου λογισμικού και άλλες υπολογιστικές στρατηγικές επιτρέπουν την ανίχνευση κορυφών συνεχούς εκκλούσεως. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα εκτεταμένων βιβλιοθηκών δεδομένων φασμάτων μάζας βοηθούν σε μεγάλο βαθμό στη διαδικασία της ταυτοποίησης.

Ο πίνακας 3.3 που ακολουθεί δείχνει τις κυριότερες κατηγορίες ενώσεων που έχουν ανιχνευτεί στα σταφύλια και στο κρασί με αέρια χρωματογραφία.

**Πίνακας 3.3:** Κυριότερες κατηγορίες ενώσεων και οι ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί με GC-MS και GC-FID σε σταφύλια και κρασί.. (αναφορές [58-69])

<u>ΕΣΤΕΡΕΣ</u>	<u>ΑΛΚΟΟΛΕΣ</u>	<u>ΤΕΡΠΕΝΙΑ</u>	<u>ΝΟΡΙΣΟΠΡΕΝΟΪΔΙΑ</u>
ΒΟΥΤΑΟΝΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΦΑΙΛΥΛΛΑΙΘΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	ΛΙΜΟΝΕΝΙΟ	Α-ΙΟΝΟΝΗ
ΕΞΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	6-ΜΕΘΥΛΟ-5- ΕΠΤΑ-2-ΟΛΗ	ΤΕΡΠΙΝΟΛΕΝΙΟ	Β-ΙΟΝΟΝΗ
ΟΚΤΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	1-ΕΞΑΝΟΛΗ	Β-ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ	ΙΟΝΟΝΗ
2- ΜΕΘΥΛΠΡΟΠΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΒΕΝΖΥΛΑΛΚΟΟΛΗ	Β-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗ	Β-ΔΑΜΑΣΚΕΝΟΝΗ
ΟΞΙΚΟΣ ΕΞΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΑΙΘΑΝΟΛΗ	Α-ΤΕΡΠΙΝΕΟΛΗ	Β-ΔΑΜΑΣΚΟΝΗ
ΟΞΙΚΟΣ ΦΑΙΛΥΛΛΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΙΣΟΒΟΥΤΑΝΟΛΗ	ΝΕΡΟΛΗ	3-ΥΔΡΟΞΥ-Β- ΔΑΜΑΣΚΟΝΗ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΔΙΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΙΣΟΑΜΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	ΓΕΡΑΝΙΟΛΗ	3-ΟΞΟ-Α-ΙΟΝΟΛΗ
ΙΣΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	3-(ΜΕΘΥΛΟΘΕΙΟ)- 1-ΠΡΟΠΑΝΟΛΗ	ΟΞΙΚΟΣ ΝΕΡΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	3-ΥΔΡΟΞΥ-7,8- ΔΙΥΔΡΟ-Β-ΙΟΝΟΛΗ
ΟΞΙΚΟΣ ΙΣΟΒΟΥΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	1-ΒΟΥΤΑΝΟΛΗ	Α-ΠΙΝΕΝΙΟ	Α-ΙΟΝΟΛΗ
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	2-ΕΝΝΕΑΟΛΗ	Β-CIS-ΟΚΙΜΕΝΙΟ	Β-ΙΟΝΟΛΗ
ΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	3-ΜΕΘΥΛΟ-1- ΒΟΥΤΑΝΟΛΗ	1,5,7-ΟΚΤΑΤΡΙΕΝ-3-ΟΛΗ	ΑΚΤΙΝΙΔΟΛΕΣ

ΟΞΙΚΟΣ ΙΣΟΑΜΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	2-ΜΕΘΥΛΟ-1-ΒΟΥΤΑΝΟΛΗ	CIS/TRANS-ROSE OXIDE	RIESLING ΑΚΕΤΑΛΗ
2-ΕΞΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	1-ΟΚΤΑΝΟΛΗ	ΟΞΕΙΔΙΟ ΝΕΡΟΛΗΣ	4-ΟΞΟ-ΙΣΟΦΟΡΟΝΗ
2-ΦΟΥΡΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	(E)-3-ΕΞΕΝ-1-ΟΛΗ	ΚΙΤΡΟΝΕΛΛΟΛΗ	Β-ΙΣΟΦΟΡΟΝΗ
ΕΞΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	(Z)-3-ΕΞΕΝ-1-ΟΛΗ	CIS/TRANS ΟΚΙΜΕΝΟΛΗ	Β-ΚΥΚΛΟΚΙΤΡΑΛΗ
ΕΠΤΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	4-ΜΕΘΥΛΟ-3-ΠΕΝΤΕΝΟ-1-ΟΛΗ	CIS/TRANS ΟΞΕΙΔΙΟ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ (ΦΟΥΡΑΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ)	<u>ΟΞΕΑ</u>
ΒΟΥΤΥΡΙΚΟΣ ΛΙΝΑΛΙΛΕΣΤΕΡΑΣ	(E)-2-ΕΞΕΝ-1-ΟΛΗ	CIS/TRANS ΟΞΕΙΔΙΟ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗΣ (ΠΥΡΑΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ)	ΕΞΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ
ΔΙΥΔΡΟΚΙΝΝΑΜΩΜΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	1-ΟΚΤΕΝ-3-ΟΛΗ	ΥΔΡΟΞΥΚΙΤΡΟΝΕΛΛΟΛΗ	ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ
ΕΞΑΝΟΪΚΟΣ ΙΣΟΠΕΝΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	2-ΑΙΘΥΛΟ-1-ΕΞΑΝΟΛΗ	8-ΥΔΡΟΞΥΔΙΥΔΡΟΛΙΝΑΛΟΟΛΗ	ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ
ΜΗΛΕΪΝΙΚΟΣ ΔΙΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΦΟΥΡΦΟΥΡΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	7-ΥΔΡΟΞΥΓΕΡΑΝΙΟΛΗ	ΟΚΤΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ
ΟΚΤΑΝΟΪΚΟΣ ΠΡΟΠΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	<b><u>ΣΕΣΚΙΤΕΡΠΕΝΙΑ</u></b>	7-ΥΔΡΟΞΥΝΕΡΟΛΗ	ΔΕΚΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ
ΕΝΝΕΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΝΕΡΟΛΙΔΟΝΗ	CIS/TRANS 8-ΥΔΡΟΞΥ ΛΙΝΑΛΟΟΛΗ	ΙΣΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ
ΔΕΚΑΝΟΪΚΟΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΦΑΡΝΕΣΟΛΗ	ΔΙΕΝΔΙΟΛΗ Ι	2-ΜΕΘΥΛΟ ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ
ΔΕΚΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΡΟΤΟΥΝΔΟΝΗ	ΕΝΔΙΟΛΗ	ΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟ ΟΞΥ

TRANS-4-ΔΕΚΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	Γ-ΚΑΔΙΝΕΝΙΟ	ΔΙΕΝΔΙΟΛΗ ΙΙ	ΔΕΚΑΕΞΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ
ΟΚΤΑΝΟΪΚΟΣ ΙΣΟΑΜΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	Α-ΥΛΑΝΘΑΝΙΟ	2-ΕΞΩ-ΥΔΡΟΞΥ-1,8-ΚΙΝΕΟΛΗ	ΔΕΚΑΟΚΤΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ
ΔΕΚΑΝΟΪΚΟΣ ΠΡΟΠΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	Α-ΦΑΡΝΕΣΕΝΙΟ	1,8-ΚΙΝΕΟΛΗ	
ΔΩΔΕΚΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	Β-ΦΑΡΝΕΣΕΝΙΟ	CIS/TRANS 1,8-ΤΕΡΠΙΝΗ	
ΟΞΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ		P-MΙΝΤΕΝΟΔΙΟΛΗ Ι	
2-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ		(Ε)-ΓΕΡΑΝΙΚΟ ΟΞΥ	
2- ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ		ΤΡΙΟΛΗ	
3-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝΟΪΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ		ΜΥΡΚΕΝΟΛΗ	

<u><b>ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b></u>	<u><b>ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b></u>	<u><b>ΒΕΝΖΟΕΙΑΗ</b></u>	<u><b>ΑΖΟΤΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b></u>
ΑΚΕΤΑΛΔΕΪΔΗ	2-ΦΟΥΡΦΟΥΡΥΛΟΘΕΙΟΛΗ	ΤΖΙΝΤΖΕΡΟΝΗ	3-ΙΣΟΒΟΥΤΥΛΟ-2- ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ
ΑΚΕΤΟΪΝΗ	4-ΜΕΡΚΑΠΤΟ-4-ΜΕΘΥΛΟ-2- ΠΕΝΤΑΝΟΝΗ	ΤΖΙΝΤΖΕΡΟΛΗ	3-ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ-ΒΟΥΤΥΛΟ-2- ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ
2-ΕΝΑΝΟΝΗ	3-ΜΕΡΚΑΠΤΟΕΞΑΝ-1-ΟΛΗ	ΑΚΕΤΟΦΑΙΝΟΝΗ	3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟ-2-

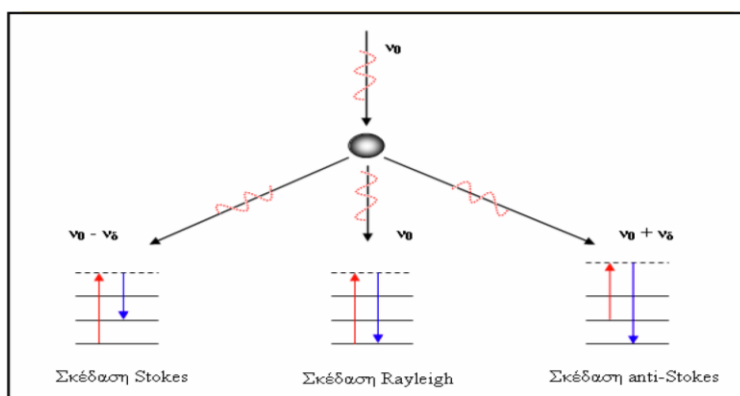
			ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ
TRANS-ΜΕΘΥΛΟΚΤΑΛΑΚΤΟΝΗ	ΟΞΙΚΟΣ 3- ΜΕΡΚΑΠΤΟΕΞΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΒΑΝΙΛΙΝΗ	3-ΑΙΘΥΛΟ-2-ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΗ
ΔΙΑΚΕΤΥΛΙΟ	BENZOLOMETHANOΘΕΙΟΛΗ	ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΣ ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	<b><u>ΛΑΚΤΟΝΕΣ</u></b>
ΙΣΟΒΟΥΤΥΡΑΛΔΕΨΔΗ	ΔΙΜΕΘΥΛΟΣΟΥΛΦΙΔΙΟ	ΕΥΓΕΝΟΛΗ	Γ-ΒΟΥΤΥΡΟΛΑΚΤΟΝΗ
2-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝΑΛΗ	ΜΕΘΥΛΟΜΕΡΚΑΠΤΑΝΗ	CIS/TRANS ΙΣΟΕΥΓΕΝΟΛΗ	Γ-ΕΞΑΛΑΚΤΟΝΗ
ΙΣΟΒΑΛΕΡΑΛΔΕΨΔΗ	ΑΙΘΥΛΟΜΕΡΚΑΠΤΑΝΗ	2-ΦΑΙΝΥΛΟΑΙΘΑΝΟΛΗ	Γ-ΕΝΝΕΑΛΑΚΤΟΝΗ
1-ΟΚΤΕΝ-3-ΟΝΗ	ΔΙΑΙΘΥΛΟΣΟΥΛΦΙΔΙΟ	BENZΥΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	Γ-ΔΕΚΑΛΑΚΤΟΝΗ
(E)-2-ΕΠΤΑΝΑΛΗ	ΔΙΜΕΘΥΛΟΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΟ	ΑΚΕΤΟΒΑΝΙΛΟΝΗ	
ΜΕΘΕΙΟΝΑΛΗ	ΔΙΑΙΘΥΛΟΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΟ	4-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΑΛΔΕΨΔΗ	
(E)-2-ΟΚΤΕΝΑΛΗ	METHYL THIOACETATE	2,4- ΔΙΜΕΘΥΛΟΒΕΝΖΑΛΔΕΨΔ Η	
ΕΞΑΝΑΛΗ	ΘΕΙΟΟΞΙΚΟΣ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑΣ	ΦΑΙΝΥΛΟΑΚΕΤΑΛΔΕΨΔΗ	
(E)-2-ΕΞΑΝΑΛΗ	2-ΜΕΡΚΑΠΤΟΑΙΘΑΝΟΛΗ	ΣΙΡΙΓΓΑΛΔΕΨΣΗ	
(Z)-3-ΕΞΑΝΑΛΗ	2-(ΜΕΘΥΛΟΘΕΙΟ)-1-ΑΙΘΑΝΟΛΗ	ΣΥΡΙΠΤΟΛΗ	
(Z)-2-ΕΝΝΕΑΛΗ	3-(ΜΕΘΥΛΟΘΕΙΟ)-1- ΠΡΟΠΑΝΟΛΗ	ΒΑΝΙΛΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	
ΦΟΥΡΦΟΥΡΑΛΗ	4-(ΜΕΘΥΛΟΘΕΙΟ)-1- ΒΟΥΤΑΝΟΛΗ	ΣΙΝΑΠΙΚΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	

5-ΜΕΘΥΛΟΦΟΥΡΦΟΥΡΑΛΗ	2-ΦΟΥΡΑΝΟΜΕΘΑΝΟΘΕΙΟΛΗ	Ο-ΚΥΜΕΝΙΟ	
ΓΕΡΑΝΙΑΛΗ	BENZOΘΕΙΑΖΟΛΗ	Π-ΚΥΜΕΝΙΟ	
ΝΕΡΑΛΗ	ΘΕΙΑΖΟΛΗ	4-ΑΙΘΥΛΟΦΑΙΝΟΛΗ	
ΓΛΥΟΞΑΛΗ	5-(2-ΥΔΡΟΞΥΑΙΘΥΛΟ)-4-ΜΕΘΥΛΟΘΕΙΑΖΟΛΗ	4-ΒΙΝΥΛΟΦΑΙΝΟΛΗ	
ΜΕΘΥΛΟΓΛΥΟΞΑΛΗ	CIS/TRANS 2-ΜΕΘΥΛΟΘΕΙΟΦΑΙΝΟ-3-ΟΛΗ	2'-ΑΜΙΝΟΑΚΕΤΟΦΑΙΝΟΝΗ	
ΓΛΥΚΟΛΑΛΔΕΨΔΗ	2-ΜΕΘΥΛΟΤΕΤΡΑΥΔΡΟΘΕΙΟΦΑΙΝ-3-ΟΝΗ	<u>ΓΟΥΑΪΑΚΟΛΗ</u>	
ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΠΑΝΔΙΑΛΗ	CIS/TRANS 2-ΜΕΘΥΛΟΤΕΤΡΑΥΔΡΟΘΕΙΟΦΑΙΝ-3-ΟΛΗ		
2,4-ΕΝΝΕΑΔΙΕΝΑΛΗ	ΘΕΙΚΟΣ 3-ΜΕΡΚΑΠΤΟΕΞΑΝΟΛΕΣΤΕΡΑΣ		
2,6-ΕΝΝΕΑΔΙΕΝΑΛΗ	4-ΜΕΡΚΑΠΤΟ-4-ΜΕΘΥΛΟΠΕΝΤΑΝ-2-ΟΛΗ		
	3-ΜΕΡΚΑΠΤΟ-3-ΜΕΘΥΛΟΒΟΥΤΑΝ-1-ΟΛΗ		

### 3.7 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN

Το φαινόμενο Raman παρατηρήθηκε, για πρώτη φορά το 1928, από τους C.V. Raman και K.S. Krishnan και, ανεξάρτητα, από τους G. Landsberg και L. Madelstam. Αποτελεί ένα φαινόμενο το οποίο προκύπτει από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης. Όταν μια δέσμη ισχυρής ακτινοβολίας καθορισμένης συχνότητας προσπίπτει σε μια ουσία (αέριο, υγρό ή στερεό), η ακτινοβολία που σκεδάζεται έχει όχι μόνο την αρχική συχνότητα αλλά και ορισμένες άλλες συχνότητες οι οποίες είναι γενικά χαμηλότερες και περιστασιακά υψηλότερες από εκείνη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως σκέδαση Raman. Οι φασματικές γραμμές που προκύπτουν από τις χαμηλότερες συχνότητες απ' ότι της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ονομάζονται γραμμές Stokes και εκείνες που προέρχονται από υψηλότερες συχνότητες ονομάζονται γραμμές anti-Stokes [70]. Στο Σχήμα 3.6 απεικονίζεται συνοπτικά το φαινόμενο Raman.

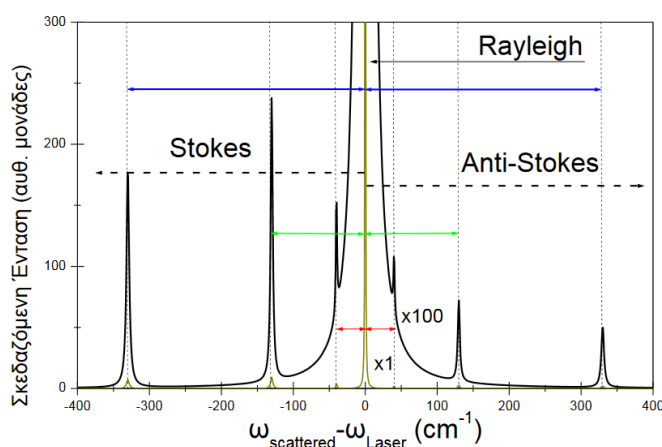
Στα φάσματα Raman οι συχνότητες δόνησης  $\nu_0$  εκφράζονται ως μετατοπίσεις  $\nu_0 \pm \nu_s$  (Raman Shift). Κάθε μετατόπιση είναι ισοδύναμη με την διαφορά δύο ενεργειακών επιπέδων δόνησης της ουσίας. Η φασματοσκοπία Raman καταγράφει αυτές τις ενεργειακές διαφορές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη διέγερση μιας ορισμένης δόνησης του μορίου της ουσίας. Κάθε κορυφή του φάσματος Raman αντιστοιχεί σε δόνηση της συγκεκριμένης ουσίας. Κάθε δόνηση η οποία προκαλεί μεταβολή στην πολωσιμότητα του εξεταζόμενου χημικού είδους, είναι ενεργός κατά Raman, και εμφανίζεται και στο φάσμα Raman [71].



Σχήμα 3.6: Σχηματική απεικόνιση φαινομένου Raman



Ένα φάσμα Raman, στο οποίο καταγράφεται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, συναρτήσει της συχνότητας, έχει τη μορφή που φαίνεται στο σχήμα 3.7.



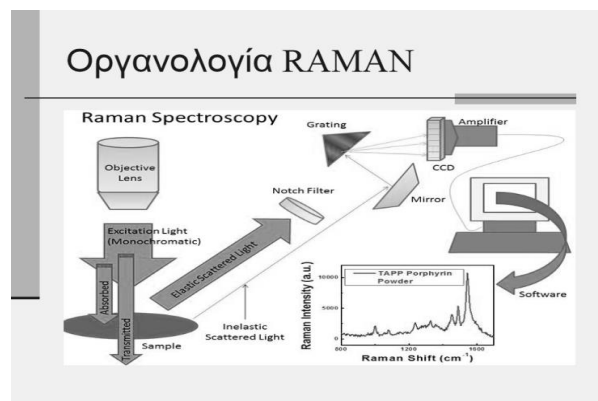
**Σχήμα 3.7:** Τυπικό φάσμα σκέδασης Raman, στο οποίο φαίνονται η ζώνη ελαστικής σκέδασης (Rayleigh) και οι ζώνες μη-ελαστικής σκέδασης (Stokes και Anti-Stokes).

Για καθαρά πρακτικούς λόγους συνηθίζεται τα αποτελέσματα να εκφράζονται σε κυματαριθμούς αντί συχνοτήτων. Η συχνότητα  $\nu$  εκφράζει τον αριθμό των δονήσεων ενός είδους στη μονάδα του χρόνου. Η αντίστοιχη ποσότητα σε κυματαριθμούς εκφράζει τον αριθμό των κυμάτων ανά cm και σχετίζεται με τη συχνότητα μέσω της εξίσωσης  $\sim \nu/c$ , όπου  $c$  η ταχύτητα του φωτός.

Τα φασματομέτρα Raman βασίζονται σε μία από τις δύο τεχνολογίες: στη φασματοσκοπία διασποράς Raman και στη φασματοσκοπία Raman με μετασχηματισμό κατά Fourier. Κάθε τεχνική έχει μοναδικά πλεονεκτήματα και καθεμία είναι κατάλληλη για συγκεκριμένους τύπους ανάλυσης.

Για να παρατηρηθεί το φάσμα Raman, είναι απαραίτητο να διαχωριστεί το συλλεγόμενο σκεδαζόμενο φως Raman στα μήκη κύματός του. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συλλογή του σκεδαζόμενου φωτός σε ένα φράγμα περίθλασης, το οποίο χωρίζει τη δέσμη στα μήκη κύματός του. Οι δέσμες που έχουν διαχωρισθεί κατευθύνονται πάνω σε έναν ανιχνευτή σύζευξης φορτίου (charge-coupled device ή CCD). Αυτά τα φασματομέτρα συνήθως χρησιμοποιούν laser ορατής ακτινοβολίας. Τα τυπικά μήκη κύματος laser είναι: 1064 nm, 780 nm, 633 nm, 532 nm και 473 nm, κ.ά. Η ένταση της σκέδασης Raman είναι ανάλογη με  $1/\lambda^4$ . Κατά συνέπεια, laser μικρού μήκους κύματος δίνουν ισχυρότερο σήμα Raman. Παρά το γεγονός ότι αυτό θα σήμαινε πως όλα τα φάσματα Raman θα πρέπει να συλλέγονται χρησιμοποιώντας laser μικρότερου

μήκους κύματος, το φαινόμενο του φθορισμού είναι πολύ πιο πιθανό να συμβεί κάτω από αυτές τις συνθήκες [72].



Σχήμα 3.8 Φασματόμετρο διασποράς Raman

### Φασματοσκοπία Raman και ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία Raman, όπως ακριβώς και η φασματοσκοπία υπερύθρου IR, μπορεί να θεωρηθεί ως δακτυλικό αποτύπωμα, αφού η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συχνά ως μέθοδος ταυτοποίησης και ποσοτικής ανάλυσης. Ακόρεστοι δεσμοί όπως:  $-C=C-$ ,  $-C=N$ ,  $-C\equiv C-$  κ.ά. δίνουν ισχυρή σκέδαση Raman αλλά ασθενή απορρόφηση IR. Δεσμοί που περιέχουν ένα ή περισσότερα βαριά άτομα όπως  $-Cl$ ,  $-Pb$  κ.ά. δίνουν εξαιρετικά ισχυρή σκέδαση Raman και μερικές φορές και ισχυρή απορρόφηση IR.

Οι ομάδες  $-SH$ ,  $-S-S-$ ,  $-C-C-$  δίνουν εξίσου έντονο φάσμα Raman. Οι καρβονυλικές και καρβοξυλικές ομάδες έχουν ισχυρό φάσμα Raman όπως και όλες οι ενώσεις που περιέχουν δακτυλίους κορεσμένους ή αρωματικούς [50].

Η προκατεργασία δείγματος για τα υγρά και τα αέρια απαιτεί διήθηση για απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων που αυξάνουν τη σκέδαση και οδηγούν σε χαμηλή συλλογή σήματος. Επιπλέον απαιτείται η απομάκρυνση ουσιών που φθορίζουν, καθώς η ακτινοβολία φθορισμού είναι πιο έντονη απ' την ακτινοβολία Raman. Συνήθως τα φάσματα Raman δίνουν συμπληρωματικές πληροφορίες με αυτά του IR [51].

### Φωταύγεια

Με τον όρο φωταύγεια (luminescence) ή αλλιώς ψυχρή ακτινοβολία, χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε εκπομπή φωτός δίχως θέρμανση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όταν κάποιο σώμα εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όπου η έντασή της σε ορισμένα μήκη κύματος ή στενές περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματός τους είναι μεγαλύτερη από εκείνη της θερμικής ακτινοβολίας που εκπέμπει το ίδιο σώμα

στην ίδια θερμοκρασία. Η φωταύγεια παρατηρείται τόσο σε στερεές όσο και σε υγρές ουσίες, ανόργανες ή οργανικές και ανάλογα στο χώρο που παρατηρείται αλλά και του τρόπου με τον οποίο συμβαίνει ως διεργασία, διακρίνεται σε ατμοσφαιρική, βιοφωταύγεια, καθοδοφωταύγεια, ραδιοφωταύγεια, τριβοφωταύγεια, φωτοφωταύγεια, χημικοφωταύγεια κ.ά. Σε όλες τις περιπτώσεις παρέχεται ενέργεια στα ηλεκτρόνια των ατόμων του υλικού, η οποία προκαλεί την διέγερσή τους. Αυτά στη συνέχεια αποδιεγείρονται επανεκπέμποντας μέρος της ενέργειας που είχαν απορροφήσει υπό μορφή φωτονίων [73].

Συνήθες παραδείγμα φωτοφωταύγειας είναι ο λαμπτήρας νέου, που αποτελείται από γυάλινο σωλήνα γεμάτο με αέριο προερχόμενο από την εξάχνωση μιας σταγόνας υδραργύρου και φθορίζον επίχρισμα στο εσωτερικό του σωλήνα. Όταν η ηλεκτρική εκκένωση προκληθεί μεταξύ των ηλεκτροδίων στο σωλήνα, τα διεγερμένα άτομα του αερίου εκπέμπουν φωτόνια σε μεγάλο βαθμό στην ορατή και την υπεριώδη περιοχή του φάσματος. Το φως απορροφάται από την επίστρωση και εκπέμπονται φωτόνια στο ορατό με συνεχή ενεργειακή κατανομή [74].

Όταν η ενέργεια παρέχεται σε ένα υλικό με απορρόφηση (absorption) φωτός από τις περιοχές του υπέρυθρου, του ορατού ή του υπεριώδους τότε η διαδικασία της εκπομπής φωτός ονομάζεται φωτοφωταύγεια (photoluminescence). Αυτή περιλαμβάνει τόσο τα φαινόμενα του φθορισμού (fluorescence-μικροί χρόνοι ζωής των διεγερμένων σταθμών), όσο και του φωσφορισμού (phosphorescence-μεγάλοι χρόνοι ζωής των διεγερμένων σταθμών). Στη δεύτερη περίπτωση φωτοφωταύγειας συνήθως απαιτούνται ενεργά υλικά με πολυσύνθετη οργανική δομή [73].

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ο πίνακας με τις κατηγορίες των ενώσεων που έχουν προσδιοριστεί με φασματοσκοπία RAMAN

**Πίνακας 3.4:** Κατηγορίες ενώσεων που προσδιορίζονται με φασματοσκοπία Raman (Πηγές [75-77]).

<b>Κατηγορίες Ενώσεων</b>
<b>Οργανικά οξέα</b>
<b>Πολυφαινόλες</b>
<b>Ανθοκυανίνες</b>
<b>Ταννίνες</b>
<b>Υδροξυκινναμωμικά</b>

οξέα

**Καφεϊκό οξύ**

**Καφταρικό οξύ**

**π-Κουμαρικό οξύ**

**Φερουλικό οξύ**

**Σιναπικό οξύ**

**Γαλλικό οξύ**

### **3.8 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΟΡΑΤΟΥ**

#### **3.8.1 Γενικά για τη φασματοσκοπία UV-VIS**

Γενικότερα, οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, όπως είναι η φασματοφωτομετρία UV-Vis χρησιμοποιούνται για την επίλυση διαφόρων προβλημάτων χημικών σχετικά με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση και την ποσοτική ανάλυση των ενώσεων.

Τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων χημικής ανάλυσης είναι:

- Η χρήση μικρής ποσότητας δείγματος
- Η μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία
- Ο μικρός χρόνος ανάλυσης
- Το δείγμα δεν καταστρέφεται στο τέλος της ανάλυσης.

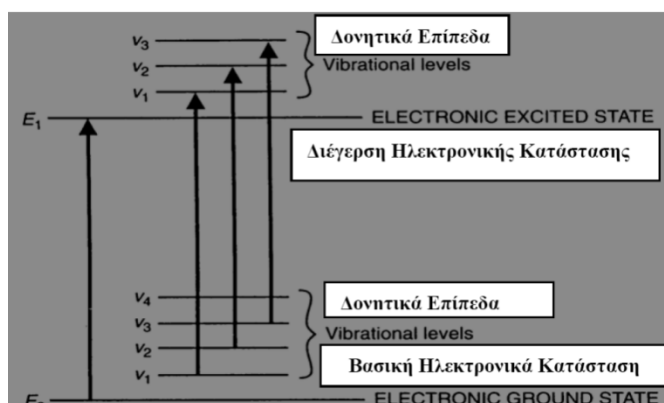
Οι περισσότερες φασματοφωτομετρικές μέθοδοι στηρίζονται στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μια ουσία, η οποία δεσμεύεται από τα άτομα ή τα μόρια της ύλης και προκαλεί διεγέρσεις ηλεκτρονίων, διεγέρσεις πυρήνων, αλλαγές στην περιστροφή και την δόνηση των μορίων. Ύστερα, τα άτομα και τα μόρια επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση, αποβάλλοντας το ποσό της ενέργειας που είχε απορροφηθεί. Η καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με τη συχνότητα της ακτινοβολίας ή το μήκος κύματος δημιουργεί το φάσμα απορρόφησης.

Η απορρόφηση της ακτινοβολίας στην υπεριώδη περιοχή προκαλεί ηλεκτρονιακές μεταβολές, μεταβολές δόνησης και περιστροφής. Επειδή οι ηλεκτρονιακές και γειτονικές ταινίες δόνησης και περιστροφής δε μπορούν να διαχωριστούν, τελικά

λαμβάνονται ευρείες κορυφές. Στο υπεριώδες υπάρχουν δύο περιοχές: 1) το εγγύς υπεριώδες (400 έως 190 nm) και 2) το άπω υπεριώδες (190 έως 100 nm) [70].

#### *Η ενέργεια των ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονιακές μεταβάσεις*

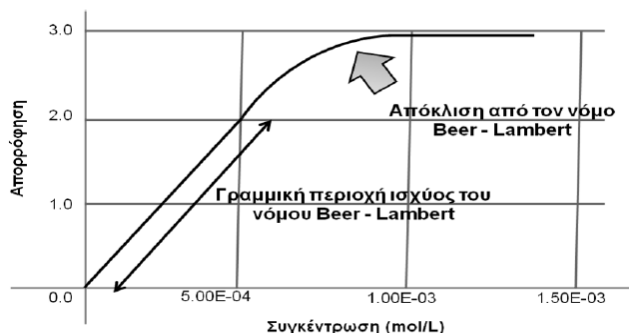
Το ορατό φως εμφανίζει ιδιότητες κύματος και σωματιδίου σύμφωνα με το κυματοσωματιδιακή διττή φύση του φωτός. Το σωματίδιο είναι ένα φωτόνιο ενώ το άτομο είναι η πηγή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είτε στο ορατό είτε στο υπεριώδες. Αυτό είναι αποτέλεσμα της κίνησης των ηλεκτρονίων γύρω από τον πυρήνα του ατόμου σε καθορισμένες τροχιές που εκπροσωπούν ένα ενεργειακό επίπεδο η κάθε μία. Τα ηλεκτρόνια απορροφούν ενέργεια από εξωτερικούς παράγοντες και κατευθύνονται σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη, αυτή η κατάσταση είναι ασταθής και συνήθως χάνει την επιπλέον ενέργεια με αποτέλεσμα να επιστρέφει πίσω στην ενεργειακή κατάσταση που βρισκόταν όπως παρουσιάζεται στο *Σχήμα 3.9*. Για να γίνει αυτό εκπέμπει φωτόνια, η ενέργεια των οποίων είναι ίση με αυτή που απορρόφησε το ηλεκτρόνιο [78].



**Σχήμα 3.9** Ενέργεια των μορίων στις ηλεκτρονικές και δονητικές μεταβάσεις [78].

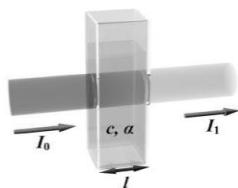
### 3.8.2 Νόμος των Lambert-Beer

Η βασική αρχή της μεθόδου της φασματοσκοπίας στηρίζεται στο νόμο των Lambert-Beer. Η ποσοτικοποίηση της απορρόφησης γίνεται με τη μέτρηση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα που μελετάται. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από ένα διάλυμα το οποίο περιέχει μια ουσία που απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω απορρόφησης της από την ουσία. Η ελάττωση της ισχύος εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας και από την απόσταση που διένυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα [51].



**Σχήμα 3.10:** Γραφική απεικόνιση νόμου Lambert-Beer [79]

Η μέτρηση της απορρόφησης ενός δείγματος συγκέντρωσης  $C$ , μέσα σε κυψελίδα πάχους  $l$ , όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.11, σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση μεταξύ των φωτονίων και των μορίων του δείγματος που μελετώνται. Η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται υπό την μορφή συγκρούσεων, όπου η κάθε σύγκρουση είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των φωτονίων και των αριθμό των μορίων.



**Σχήμα 3.11** Διεργασία της απορρόφησης και μεταβολή της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ( $I_0$ ) μετά από διέλευση από δείγμα πάχους  $l$  και συγκέντρωσης  $C$  [79]

### 3.8.3 Οργανολογία

Οι βασικές δομικές μονάδες ενός φασματοφωτομέτρου είναι: 1) μια πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος, 2) ένας μονοχρωμάτορας για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, 3) μια κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος, 4) ένας ανιχνευτής ακτινοβολίας που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και 5) ένα σύστημα μετρήσεως που περιλαμβάνει ενισχυτή του σήματος και όργανο αναγνώσεως.

- ✓ Πηγή ακτινοβολίας. Στην υπεριώδη περιοχή (160-340 nm) χρησιμοποιείται η λυχνία εκκενώσεως δευτερίου, ενώ στην ορατή (340-800nm) λυχνία πυρακτώσεως βολφραμίου, στην οποία σπείραμα από σύρμα βολφραμίου, ευρισκόμενο σε γυάλινο περίβλημα, πυρακτώνεται με ηλεκτρικό ρεύμα και φωτοβολεί. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται μέσω

κατόπτρων στο μονοχρωμάτορα, όπου ένα φράγμα περίθλασης εμποδίζει τα μήκη κύματος που δεν είναι επιθυμητά, επιτρέποντας τη διέλευση μόνο της προεπιλεγμένης μονοχρωματικής ακτινοβολίας.

- ✓ Στη συνέχεια, η δέσμη χωρίζεται σε δύο τμήματα, ένα για το διάλυμα του δείγματος και ένα για το τυφλό ή διάλυμα αναφοράς. Καθεμία από τις δέσμες διέρχεται από μια κυψελίδα (που περιέχει το δείγμα και το τυφλό αντίστοιχα) όπου λαμβάνει χώρα απορρόφηση. Οι κυψελίδες είναι κατασκευασμένες από χαλαζία για μετρήσεις στην περιοχή του υπεριώδους ή από γυαλί για μετρήσεις στο ορατό, έχουν συγκεκριμένο πάχος, συνήθως 1 cm και θα πρέπει να δείχνουν την ίδια απορρόφηση όταν περιέχουν το ίδιο διάλυμα.
- ✓ Μετά τη διέλευσή τους από τις κυψελίδες, οι δέσμες κατευθύνονται προς τους αντίστοιχους ανιχνευτές για την μετατροπή του οπτικού σήματος σε ηλεκτρικό και την ενίσχυσή του. Όταν προσπίπτει ακτινοβολία στην επιφάνεια του ημιαγωγού, προκαλεί ροή ηλεκτρονίων από τον αγωγό προς το μεταλλικό στρώμα, το οποίο συνδέεται με εξωτερικό αγωγό και το κύκλωμα διαρρέεται από ασθενές ρεύμα.

### **3.9 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ FOURIER ΜΕ ΑΠΟΣΒΕΝΟΥΣΑ ΟΛΙΚΗ ΑΝΑΚΛΑΣΗ (ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE-FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY, ATR-FT-IR)**

#### *Βιβλιογραφική Επισκόπηση*

Η φασματοσκοπία δόνησης είναι μια μη επεμβατική μέθοδος αποτύπωσης δακτυλικών αποτυπωμάτων που επιτρέπει την ταχεία, μη καταστρεπτική, ανάλυση υψηλής απόδοσης σε ποικιλία δειγμάτων. Όταν το δείγμα ακτινοβολείται με φως, οι χημικοί δεσμοί σε συγκεκριμένα μήκη κύματος απορροφούν αυτό το φως και δημιουργούνται δονήσεις. Αυτές οι απορροφήσεις / δονήσεις μπορούν στη συνέχεια να συσχετιστούν με απλούς δεσμούς ή λειτουργικές ομάδες ενός μορίου για τον προσδιορισμό άγνωστων ενώσεων. Η φασματοσκοπία FT-IR είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για τη μεταβολομική ανάλυση λόγω της ικανότητάς του να αναλύει υδατάνθρακες, αμινοξέα οξέα, λιπίδια, λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες ταυτόχρονα. Χρησιμοποιείται ακόμη ελάχιστα, στις μελέτες οίνου. Παρά το πλήθος των σημάτων που παρέχονται από το FT που αντιστοιχεί στα C, H, O, N

και S, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί και μια άλλη αναλυτική τεχνική για την ανάλυση διαφορετικών οικογενειών ενώσεων. Επομένως, η συμπληρωματικότητα των διαφορετικών τεχνικών επιτρέπει την καλύτερη απεικόνιση της χημικής σύστασης του οίνου.

Το FT-IR είναι μια πολύ ευέλικτη τεχνική που απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Ένα από τα κύρια μειονεκτήματά του είναι η έντονη απορρόφηση νερού στην περιοχή των μέσων IR (MIR), γι' αυτό και συνιστάται αφυδάτωση του δείγματος ή βραχύχρονοι χρόνοι ακτινοβολίας σε συνδυασμό με αύξηση του αριθμού των σαρώσεων για την υπέρβαση αυτού του περιορισμού.

**Πίνακας 3.5** Ενώσεις που έχουν προσδιοριστεί στο κρασί με φασματοσκοπικές τεχνικές [80]

<u>ΕΝΩΣΗ</u>	<u>ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ</u>	
ΤΡΥΓΙΚΟ ΟΞΥ	NIR	MIR
ΜΗΛΙΚΟ ΟΞΥ	NIR	MIR
ΜΕΤΑΛΛΑ	NIR	
ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	NIR	MIR
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	NIR	
ΓΛΟΥΚΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	NIR	
ΟΛΙΚΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ	NIR	
ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ	NIR	
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	NIR	
TRANS-ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ	NIR	
ΚΕΡΣΕΤΙΝΗ	NIR	
ΚΑΤΕΧΙΝΗ	NIR	
ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ	NIR	
ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ	NIR	
ΑΛΚΟΟΛΗ	MIR	
ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	MIR	
ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	MIR	
ΓΛΥΚΟΖΗ	MIR	
ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	MIR	
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	MIR	
ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ	MIR	
3- ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΤΗΣ ΔΕΛΦΙΝΙΔΙΝΗΣ	MIR	
3-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΤΗΣ ΚΥΑΝΙΔΙΝΗΣ	MIR	
3-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΤΗΣ ΠΕΤΟΥΝΙΔΙΝΗΣ	MIR	
3-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΤΗΣ ΜΑΛΒΙΔΙΝΗΣ	MIR	



### *Γενικά στοιχεία για την υπέρυθρη ακτινοβολία*

Η υπέρυθρη ακτινοβολία αποτελεί το τμήμα του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που βρίσκεται ανάμεσα στην ορατή περιοχή και στην περιοχή των μικροκυμάτων.

Η υπέρυθρη ακτινοβολία χωρίζεται σε τρεις επιμέρους περιοχές [81]:

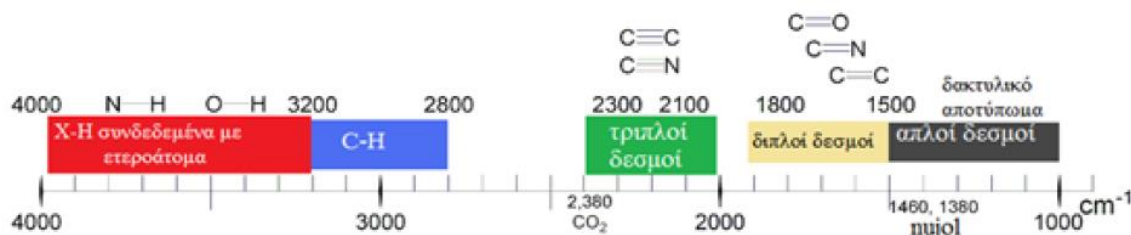
- ✓ Το εγγύς υπέρυθρο (NIR) που κυμαίνεται μεταξύ 0.8  $\mu\text{m}$  έως 2.5  $\mu\text{m}$  και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 14,000 - 4,000  $\text{cm}^{-1}$ .
- ✓ Το μέσο υπέρυθρο (MIR) που κυμαίνεται μεταξύ 2.5  $\mu\text{m}$  έως 25  $\mu\text{m}$  και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 4,000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ .
- ✓ Το άπω υπέρυθρο (FIR) που κυμαίνεται μεταξύ 25  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$  και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 400 - 10  $\text{cm}^{-1}$ .

### *Φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας*

Όταν ένα μόριο απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία τότε αυτό διεγείρεται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διέγερση είναι το μόριο να εμφανίζει μεταβολή της διπολικής ροπής. Τέτοιες περιπτώσεις μορίων είναι τα μόρια που αποτελούνται από δύο ετεροάτομα (όπως το μόριο HCl) ή τα μόρια που αποτελούνται από δεσμούς άνθρακα. Τα διατομικά μόρια που αποτελούνται από το ίδιο άτομο (όπως το H<sub>2</sub>) δεν διεγείρονται με απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας, αφού δεν μεταβάλλεται η διπολική τους ροπή [82].

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR) είναι μια καθιερωμένη τεχνική επιβεβαίωσης της ταυτότητας μιας ελεγχόμενης ουσίας. Απαιτεί υψηλής καθαρότητας δείγματα και η πρόοδος της τεχνολογίας έχει μειώσει δραστικά τους χρόνους προετοιμασίας και ανάλυσης του δείγματος [83].

Επιπλέον, η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας συγκεκριμένης συχνότητας από ένα μόριο λόγω δονήσεων και περιστροφών που λαμβάνουν χώρα σε αυτό στην ίδια συχνότητα και χρησιμοποιείται η περιοχή με μήκη κύματος από 2 - 50  $\mu\text{m}$  ή με κυματαριθμούς από 4.000 - 200  $\text{cm}^{-1}$ , δηλαδή η μέση υπέρυθρη περιοχή. Στο διάστημα από 4.000–1.500  $\text{cm}^{-1}$ , απορροφούν οι χαρακτηριστικές ομάδες κυρίως οργανικών ενώσεων, ενώ στο διάστημα από 1.500 - 200  $\text{cm}^{-1}$  απορροφούν οι απλοί δεσμοί. Το φάσμα απορρόφησης είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση και αποτελεί το "δακτυλικό αποτύπωμά" της [84].



Σχήμα 3.12 Οι απορροφήσεις στο φάσμα χαρακτηριστικών ομάδων [85].

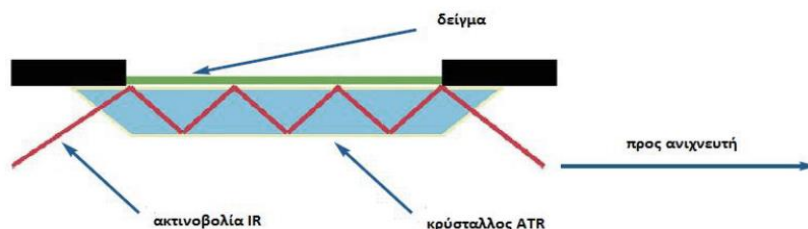
Εκτός όμως από την ποιοτική ανάλυση, με την υπέρυθη φασματοσκοπία είναι δυνατή και η ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος, καθώς το ποσό της ενέργειας που απορροφάται είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του δείγματος. Η συγκέντρωση του δείγματος προσδιορίζεται συγκρίνοντας το μέγεθος της ταινίας που ενδιαφέρει στο φάσμα με το μέγεθος της αντίστοιχης ταινίας σε φάσμα από δείγμα γνωστής συγκέντρωσης [82].

*Φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared, ATR-FT-IR)*

Στην κατηγορία των FT-IR ανήκει και το φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared, ATR-FT-IR). Στην υπέρυθη φασματοσκοπία FT-IR, όταν αναλύονται στερεά και υγρά δείγματα προκύπτουν ορισμένα προβλήματα. Η παστίλια (δισκίο) που κατασκευάζεται μπορεί να είναι εύθραυστη ή να μην περιέχει το δείγμα με ομογενοποιημένο τρόπο. Ακόμη, μπορεί η παστίλια να είναι ιδιαίτερα υγροσκοπική, οπότε η υγρασία που απορροφάει να επηρεάζει το φάσμα. Οι παραπάνω δυσκολίες ξεπερνιούνται με την τεχνική ATR-FT-IR [84].

Κατά την τεχνική αυτή, η υπέρυθη ακτινοβολία, αρχικά, διαπερνά έναν κρύσταλλο υψηλού δείκτη διάθλασης, που κατασκευάζεται από γερμάνιο ή διαμάντι και στη συνέχεια προσπίπτει στο δείγμα. Η ακτινοβολία προσπίπτει υπό συγκεκριμένη γωνία, συνήθως 45°, και υπόκειται σε πολλαπλές ολικές ανακλάσεις εντός του κρυστάλλου, διεισδύοντας σε πολύ μικρό βάθος μέσα στο δείγμα (της τάξης του 1 μm). Με αυτόν τον τρόπο, η ακτινοβολία διέρχεται μέσα στο δείγμα και οι πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στις οποίες υπόκεινται αυξάνουν την αναλογία του σήματος προς το θόρυβο, οπότε το σήμα είναι πιο έντονο σε σχέση με αυτό της FT-IR. Προϋπόθεση για να εφαρμοστεί σωστά η τεχνική είναι η καλή επαφή του δείγματος με τον κρύσταλλο. Αυτό εξασφαλίζεται με τη χρήση ειδικού εξοπλισμού που πιέζει το

δείγμα πάνω στον κρύσταλλο και με την επιλογή κρυστάλλου που να έχει μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης από εκείνο του δείγματος, ώστε να μπορεί η ακτινοβολία να υπόκειται σε πολλαπλές ολικές ανακλάσεις [85].



**Σχήμα 3.13** Το σύστημα των πολλαπλών ολικών ανακλάσεων στον κρύσταλλο ATR-FT-IR [84].)

Η ATR-FT-IR συγκριτικά με την συμβατική FT-IR έχει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Δεν χρειάζεται να κατασκευαστεί κάποια παστίλια (με συνέπεια να αποφεύγονται τα προβλήματα που αναφέρθηκαν).
- Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων βελτιώνεται χάρη στις πολλαπλές ολικές ανακλάσεις.
- Το δείγμα μπορεί να είναι σε πολύ μικρή ποσότητα, πλεονέκτημα που είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην ανάλυση ιστορικών έργων όπου η εκτεταμένη δειγματοληψία και η επεξεργασία του δείγματος είναι απαγορευτική.

## Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Η παραγωγή των οίνων στην Ελλάδα διαφέρει τόσο από τόπο σε τόπο, όσο και στο εκάστοτε οινοποιείο. Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούν οι οινολόγοι είναι απλές και βασίζονται κυρίως στην καταλληλότητα των οίνων σύμφωνα με τις παραμέτρους που έχει ορίσει η νομοθεσία (έλεγχοι για φυτοφάρμακα, μικροβιολογικοί έλεγχοι, προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων, οξύτητας, αλκοολικού τίτλου και θειώδους ανυδρίτη). Όσον αφορά τον έλεγχο οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και κυρίως του αρώματος και της γεύσης του οίνου, προσδιορίζονται εμπειρικά από τον εκάστοτε οινολόγο. Ο ποσοτικός ή/και ο ποιοτικός προσδιορισμός ουσιών με ενόργανες αναλυτικές τεχνικές παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου των χαρακτηριστικών του οίνου όπως η γεύση, το άρωμα, το χρώμα κλπ. με μεγαλύτερη αντικειμενικότητα.

Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας ήταν να ληφθεί το συνολικό μεταβολομικό προφίλ των δειγμάτων σταφυλιού και γλεύκους ποικίλιας Μοσχάτου Αλεξανδρείας Λήμνου. Πιο συγκεκριμένα, στόχος ήταν η εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων για την εύρεση ενώσεων σε σταφύλια και η μελέτη της διαφοροποίησής τους με κριτήριο την ωρίμανση και το terroir, καθώς και η παρατήρηση της μεταβολής των ενώσεων του γλεύκους κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό επιτεύχθη με την χρήση τεχνικών UPLC-HRMS και φασματοσκοπιών RAMAN, UV-VIS. Ακόμη, τα ιζήματα που προέκυψαν μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων αναλύθηκαν με ATR-FT-IR για διερευνητικούς σκοπούς.

## **Πειραματικό Μέρος**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1 ΥΛΙΚΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ- ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

#### 4.1.1 Υλικά

##### *Δείγματα σταφυλιού*

Την περίοδο που τα σταφύλια είχαν σχεδόν φτάσει σε ένα επιθυμητό επίπεδο ωρίμανσης για την οينوποίηση τους (λίγο πριν την έναρξη του τρυγητού), έγινε συλλογή δειγμάτων από τρεις διαφορετικούς αμπελώνες της νήσου της Λήμνου, με τη βοήθεια και υπό την επίβλεψη των αμπελουργών-ιδιοκτητών. Το κριτήριο επιλογής των συγκεκριμένων αμπελώνων ήταν η γεωγραφική περιοχή, το διαφορετικό υψόμετρο και η πιθανή διαφορετική σύσταση στο έδαφος. Η ποικιλία των σταφυλιών ήταν Μοσχάτο Αλεξανδρείας και ήταν ίδια σε όλα τα δείγματα.

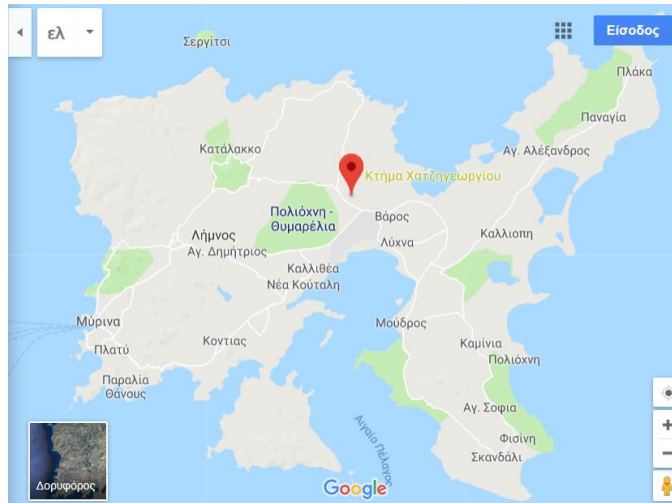
Τα σταφύλια συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικούς αμπελώνες σε τρεις διαφορετικές ημερομηνίες (για να ελεγχθεί ο παράγοντας της ωρίμανσης των σταφυλιών) με διάστημα 5 ημερών ανάμεσα στις δειγματοληψίες. Πιο συγκεκριμένα, οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 8, 13 και 18 Αυγούστου 2017 από τα αμπελία Μετόχα παλιό, Μετόχα πάνω και Λαγοπάτι (με αυτή τη σειρά) και από κάθε αμπελώνα συλλέχθηκαν από τυχαία σημεία 3 δείγματα βάρους 300 - 500 g το καθένα. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από την προπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Χημικών Μηχανικών ΑΠΘ, Μαρινάκη Μαρία, και οι αμπελώνες από όπου έγινε η συλλογή των σταφυλιών ανήκουν στη οικογένειά της. Η συλλογή έγινε σε τελάρο από τον αμπελουργό, ο οποίος μάζευε μικρά τσαμπάκια με λίγες ράγες από διάφορα κλήματα καθ' όλη την έκταση του αμπελιού τόσο από πιο σκιερά όσο και από περισσότερο εκτεθειμένα στον ήλιο τμήματα. Στη συνέχεια, τα τσαμπιά διαχωρίστηκαν με τυχαίο τρόπο σε μικρά σακουλάκια τροφίμων ζυγίζοντάς τα σε κλασικό ζυγό ώστε να έχουν περίπου το ίδιο βάρος. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για να θεωρηθούν τα δείγματα αντιπροσωπευτικά.

Για την καταγραφή των δειγμάτων, θεωρήθηκε αναγκαία η κωδικοποίηση των δειγμάτων με αριθμούς και όχι με ονόματα αμπελώνων και ημερομηνίες όπως είχε γίνει αρχικά. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται η αντιστοίχιση των 27 δειγμάτων σταφυλιών με τον αντίστοιχο αριθμό - 'κωδικό' τους.

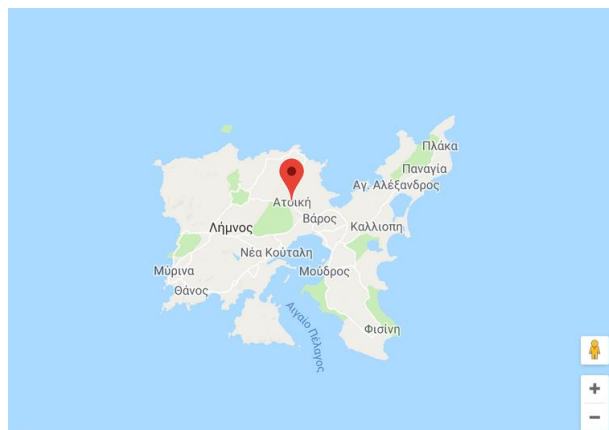
**Πίνακας 4.1** Αντιστοίχιση δειγμάτων σταφυλιών με αριθμό-κωδικό για τη διευκόλυνση των πειραματικών διαδικασιών

<b>Δείγμα Σταφυλιού Αμπελώνας Ημερομηνία</b>	<b>Κωδικός</b>	<b>Δείγμα Σταφυλιού Αμπελώνας Ημερομηνία</b>	<b>Κωδικός</b>
Μετόχα Παλιό 08/08/2017	Σ1	Μετόχα πάνω 13/08/2017	Σ15
Μετόχα Παλιό 08/08/2017	Σ2	Λαγοπάτι 13/08/2017	Σ16
Μετόχα Παλιό 08/08/2017	Σ3	Λαγοπάτι 13/08/2017	Σ17
Μετόχα πάνω 08/08/2017	Σ4	Λαγοπάτι 13/08/2017	Σ18
Μετόχα πάνω 08/08/2017	Σ5	Μετόχα Παλιό 18/08/2017	Σ19
Μετόχα πάνω 08/08/2017	Σ6	Μετόχα Παλιό 18/08/2017	Σ20
Λαγοπάτι 08/08/2017	Σ7	Μετόχα Παλιό 18/08/2017	Σ21
Λαγοπάτι 08/08/2017	Σ8	Μετόχα πάνω 18/08/2017	Σ22
Λαγοπάτι 08/08/2017	Σ9	Μετόχα πάνω 18/08/2017	Σ23
Μετόχα Παλιό 13/08/2017	Σ10	Μετόχα πάνω 18/08/2017	Σ24
Μετόχα Παλιό 13/08/2017	Σ11	Λαγοπάτι 18/08/2017	Σ25
Μετόχα Παλιό 13/08/2017	Σ12	Λαγοπάτι 18/08/2017	Σ26
Μετόχα πάνω 13/08/2017	Σ13	Λαγοπάτι 18/08/2017	Σ27
Μετόχα πάνω 13/08/2017	Σ14		

Παρακάτω απεικονίζονται στο χάρτη οι τοποθεσίες των αμπελώνων, από τους οποίους έγινε η συλλογή των δειγμάτων σταφυλιών



**Σχήμα 4.1:** Χάρτης με την τοποθεσία του αμπελώνα «Λαγοπάτι»



**Σχήμα 4.2:** Χάρτης με την τοποθεσία των αμπελώνων «Μετοχα παλιο» και «Μετόχα πάνω» (βρίσκονται γεωγραφικά πολύ κοντά, διαφέρουν στο υψόμετρο)

Μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα έπρεπε να καταψυχθούν. Τα δείγματα της 8ης Αυγούστου τοποθετήθηκαν σε μεγάλο οικιακό καταψύκτη μία ώρα μετά τη συλλογή τους, ενώ τα υπόλοιπα 18 δείγματα μεταφέρθηκαν σε οικιακό ψυγείοκαταψύκτη 4 ώρες μετά τη συλλογή τους. Στις 11 Σεπτεμβρίου τοποθετήθηκαν σε φελιζόλ (υλικό κατάλληλο για τη μεταφορά αντικειμένων ευαίσθητων στη θερμοκρασία, όπως φάρμακα) με προσθήκη παγοκυστών για τη διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά τους. Μεταφέρθηκαν αεροπορικώς από τη Λήμνο στη Θεσσαλονίκη και επανατοποθετήθηκαν σε σπιτικό ψυγείοκαταψύκτη. Κατά τη μεταφορά τους τα δείγματα έμειναν εκτός κατάψυξης συνολικά για 3.5 ώρες. Στις 6 Οκτωβρίου μεταφέρθηκαν σε ανθεκτική πλαστική τσάντα σε καταψύκτη στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών της Πολυτεχνικής Σχολής



ΑΠΘ. Εκεί, φυλάχθηκαν στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την κατάλληλη στιγμή της προκατεργασίας τους για την ανάλυσή τους.

#### *Δείγματα γλεύκους*

Μετά το πέρας του τρυγητού, η διαδικασία για την οινοποίηση έχει ως εξής: τα σταφύλια μεταφέρονται στο οινοποιείο για οινοποίηση. Αφού προηγηθεί έκθλιψη και αποβοστρύχωσή τους, περνούν από το πιεστήριο και το γλεύκος που δημιουργείται τοποθετείται σε άδειες δεξαμενές. Ύστερα από μέτρηση της οξύτητας του γλεύκους και της περιεκτικότητάς του σε θειώδη ανυδρίτη, προστίθενται κατάλληλες ποσότητες τρυγικού οξέος σε μορφή κρυστάλλων και θειώδους ανυδρίτη σε αέρια μορφή (εάν και εφόσον απαιτείται διόρθωσή τους). Ο θειώδης ανυδρίτης, λειτουργώντας και ως συντηρητικό του γλεύκους (και μετέπειτα του οίνου), προστίθεται στα σταφύλια από τα πιεστήρια ακόμη.

Κατόπιν, ζελατίνη και πολυβινυλοπυρρολιδόνη, σε μορφή σκόνης, διαλύονται σε νερό και προστίθενται και αυτές στη δεξαμενή. Ο λόγος που προστίθεται η ζελατίνη είναι για τη συγκράτηση των ανεπιθύμητων ουσιών στο επάνω τμήμα της δεξαμενής, ενώ η PVPP αποσκοπεί κυρίως στην προστασία του γλεύκους από την οξείδωση και βοηθά παράλληλα τη ζελατίνη στην απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών. Ύστερα, το γλεύκος διέρχεται από μηχάνημα όπου τροφοδοτείται με άζωτο και εισάγεται σε καθαρή δεξαμενή όπου και παραμένει για 4 ώρες. Ο χρόνος αυτός απαιτείται λόγω του όγκου της δεξαμενής (~25,000 L) προκειμένου να δημιουργηθεί η πηκτή (gel) που θα απομακρύνει τις ανεπιθύμητες ουσίες. Τέλος, το καθαρό πλέον γλεύκος μεταφέρεται από το κάτω τμήμα της δεξαμενής σε μία νέα δεξαμενή για ψύξη και όταν φθάσει περίπου στους  $18 - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , τότε είναι έτοιμο για την προσθήκη των ζυμών και των θρεπτικών τους. Η ημέρα που προστίθενται οι ζύμες θεωρείται και η πρώτη ημέρα αλκοολικής ζύμωσης.

Από το οινοποιείο του Αγροτικού Συνεταιρισμού Λήμνου 'Η Ένωση' ευγενικά παραχωρήθηκαν 10 δείγματα γλεύκους, ένα για κάθε μέρα της αλκοολικής ζύμωσης, που διήρκεσε 10 μέρες. Τα δείγματα των 4 πρώτων ημερών συλλέχθηκαν σε γυάλινα μπουκάλια ρετσίνας των 500 mL, ενώ τα υπόλοιπα 7 δείγματα σε πλαστικά μπουκαλάκια των 200 mL. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από την Μαρινάκη Μαρία.

### Πειραματικές λεπτομέρειες για τη διαδικασία γλυκοποίησης

Την 2<sup>η</sup> μέρα έγινε έλεγχος και ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 17 °C, η οποία και διατηρήθηκε μέχρι να ολοκληρωθεί η ζύμωση. Την 3<sup>η</sup> μέρα πραγματοποιήθηκε αερισμός για 20 λεπτά και προστέθηκαν επιπλέον ζύμες και θρεπτικά υλικά και τέλος, η ημέρα που θεωρήθηκε ότι η ζύμωση έχει ολοκληρωθεί ορίστηκε όταν η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα ήταν μικρότερη από 2 g/L και ο αλκοολικός τίτλος πάνω από 11 % vol.

Η παραλαβή των δειγμάτων γινόταν καθημερινά τις μεσημεριανές ώρες από τη δεξαμενή 98, η οποία περιείχε γλεύκος λευκών σταφυλιών ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας. Η δεξαμενή είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο χάλυβα 304 και η χωρητικότητά της είναι 25,000 L. Η ποσότητα γλεύκους που προστέθηκε σε αυτήν ήταν 21,600 L. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζεται η αντιστοίχιση των 10 δειγμάτων γλεύκους με τον αντίστοιχο αριθμό - 'κωδικό' τους.

Τα δείγματα γλεύκους τοποθετούνταν αμέσως μετά την παραλαβή τους στην κατάψυξη του οινοποιείου. Το πρωί της 11<sup>ης</sup> Σεπτεμβρίου, μεταφέρθηκαν από το οινοποιείο σε οικιακό ψυγείοκαταψύκτη και το μεσημέρι τοποθετήθηκαν σε φελιζόλ (όπου μεταφέρονται αντικείμενα ευαίσθητα στη θερμοκρασία, όπως φάρμακα), με την προσθήκη παγοκυστών για τη διατήρηση χαμηλής θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά τους. Μεταφέρθηκαν αεροπορικώς από τη Λήμνο στη Θεσσαλονίκη και επανατοποθετήθηκαν σε οικιακό ψυγείοκαταψύκτη. Τα δείγματα για τη μεταφορά τους έμειναν εκτός κατάψυξης συνολικά για 3.5 ώρες. Στις 6 Οκτωβρίου μεταφέρθηκαν σε ανθεκτική πλαστική τσάντα σε καταψύκτη στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών της Πολυτεχνικής Σχολής ΑΠΘ όπου φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους (Perestrelo, 2011).

Τα δείγματα γλεύκους έχουν κωδικοποιηθεί, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.2

Πίνακας 4.2 Αντιστοίχιση δειγμάτων γλεύκους με αριθμό-κωδικό

Δείγμα γλεύκους	Κωδικός	Δείγμα γλεύκους	Κωδικός
1 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 29/08/2017	Γ1	6 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 03/09/2017	Γ6
2 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης	Γ2	7 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης	Γ7

30/08/2017		04/09/2017	
3 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 31/08/2017	Γ3	8 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 05/09/2017	Γ8
4 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 01/09/2017	Γ4	9 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 06/09/2017	Γ9
5 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 02/09/2017	Γ5	10 <sup>η</sup> ημέρα αλκοολικής ζύμωσης 07/09/2017	Γ10

#### Πρότυπες ενώσεις

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των σακχάρων και της αιθανόλης στο γλεύκος και στα σταφύλια με την τεχνική της φασματοσκοπίας Raman παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, φρουκτόζης και αιθανόλης (Martin et al, 2015). Τα πρότυπα γλυκόζης και αιθανόλης καθαρότητας 99,9% κατ όγκον παραχωρήθηκαν από τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτρη Χριστόφιλο του Τμήματος Χημικών Μηχανικών ΑΠΘ (Εργαστήριο Φυσικής, Πολυτεχνικής Σχολής Α.Π.Θ.) και φρουκτόζη 10% w/v παραχωρήθηκε από την Δρ. Αλεξάνδρα Μοσχονά. Επιπλέον, για την ταυτοποίηση των ιζημάτων με FT-IR χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα ζυμών, ζελατίνης, θρεπτικών και τρυγικού οξέος (Grangeteau, 2016), τα οποία παραχωρήθηκαν από τον οινολόγο του οινοποιείου του Αγροτικού Συνεταιρισμού Λήμνου "Η Ένωση", κ. Νικόλαο Βακιρτζή.

#### 4.1.2 Σκεύη και Συσκευές

Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3 Σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία

Σκεύη	Περιγραφή	Συσκευή	Περιγραφή
Φιαλίδια φυγοκέντρισης	15 ml	Υδατόλουτρο	BUCHI Heating Bath B-491
Σύριγγες	2.5 ml	Ηλεκτρονική Πιπέτα	100 - 1000 μl, Eppendorf Research

<b>Γυάλινα Φιαλίδια</b>	12 ml	<b>Κυκλοαναδευτήρας</b>	Vortex MS2 Minishaker IKA
<b>Φιαλίδια LC-MS</b>	2.5 ml	<b>Ζυγός ακριβείας</b>	Kern & Sohn GmbH, ABS, capacity: 120 gr, readability:0.1mg
<b>Φιλτράκια</b>	0.22 μm και 0.45 μm, Chromatography Direct.com	<b>Φυγόκεντρος</b>	KUBOTA 5922
<b>e.p tips</b>	Eppendorf tips Standard 50 - 1000 μl	<b>Φυγόκεντρος</b>	Hettich D-78532

### 4.1.3 Οργανολογία

Για την ανάλυση των δειγμάτων οι διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Διάταξη υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας (LC-MS) Thermo Scientific LTQ Orbitrap Discovery η οποία ανήκει στις διατμηματικές υποδομές του τμήματος Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ. και παρουσιάζεται στο *Σχήμα 4.1* με αυτόματο δειγματολήπτη εισαγωγής δείγματος.



**Σχήμα 4.2** Διάταξη LC-MS

- Φασματοσκοπική διάταξη Raman Horiba Scientific LabRam HR η οποία παρουσιάζεται στο *Σχήμα 4.2* (Εργαστήριο Φυσικής, Πολυτεχνικής Σχολής Α.Π.Θ.)



Σχήμα 4.4 Διάταξη Raman

- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Hitachi U-1900, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.3 (Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών Α.Π.Θ.)



Σχήμα 4.5: Διάταξη UV-Vis

- Φασματοσκοπική διάταξη ATR-FTIR η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.4 (Τμήμα Φαρμακευτικής Σχολής Α.Π.Θ.)



Σχήμα 4.6 Διάταξη ATR-FTIR

## 4.2 ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### 4.2.1 Προκατεργασία δειγμάτων σταφυλιού

Αρχικά τα δείγματα των σταφυλιών εξέρχονταν από την κατάψυξη για μερικά λεπτά, όπου λαμβάνονταν με τυχαία επιλογή 5-6 ράγες από κάθε δείγμα και ύστερα επανατοποθετούνταν στην κατάψυξη για μελλοντική χρήση. Οι ράγες που είχαν επιλεγεί τοποθετούνταν σε αλουμινόχαρτο, στο οποίο αναγραφόταν σε ετικέτα ο κωδικός που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα και αφήνονταν να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια οι ράγες κάθε δείγματος χωριστά, τοποθετούνταν σε γυάλινο γουδί για έκθλιψη. Ύστερα, διέρχονταν από κόσκινο και με τη βοήθεια γυάλινου χωνιού εισάγονταν 10 mL του διηθήματος σε φιαλίδια φυγοκέντρισης των 15 mL.

Για ορθή φυγοκέντριση δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε τα φιαλίδια φυγοκέντρισης να έχουν τον ίδιο όγκο και θεωρώντας ότι η πυκνότητά τους είναι παρόμοια, να έχουν τελικά το ίδιο βάρος.

Στη συνέχεια τα δείγματα σφραγίζονταν με parafilm και τοποθετούνταν στη φυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά σε 4.800 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, αφαιρούνταν από το σωλήνα με πιπέτα Pasteur το υπερκείμενο υγρό, προσεκτικά χωρίς το ίζημα, και τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια των 12 mL. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνταν κατόπιν για οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία απαιτούσε η εκάστοτε αναλυτική τεχνική [86].

### 4.2.2 Προκατεργασία δειγμάτων γλεύκους

Τα δείγματα γλεύκους βρίσκονταν σε γυάλινα μπουκάλια των 500 mL και σε πλαστικά μπουκαλάκια των 200 mL, ποσότητες που απαιτούσαν αρκετό χρόνο για την απόψυξή τους. Για το λόγο αυτό, αποψύχθηκαν και εισήχθησαν σε πλαστικά φιαλίδια των 50 mL και τοποθετήθηκαν και πάλι στην κατάψυξη.

Η κοινή προκατεργασία του γλεύκους για όλες τις αναλυτικές τεχνικές είναι η εξής: τα φιαλίδια των 50 mL εξάγονταν από την κατάψυξη και αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για την απόψυξή τους, στη συνέχεια αναδεύονταν σε Vortex για 30 sec σε 2.200 rpm και με απόχυση με τη βοήθεια γυάλινου χωνιού εισάγονταν 10 mL γλεύκους σε πλαστικά φιαλίδια φυγοκέντρισης των 15 mL, ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για ορθή φυγοκέντριση δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε τα φιαλίδια φυγοκέντρισης να έχουν τον ίδιο όγκο και θεωρώντας ότι η πυκνότητα τους είναι παρόμοια, να έχουν τελικά το ίδιο βάρος.

Στη συνέχεια τα δείγματα σφραγίζονταν με parafilm και τοποθετούνταν στη φυγόκεντρο, όπου φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά σε 4.800 rpm [87]. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, αφαιρούνταν από το σωλήνα με πιπέτα Pasteur το υπερκείμενο υγρό, προσεκτικά χωρίς το ίζημα, και τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια των 12 mL. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνταν κατόπιν για οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία απαιτούσε η εκάστοτε αναλυτική τεχνική.

Το ίζημα που προέκυπτε λαμβανόταν από το φιαλίδιο φυγοκέντρισης με τη βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας με πλαστικά tips και τοποθετούνταν σε ειδικό γυάλινο σκεύος, για να αναλυθούν στη συνέχεια.

### **4.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΓΛΕΥΚΟΥΣ**

Τα δείγματα και σταφυλιού και γλεύκους χαρακτηρίστηκαν με τρεις διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης, UPLC-HRMS, Raman και UV-Vis. Επίσης, το ίζημα που παρατηρήθηκε μετά από τη φυγοκέντριση του γλεύκους αναλύθηκε με ATR-FTIR.

#### **4.3.1 Υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας (LC-MS)**

##### *Περιγραφή πειραματικής διάταξης*

Το όργανο UPLC-ESI-MS είναι της εταιρείας Thermo Scientific, ανήκει στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης και αποτελεί συνδυασμό χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης με φασματομετρία μάζας, μια σύγχρονη υβριδική τεχνική με μεγάλη ποικιλία εφαρμογών.

Το σύστημα UPLC-ESI-MS απαρτίζεται από τα παρακάτω:

- ✓ Μονάδα ανάλυσης φασμάτων μάζας LTQ-ORBITRAP XL (Thermo Fisher Scientific)
- ✓ Σύστημα υγρής χρωματογραφίας LC με αντλία (Accela Pump Ser. No 750157) και θερμοστατούμενο σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη
- ✓ Μονάδα Liebert NX UPS
- ✓ Μονάδα παραγωγής N<sub>2</sub> (ClainoLCMS)
- ✓ Σύστημα ψύξης (Chiller, ThermoFlex900, Thermo Scientific)
- ✓ Φιάλη He υψηλής καθαρότητας
- ✓ Μονάδα υπολογιστή

✓ Λογισμικό χρήσης και επεξεργασίας Xcalibur 2.1

Η στήλη για το χρωματογραφικό διαχωρισμό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η Acquity UPLC HSS C18 SB 1.8 μm, 2.1 × 100 μm).



Σχήμα 4.7 Χρωματογραφική στήλη UPLC

*Πειραματική διαδικασία*

Τα δείγματα που είχαν αρχικά προκατεργαστεί όπως περιγράφηκε προηγουμένως, έπρεπε να υποστούν μία επιπλέον κατεργασία πριν την χρωματογραφική τους ανάλυση. Συγκεκριμένα, ποσότητα από τα φυγοκεντρημένα δείγματα που βρίσκονταν σε γυάλινα φιαλίδια, λαμβανόταν με τη βοήθεια σύριγγας 2.5 mL και αφού διέρχονταν από φίλτρακια 0.22 μm, τα οποία είχαν ενεργοποιηθεί με νερό LC-MS, εισάγονταν σε φιαλίδια LC-MS 2.5 mL, τα οποία σφραγίζονταν με προτρυπημένες μεμβράνες PTFE. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο για τα δείγματα του σταφυλιού, όσο και για τα δείγματα του γλεύκους [88].

Τα δείγματα αναλύθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους ανάλυσης του οργάνου, μία μεγαλύτερης (60 min) και μία μικρότερης διάρκειας (18 min), και οι αντίστοιχες παράμετροι για την υγρή χρωματογραφία και τη φασματομετρία μάζας παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.4 και 4.5.

Πίνακας 4.4 Παράμετροι μεθόδων ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας.

Παράμετρος	1 <sup>η</sup> Μέθοδος ανάλυσης			2 <sup>η</sup> Μέθοδος ανάλυσης		
Συνολικός χρόνος ανάλυσης	18 min			60 min		
Θερμοκρασία στήλης	40 °C			40 °C		
Κινητή φάση	Διαλύτης A: 0.1 % μυρμηκικό οξύ σε νερό Διαλύτης B: 0.1 % μυρμηκικό οξύ σε μεθανόλη			Διαλύτης A: 0.1 % μυρμηκικό οξύ σε νερό Διαλύτης B: 0.1 % μυρμηκικό οξύ σε μεθανόλη		
Βαθμωτή έκλυση	ΧΡΟΝΟΣ	% A	% B	ΧΡΟΝΟΣ	% A	% B



	0.00	95.0	5.0	0.00	100.0	0.0
	2.00	95.0	5.0	6.00	100.0	0.0
	15.00	0.00	100.0	56.00	0.0	100.0
	18.00	0.00	100.0	60.00	0.0	100.0
	18.01	95.0	5.0	63.00	100.0	0.0
	21.00	95.0	5.0			
<b>Ρυθμός ροής</b>	300 μl/min			300 μl/min		
<b>Ελάχιστη Πίεση</b>	250 PSI			250 PSI		
<b>Μέγιστη Πίεση</b>	8000 PSI			8000 PSI		
<b>Όγκος Έγχυσης του Δείγματος</b>	5000 μl			5000 μl		
<b>Θερμοκρασία Εσωτερικού Χώρου Αυτόματου Δειγματολήπτη</b>	4 °C			4 °C		

**Πίνακας 4.5** Παράμετροι μεθόδων ανάλυσης φασματομετρίας μάζας

<b>ΤΥΠΟΣ ΣΑΡΩΣΗΣ</b>	ΠΛΗΡΗΣ
<b>ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ</b>	ΘΕΤΙΚΗ (ΜΟΝΟ)
<b>ΑΝΑΛΥΤΗΣ</b>	FTMS SCAN EVENT 1, ION TRAP SCAN EVENT 2 AND 3
<b>ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΘΡΑΥΣΗΣ</b>	35 V
<b>ΕΥΡΟΣ ΜΑΖΑΣ</b>	ΚΑΝΟΝΙΚΟ
<b>RESOLUTION</b>	30000
<b>ΣΥΜΒΑΝΤΑ ΣΑΡΩΣΗΣ</b>	3
<b>ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΣΑΡΩΣΗ</b>	ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΜΒΑΝΤΑ ΣΑΡΩΣΗΣ 1 ΚΑΙ 2
<b>ΤΑΞΗ ΣΑΡΩΣΗΣ</b>	ΚΑΝΟΝΙΚΗ
<b>ΣΑΡΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ</b>	80-1000 AMU

### 4.3.3 Φασματοσκοπία Raman

#### *Περιγραφή πειραματικής διάταξης*

Η διάταξη φασματοσκοπίας Raman, LabRAM HR της εταιρίας HORIBA έφοδιασμένη με μικροσκόπιο, είναι αυτοματοποιημένη και ελέγχεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αποτελείται από ένα μονοχρωμάτορα, με φράγμα περίθλασης 300, 600 ή 1800 γραμμές/mm που μπορεί να επιλεγθεί με αυτοματοποιημένο τρόπο. Η ανίχνευση του φωτός γίνεται από κάμερα Charged Coupled Device (CCD), ψυχόμενη με σύστημα ψύξης Peltier [89].

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, δύο βασικά στοιχεία πρέπει να ληφθούν υπόψη, η πηγή laser που εκπέμπει τη διεγείρουσα ακτινοβολία που αλληλεπιδρά με το δείγμα και το φασματόμετρο, το οποίο αναλύει το σκεδαζόμενο φως δίνοντας τη δυνατότητα καταγραφής του φάσματος Raman. Αφού εξέλθει η δέσμη της διεγείρουσας ακτινοβολίας από τη κοιλότητα του laser οδηγείται μέσω κατόπτρων στο κυρίως σύστημα της διάταξης όπου «καθαρίζεται» συχνοτικά διερχόμενη από κατάλληλο συμβολομετρικό φίλτρο. Ακολούθως, εστιάζεται στο μελετώμενο δείγμα μέσω ενός μικροσκοπίου (micro-Raman) με τη χρήση του επιθυμητού αντικειμενικού φακού (x10, x20, x50, x100 και x50 μεγάλης εστιακής απόστασης). Η σκεδαζόμενη από το δείγμα ακτινοβολία συλλέγεται πάλι μέσω του μικροσκοπίου (γεωμετρία οπισθοσκέδασης) και εισέρχεται στο φασματόμετρο μέσω της σχισμής εισόδου. Στο εσωτερικό του φασματόμετρου, η σκεδαζόμενη ακτινοβολία υπόκειται σε φασματική ανάλυση και οδηγείται στην κάμερα CCD όπου το οπτικό σήμα μετατρέπεται σε ηλεκτρικό. Η διάταξη του εργαστηρίου είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και έτσι ελέγχονται από υπολογιστή τόσο η κίνηση του μονοχρωμάτορα, όσο και η εμφάνιση των φασμάτων καθώς και ο οπτικός έλεγχος του δείγματος μέσω της κάμερας που είναι συνδεδεμένη με το μικροσκόπιο της διάταξης. Μέσω κατάλληλου λογισμικού (LabSpec της HORIBA) παρέχεται η δυνατότητα καταγραφής φασμάτων με επιθυμητές παραμέτρους (χρονική διάρκεια της μέτρησης, λήψη μέσου όρου αλληπάλληλων φασμάτων), ώστε στα φάσματα που καταγράφονται ο λόγος σήματος/θόρυβο να είναι ικανοποιητικός.

Να σημειωθεί ότι μόνο η ανελαστικά σκεδαζόμενη ακτινοβολία (διαφορετική ενέργεια από της προσπίπτουσας) οδηγείται στο φασματόμετρο και στη συνέχεια στον ανιχνευτή, καθώς ότι η ελαστικά σκεδαζόμενη ακτινοβολία λόγω σκέδασης Rayleigh, φιλτράρεται. Ο διαχωρισμός της ασθενούς ανελαστικής σκέδασης που

ενδιαφέρει από την ισχυρότατη σκέδαση Rayleigh γίνεται με αποκοπή της τελευταίας. Στη συγκεκριμένη διάταξη αυτό επιτυγχάνεται με χρήση καταλλήλων φίλτρων αποκοπής (edge filters). Στην είσοδο του φασματομέτρου μπορεί να τοποθετηθεί και ένας αναλυτής για επιλογή της πόλωσης του σκεδαζόμενου φωτός. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η μελέτη της συμμετρίας και η ταυτοποίηση ενεργών κατά Raman τρόπων δόνησης [89].

Τα μετρούμενα δείγματα είναι σε υγρή μορφή, γι' αυτό το λόγο ο φακός που επιλέγεται είναι προσαρμοσμένος σε ειδικό εξάρτημα τοποθέτησης της κυψελίδας με εστιακή απόσταση  $\sim 5$  cm, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.8.



**Σχήμα 4.8** Εξάρτημα τοποθέτησης κυψελίδας για ανάλυση υγρού δείγματος

#### *Βελτιστοποίηση μεθόδου (Optimization)*

Πριν από τη λήψη των φασμάτων το φασματόμετρο βαθμονομήθηκε (instrument calibration) αρχικά με βάση τη γραμμή αναφοράς του Si στους  $\sim 521$   $\text{cm}^{-1}$  και στη συνέχεια, με βάση τις θέσεις των γραμμών εκπομπής μίας λάμπας Νέου. Βαθμονόμηση με βάση τις θέσεις των γραμμών εκπομπής μίας λάμπας Νέου πραγματοποιούνταν κάθε φορά που ολοκληρωνόταν η ανάλυση ενός δείγματος και ακολουθούσε νέο δείγμα, ενώ βαθμονόμηση με βάση τη γραμμή αναφοράς του Si πραγματοποιούνταν όταν γινόταν αλλαγή της γραμμής laser. Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας του οργάνου, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ως προς τη γραμμή laser που χρησιμοποιήθηκε, τις περιοχές κυματαρίθμων, το φράγμα περίθλασης, τη σχισμή εισόδου στο φασματόμετρο, τις επαναλήψεις και το χρόνο λήψης του φάσματος.

Τα μήκη κύματος της γραμμής laser που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αντίστοιχα του πράσινου, του κόκκινου και του IR, δηλαδή 514.6 nm, 632.8 nm και 785 nm. Και στα τρία μήκη κύματος laser έγιναν μετρήσεις με διάφορους χρόνους, με διαφορετικούς αριθμούς επαναλήψεων, με αλλαγές των περιοχών κυματαρίθμων. Τελικά τα δύο πρώτα μήκη κύματος απορρίφθηκαν επειδή εμφάνιζαν πολύ έντονα το φαινόμενο του φθορισμού.

Στη συνέχεια για το επιλεγθέν μήκος κύματος,  $\lambda = 785 \text{ nm}$ , πραγματοποιήθηκαν αλλαγές των περιοχών κυματαρίθμων, καταλήγοντας τελικά σε 3 περιοχές, την κάτω από τους  $870 \text{ cm}^{-1}$ , την μεσαία στους  $2.100 \text{ cm}^{-1}$  και την πάνω περιοχή στους  $3.200 \text{ cm}^{-1}$ . Επιπλέον πραγματοποιήθηκε αλλαγή όσον αφορά το φράγμα περίθλασης από  $600 \text{ γραμμές/mm}$  σε  $300 \text{ γραμμές/mm}$  και του εύρους της σχισμής εισόδου από  $50 \mu\text{m}$  σε  $100 \mu\text{m}$ .

Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της βελτιστοποίησης θεωρήθηκε ο συνδυασμός χρόνου-επαναλήψεων λήψης του φάσματος, γι' αυτό και πραγματοποιήθηκαν πολλές δοκιμές σε όλα τα στάδια της βελτιστοποίησης. Οι χρόνοι που δοκιμάστηκαν ήταν  $3 \text{ s}$ ,  $10 \text{ s}$ ,  $30 \text{ s}$ ,  $60 \text{ s}$  και  $120 \text{ s}$ , ενώ οι επαναλήψεις ήταν  $2$ ,  $5$ ,  $6$ ,  $10$ ,  $12$ ,  $20$ ,  $24$  και  $30$ .

Εκτός από τα φυγοκεντρημένα δείγματα που μετρήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές και σε μη φυγοκεντρημένα δείγματα, τα οποία λόγω των σωματιδίων που περιείχαν, αναμενόταν να προσδώσουν περισσότερη πληροφορία. Ωστόσο, προκαλούσαν σκέδαση και απαιτούσαν μέτρηση με  $\times 100$  φακό και όχι με το εξάρτημα στο οποίο προσαρμόζεται η κυψελίδα, δημιουργώντας μία χρονοβόρα και δύσκολη μέτρηση με μικρότερη αξιοπιστία λόγω των σωματιδίων.

#### *Πειραματική διαδικασία*

Για τη διέγερση του μελετώμενου δείγματος χρησιμοποιήθηκε η γραμμή Laser  $785 \text{ nm}$ . Κατά τη λήψη των φασμάτων Raman χρησιμοποιήθηκε το φράγμα περίθλασης  $300 \text{ γραμμές/mm}$  και σχισμή εισόδου στο φασματόμετρο εύρους  $100 \mu\text{m}$  που δίνουν ένα φασματικό εύρος στο σύστημα  $\sim 7 \text{ cm}^{-1}$ . Η ισχύς του συστήματος ήταν  $10 \text{ mV}$ , οι περιοχές κυματαρίθμων  $870 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2.100 \text{ cm}^{-1}$  και  $3.200 \text{ cm}^{-1}$  και πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις κάθε 30s για κάθε μια από τις προαναφερθείσες περιοχές (καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων τα φώτα του εργαστηρίου και η οθόνη του υπολογιστή παρέμειναν σβηστά). Με τη μέθοδο αυτή ελήφθησαν τα φάσματα των δειγμάτων γλεύκους και σταφυλιών.

Για την μετέπειτα ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε σάκχαρα και αιθανόλη, μετρήθηκαν πρότυπα διαλύματα γλυκόζης και φρουκτόζης, που από τη βιβλιογραφία θεωρείται ότι αποτελούν τα κύρια σάκχαρα σταφυλιών και γλεύκους, καθώς και διαλύματα αιθανόλης, που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση. Οι μετρήσεις στο όργανο ακολούθησαν την ίδια μεθοδολογία με τα δείγματα. Για να παρασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων έγιναν αραιώσεις

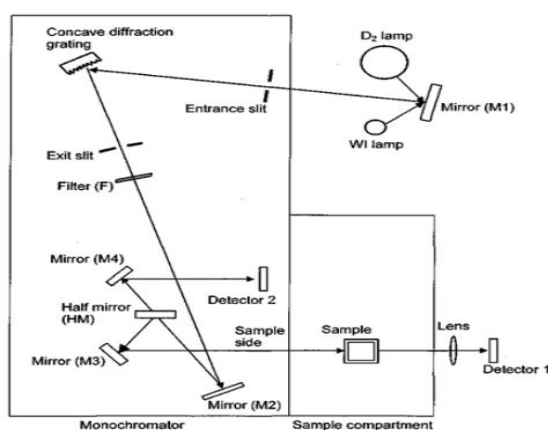
των διαλυμάτων. Η γλυκόζη ήταν σε διάλυμα 5 % v/v και αφού αραιώθηκε με νερό υψηλής καθαρότητας, παρασκευάστηκαν διαλύματα 2.5 %, 1.25% και 0.625 % v/v, ενώ η φρουκτόζη βρισκόταν σε διάλυμα 10 % v/v και με κατάλληλες αραιώσεις δημιουργήθηκαν διαλύματα 5 %, 2.5% και 1.25 % v/v. Τέλος, υγρή αιθανόλη καθαρότητας 99.5 % χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή 4 αραιών διαλυμάτων, όπως αυτά της φρουκτόζης. Να σημειωθεί ακόμη ότι για τη λήψη των φασμάτων των πρότυπων διαλυμάτων, έγιναν 10 επαναλήψεις και όχι 6 για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ακρίβεια και να γίνει εξάλειψη του θορύβου.

### 4.3.3 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

#### Περιγραφή πειραματικής διάταξης

Βασικά μέρη του φασματοφωτόμετρου Hitachi U-1900 αποτελούν το οπτικό του σύστημα (Σχήμα 4.9) και το σύστημα επεξεργασίας και ελέγχου σήματος, βασικά στοιχεία των οποίων είναι:

- ✓ Μονοχρωμάτορας Seya-Namioka
- ✓ Κοίλο φράγμα περίθλασης με σταθερά 1/600 mm, βελτιστοποιημένο στα 250 nm και ενεργό στην περιοχή διάθλασης 20 mm x 25 mm
- ✓ Ροειδές κάτοπτρο (M2) και ημι-κάτοπτρο (HM)
- ✓ Ανιχνευτής οπτικού σήματος
- ✓ Μετατροπέας A/D



Σχήμα 4.9 Οπτικό σύστημα του Hitachi U-1900 (Hitachi U-1900, 2018)

#### Βελτιστοποίηση μεθόδου (Optimization)

Αρχικά για την εύρεση της βέλτιστης μεθόδου ανάλυσης όλων των δειγμάτων με φασματοσκοπία υπέρυθρου-ορατού, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές κυψελίδες, έγιναν διαφορετικές αραιώσεις στα δείγματα και εφαρμόστηκαν διαφορετικές

παράμετροι λειτουργίας του οργάνου σε δύο δείγματα γλεύκους, τα Γ1 και Γ10, και σε ένα δείγμα σταφυλιού, το Σ11. Από τα φάσματα που ελήφθησαν για μήκη κύματος 800 - 200 nm, με ταχύτητα 400 nm/min και μέτρια απόκριση, παρατηρήθηκε ότι τα προφίλ των τριών δειγμάτων ήταν παρόμοια, με απορροφήσεις, όμως, πολύ μεγαλύτερες από αυτές που θα μπορούσαν να θεωρηθούν αξιόπιστες για το όργανο. Το τυφλό διάλυμα (blank) επιλέχθηκε να είναι το νερό βρύσης έναντι του απιονισμένου νερού, καθώς μετά από μετρήσεις δεν προέκυψαν διαφορές μεταξύ των φασμάτων.

Στις πρώτες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν από χαλαζία 6Q διαστάσεων 1cm\*1cm\*4cm, οι οποίες στην συνέχεια επαναλήφθηκαν με κυψελίδα διαστάσεων 1cm\*0.2cm\*4cm, που επέβαλε μικρότερη διαδρομή στη διερχόμενη δέσμη φωτός. Ωστόσο, καθώς και σε αυτήν την περίπτωση προέκυψαν απορροφήσεις μεγαλύτερες από αυτές που θεωρούνται αξιόπιστες, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των δειγμάτων και εκ νέου μετρήσεις και με τις δύο κυψελίδες.

Τα δείγματα αραιώθηκαν 5, 20 και 40 φορές. Για τις αραιώσεις αυτές εφαρμόστηκε ο νόμος της αραιώσης. Για να πραγματοποιηθούν οι εν λόγω αραιώσεις, αρχικά τα δείγματα αναδεύονταν με Vortex για 30s σε 2,200 rpm και έπειτα οι ποσότητες δείγματος που προκύπταν από το νόμο της αραιώσης, προστέθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες οι οποίες πληρώνονταν με νερό βρύσης και αναδεύονταν εκ νέου με Vortex. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνταν σε ογκομετρικές φιάλες των 5 mL και οι ποσότητες δείγματος που προστέθηκαν ήταν 1 mL, 250  $\mu$ L και 125  $\mu$ L για 5, 20 και 40 φορές αραιώση αντίστοιχα. Τόσο τα αρχικά, όσο και τα αραιωμένα δείγματα φυλάσσονταν σε γυάλινα φιαλίδια των 12 mL.

Τα αραιωμένα δείγματα μετρήθηκαν στο UV-Vis και με τις δυο κυψελίδες και προέκυψε ότι βέλτιστη απορροφήση πρόκειται με αραιώση του δείγματος κατά 20 φορές και με τις δυο κυψελίδες. Χρήση της κυψελίδας μικρότερου πλάτους ωστόσο δεν επέφερε καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά την απορρόφηση και καθότι είναι αρκετά δυσκολότερη στην πλήρωση αλλά και στον καθαρισμό της, επιλέχθηκε η άλλη ως βέλτιστη. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με διαφορετική μέθοδο λειτουργίας του οργάνου και πιο συγκεκριμένα με μικρότερη ταχύτητα, 100 nm/min, και γρήγορη απόκριση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν διέφεραν σημαντικά από τα προηγούμενα, επομένως προτιμήθηκε η αρχική μέθοδος καθώς ολοκληρωνόταν στο 1/4 του χρόνου της δεύτερης μεθόδου.

Πριν από κάθε κύκλο μετρήσεων, δηλαδή με αλλαγή κάποιας παραμέτρου, πραγματοποιούνταν μηδενισμός της απορρόφησης (Baseline) με το τυφλό διάλυμα (νερό βρύσης). Απαραίτητη προϋπόθεση για ορθές μετρήσεις στη φασματοσκοπία είναι η διαύγεια των διαλυμάτων καθώς η ύπαρξη σωματιδίων προκαλεί σκέδαση και λανθασμένες απορροφήσεις. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις δειγμάτων τα οποία είχαν φιλτραριστεί με φιλτράκια 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### *Πειραματική διαδικασία*

Μετά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι μετρήσεων, ένας για τα δείγματα σταφυλιού και ένας για τα δείγματα γλεύκους. Οι συνθήκες που θεωρήθηκαν τελικά βέλτιστες ήταν οι ακόλουθες:

- ✓ Νερό βρύσης ως τυφλό διάλυμα
- ✓ Κυψελίδα χαλαζία 6Q διαστάσεων 1cm\*1cm\*4cm
- ✓ Αραίωση δείγματος 20 φορές
- ✓ Μέθοδος με ταχύτητα 400 nm/min και μέτρια απόκριση
- ✓ Διέλευση δείγματος από φιλτράκια 0.22  $\mu\text{m}$

Αρχικά, αναφορικά με τα δείγματα του γλεύκους, αυτά μετρήθηκαν με τις παραπάνω συνθήκες με προσεκτικό καθαρισμό της κυψελίδας με νερό και ακετόνη πριν και μετά από τη μέτρηση καθενός από τα 10 δείγματα. Κάθε μέτρηση πραγματοποιούνταν 3 φορές έτσι ώστε να εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα δείγματα του σταφυλιού. Ωστόσο, για τις μετρήσεις στο UV-Vis η προκατεργασία των σταφυλιών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 4.2 με τη μόνη διαφορά ότι έγινε σύμπτυξη των τριών ίδιων δειγμάτων από κάθε χωράφι της ίδιας ημερομηνίας συλλογής και έτσι τα 27 δείγματα μετατράπηκαν σε 9 δείγματα. Για την σύμπτυξη αυτή λαμβάνονταν 2 ράγες από καθένα από τα τρία ίδια δείγματα κάθε χωραφιού στην ίδια ημερομηνία συλλογής. Όλη η υπόλοιπη προκατεργασία του δείγματος, αλλά και οι μετρήσεις των δειγμάτων με το φασματοφωτόμετρο πραγματοποιήθηκαν ακριβώς όπως περιγράφηκε και για το γλεύκος.

Μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων σε όλο το εύρος μηκών κύματος 800 - 200 nm, παρατηρήθηκαν κάποια μέγιστα μήκη κύματος για κάθε δείγμα (263 - 265 nm) και έτσι στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για αυτό το μέγιστο μήκος κύματος ( $\lambda_{\text{max}}$ ) κάθε δείγματος. Σε κάθε μήκος κύματος που επιλεγόταν για τις μετρήσεις, γινόταν αρχικά μηδενισμός με το τυφλό διάλυμα και έπειτα ακολουθούσε

η μέτρηση. Στα μέγιστα μήκη κύματος μετρήθηκε η απορρόφηση όλων των δειγμάτων, δηλαδή τα 10 δείγματα γλεύκους και τα 9 δείγματα σταφυλιού.

#### **4.3.4 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR-FT-IR)**

Η ανάλυση με φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR πραγματοποιήθηκε στην περιοχή κυματαρίθμων  $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$  με τη χρήση φασματοφωτομέτρου IR-Prestige-21 της εταιρίας Shimadzu (Shimadzu Co. Ιαπωνία) σε σύζευξη με σύστημα εξασθενημένης ολικής ανάκλασης MKII Golden Gate™ της εταιρείας Specac (Specac Ltd. Slough, UK). Η λειτουργία του οργάνου έγινε με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος IR-Solutions (Shimadzu Co. Ιαπωνία). Η ανάλυση ήταν  $2 \text{ cm}^{-1}$  και ελήφθησαν 64 διαδοχικές σαρώσεις για κάθε δείγμα. Ο μέσος όρος αυτών δημιούργησε και το τελικό φάσμα.

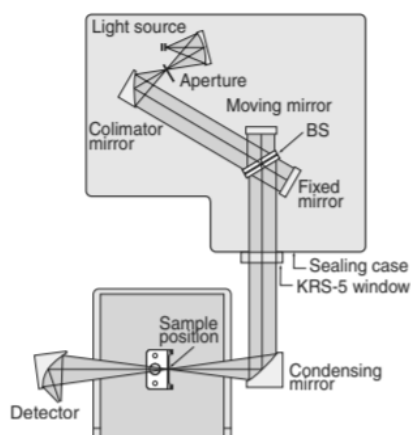
##### *Περιγραφή Πειραματικής διάταξης*

Το IR Prestige-21 χρησιμοποιεί μια φωτεινή κεραμική πηγή φωτός, DLATGS ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας, και οπτικά στοιχεία υψηλής απόδοσης (IR Prestige-21, 2018).

Το φασματοφωτόμετρο αποτελείται από ανιχνευτή υψηλής ευαισθησίας DLATGS, που φαίνεται στο *Σχήμα 4.11* (Δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη με πρόσμιξη L-αλανίνης). Το περιβάλλον του στοιχείου ανίχνευσης ελέγχεται για να το κρατήσει σε μια καθορισμένη θερμοκρασία. Οι συνθήκες αυτές προσδίδουν υψηλή ευαισθησία και σταθερότητα στο όργανο.

Η φωτεινή κεραμική πηγή φωτός που περιλαμβάνει το φασματοφωτόμετρο είναι αερόψυκτη. Αυτή η πηγή υψηλής ενέργειας δεν απαιτεί κανένα ειδικό εξάρτημα, και είναι εξαιρετικά σταθερή. Τα οπτικά στοιχεία υψηλής ενεργειακής απόδοσης, όπως π.χ. χρυσά κάτοπτρα είναι συστήματα υψηλής ακρίβειας, μειώνουν την απώλεια ενέργειας στην οπτική διαδρομή και οδηγούν σε αυξημένη ενέργεια στο δείγμα. Στο *Σχήμα 4.10* παρουσιάζεται ένα τέτοιο σύστημα οπτικών στοιχείων (IR Prestige-21, 2018).





**Σχήμα 4.10** Σύστημα οπτικών στοιχείων (IR Prestige-21, 2018)

Απαιτείται πολύ ακριβής έλεγχος του κινούμενου καθρέφτη για να σταθεροποιηθεί το interferogram του οργάνου FT-IR. Το IRPrestige-21 περιλαμβάνει το πατενταρισμένο σύστημα FJS - πολύ ομαλή και ακριβή μονάδα κινούμενων κατόπτρων - και το σύστημα προηγμένης Δυναμικής ευθυγράμμισης (ADA, Advanced Dynamic Alignment) για τη βελτιστοποίηση και σταθεροποίηση της μονάδας συμβολομετρητών. Το σύστημα ADA ευθυγραμμίζει αυτόματα το συμβολόμετρο όταν ο διαχωριστής δέσμης αντικαθίσταται (το συμβολόμετρο αποτελεί ένα από τα πολλά σημαντικά τμήματα του FTIR).

#### *Πειραματική διαδικασία*

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (ATR-FT-IR) όπως έχει προαναφερθεί, χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των ιζημάτων που προέκυψαν από τη φυγοκέντριση των δειγμάτων γλεύκους. Με ηλεκτρονική πιπέτα λαμβανόταν από κάθε δείγμα ποσότητα ιζήματος και τοποθετούνταν σε ειδικό γυάλινο σκεύος, στο οποίο γινόταν εξάτμιση του νερού με τη βοήθεια αζώτου.

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης με το όργανο IR Prestige-21 που περιγράφηκε παραπάνω και με την πολύτιμη βοήθεια του Επικουρού Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μπαρμπαλέξη.

Αρχικά μετρήσεις έγιναν για δύο μόνο δείγματα ενδεικτικά, τα Γ4 και Γ7 και στην υγρή μορφή τους και στην στερεή, δηλαδή πριν και μετά από την εξάτμιση του νερού. Μεταξύ των φασμάτων των υγρών και στερεών ιζημάτων υπήρξαν διαφορές, που ήταν αναμενόμενο, οπότε κρίθηκε προτιμότερο οι μετρήσεις να συνεχιστούν σε στερεά ιζήματα λόγω της απουσίας των επιπλέον κορυφών από τους δεσμούς του νερού που εμφανίζονται στα υγρά ιζήματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια

σειρά μετρήσεων όλων των δειγμάτων γλεύκους σε στερεή μορφή. Το δείγμα Γ1 δεν μετρήθηκε λόγω μη επαρκούς ποσότητας δείγματος.

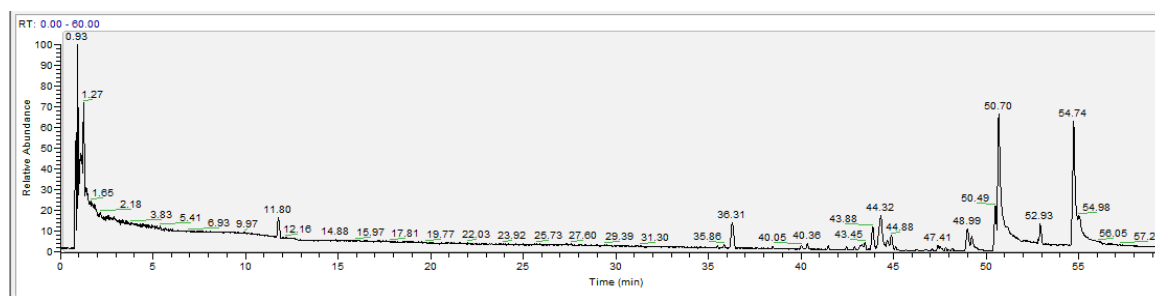
Από βιβλιογραφική ανασκόπηση και σύγκριση των φασμάτων με αντίστοιχα δημοσιευμένων άρθρων, υποτέθηκε ότι το ίζημα αντιστοιχούσε σε υπολείμματα ζυμών και θρεπτικών τους υλικών. Παραχωρήθηκαν από τον κ. Νικόλαο Βακιρτζή και το οινοποιείο Λήμνου "Η Ένωση", όλα τα πρόσθετα στο γλεύκος, οπότε στη συνέχεια ακολούθησαν μετρήσεις των πρότυπων ενώσεων με την ίδια μέθοδο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

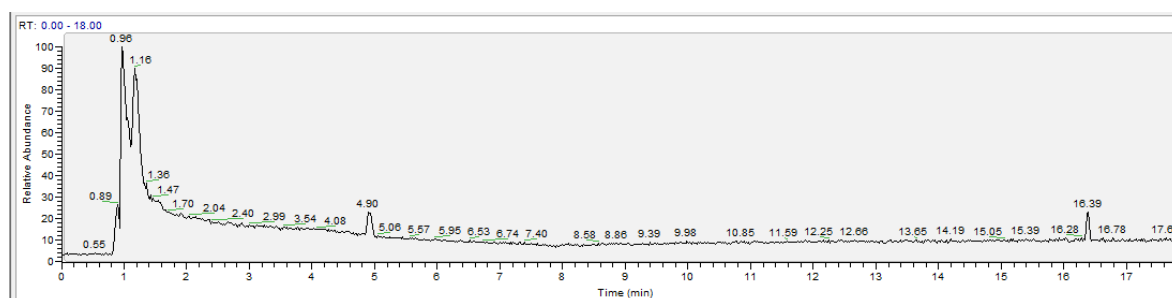
### 5.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (UPLC-HRMS)

#### 5.1.1 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων σταφυλιού

Αναφορικά με τα σταφύλια, η ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μεγαλύτερης διάρκειας (60 min), στην οποία και έγινε και στατιστική ανάλυση. Ωστόσο, κάποια δείγματα των σταφυλιών αναλύθηκαν και με τη μέθοδο των 18 min, για να γίνει σύγκριση των κορυφών με τις αντίστοιχες του γλεύκους. Τα χρωματογραφήματα παρακολούθηθηκαν με το πρόγραμμα Xcalibur 2.1. Στα Σχήματα 5.1 και 5.2 παρουσιάζονται δύο χρωματογραφήματα δειγμάτων σταφυλιού με τις δύο μεθόδους ανάλυσης αντίστοιχα.



Σχήμα 5.1: Χρωματογράφημα δείγματος σταφυλιού Σ15 μεθόδου 60 min



Σχήμα 5.2 Χρωματογράφημα δείγματος σταφυλιού Σ26 μεθόδου 18 min

Σημείωση: το δείγμα Σ15 αντιστοιχεί σε δείγμα από τον αμπελώνα Μετόχα πάνω και σε ημερομηνία συγκομιδής 13/08/2017 και το Σ26 αντιστοιχεί σε δείγμα από τον αμπελώνα Λαγοπάτι και σε ημερομηνία συγκομιδής 18/08/2017.

Από τα παραπάνω χρωματογραφήματα παρατηρείται ότι εμφανίζονται και τα δύο παρόμοια μορφή με μεγαλύτερες κορυφές να εμφανίζονται στην αρχή της ανάλυσης, δηλαδή ενώσεις υδατοδιαλυτές που εκλύονται με το νερό.

Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν πριν την στατιστική επεξεργασία (όπου έγινε ημιταυτοποίηση των μεταβολιτών-δεικτών που θεωρούνταν υπεύθυνοι για το διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σταφυλιού) φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί. Η ταυτοποίηση έγινε με βάση τα φάσματα μάζας και τα χρωματογραφήματα της μεθόδου των 60 λεπτών.

Τα κύρια ιόντα των κορυφών καθώς και τα θραύσματά τους, μέσω κατάλληλων βάσεων δεδομένων-βιβλιοθηκών, μπορούν να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση των κορυφών των χρωματογραφήματων. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής είναι οι Mass Bank, Chem Spider και HMDB [90-92] Για την άμεση ταυτοποίηση κάποιων ενώσεων που εντοπίστηκαν στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν δημοσιευμένα άρθρα [42], [43], [44], [45], [46], [47] που ακολουθούσαν παρόμοιες μεθόδους, διότι η ταυτοποίηση, ιδιαίτερα μέσω βάσεων δεδομένων, απαιτεί επίπονη ενασχόληση για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι για την ταυτοποίηση των ενώσεων της μεθόδου ανάλυσης των 60 λεπτών χρησιμοποιήθηκε βιβλιοθήκη δεδομένων που παραχωρήθηκε από την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Γκίκα και η οποία είχε δημιουργηθεί από σειρά πειραμάτων που διεξήχθησαν με παρόμοια μέθοδο ανάλυσης [93]. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν μέσω άρθρων επιβεβαιώθηκαν σε αρκετές περιπτώσεις και με τις βάσεις δεδομένων Mass bank, ChemSpider και HMDB.

Πληροφορίες για τις βάσεις δεδομένων δίνονται παρακάτω:

- Chemspider: είναι μια ελεύθερη βάση δεδομένων χημικών δομών ενώσεων που παρέχει γρήγορη πρόσβαση σε πάνω από 67 εκατομμύρια χημικές δομές, τις ιδιότητές τους και ό,τι άλλες σχετικές πληροφορίες.
- Mass bank: Αυτή η βάση δεδομένων παρέχει πλήρη φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας μεταβολιτών.
- HMDB: είναι μια λεπτομερής βάση δεδομένων των μικρών μορίων από τον Homo sapiens. Κάθε καταχώρηση μικρού μορίου έχει εκτεταμένες πληροφορίες για τις ιδιότητες, τη δομή και τη βιολογία τους.

Ουσιαστικά η ταυτοποίηση πιθανών μεταβολιτών έγινε με βάση περισσότερο τον λόγο μάζας/φορτίο και όχι τόσο με βάση τον χρόνο έκλυσης. Ωστόσο, δόθηκε προσοχή οι χρόνοι έκλυσης να μην έχουν μεγάλη απόκλιση με τη σχετική βιβλιογραφία και να είναι λογική η προσέγγιση.

Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται οι πιθανές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα σταφυλιού με τη μέθοδο των 60 λεπτών.

**Πίνακας 5.1:** Ταυτοποίηση συστατικών σε δείγματα σταφυλιού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και με βάση δεδομένων με την μέθοδο των 60 min [42-47] [90-93].

ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΛΟΥΣΗΣ	ΈΝΩΣΗ	ΤΥΠΟΣ	ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ	M/z
0,84	ΓΛΟΥΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	132,0422	133,0495
	ΠΡΟΛΙΝΗ	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,0633	116,0706
0,96	ΓΛΥΚΟΖΗ	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,16	219,025
1,54	ΛΕΥΚΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,0946	132,1019
	ΙΣΟΛΕΥΚΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,0946	132,1019
2,86	ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗ	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,0789	166,0862
3,17	5ΥΔΡΟΞΥΜΕΘΥΛΟΦΟΥΡΦΟΥΡΑΛΗ	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126,0317	127,0390
7,99	ΤΡΥΠΤΟΦΑΝΗ	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,0898	205,0971
13,71	ΚΕΡΣΕΤΙΝΗ	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448,1005	449,1078
39,44	ΑΜΠΙΣΙΣΙΚΟ ΟΞΥ (ABSCISIC ACID)	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264,1362	265,1434
43,82	ΠΕΤΟΥΝΙΔΙΝΗ	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	317,0655	318,0728
	ΣΥΡΙΓΓΕΤΙΝΗ	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346,0688	347,0761
48,08	ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	376,1382	377,1455
48,89	ΛΙΝΕΛΑΪΚΟ ΟΞΥ	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,2402	281,2475
52,81	CIS11 ΕΙΚΟΣΕΝΟΪΚΟ ΟΞΥ	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	310,2872	311,2945

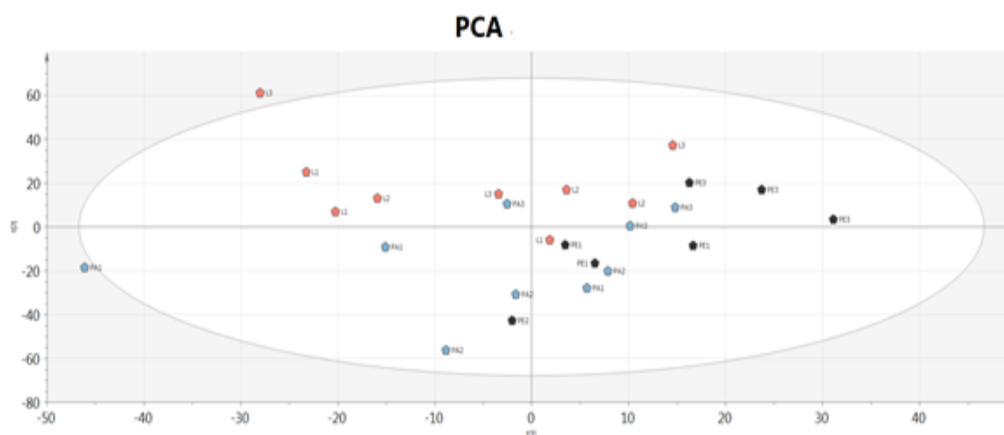
Όλες οι παραπάνω ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό μέρος αποτελούν ενώσεις που βρίσκονται στα σταφύλια.

### 5.1.2 Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων

Τα δεδομένα μη στοχευμένης ανάλυσης που λήφθηκαν από την ανάλυση των δειγμάτων της μεθόδου των 60 min με Orbitrap, υπέστησαν επεξεργασία με την καθοδήγηση της Δρ. Χριστίνας Βιργιλίου με χρήση του προγράμματος XCMS και έπειτα ακολούθησε στατιστική ανάλυση. Το XCMS είναι ένα πρόγραμμα όπου αναλύονται τα δεδομένα από LC-MS για την ευθυγράμμιση, την ολοκλήρωση και την εξαγωγή των εντάσεων των κορυφών.

Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με δύο τρόπους, μία σύμφωνα με την ημερομηνία συγκομιδής των σταφυλιών και μία σύμφωνα με τον αμπελώνα από τον οποίο έγινε η συγκομιδή.

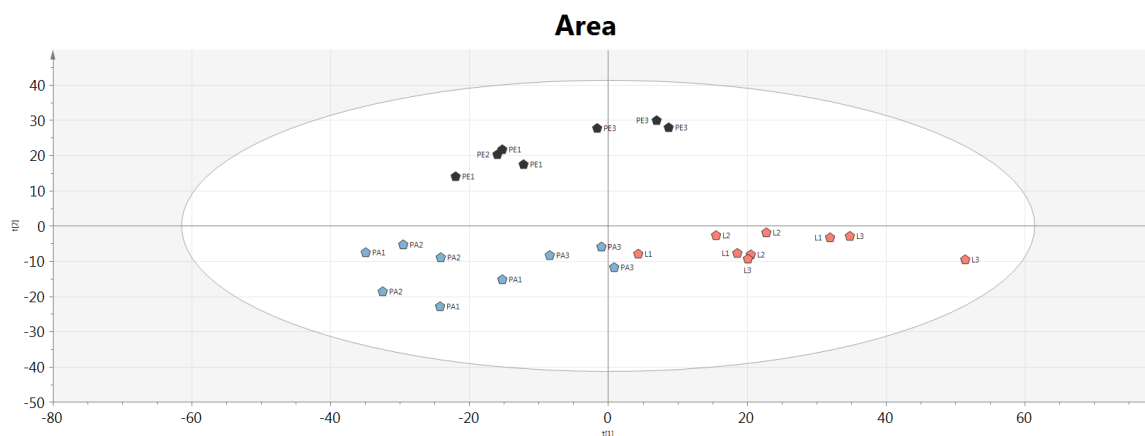
Στο Σχήμα 5.3 παρουσιάζεται το διάγραμμα της PCA (Principal Component Analysis), δηλαδή ο "αυθόρμητος" διαχωρισμός των δειγμάτων, ενώ στα Σχήματα 5.4 και 5.5 παρουσιάζονται τα διαγράμματα των PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) με ομαδοποίηση σύμφωνα με τον αμπελώνα και το χρόνο αντίστοιχα, στα οποία έχει πραγματοποιηθεί διαχωρισμός με επιβολή φίλτρων.



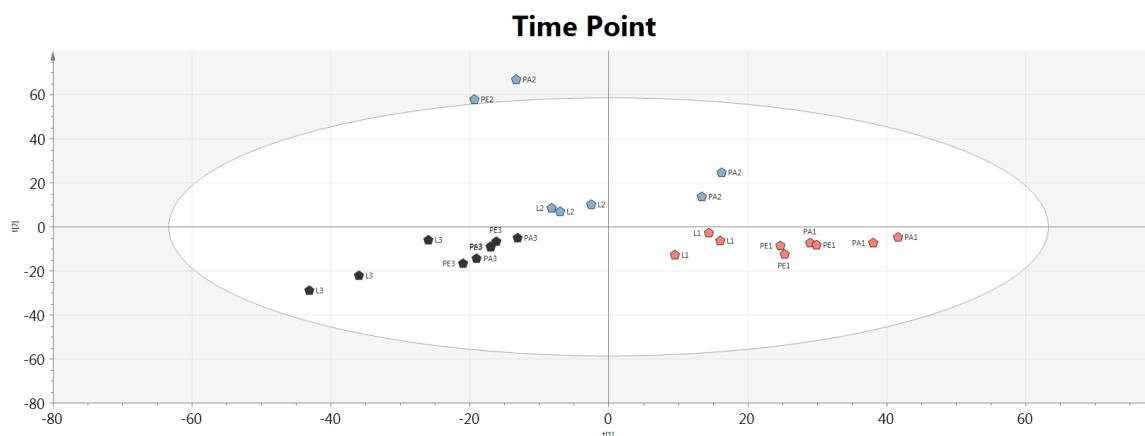
Σχήμα 5.3 PCA δειγμάτων σταφυλιού που μελετήθηκαν

Από το Σχήμα 5.3 παρατηρείται ότι τα δείγματα που προέρχονται από το αμπέλι Λαγοπάτι, έχουν μία σαφέστερη τάση να διαχωριστούν από τα άλλα δύο αμπέλια. Το αμπέλι αυτό, γεωγραφικά βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση απ' ότι τα άλλα δύο μεταξύ τους, επομένως στην περίπτωση αυτή φαίνεται πως ακόμη και στο ίδιο νησί, παρουσιάζονται εδαφικές διαφορές που επηρεάζουν και την καλλιέργεια και άρα τη σύσταση των σταφυλιών. Επιπλέον, παρατηρείται πως τα δείγματα του ίδιου αμπελιού έχουν την τείνουν να ομαδοποιηθούν και σύμφωνα με το διαφορετικό

χρόνο συλλογής τους, γεγονός που αποδεικνύει πως η ωρίμανση των σταφυλιών επιδρά στην εξέλιξη ορισμένων μεταβολιτών που περιέχουν.



Σχήμα 5.4 PLS-DA με ομαδοποίηση σύμφωνα με τον αμπελώνα



Σχήμα 5.5 PLS-DA με ομαδοποίηση σύμφωνα με την ημερομηνία συγκομιδής

Από τα Σχήματα 5.4 και 5.5 παρατηρούνται πιο ευδιάκριτα ο διαχωρισμός των δειγμάτων και ως προς την περιοχή και ως προς το χρόνο συλλογής, οπότε υπάρχουν μεταβολίτες στα δείγματα που επηρεάζονται από τους παράγοντες αυτούς με ανάλογο τρόπο.

*Ημι-αυτοποίηση των υπεύθυνων μεταβολιτών-δεικτών για τον διαχωρισμό των ομάδων*

Η εύρεση των μεταβολιτών που προκαλούν το διαχωρισμό αυτό, είναι μια χρονοβόρα διαδικασία. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με πολυπαραμετρική στατιστική PLS-DA για την εύρεση διαφοροποιήσεων μεταξύ των εξεταζόμενων ομάδων. Μέσω XCMS εφαρμόστηκε script Camera για την ημί-αυτοποίηση των δεικτών.

Οι περισσότεροι από αυτούς ταυτοποιήθηκαν κατόπιν με βάση τη βιβλιογραφία (που αναφέρθηκε παραπάνω).

Τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε ομάδες και δόθηκαν κωδικά ονόματα όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 5.2:** Επεξήγηση των συντομογραφιών των ομάδων

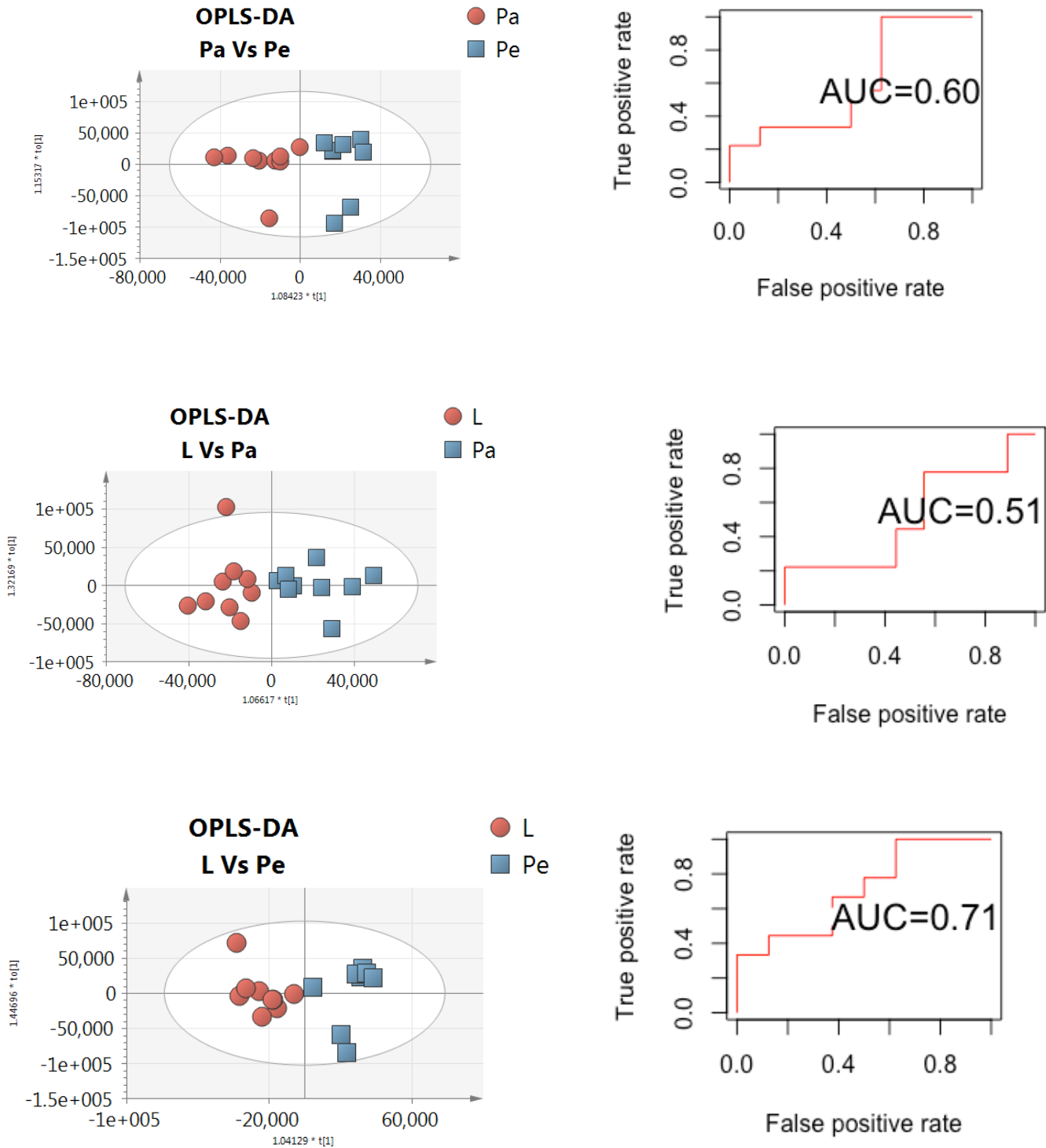
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΟΜΑΔΑΣ</b>	<b>ΚΩΔΙΚΑ ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΙΧΑΝ ΔΟΘΕΙ ΑΡΧΙΚΑ</b>	<b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ</b>
PA1	S1-S2-S3	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΛΙΟ 8/8/2017
PA2	S10-S11-S12	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΛΙΟ 13/8/2017
PA3	S19-S20-S21	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΛΙΟ 18/8/2017
PE1	S4-S5-S6	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΝΩ 8/8/2017
PE2	S13-S14-15	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΝΩ 13/8/2017
PE3	S22-S23-S24	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΝΩ 18/8/2017
L1	S7-S8-S9	ΛΑΓΟΠΑΤΙ 8/8/2017
L2	S17-S17-S18	ΛΑΓΟΠΑΤΙ 13/8/2017
L3	S25-S26-S27	ΛΑΓΟΠΑΤΙ 18/8/2017

#### Μελέτη της Περιοχής (Αμπελώνας)

Μετά την επεξεργασία των «raw» δεδομένων με XCMS προέκυψαν τα OPLS-DA score plots. Αν και φαίνεται διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων δεν σημαίνει πως τα μοντέλα αυτά είναι επικυρωμένα που σημαίνει ότι πρέπει να γίνει έλεγχος παραμέτρων όπως π.χ p value από cv anova test. Ακολούθησε ROC (Receiver Operating Characteristic) (ή καμπύλες λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη) Analysis των μοντέλων και υπολογίστηκε το AUC (Area Under the Curve) Value χρησιμοποιώντας την παράμετρο YpredCV. Για κάθε μοντέλο έχει υπολογιστεί το AUC (όσο πιο μεγάλη η τιμή τόσο αυξάνεται η αξιοπιστία του μοντέλου, για

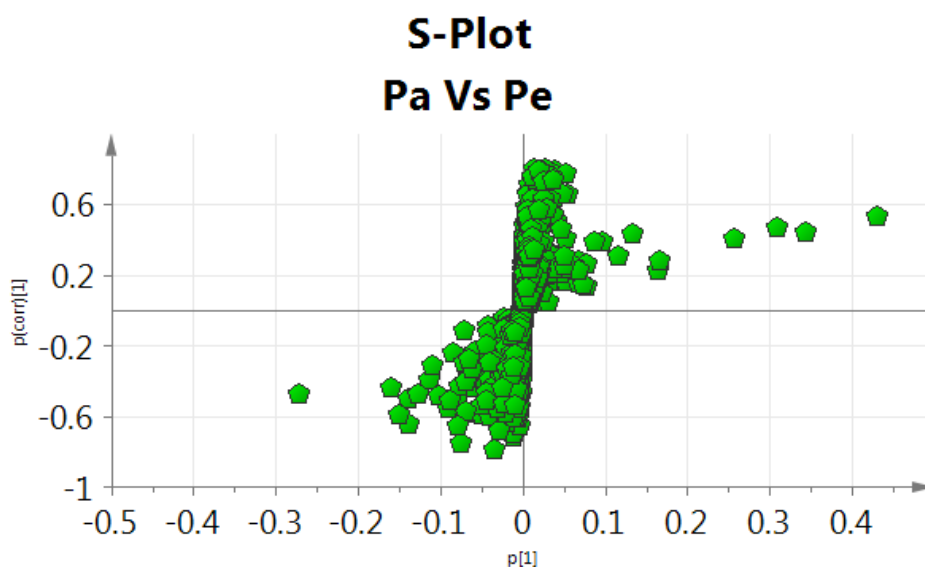


στατιστικά σημαντικά μοντέλα καλή τιμή είναι  $AUC > 65\%$  χωρίς αυτό να σημαίνει ότι το  $p$  value του μοντέλου είναι  $< 0.05$ )



**Σχήμα 5.6:** Τα OPLS-DA score plots που προέκυψαν μετά την επεξεργασία των «raw» δεδομένων με XCMS για τους αμπελώνες PA, PE, L

Μετά την αξιολόγηση των μοντέλων ακολούθησε η εύρεση των δεικτών (μεταβολίτες) στα οποία οφείλεται ο διαχωρισμός των ομάδων. Από S plot επιλέχθηκαν τα ιόντα με  $p > 0,05$  και  $p < -0,05$  καθώς και  $p_{cor}$  τιμές  $> 0,1$  και  $p_{cor} < -0,1$ . Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά μια εικόνα από S plot ενός μοντέλου.

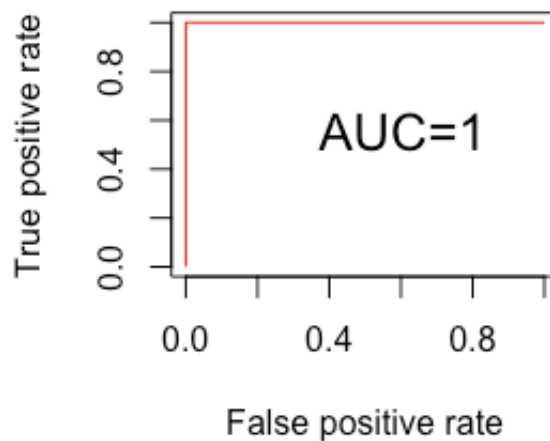
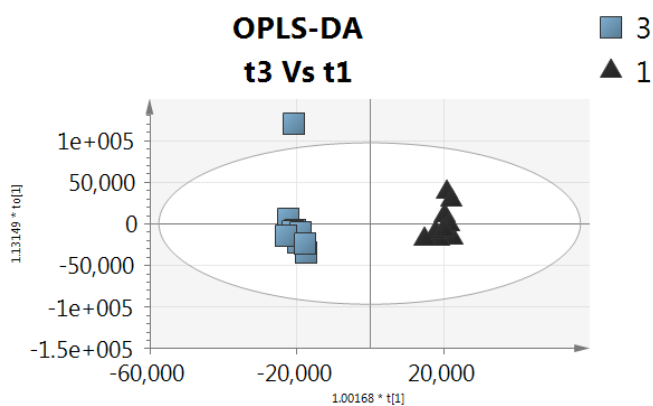
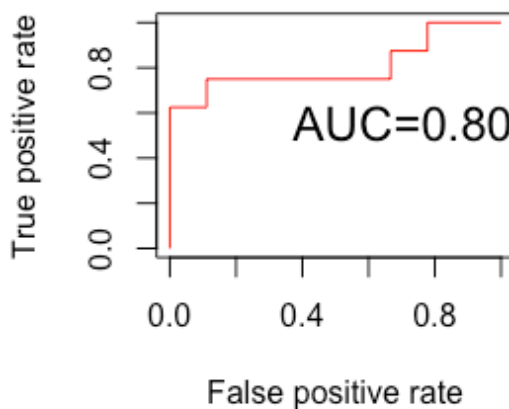
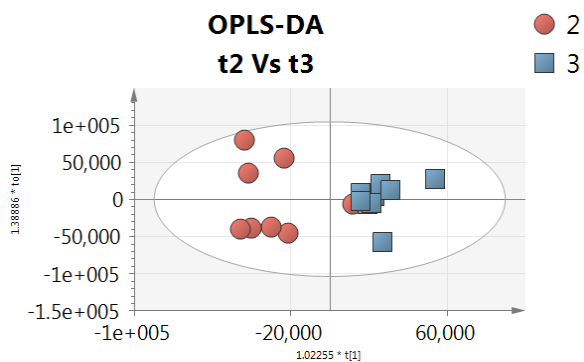
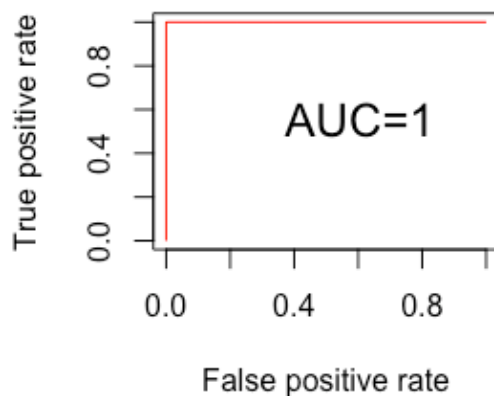
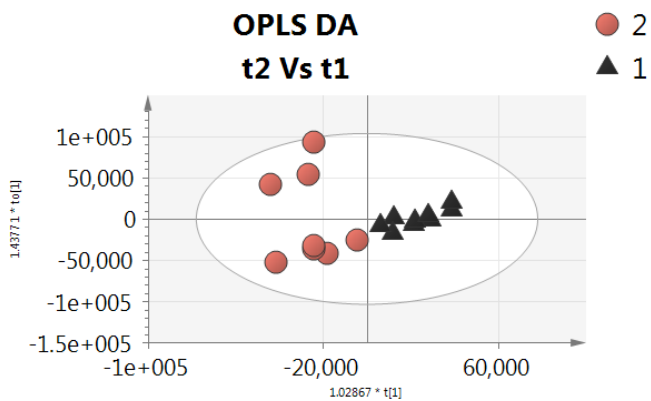


**Σχήμα 5.7:** S plot μεταξύ αμπελών μετόχα παλιό και μετόχα πάνω

Επόμενο βήμα για την απόκλειση των μη στατιστικά σημαντικών μεταβλητών ήταν η μελέτη των VIP τιμών (από SIMCA: εργαλείο που μετατρέπει τα δεδομένα σε οπτική πληροφορία για ευκολότερη ερμηνεία). Μεταβλητές με  $VIP < 1$  και αρνητικό correlation coefficient δεν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές. Ακολούθησε μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση. Υπολογίστηκε η τιμή  $p$  από ttest. Μόνο τα ιόντα με  $p < 0.05$  θεωρούνται στατιστικά σημαντικά. Απο κάθε μοντέλο προέκυψαν και οι αντίστοιχοι δείκτες.

#### ✚ Μελέτη του χρόνου ωρίμανσης

Για την μελέτη αυτή ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία (βλέπε παραπάνω) και προέκυψαν τα παρακάτω μοντέλα.



**Σχήμα 5.8:** Τα OPLS-DA score plots που προέκυψαν μετά την επεξεργασία των «raw» δεδομένων με ΧCMS για τους χρόνους συγκομιδής τις ημερομηνίες 8/8, 13/8, 18/8/2017.

Αποτελέσματα από την στατιστική επεξεργασία

✚ Παράμετρος διαχωρισμού: Χρόνος συγκομιδής-ωρίμανσης

Οι δείκτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PE1-L1 και PA1- PE2-L3 είναι οι παρακάτω:

**Πίνακας 5.3:** πιθανοί δείκτες υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PE1-L1 και PA1- PE2-L3 [42-47], [90-93].

<u>M/Z</u>	<u>ΧΡΟΝΟΣ</u> <u>ΕΚΚΛΟΥΣΗΣ</u> <u>(MIN)</u>	<u>ΈΝΩΣΗ</u>	<u>ΤΥΠΟΣ</u>	<u>MR</u>
133	0,7	ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗ	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,0534
177	0,8	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176,0320
161	0,82			
102	0,83	ΕΞΥΛΑΜΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	101,1204
103	0,833	ΚΑΔΑΒΕΡΙΝΗ	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	102,1157
104,1	1,15	Γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103,0633
146,1	1,18	ΣΠΕΡΜΙΔΙΝΗ	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	145,1579
138,1	1,32	ΤΥΡΑΜΙΝΗ	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	137,0841
366,3	43,17			
199,2	43,3	ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198,0528
280,3	49	ΛΙΝΟΛΕΝΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278,2246
282,3	50,7	ΛΙΝΕΛΑΪΚΟ ΟΞΥ	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,2402
283,3	50,7	ΕΛΑΪΚΟ ΟΞΥ	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282,2558

304,3	50,7	ΔΕΛΦΙΝΙΔΙΝΗ	$C_{15}H_{11}O_7$	303,0499
284,3	52,95			

Οι δείκτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PE1-L1 και PA2- PE2-L2 είναι οι παρακάτω:

**Πίνακας 5.4:** δείκτες υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PE1-L1 και PA2- PE2-L2 [42-47] [90-93].

<u>M/Z</u>	<u>ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΔΟΥΣΗΣ (MIN)</u>	<u>ΈΝΩΣΗ</u>	<u>ΤΥΠΟΣ</u>	<u>MR</u>
151	0,68	ΞΥΛΟΖΗ	$C_5H_{10}O_5$	150,0528
151	0,68	ΑΡΑΒΙΝΟΖΗ	$C_5H_{10}O_5$	150,0528
151	0,68	ΡΙΒΟΖΗ	$C_5H_{10}O_5$	150,0528
165	0,68	ΡΑΜΝΟΖΗ	$C_6H_{12}O_5$	164,0684
165	0,68	ΦΟΥΚΟΖΗ	$C_6H_{12}O_5$	164,0684
193	0,68	ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ	$C_6H_8O_7$	192,0270
133	0,7	ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗ	$C_4H_8N_2O_3$	132,0534
177	0,8	ΑΣΚΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ	$C_6H_8O_6$	176,0320
181.1	1,35	ΙΝΟΣΙΤΟΛΗ	$C_6H_{12}O_6$	180,0633
181.1	1,35	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	$C_6H_{12}O_6$	180,0633
181.1	1,35	ΓΑΛΑΚΤΟΖΗ	$C_6H_{12}O_6$	180,0633
181.1	1,35	ΓΛΥΚΟΖΗ	$C_6H_{12}O_6$	180,0633
228.2	36,32			
280.3	44,65			
320.3	44,65			
280.3	49			


563.5	50,72			
338.3	54,73			

Οι δείκτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA2-PE2-L2 και PA3- PE3-L3 είναι οι παρακάτω:

**Πίνακας 5.5:** Δείκτες θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA2-PE2-L2 και PA3-PE3-L3 L2 [42-47] [90-93].

M/Z	ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΛΟΥΣΗΣ (MIN)	ΈΝΩΣΗ	ΤΥΠΟΣ	MR
101	0,83			
149	0,85	ΚΙΤΡΑΜΗΛΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	148,0372
134	0,86	ΑΣΠΑΡΤΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,0375
91	1,18	ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	90,0317
146.1	1,18	ΣΠΕΡΜΙΔΙΝΗ	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	145,1579
138.1	1,32	ΤΥΡΑΜΙΝΗ	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	137,0841
181.1	1,35	ΙΝΟΣΙΤΟΛΗ	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,0633
181.1	1,35	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,0633
181.1	1,35	ΓΑΛΑΚΤΟΖΗ	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,0633
181.1	1,35	ΓΛΥΚΟΖΗ	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,0633
136.1	1,57			
69	3,47			
304.3	50,7	ΔΕΛΦΙΝΙΔΙΝΗ	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	303,0499
283.3	50,7	ΕΛΑΪΚΟ ΟΞΥ	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282,2558
282.3	50,7	ΛΙΝΕΛΑΪΚΟ ΟΞΥ	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,2402
284.3	52,95			
338.3	54,73			
338.3	56,01			

Παρατηρείται ότι οι πιθανές υπεύθυνες ενώσεις που ξεχωρίζουν τις ομάδες των δειγμάτων ανάλογα με την περίοδο ωρίμανσής τους είναι κυρίως αμινοξέα, βιογενείς αμίνες, λιπαρά οξέα, σάκχαρα, οργανικά οξέα, φλαβανόλες, που όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος αυτές οι ενώσεις αλλάζουν περιεκτικότητα κατά την ωρίμανσή τους.

 Παράμετρος διαχωρισμού: Περιοχή Καλλιέργειας (Αμπελώνας)

Οι δείκτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PA2-PA3 και L1-L2-L3 είναι οι παρακάτω:

**Πίνακας 5.6:** Δείκτες υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PA2-PA3 και L1-L2-L3 L2 [42-47] [90-93].

<u>M/Z</u>	<u>ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΛΟΥΣΗΣ (MIN)</u>	<u>ΈΝΩΣΗ</u>	<u>ΤΥΠΟΣ</u>	<u>MR</u>
104.1	1,01	Γ-ΑΜΙΝΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103,0633
147.1	1,02	L-ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΗ	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,0691
147.1	1,02	ΛΥΣΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,1055
173	1,08			
128	1,13			
89	1,15	ΠΥΡΟΥΒΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	88,0160
89	1,15	ΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,0524
89	1,15	ΙΣΟΒΟΥΤΥΡΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,0524
89	1,15	1,4-ΔΙΑΜΙΝΟΒΟΥΤΑΝΙΟ	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	88,1000

175	1,2	ΣΙΚΙΜΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	174,0528
175	1,2	ΑΡΓΙΝΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,1116
284.3	52,95			
339.3	54,71			
360.3	54,72			
338.3	54,73			
675.7	54,73			

Οι δείκτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PE1-PE2-PE3 και L1-L2-L3 είναι οι παρακάτω:

**Πίνακας 5.7:** Δείκτες υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PE1-PE2-PE3 και L1-L2-L3 L2 [42-47] [90-93].

<u>M/Z</u>	<u>ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΔΟΥΣΗΣ (MIN)</u>	<u>ΈΝΩΣΗ</u>	<u>ΤΥΠΟΣ</u>	<u>MR</u>
128	1,13			
118.1	1,17	ΒΑΛΙΝΗ	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117,0789
72.1	1,17	ΠΥΡΡΟΛΙΔΙΝΗ	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N	71,0735
115	1,2			
150.1	1,25	ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,0510
182.1	1,55	ΤΥΡΟΣΙΝΗ	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181,0738



132.1	1,61	ΛΕΥΚΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,0946
132.1	1,61	ΙΣΟΛΕΥΚΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,0946
86.1	1,62	2-ΠΥΡΡΟΛΙΔΙΝΟΝΗ	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO	85,0528
86.1	1,62	ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΔΙΟ ΠΙΠΕΡΙΔΙΝΗΣ	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N*HCl	85,0891
133.1	1,62	ΟΞΑΛΟΕΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	132,0059
133.1	1,62	ΓΛΟΥΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	132,0422
133.1	1,62	ΑΣΠΑΡΑΓΙΝΗ	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,0534
69	2,47			
166.1	2,93	ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗ	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,0789
120.1	2,93	ΘΡΕΟΝΙΝΗ	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119,0582
167.1	2,95			
205.1	8,43	ΤΡΥΠΤΟΦΑΝΗ	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,0898
188.1	8,43			

Οι δείκτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PA2-PA3 και PE1-PE2-PE3 είναι οι παρακάτω:


**Πίνακας 5.8:** Δείκτες υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό των ομάδων PA1-PA2-PA3 και PE1-PE2-PE3 L2 [42-47] [90-93].

<u>M/Z</u>	<u>ΧΡΟΝΟΣ ΈΚΚΛΟΥΣΗΣ (MIN)</u>	<u>ΈΝΩΣΗ</u>	<u>ΤΥΠΟΣ</u>	<u>MR</u>
175.1	0,98	ΣΙΚΙΜΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	174,0528

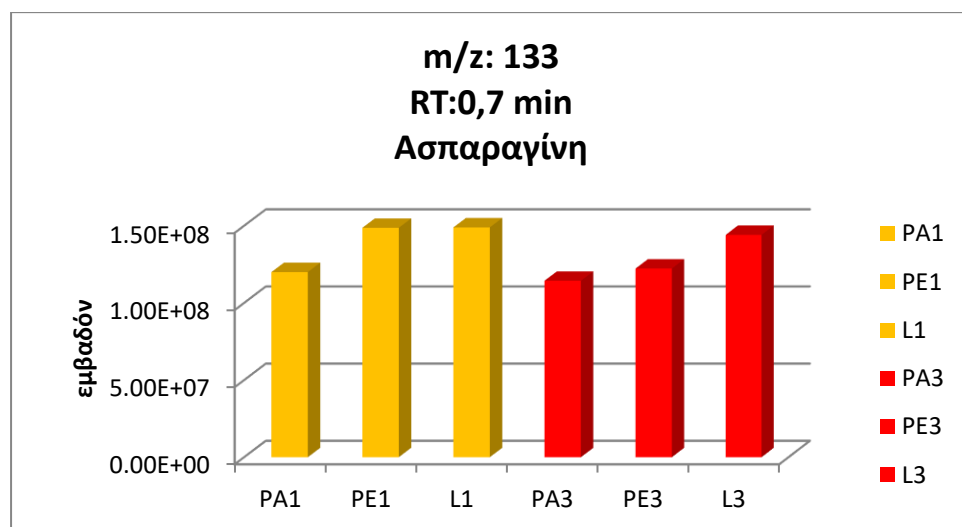
175.1	0,98	ΑΡΓΙΝΙΝΗ	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,1116
90.1	1,02	ΑΛΑΝΙΝΗ	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,0476
90.1	1,02	Β-ΑΛΑΝΙΝΗ	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,0476
90.1	1,02	ΟΥΡΕΘΑΝΗ	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,0477
90.1	1,02	ΟΞΑΛΙΚΟ ΟΞΥ	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	89,9900
291.1	1,13	ΚΑΤΕΧΙΝΗ	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,0790
291.1	1,13	ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,0790
130	1,33			

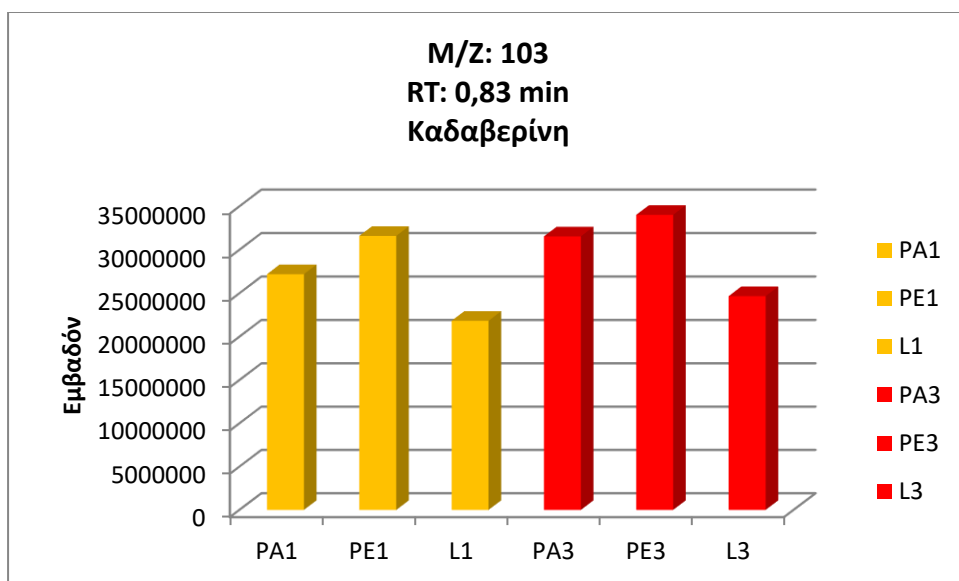
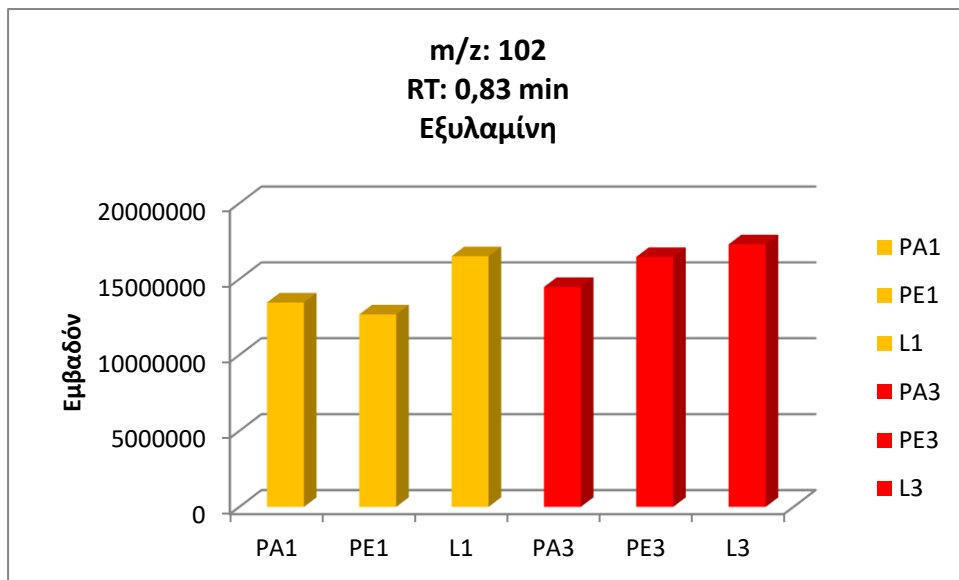
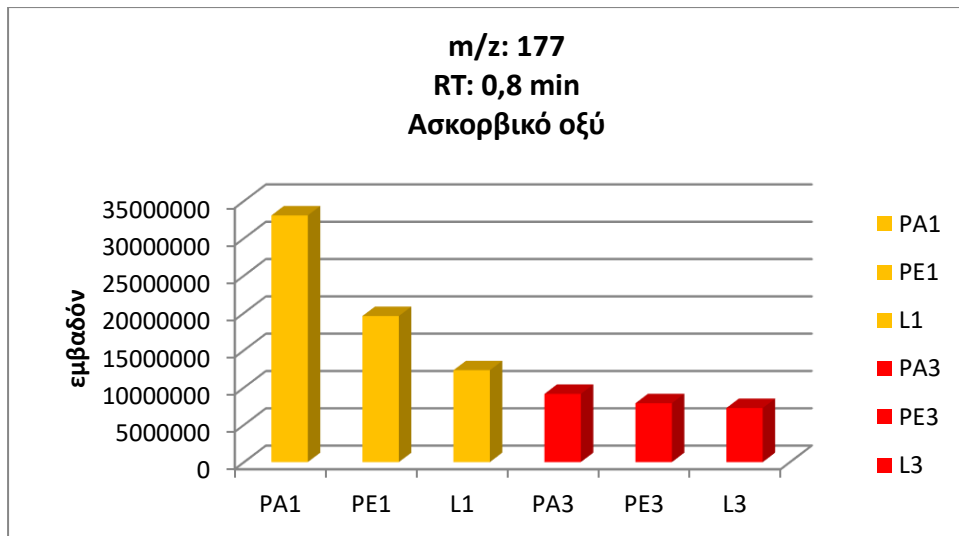
Παρατηρείται ότι οι πιθανές υπεύθυνες ενώσεις που ξεχωρίζουν τις ομάδες των δειγμάτων ανάλογα με την αμπελώνα που καλλιεργήθηκαν είναι κυρίως αμινοξέα, οργανικά οξέα, πολυαμίνες, γ-λακτάμες και φλαβανόλες.

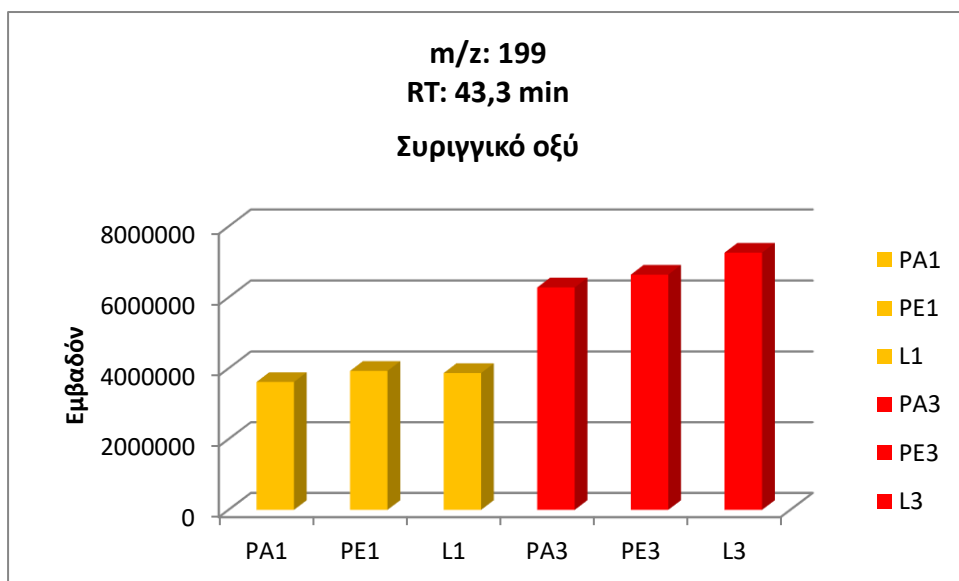
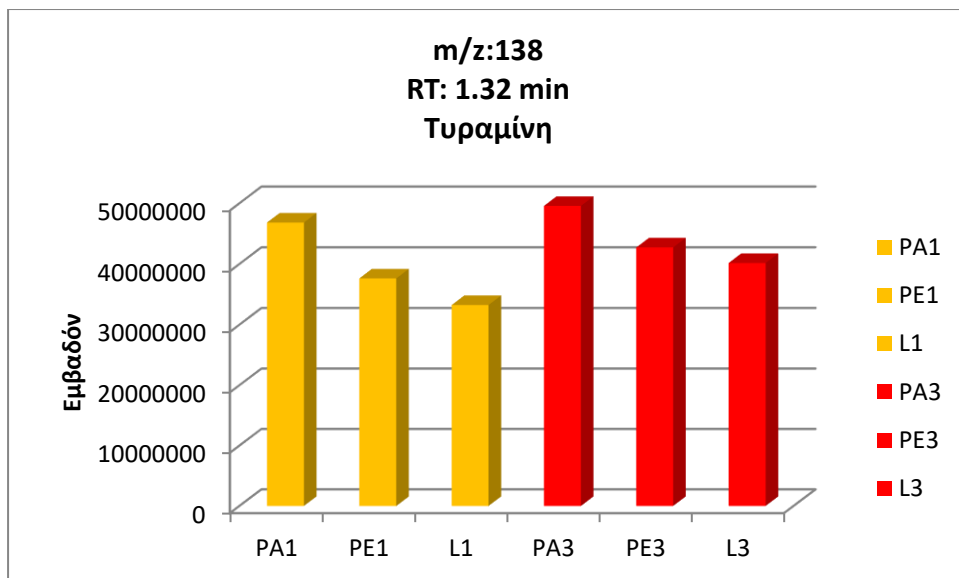
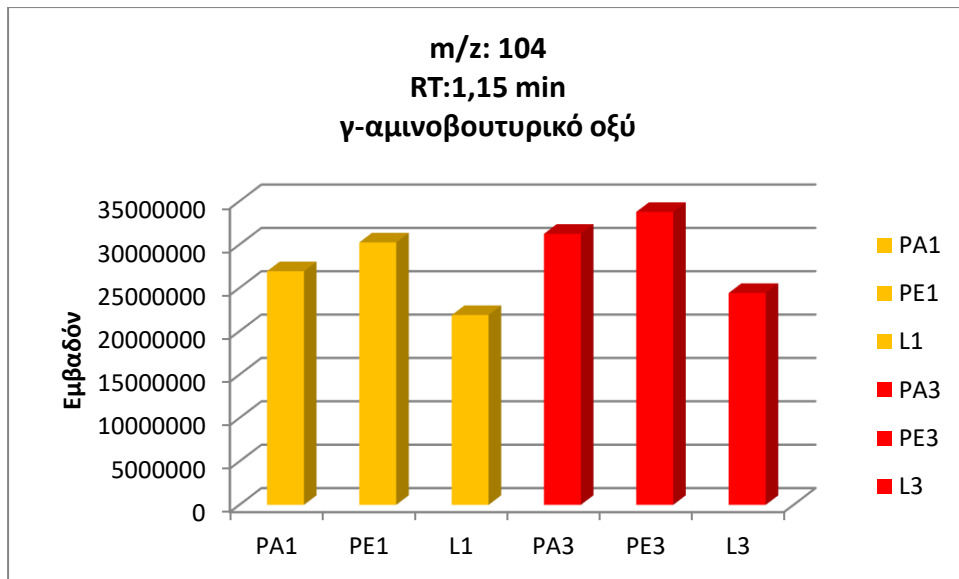
*Παρακολούθηση του εμβαδού των ευδιάκριτων χρωματογραφικών κορυφών των σημαντικότερων δεικτών που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για την διαχωρισμό των δειγμάτων.*

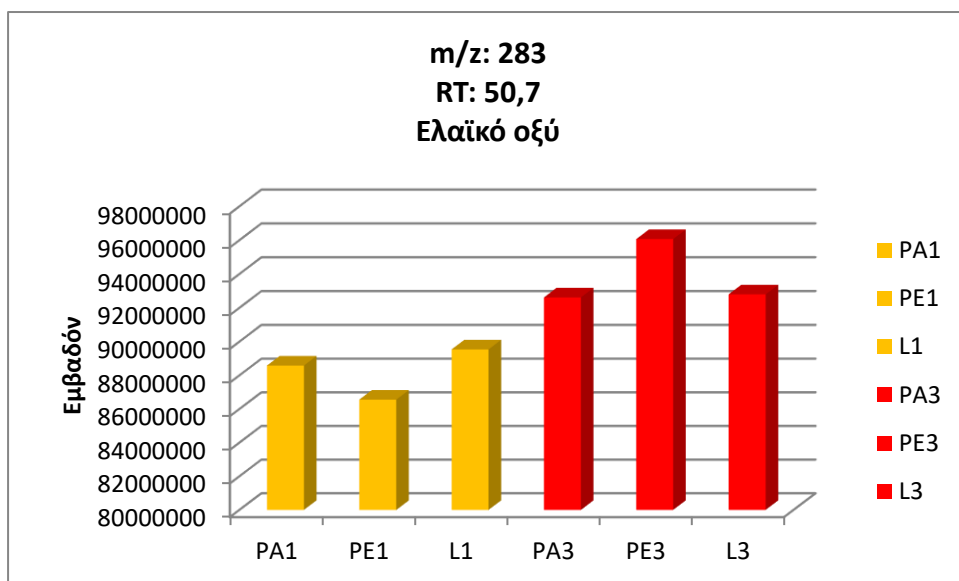
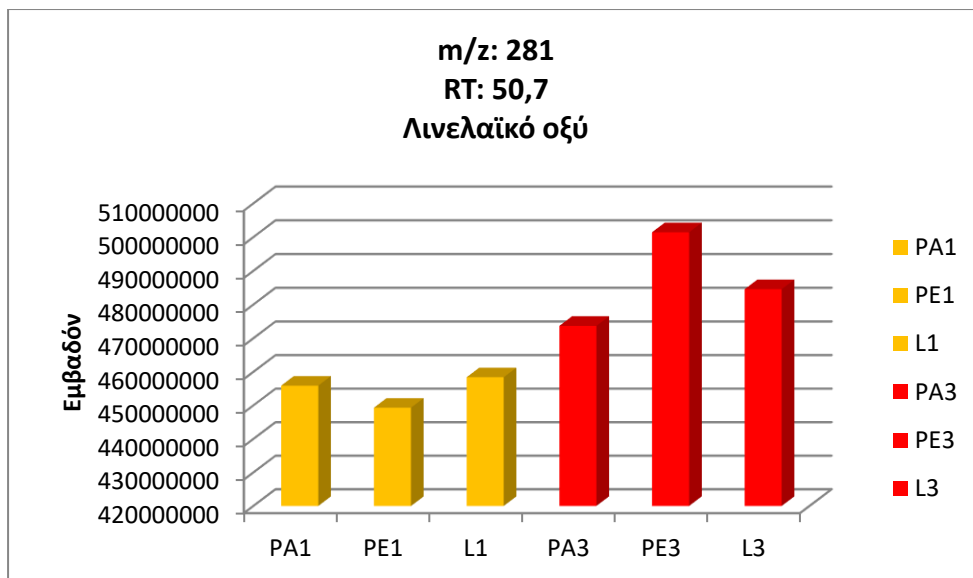
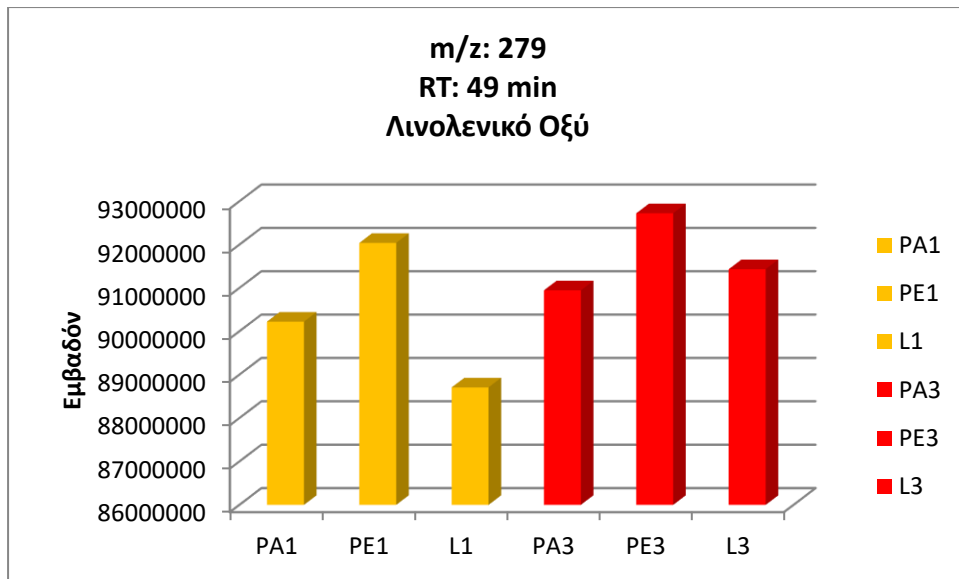
 Παράμετρος διαχωρισμού: χρόνος ωρίμανσης

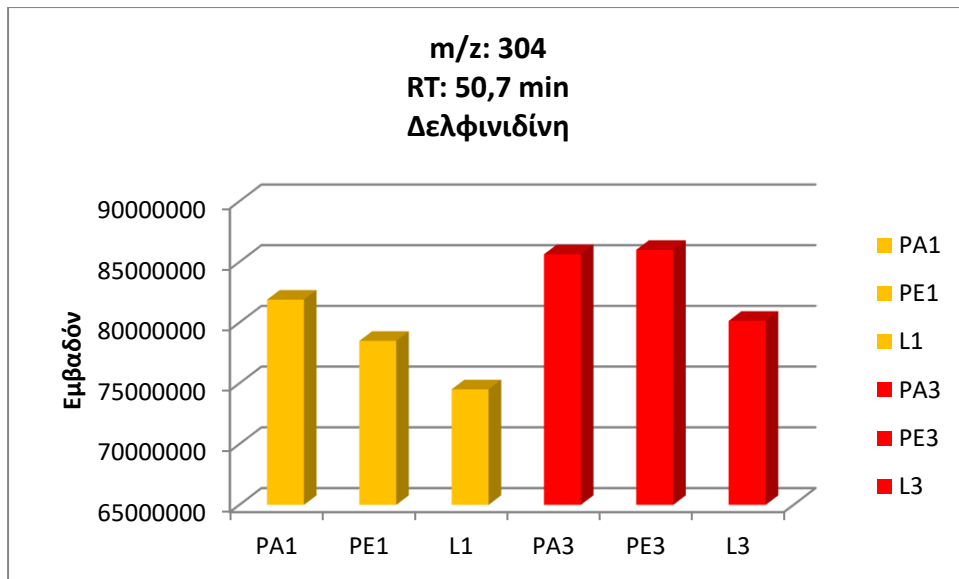
Σύγκριση δειγμάτων και από τους τρεις αμπελώνες χρονικής περιόδου 8/8/2017 και 18/8/2017 για το διαχωρισμό τους ανάλογα με την περίοδο ωρίμανσης



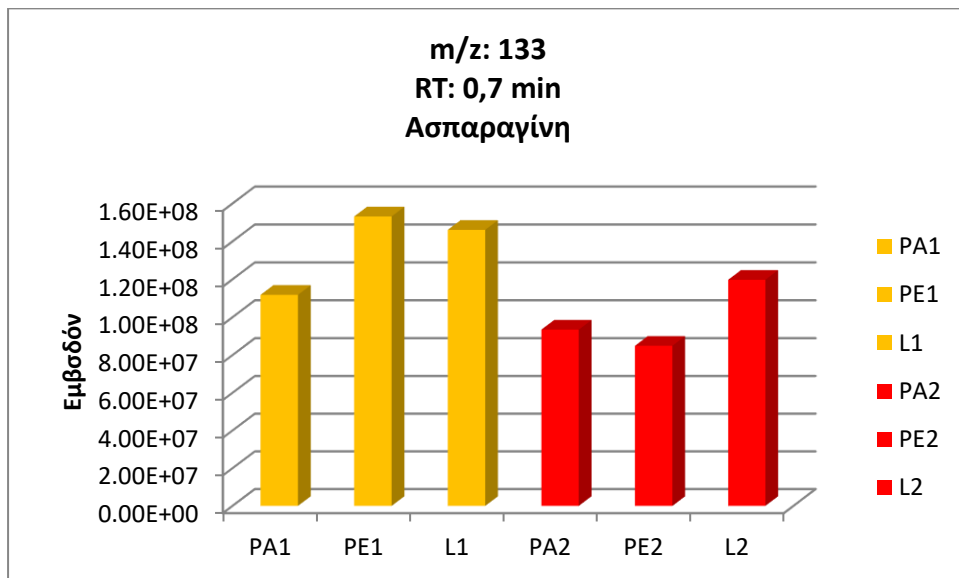


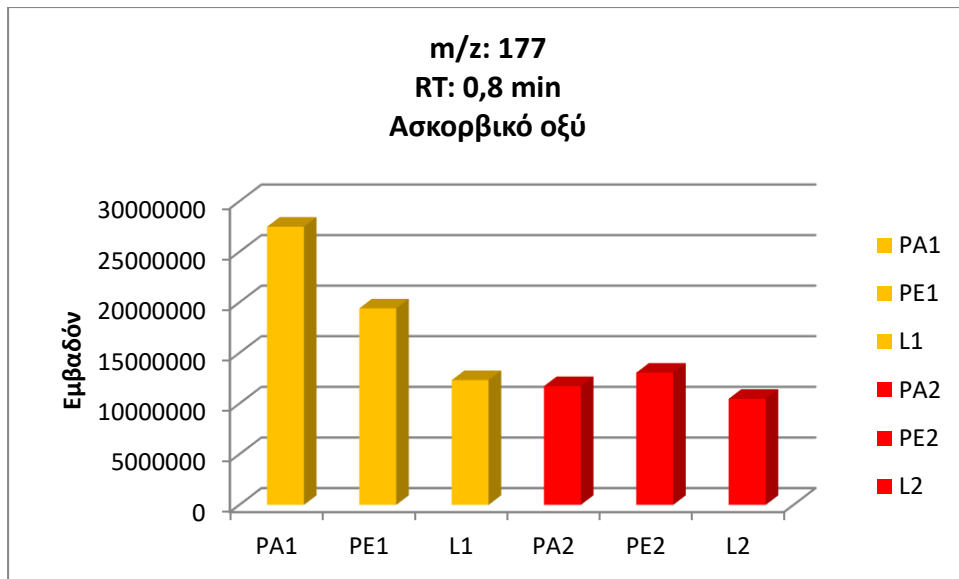




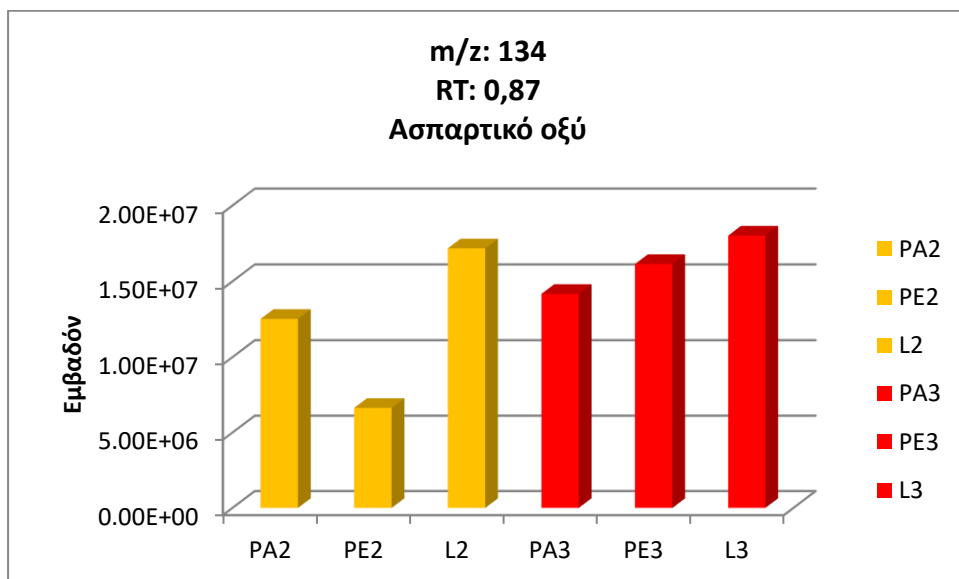
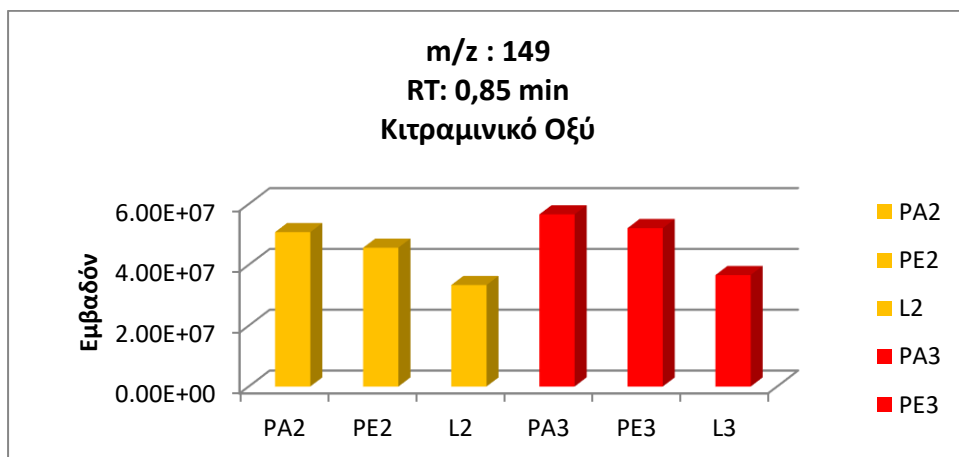


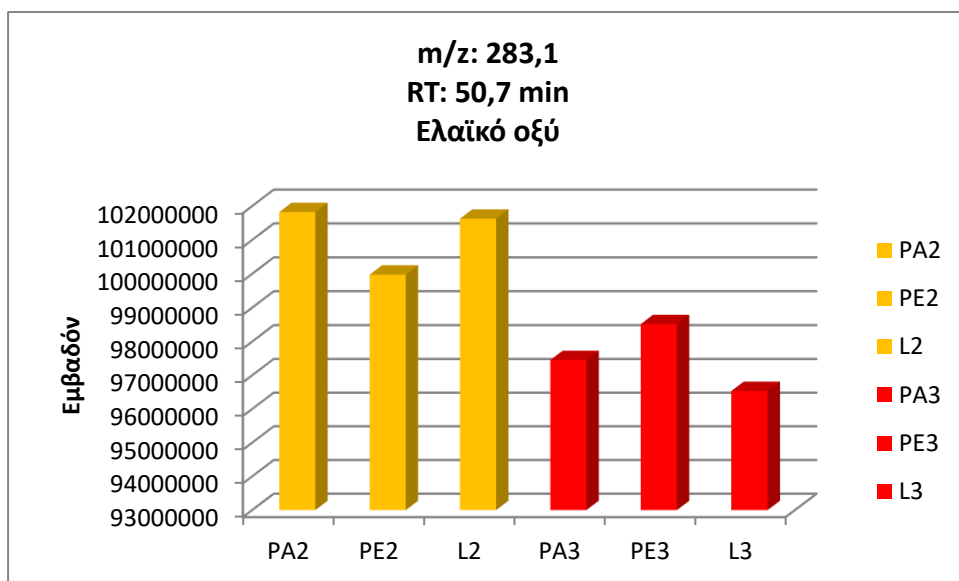
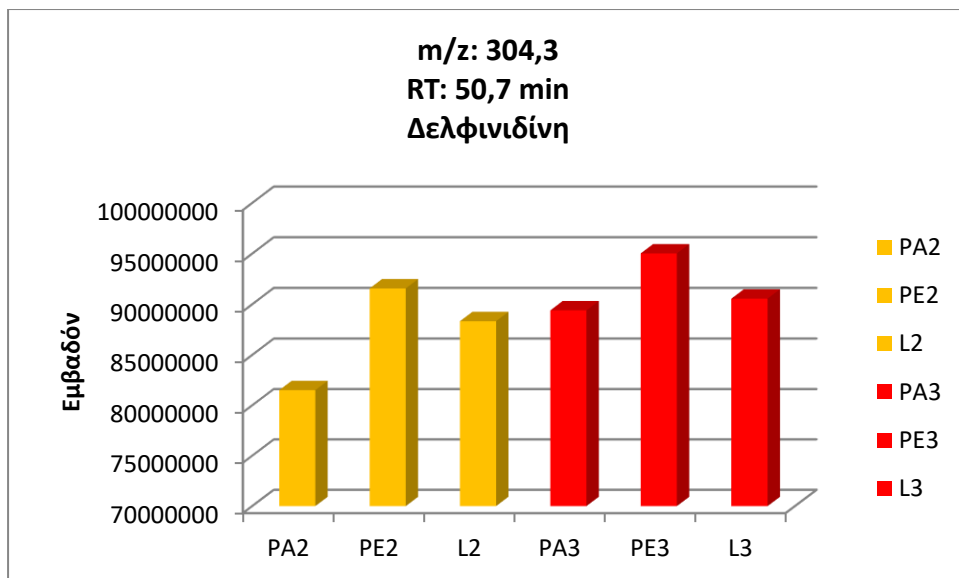
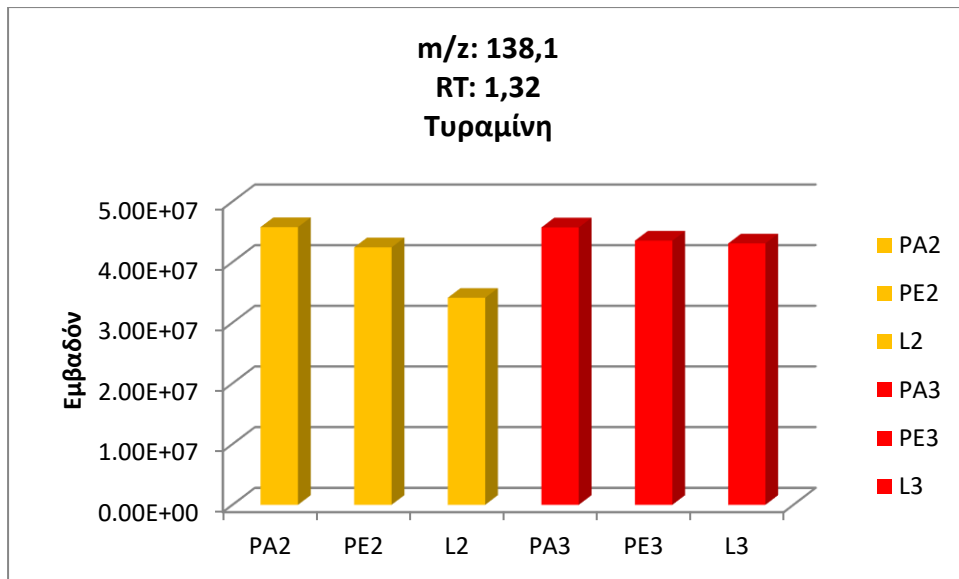
Σύγκριση δειγμάτων κι από του τρεις αμπελώνες χρονικής περιόδου 8/8/2017 και 13/8/2017 για το διαχωρισμό τους με κριτήριο την περίοδο ωρίμανσης



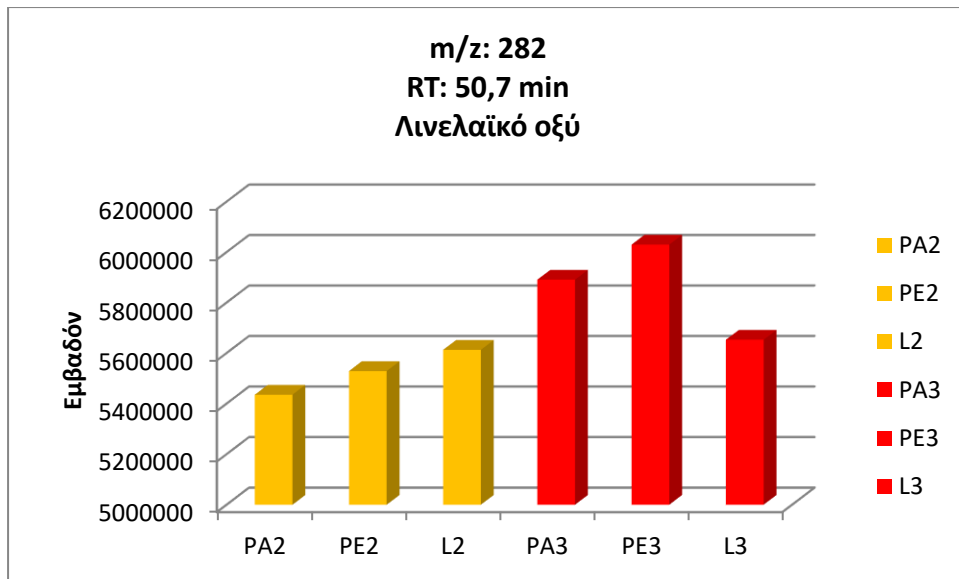


Σύγκριση δειγμάτων και από τους τρεις αμπελώνες ημερομηνίας συλλογής 3/8/2017 και 18/8/2017 για το διαχωρισμό τους με κριτήριο την περίοδο ωρίμανσης



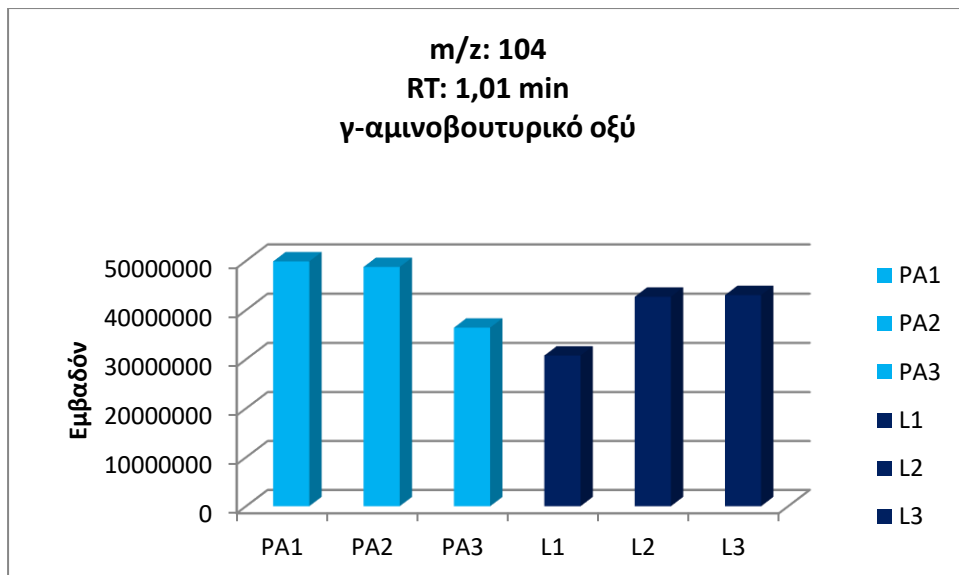


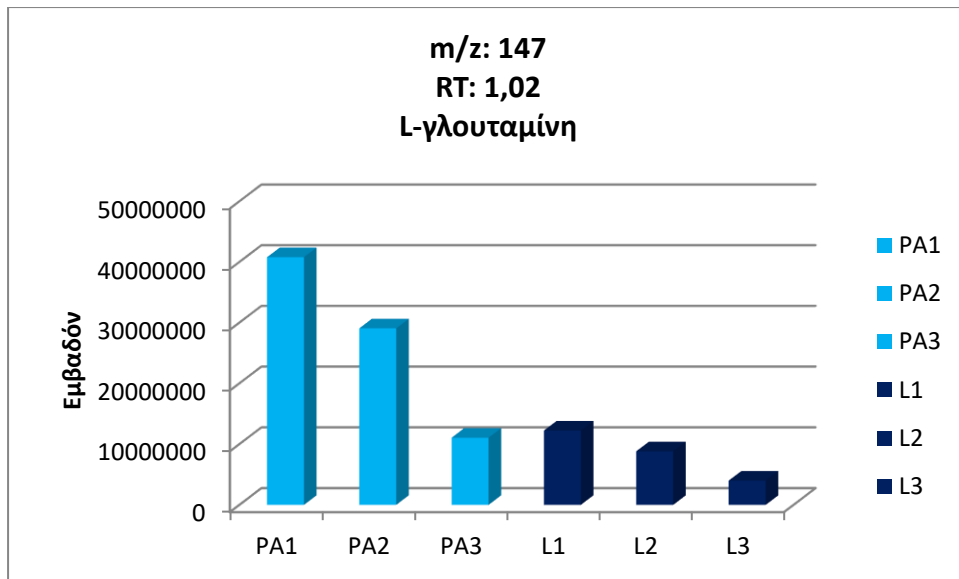




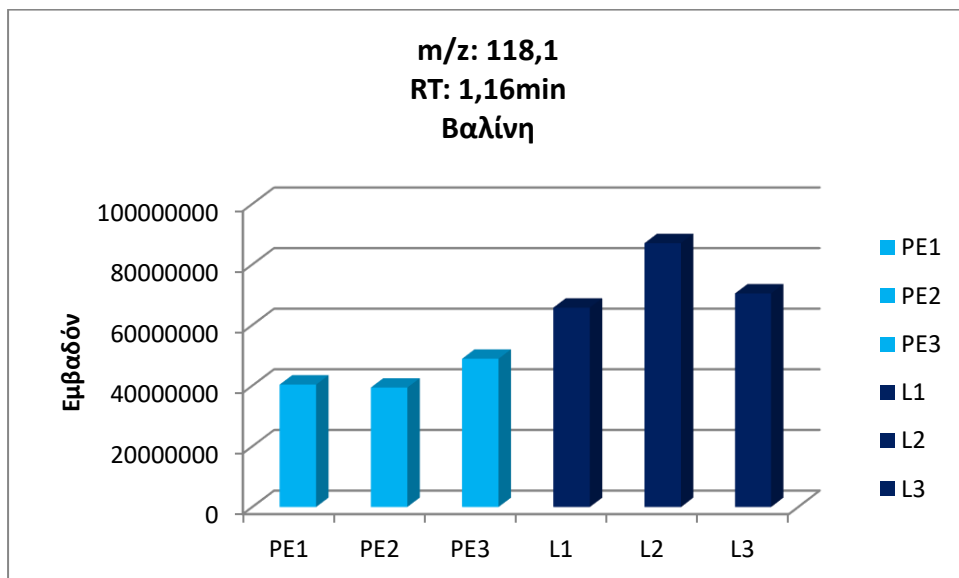
✚ Παράμετρος διαχωρισμού: Περιοχή καλλιέργειας δειγμάτων σταφυλιού

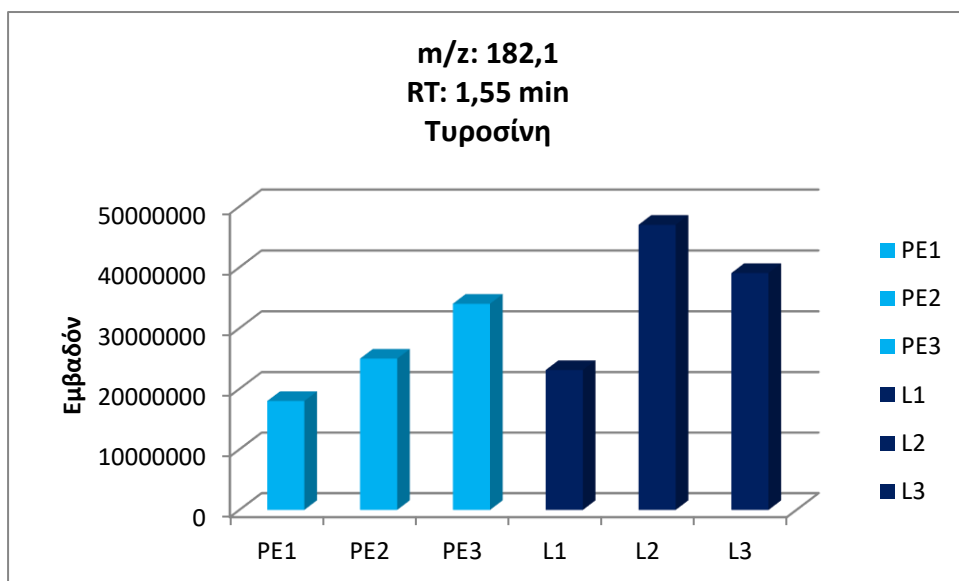
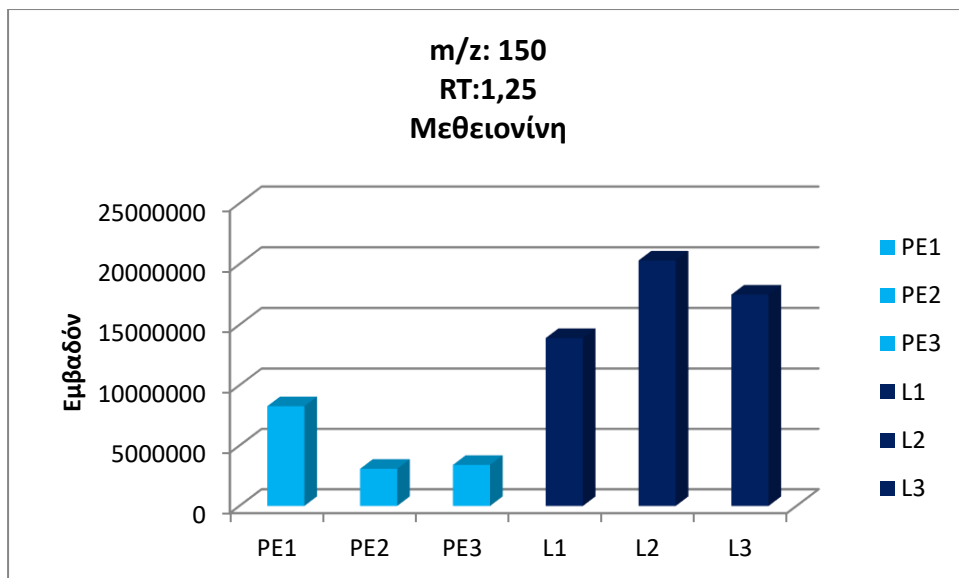
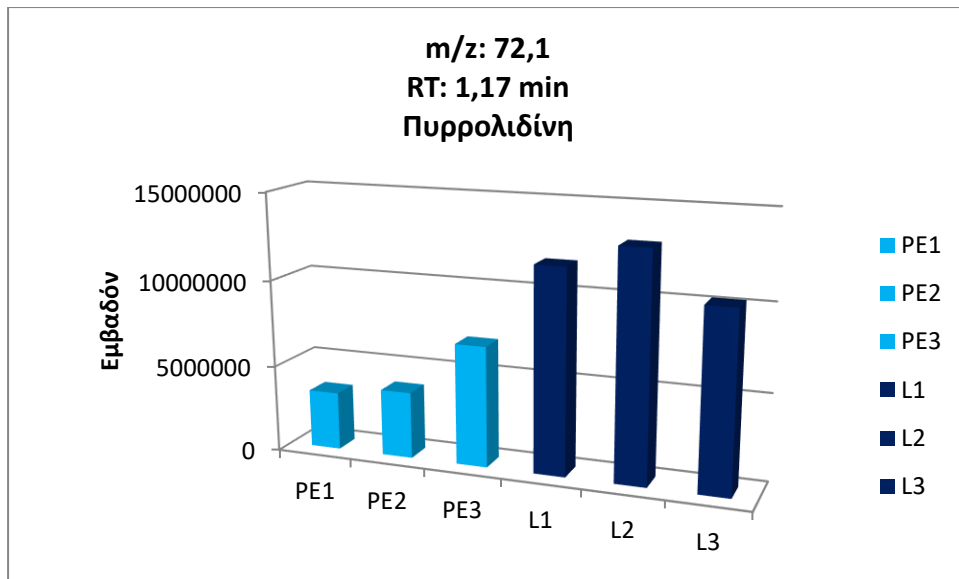
Σύγκριση δειγμάτων σταφυλιών από τους αμπελώνες Μετόχα Παλιό και Λαγοπάτι και τις τρεις χρονικές περιόδους 8/8/2017, 13/8/2017 και 18/8/2017 για το διαχωρισμό τους με κριτήριο τον αμπελώνα.

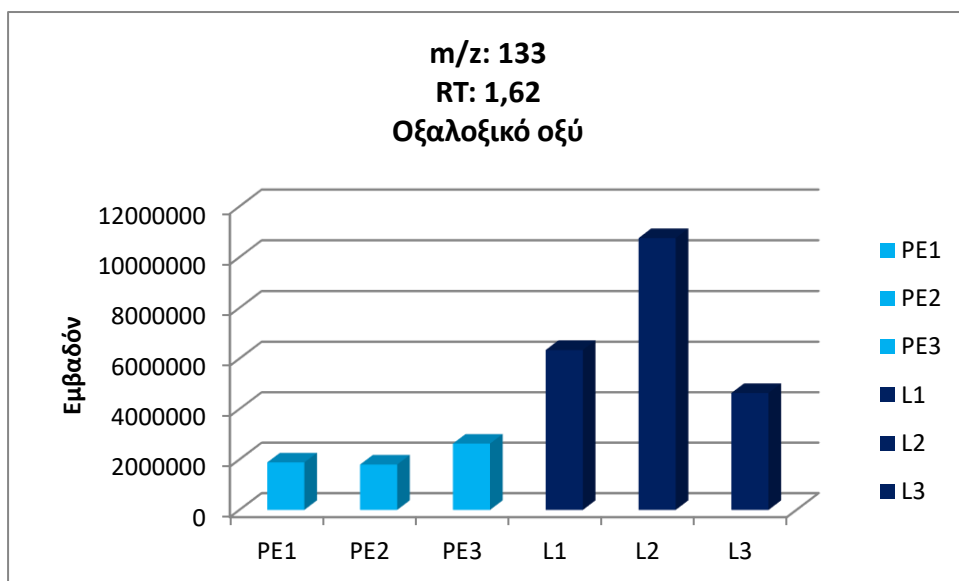
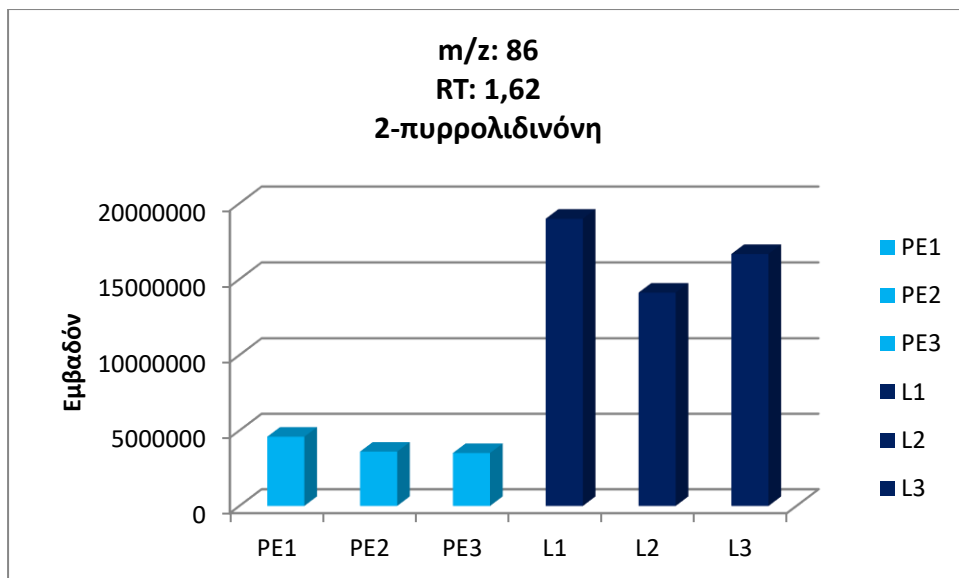
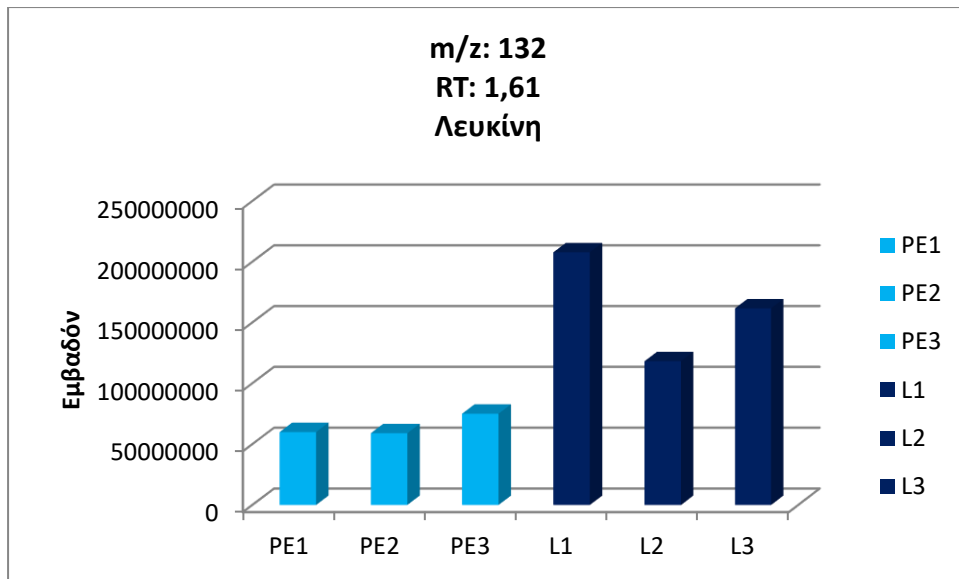


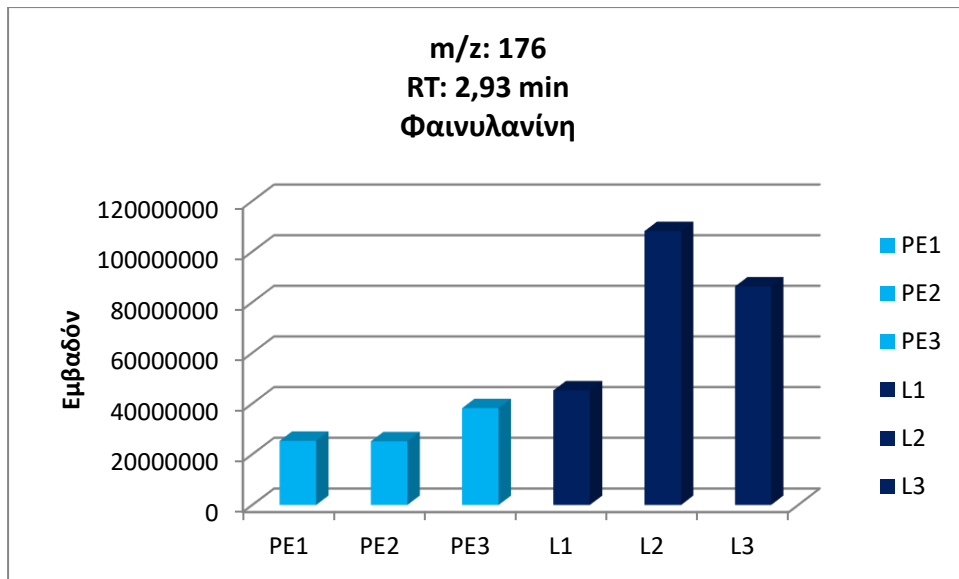


Σύγκριση δειγμάτων σταφυλιών από τους αμπελώνες Μετόχα Πάνω και Λαγοπάτι και τις τρεις χρονικές περιόδους 8/8/2017, 13/8/2017 και 18/8/2017 για το διαχωρισμό τους με κριτήριο τον αμπελώνα.

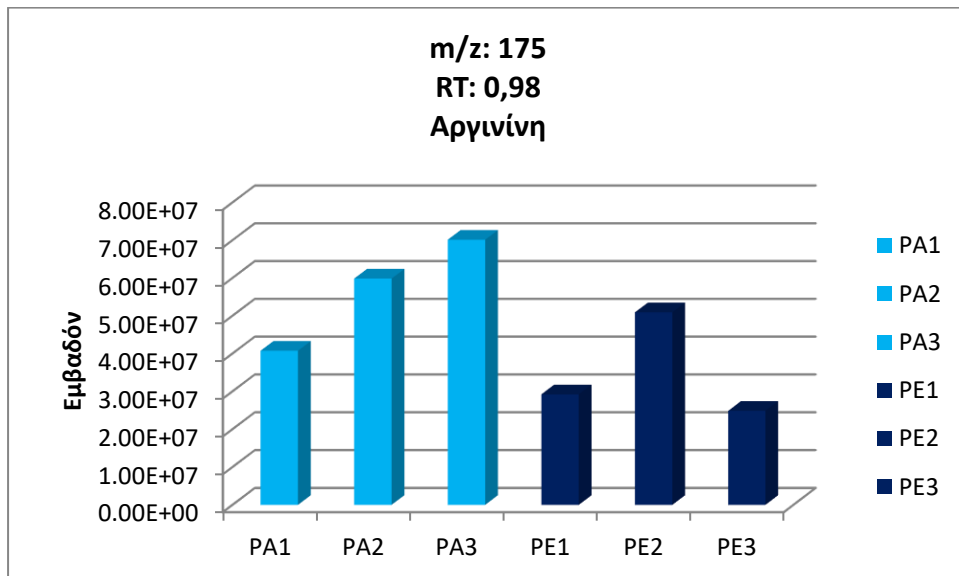


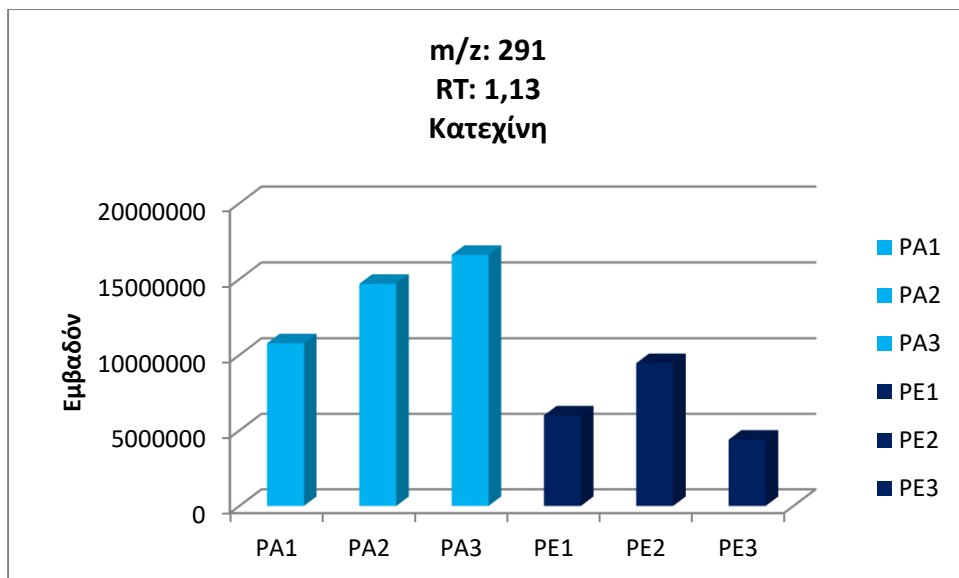
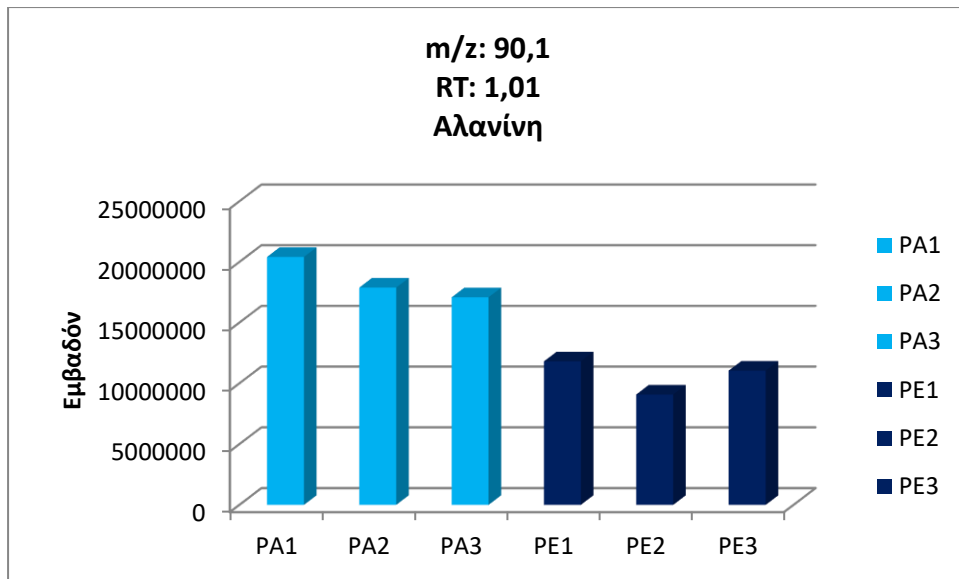






Σύγκριση δειγμάτων σταφυλιών από τους αμπελώνες Μετόχα Πάνω και Μετόχα Παλιό και τις τρεις χρονικές περιόδους 8/8/2017, 13/8/2017 και 18/8/2017 για το διαχωρισμό τους με κριτήριο τον αμπελώνα





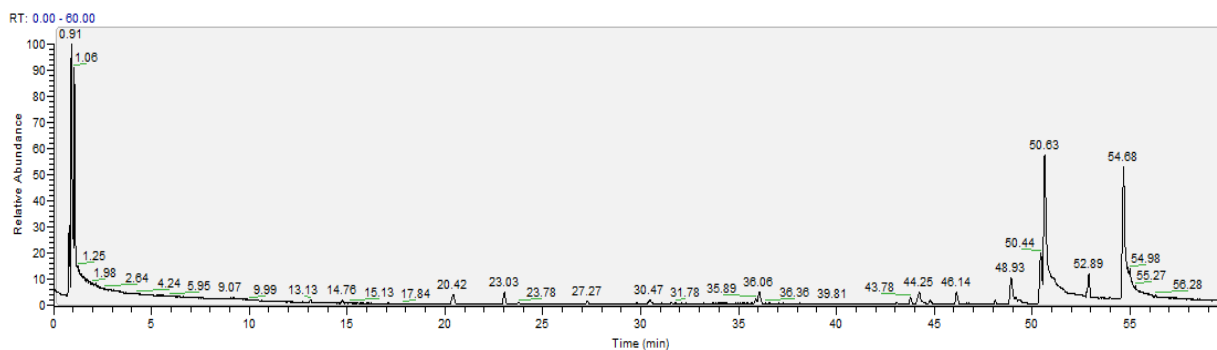
Σ αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι το αμπέλι Λαγοπάτι βρίσκεται πιο μακριά από τα άλλα δύο και γι' αυτό εμφανίζει πιθανώς διαφορετικό προφίλ στα διαγράμματα εξέλιξης εμβαδού των κορυφών των δεικτών που ταυτοποιήθηκαν. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι τα αμπέλια Μετόχα παλιό και Μετόχα πάνω βρίσκονται δίπλα το ένα στο άλλο αλλά διαφέρουν στο υψόμετρο.

## 5.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΛΕΥΚΟΥΣ

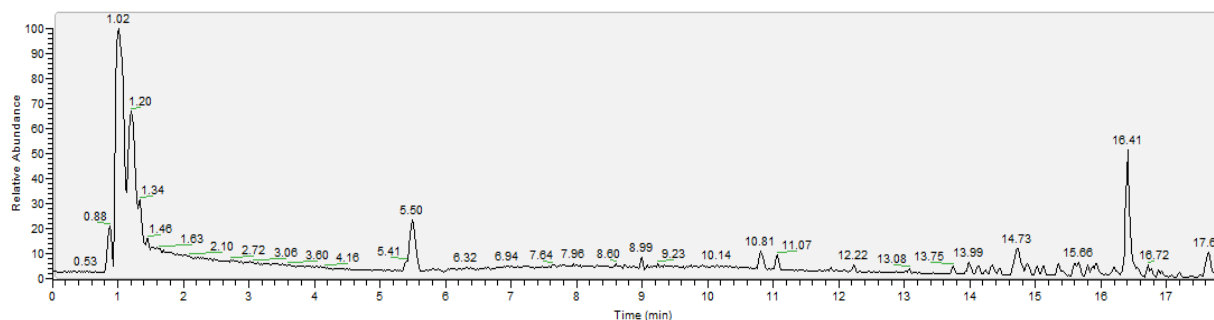
### 5.2.1 Χρωματογραφήματα και ταυτοποίηση ενώσεων

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων γλεύκου, μία μεγαλύτερης (60 min) και μία μικρότερης (18 min) διάρκειας, όπως έχει ήδη

αναφερθεί και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Xcalibur 2.1. Στο Σχήμα 5.9 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα ενός ενδεικτικού δείγματος γλεύκους που αναλύθηκε με τη μεγάλης διάρκειας μέθοδο ενώ στο Σχήμα 5.10 φαίνεται το αντίστοιχο με τη μικρής διάρκειας μέθοδο.

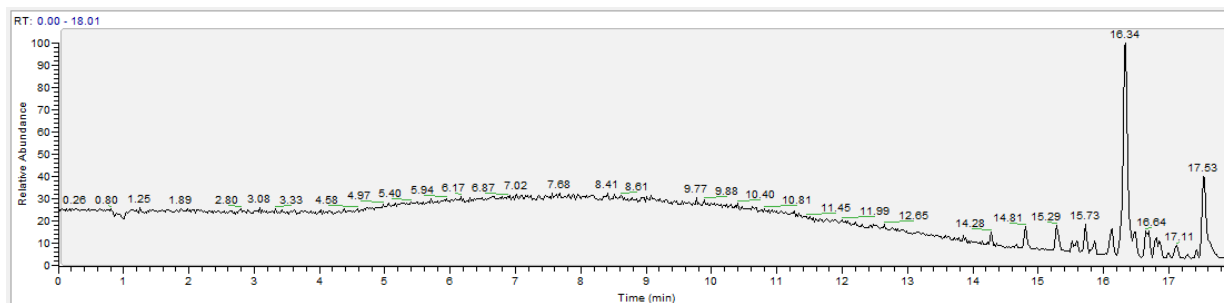


Σχήμα 5.9 Χρωματογράφημα δείγματος γλεύκους Γ5 μεθόδου 60 min



Σχήμα 5.10 Χρωματογράφημα δείγματος γλεύκους Γ5 μεθόδου 18 min

Από τα παραπάνω χρωματογραφήματα παρατηρείται ότι εμφανίζουν και τα δύο παρόμοια μορφή, με μεγαλύτερες κορυφές να εμφανίζονται στην αρχή της ανάλυσης, δηλαδή ενώσεις υδατοδιαλυτές που εκλύονται με το νερό, όπως ακριβώς και στα χρωματογραφήματα των σταφυλιών. Επιπλέον παρατηρείται ότι στο τελευταίο τμήμα των χρωματογραφημάτων εμφανίζονται αρκετές κορυφές, οι οποίες δεν οφείλονται σε ενώσεις των δειγμάτων καθώς εμφανίζονται και στο χρωματογράφημα του νερού (blank), όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα. Οι κορυφές αυτές εμφανίζονται πιο συγκεκριμένα, μετά τα 45 min στη μέθοδο της μεγάλης διάρκειας και μετά τα 14 min στη μέθοδο της μικρής διάρκειας.



Σχήμα 5.11 Χρωματογράφημα νερού μεθόδου 18 min

Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που έγινε αρχικά και με τα δείγματα σταφυλιών και που αναφέρθηκε παραπάνω.

**Πίνακας 5.9:** Χρόνοι έκλυσης, μάζα και μέθοδος ανάλυσης πιθανών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν [42-47] [90-93].

Χρόνος Έκλυσης	m/z	Ένωση	Τύπος	M <sub>R</sub>
0,81	148,0604	γλουταμικό οξύ	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,0531
0,82	132,0534	ασπαραγίνη	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	133,0339
0,95	219,025	γλυκόζη	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,063
1,23	116,0706	προλίνη	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,0633
2,60	182,0811	τυροσίνη	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181,0738
3,58	153,0757	αραβιτόλη	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	152,0684
5	166,0862	φαινυλαλανίνη	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165,0789
9,38	119,0339	ηλεκτρικό οξύ	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	118,0266
11,03	199,0601	συριγγικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198,0528
11,39	163,0389	4-υδροξυκουμαρίνη	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	162,0316
11,76	205,0971	τροπτοφάνη	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,0898
12,9	146,1652	σπερμιδίνη	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	145,1579
13,1	155,0339	πρωτοκατεκινικό οξύ	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,0266
13,41	132,0822	γλουταρικό οξύ	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	133,0856
14,72	291,0863	κατεχίνη	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,0790
20,35	161,084	τροπτοφόλη	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO	162,091



24,32	192,0423	σκοπολετίνη	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	193,1194
30,47	466,1101	3-γλυκοζίτης της δελφινιδίνης	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465,1028
31,57	480,1257	3-γλυκοζίτης της πετουνιδίνης	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479,1184
35,69	228,0786	trans-ρεσβερατρόλη	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O	229,1954
36,04	253,0859	6-μεθοξυφλαβόνη	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	252,0786
43,8	318,0728	πετουνιδίνη	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	317,0655
	347,0761	συριγγετίνη	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346,0688
48,1	377,1455	ριβοφλαβίνη	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	376,1382
48,91	302,0779	παιονιδίνη	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	301,0706
50.61	304,0572	δελφινιδίνη	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	303,0499

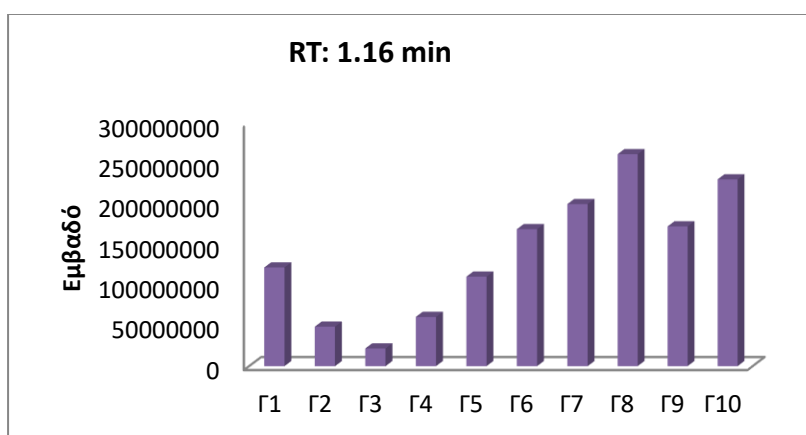
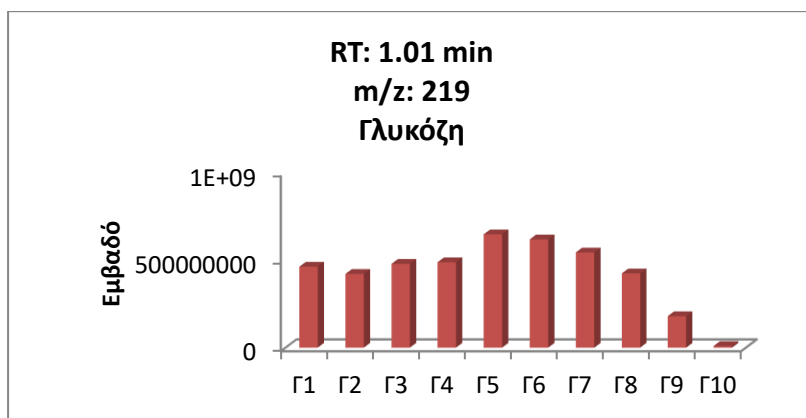
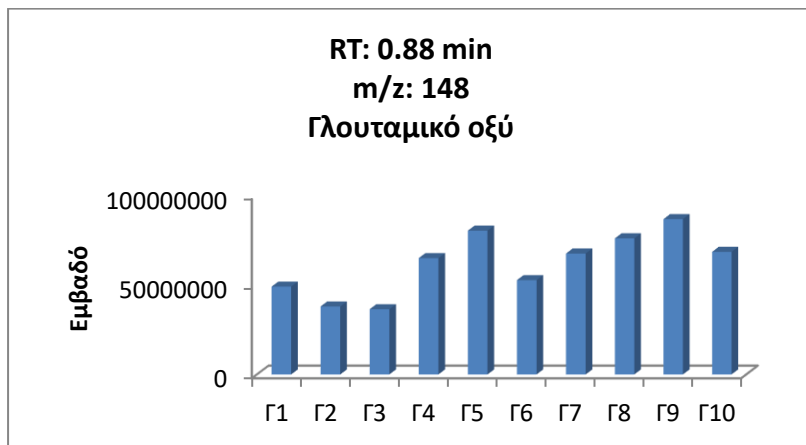
Παρατηρείται ότι οι πιθανοί μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο των 60 λεπτών στα δείγματα γλεύκους είναι ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες των αμινοξέων, των αλκοολών, των οργανικών οξέων, των φαινολικών οξέων, των φλαβονολών και των ανθοκυανών. Οι ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (κυρίως τα γευστικά), όπως συζητήθηκε και στο Κεφάλαιο 2.

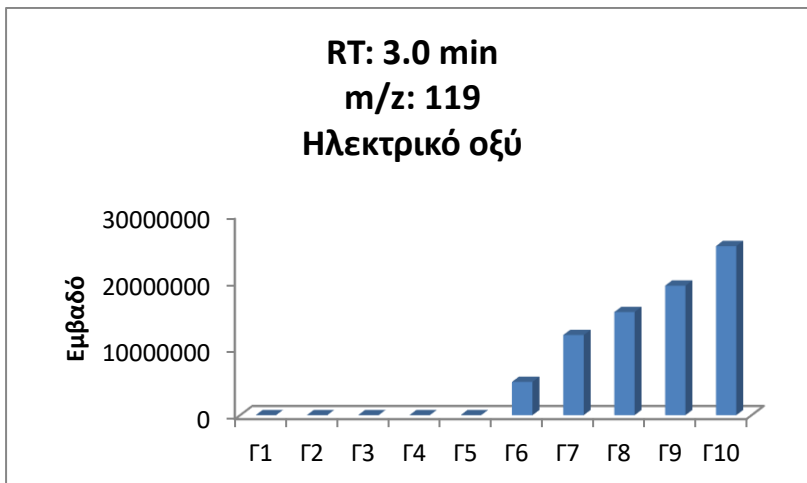
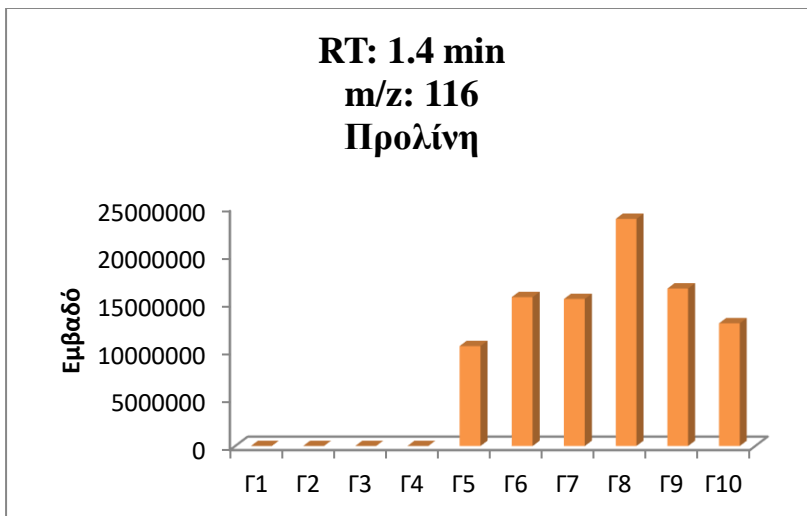
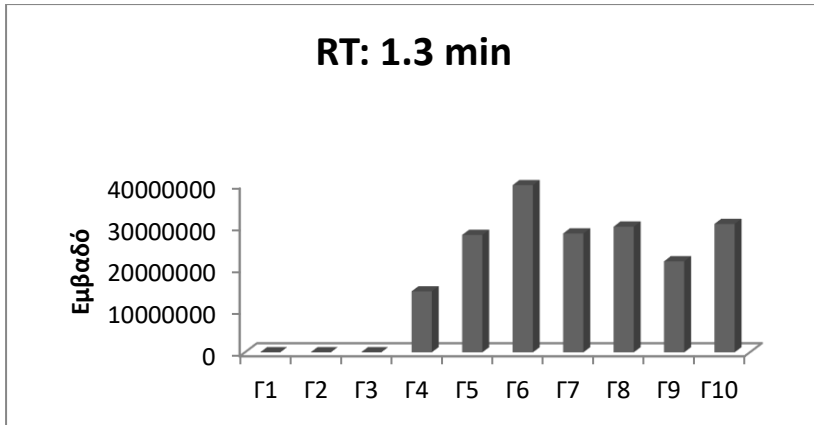
### 5.2.2 Εμβαδοποίηση και σύγκριση κορυφών

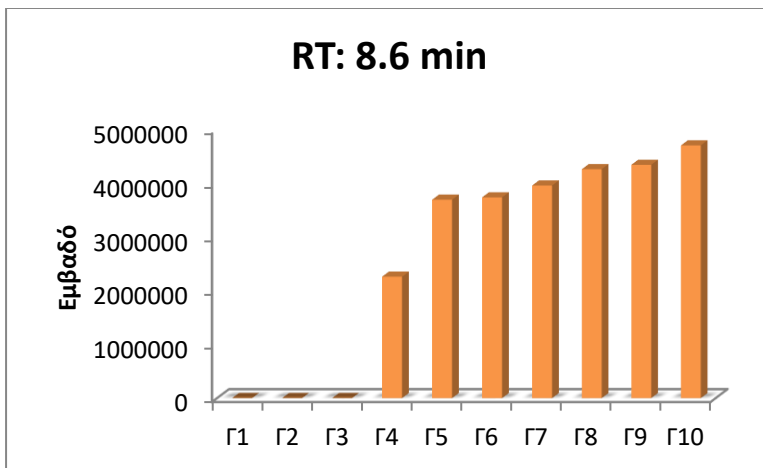
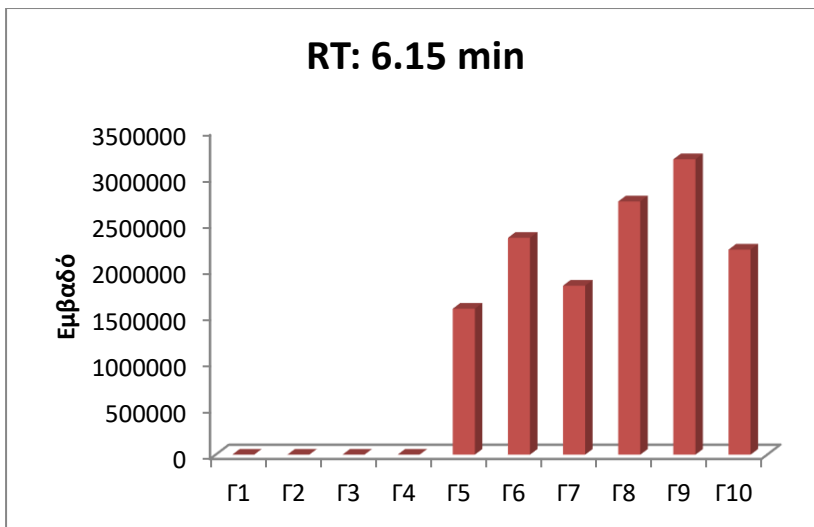
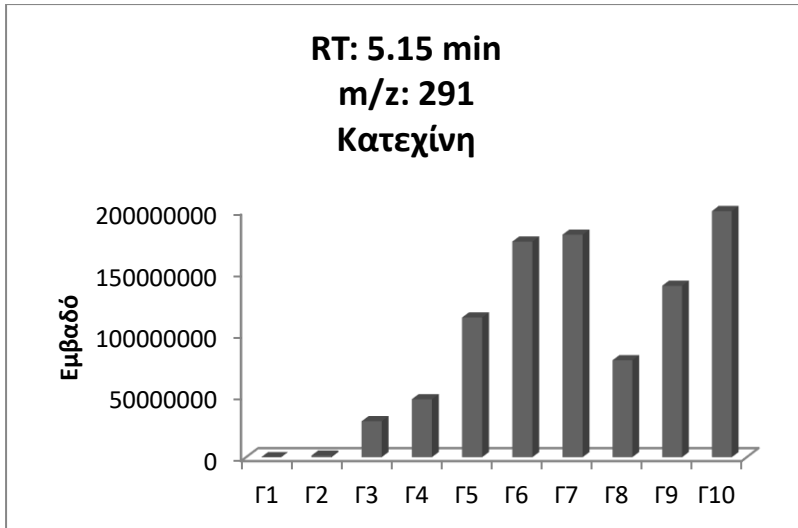
Με τη βοήθεια του λογισμικού Xcalibur 2.1, πραγματοποιήθηκε εμβαδοποίηση των κορυφών των δειγμάτων γλεύκους της μεθόδου των 18 min, ώστε στη συνέχεια να μπορεί να παρακολουθηθεί η πορεία της κορυφής-ένωσης στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η μέθοδος αυτή θεωρείται πιο αξιόπιστη, καθώς οι κορυφές φαίνεται να είναι λιγότερο σπασμένες ή με ουρές που συχνά δημιουργούνται από τους μεγάλους χρόνους ανάλυσης. Να αναφερθεί ότι έγινε αντιστοίχιση, όσο ήταν δυνατό, των δεικτών-μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν στη μέθοδο των 60 λεπτών με τις κορυφές και τις μάζες στη μέθοδο των 18 λεπτών. Ωστόσο, οι περισσότερες καθαρές κορυφές των χρωματογραφημάτων δε μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν και έτσι στα περισσότερα διαγράμματα που ακολουθούν απλά παρακολουθείται η εξέλιξη των κορυφών των δειγμάτων γλεύκους κατά την αλκοολική ζύμωση, χωρίς έχει γίνει ταυτοποίησή τους.

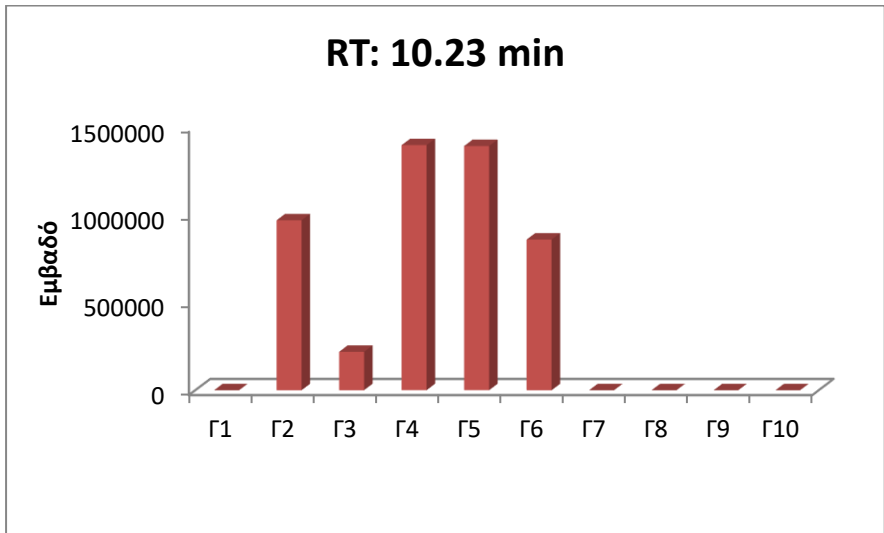
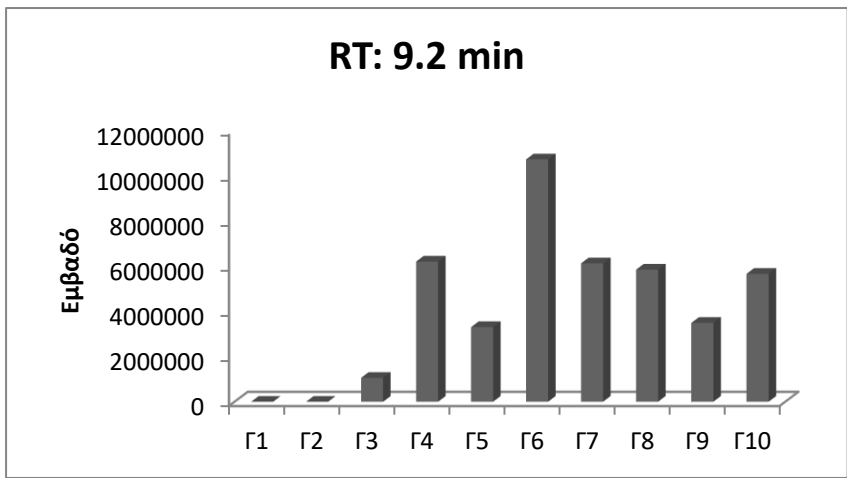
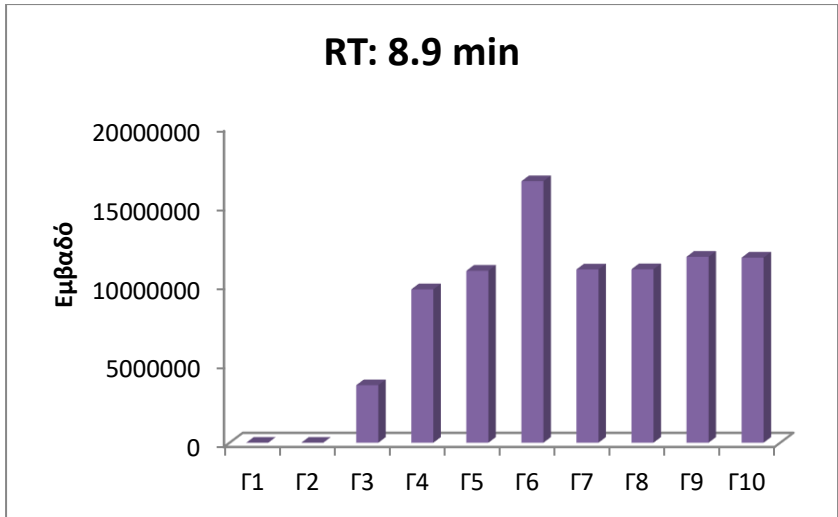
Στη συνέχεια παρατίθενται όλα τα διαγράμματα εμβαδού κορυφών των δειγμάτων του γλεύκους που καταγράφηκαν.

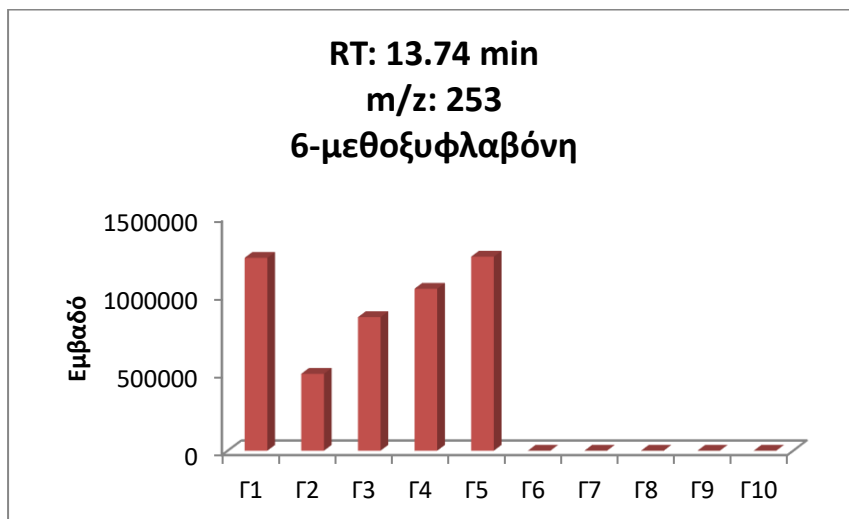
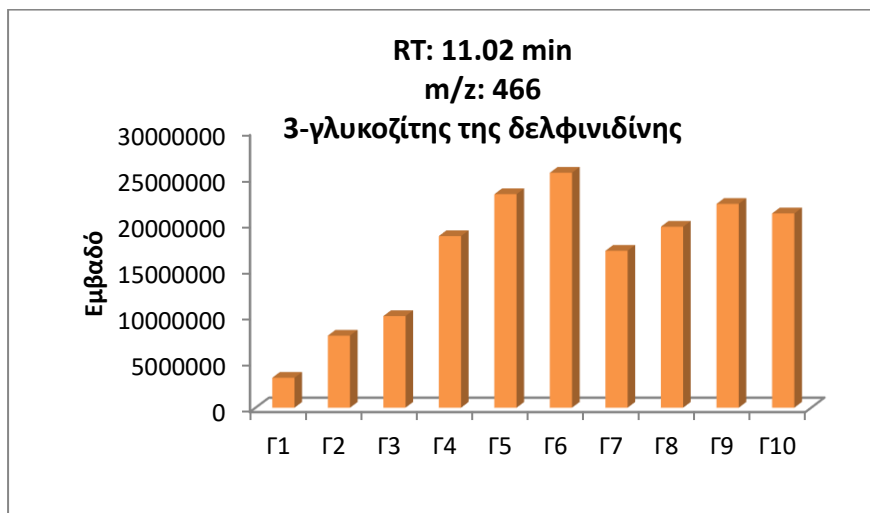
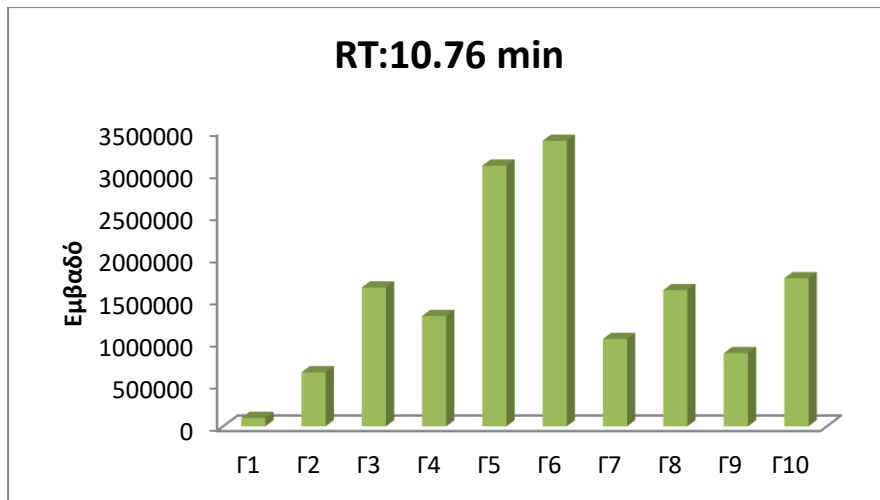
*Διαγράμματα εξέλιξης εμβαδού των κυριότερων χρωματογραφικών κορυφών των δειγμάτων γλεύκους*











Προκύπτει, λοιπόν από τα γραφήματα πως το εμβαδόν κάθε κορυφής που αντιστοιχεί σε κάποια ένωση-κατηγορία ενώσεων επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο κατά την

αλκοολική ζύμωση, καθώς το εμβαδόν-ύψος-ένταση τους (άρα και η περιεκτικότητά τους) αυξομειώνεται, με άλλων να παρατηρείται αισθητή ελάττωση που φτάνει ως και ίχνη, και άλλων σημαντική αύξηση κατά τη πορεία της αλκοολικής ζύμωσης.

## 5.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN

Τα τελικά φάσματα Raman ποέκυψαν έπειτα από βελτιστοποίηση των παραμέτρων της ανάλυσης και η μέθοδος ανάλυσης ήταν η ίδια στα δείγματα γλεύκους και των σταφυλιών.

Να σημειωθεί ότι για τη κατασκευή διαγραμμάτων σύγκρισης των φασμάτων Raman, UV-VIS και ATR-FTIR χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Origin Pro 9.0. Στο πρόγραμμα αυτό δεν είναι δυνατή η χρήση ελληνική γλώσσας γι'αυτό στα υπομνήματα οι επεξηγήσεις είναι γραμμένες στα Αγγλικά. Για την αποφυγή σύγχυσης, στον πίνακα που ακολουθεί εξηγούνται τα ονόματα-κωδικοί που έχουν δοθεί στα δείγματα με τη χρήση του προγράμματος.

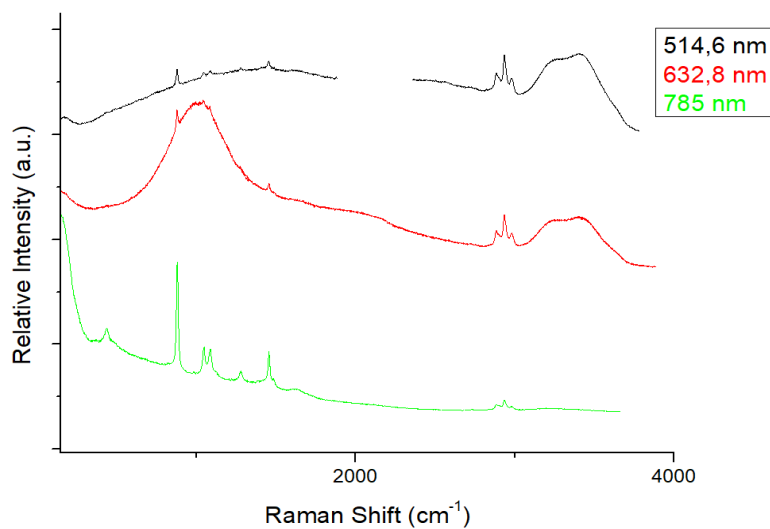
**Πίνακας 5.9:** Ονόματα και περιγραφή των δειγμάτων που δόθηκαν στην ανάλυση με φασματοσκοπία RAMAN, UV-VIS και ATR-FTIR

ΟΝΟΜΑΤΑ ΟΜΑΔΑΣ ΣΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ	ΚΩΔΙΚΑ ΟΝΟΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΙΧΑΝ ΔΟΘΕΙ ΑΡΧΙΚΑ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ
S1	Σ1-Σ2-Σ3	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΛΙΟ 8/8/2017
S2	Σ4-Σ5-Σ6	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΝΩ 8/8/2017
S3	Σ7-Σ8-Σ9	ΛΑΓΟΠΑΤΙ 8/8/2017
S4	Σ10-Σ11-12	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΛΙΟ 13/8/2017
S5	Σ13-Σ14-Σ15	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΝΩ 13/8/2017
S6	Σ17-Σ17-Σ18	ΛΑΓΟΠΑΤΙ 13/8/2017
S7	Σ19-Σ20-Σ21	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΛΙΟ 18/8/2017

S8	Σ22-Σ23-Σ24	ΜΕΤΟΧΑ ΠΑΝΩ 18/8/2017
S9	Σ25-Σ26-Σ27	ΛΑΓΟΠΑΤΙ 18/8/2017
G1	Γ1	1 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ 29/08/2017
G2	Γ2	2 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ 30/08/2017
G3	Γ3	3 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ 31/08/2017
G4	Γ4	4 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ 01/09/2017
G5	Γ5	5 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ 02/09/2017
G6	Γ6	6 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ <b>03/09/2017</b>
G7	Γ7	7 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ <b>04/09/2017</b>
G8	Γ8	8 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ <b>05/09/2017</b>
G9	Γ9	9 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ <b>06/09/2017</b>
G10	Γ10	10 <sup>η</sup> ΗΜΕΡΑ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

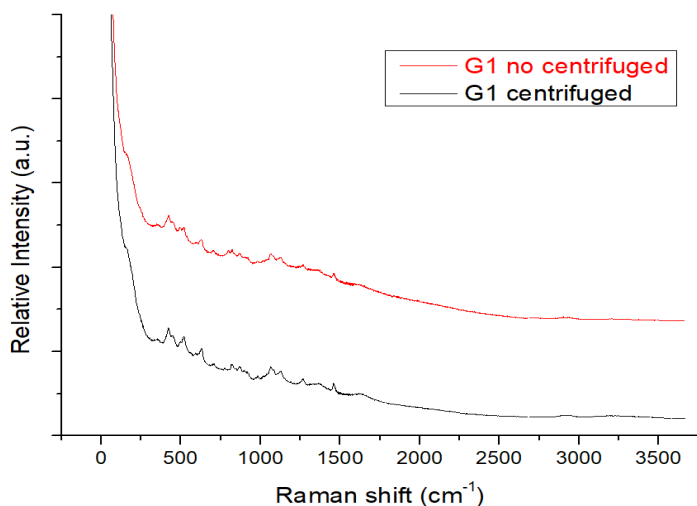


Αρχικά ελέγχθηκαν 3 διαφορετικά μήκη κύματος με τα οποία μετρήθηκαν ενδεικτικά δύο δείγματα γλεύκους, (τα Γ1 και Γ10) και ένα δείγμα σταφυλιού (Σ11). Τα φάσματα που προέκυψαν για το Γ10 παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.13. Παρατηρείται πως μόνο στα 785 nm μειώνεται η φωταύγεια σε τέτοιο σημείο που τα φάσματα που προέκυπτan να θεωρούνται ικανοποιητικά για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.



**Σχήμα 5.13:** Φάσματα Raman για τα 3 μήκη κύματος του δείγματος Γ10

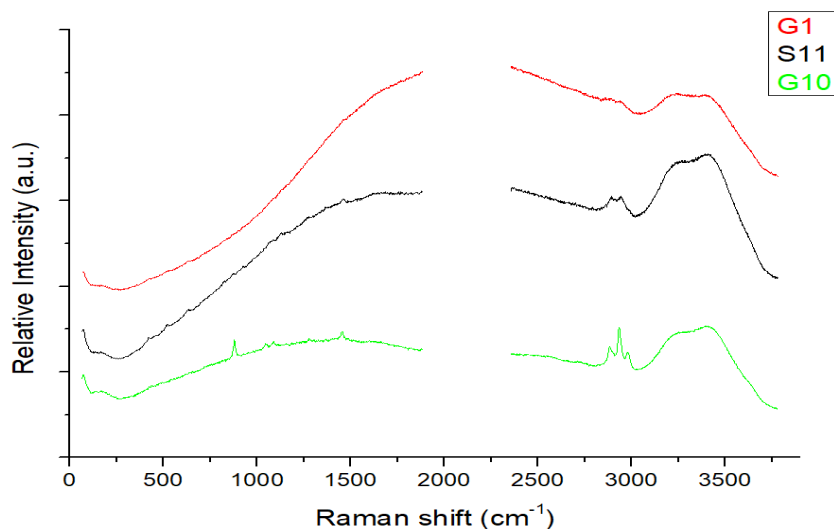
Επίσης έγιναν μετρήσεις τόσο σε φυγοκεντρημένα όσο και σε μη φυγοκεντρημένα δείγματα. Τα φάσματα του φυγοκεντρημένου δείγματος Γ1 και του αντίστοιχου μη φυγοκεντρημένου φαίνονται στο Σχήμα 5.14.



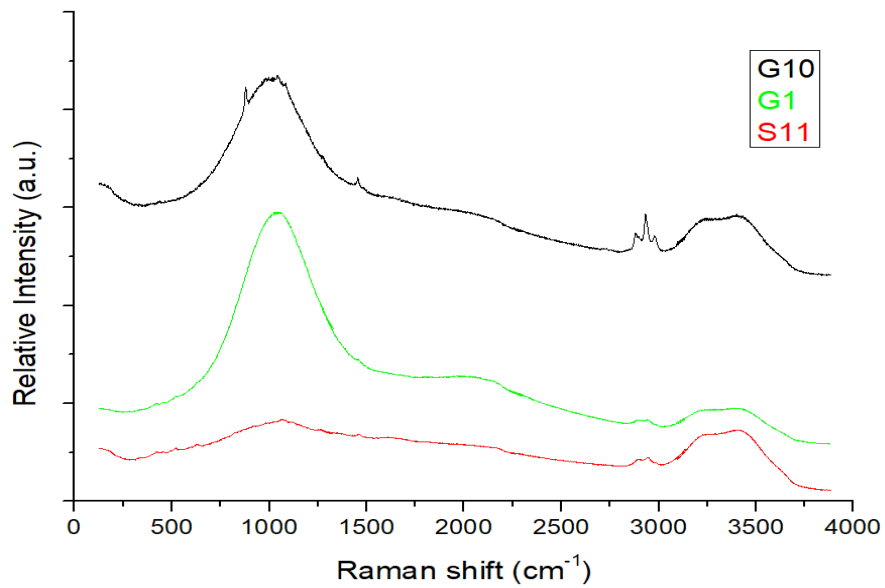
**Σχήμα 5.14:** Φάσματα Raman φυγοκεντρημένου (*G1 centrifuged*) και μη-φυγοκεντρημένου δείγματος Γ1 (*G1 no centrifuged*).

Τα φυγοκεντρημένα δείγματα παρατηρείται ότι αποδίδουν λίγο πιο καθαρές κορυφές σε σχέση με τα δείγματα που είχαν σωματίδια. Συνεπώς, τα σωματίδια εμποδίζουν την σωστή απόδοση των κορυφών και αντί να προσθέτουν πληροφορία, τελικά δυσχεραίνουν την ανάλυση. Επιπλέον απαιτούν περισσότερο χρόνο για την ανάλυσή τους, αφού η μέτρηση δεν πραγματοποιείται με χρήση του ειδικού εξαρτήματος για τα υγρά, αλλά με  $\times 50$  φακό, που απαιτεί ρύθμιση της δέσμης laser ώστε να διαπερνά τα τοιχώματα της κυψελίδας και να αποδίδει μόνο το φάσμα του δείγματος.

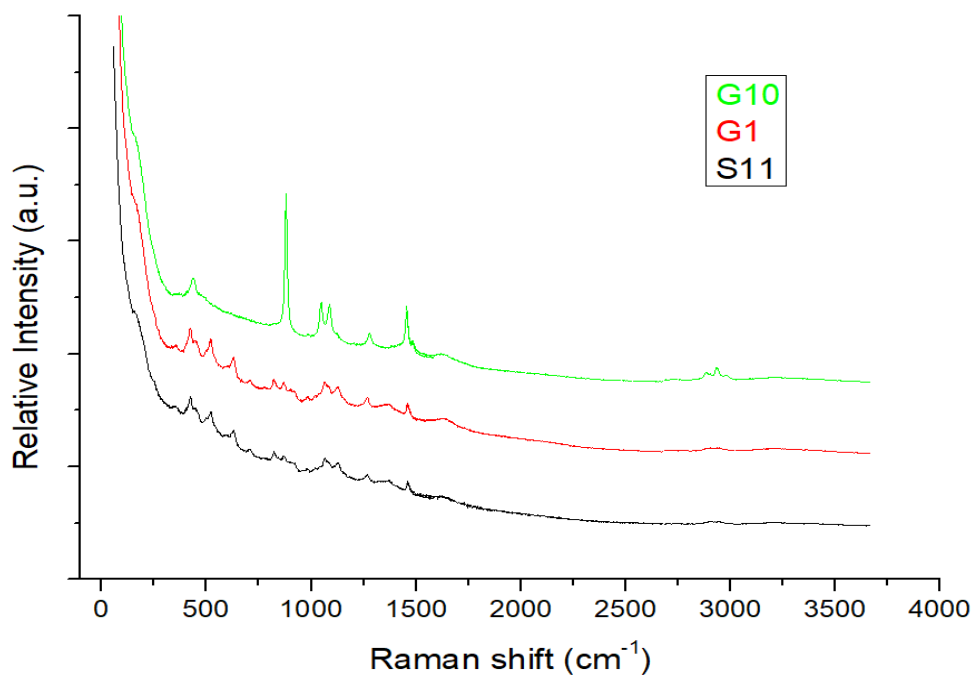
Για να δημιουργηθεί η τελική μέθοδος ανάλυσης με φασματοσκοπία Raman, ελήφθησαν και μελετήθηκαν αρκετά φάσματα μεταβάλλοντας διάφορες παραμέτρους που αναφέρθηκαν στο Κεφάλαιο 4.



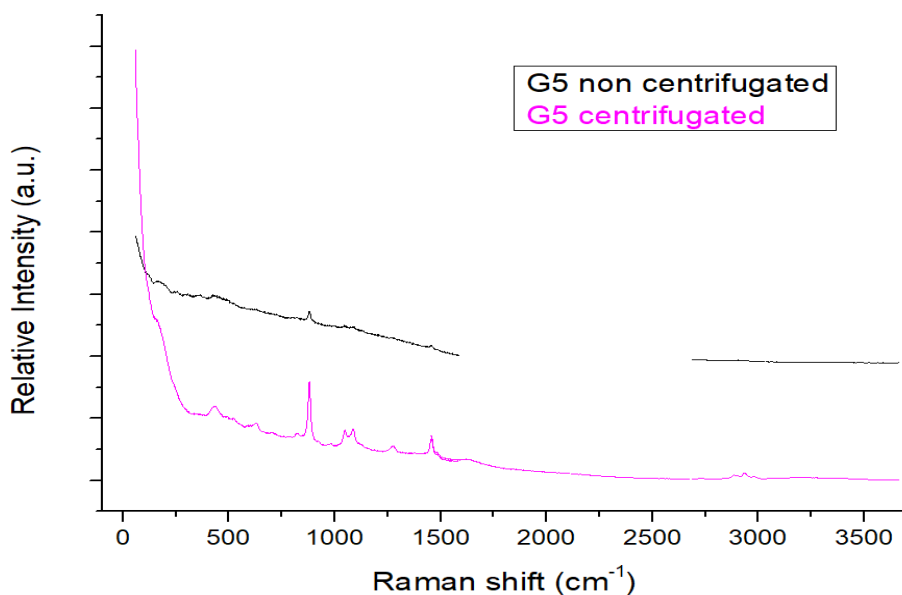
**Σχήμα 5.14** Φάσματα στα 514.63 nm δειγμάτων Γ1 (*G1*)-Γλεύκος την 1<sup>η</sup> μέρα της αλκοολικής ζύμωσης, Σ11 (*S11*)-δείγμα σταφυλιού και Γ10 (*G10*)- γλεύκος την 10<sup>η</sup> μέρα της αλκοολικής ζύμωσης



**Σχήμα 5.15:** Φάσματα δειγμάτων στα 632.8 nm Γ1 (G1)-Γλεύκος την 1<sup>η</sup> μέρα της αλκοολικής ζύμωσης, Σ11 (S11)- δείγμα σταφυλιού και Γ10 (G10)- γλεύκος την 10<sup>η</sup> μέρα της αλκοολικής ζύμωσης



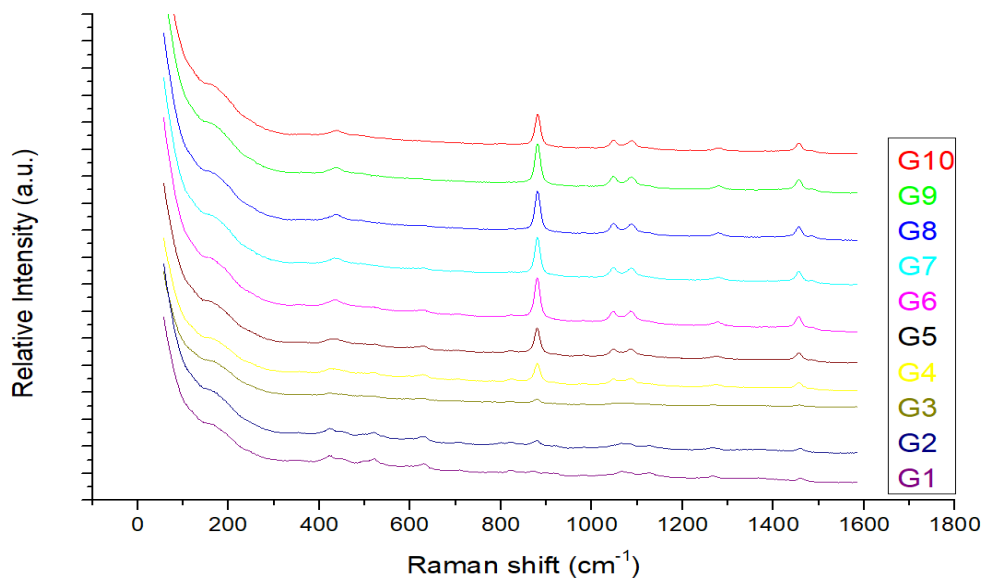
**Σχήμα 5.16:** Φάσματα δειγμάτων στα 785 nm Γ1 (G1)-Γλεύκος την 1<sup>η</sup> μέρα της αλκοολικής ζύμωσης, Σ11 (S11)- δείγμα σταφυλιού και Γ10 (G10)- γλεύκος την 10<sup>η</sup> μέρα της αλκοολικής ζύμωσης



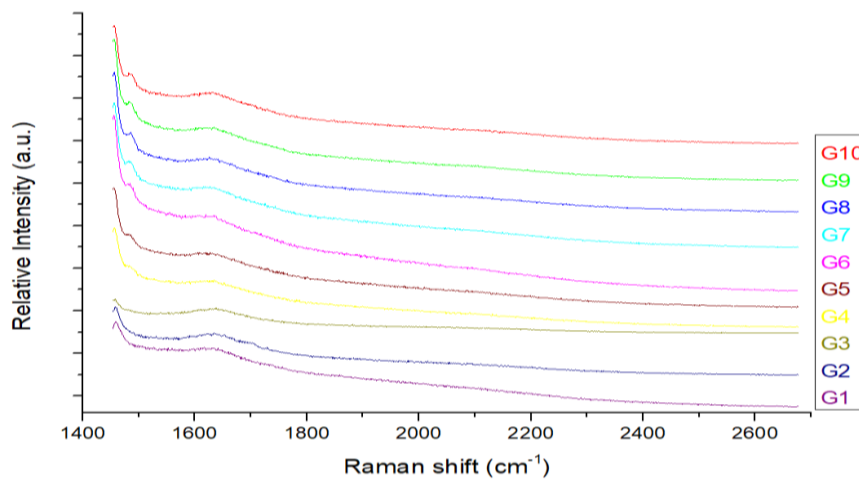
**Σχήμα 5.17:** Φάσματα φυγοκεντρημένου (*G5 centrifugated*) και μη (*G5 non centrifugated*) δείγματος *G5* στα 785 nm

### 5.2.1 Αποτελέσματα δειγμάτων γλεύκους

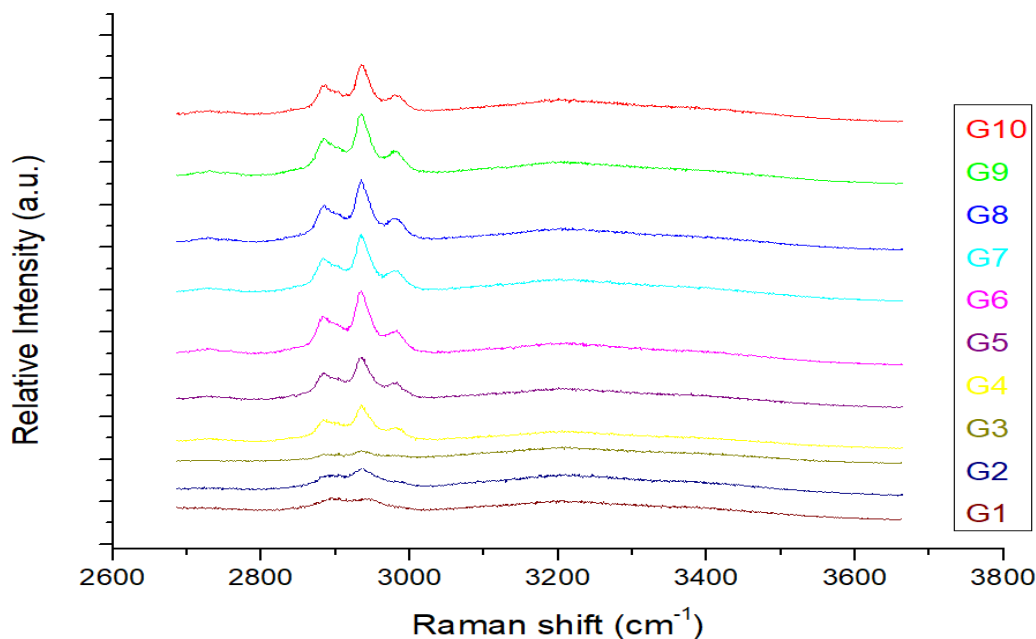
Τα φάσματα των δειγμάτων γλεύκους θεωρήθηκε ότι καλύτερο είναι να συγκριθούν ξεχωριστά στα τρία διαφορετικά παράθυρα (1<sup>ο</sup> παράθυρο: 870 cm<sup>-1</sup>, 2<sup>ο</sup> παράθυρο: 2100 cm<sup>-1</sup>, 3<sup>ο</sup> παράθυρο: 3200 cm<sup>-1</sup>) για να είναι πιο διακριτές οι ομοιότητες και οι διαφορές τους. Με τη χρήση του προγράμματος Origin Pro 9.0 δημιουργήθηκαν συγκεντρωτικά διαγράμματα για καθένα από τα τρία παράθυρα τα οποία παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.18, 5.19 και 5.20.



**Σχήμα 5.18:** Φάσματα Raman δειγμάτων γλεύκους για το πρώτο παράθυρο (870 cm<sup>-1</sup>)



Σχήμα 5.19: Φάσματα Raman δειγμάτων γλεύκους για το δεύτερο παράθυρο ( $2.100 \text{ cm}^{-1}$ )

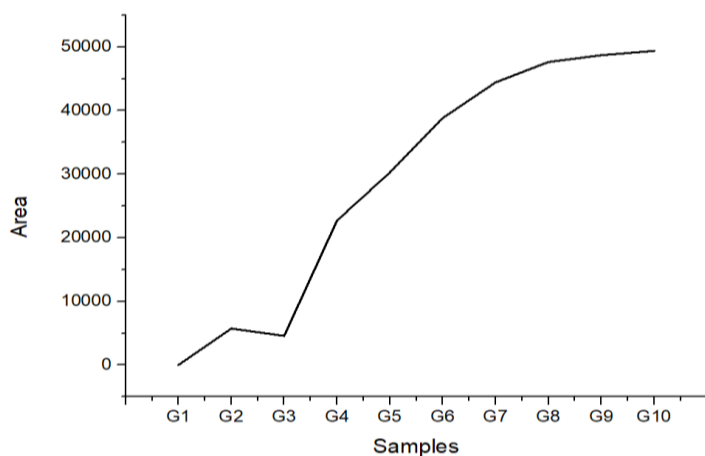


Σχήμα 5.20: Φάσματα Raman δειγμάτων γλεύκους για το τρίτο παράθυρο ( $3.200 \text{ cm}^{-1}$ )

Από το πρώτο και τρίτο παράθυρο λαμβάνεται ουσιαστικά πληροφορία, στο δεύτερο δεν υπάρχει κάποια αξιοσημείωτη κορυφή. Από τη βιβλιογραφία, προέκυψε ότι στα παράθυρα αυτά εμφανίζονται κορυφές των σακχάρων, γλυκόζη και φρουκτόζη, και χαρακτηριστικές κορυφές της αιθανόλης.

Όσον αφορά την αιθανόλη, εμβαδοποιήθηκε μια χαρακτηριστική κορυφή της στα δείγματα για έλεγχο της εξέλιξης της κατά την πρόοδο της αλκοολικής ζύμωσης και παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.21.

Να σημειωθεί ότι, για να μπορούν τα αποτελέσματα να θεωρηθούν συγκρίσιμα μεταξύ των δειγμάτων, αρχικά έγινε κανονικοποίηση των φασμάτων με βάση την κορυφή που προκύπτει από το νερό (δεσμος O-H) στην περιοχή των  $1.600-1.800\text{ cm}^{-1}$  και έπειτα αφαίρεση του θορύβου (background) με κατάλληλη επεξεργασία των κορυφών (fitting). Οι κατεργασίες όλων των φασμάτων Raman έγιναν με τη χρήση του προγράμματος Labspec (Horib).

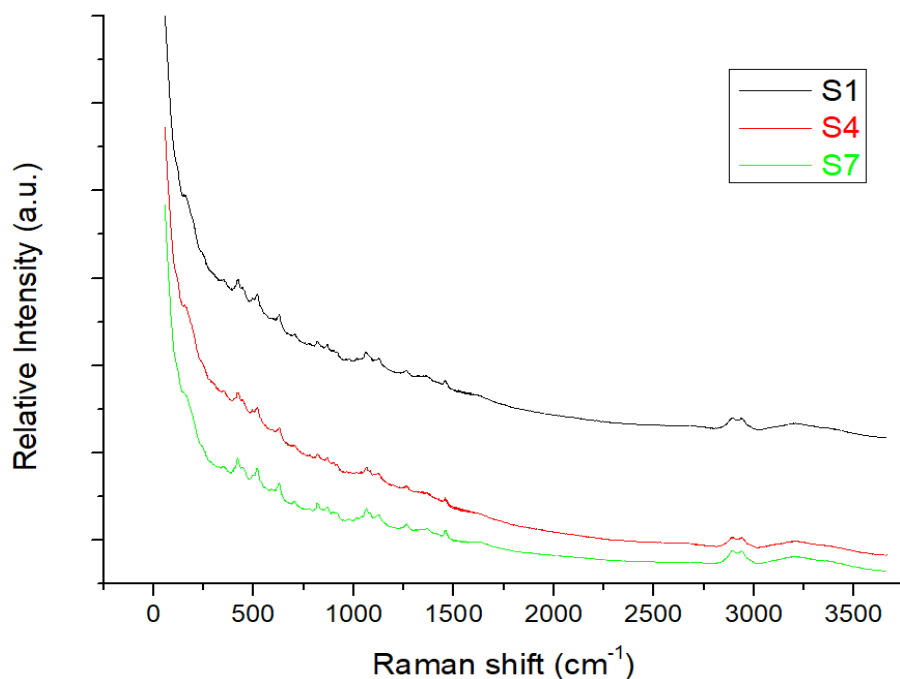


**Σχήμα 5.20:** Καμπύλη εξέλιξης χαρακτηριστικής κορυφής από φάσμα RAMAN της αιθανόλης στα δείγματα

Στο Σχήμα 5.20 παρατηρείται η αναμενόμενη αύξηση της αιθανόλης, με εξαίρεση μια μικρή μείωση που φαίνεται κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα, η οποία πιθανώς οφείλεται στον αερισμό που πραγματοποιήθηκε εκείνη τη μέρα της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης, φαίνεται ότι με τον αερισμό προκλήθηκε απότομη αύξηση της αλκοόλης που παρουσιάζεται στα δείγματα από την 4<sup>η</sup> ημέρα και μετά.

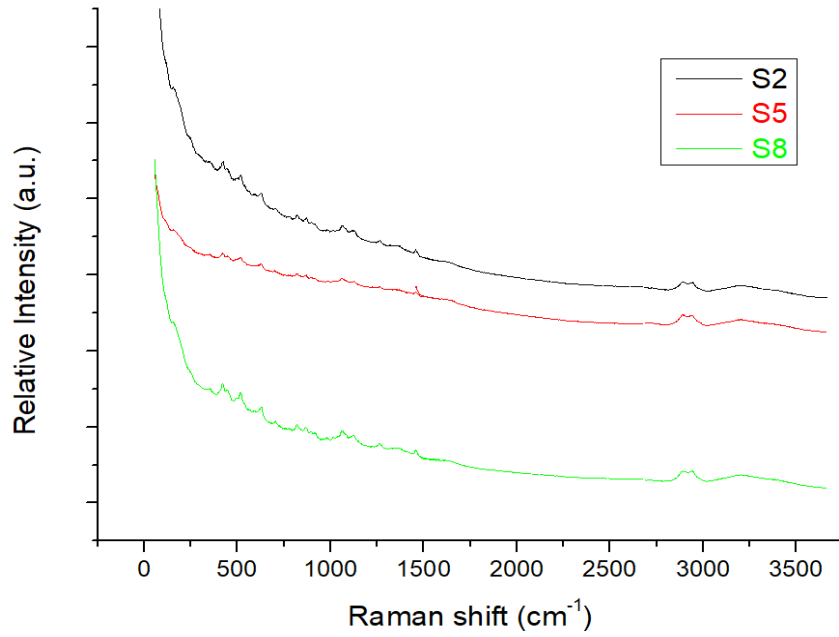
### 5.2.2 Αποτελέσματα δειγμάτων σταφυλιών

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 4, για διευκόλυνση των μετρήσεων, τα 27 δείγματα σταφυλιού μετατράπηκαν σε 9, 3 δείγματα για κάθε διαφορετικό αμπελώνα. Τα φάσματα χωρίστηκαν σε αυτά των δειγμάτων που ανήκουν στο ίδιο αμπέλι και σε αυτά που συλλέχθηκαν την ίδια ημερομηνία, ώστε να συγκριθεί η εξέλιξη των σακχάρων με βάση την ωρίμανση τους, και αν υπάρχει διαφοροποίηση ανάλογα με τον αμπελώνα. Στα σχήματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα διαγράμματα με τα φάσματα που προέκυψαν μετά από την κατηγοριοποίησή τους για την καλύτερη μελέτη και σύγκρισή τους.

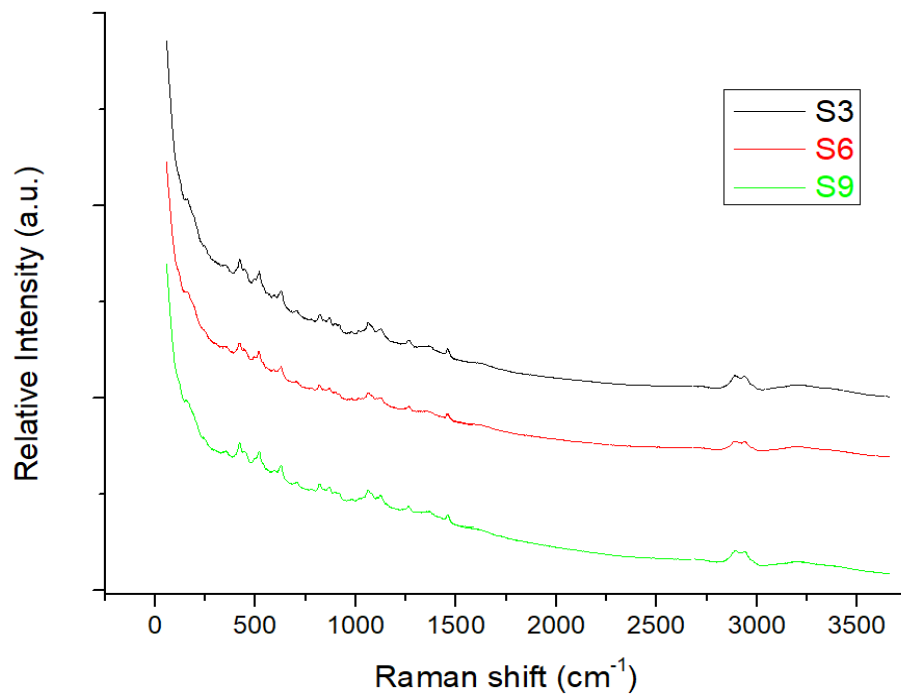


**Σχήμα 5.21:** Φάσματα Raman δειγμάτων Σ1, Σ4 και Σ7 του αμπελιού Μετόχα παλιό τις τρεις διαφορετικές ημερομηνίες συγκομιδής

Από το Σχήμα 5.21 παρατηρείται πως η αύξηση των σακχάρων είναι πιο φανερή στην περίπτωση του δείγματος Σ7 (μεγαλύτερες κορυφές). Τα φάσματα των δειγμάτων Σ1 και Σ4 δεν φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή των σακχάρων. Άρα η ωρίμανση γίνεται ταχύτερα κατά την τελευταία ημερομηνία συγκομιδής (18 Αυγούστου) για το αμπέλι Μετόχα παλιό. Τα αντίστοιχα φάσματα των αμπελιών Μετόχα πάνω και Λαγοπάτι παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.22 και 5.23.



**Σχήμα 5.22:** Φάσματα Raman δειγμάτων Σ2, Σ5 και Σ8 του αμπελιού Μετόχα Πάνωτις τρεις διαφορετικές ημερομηνίες συγκομιδής

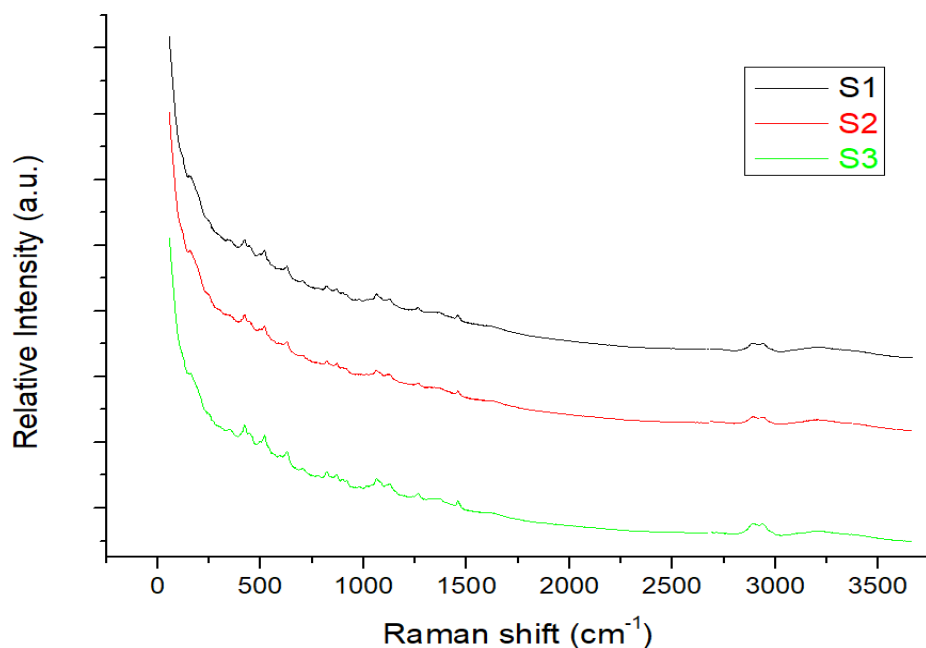


**Σχήμα 5.23:** Φάσματα Raman δειγμάτων Σ3, Σ6 και Σ9 του αμπελιού Λαγοπάτι τις τρεις διαφορετικές ημερομηνίες συγκομιδής

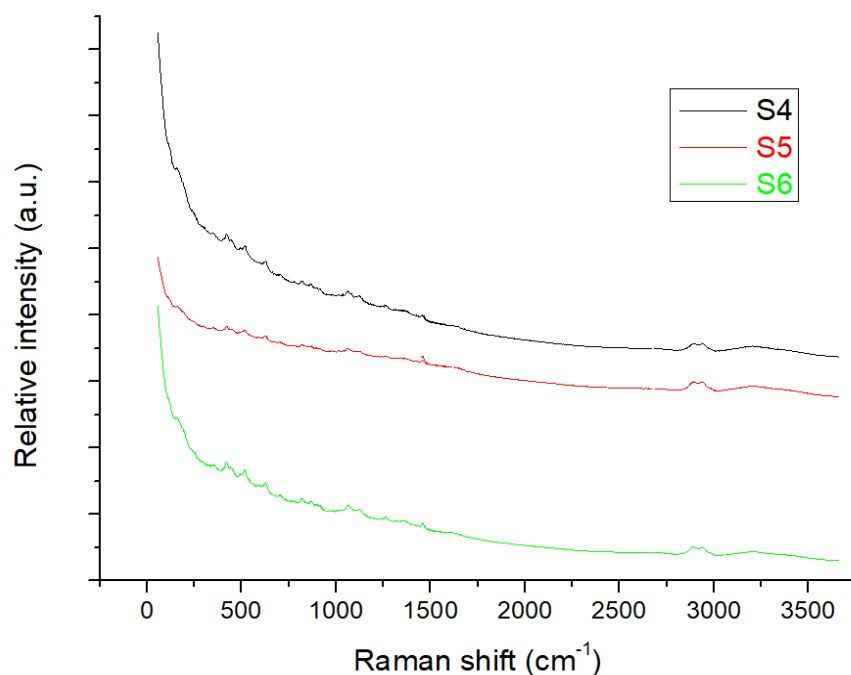


Από τα παραπάνω σχήματα παρατηρείται ότι και σε αυτά τα αμπέλια οι κορυφές των φασμάτων παρουσιάζονται μεγαλύτερες στα δείγματα (Σ8 και Σ9) που συλλέχθηκαν κατά την τελευταία ημερομηνία συλλογής τους, δηλαδή στις 18 Αυγούστου 2017.

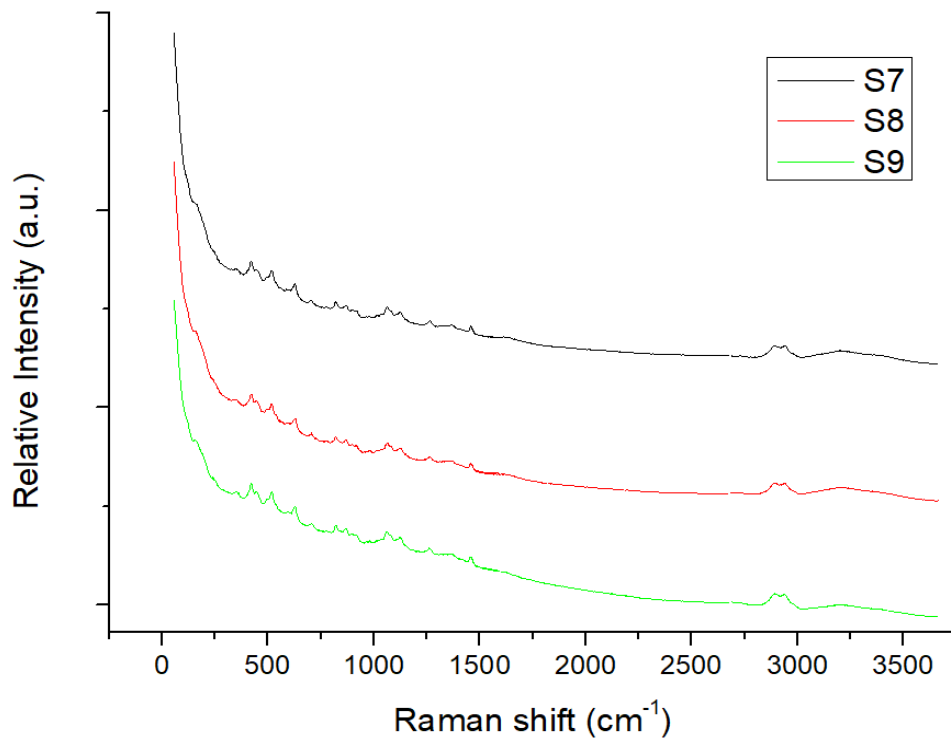
Η σύγκριση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε και μεταξύ των αμπελώνων σε κάθε ημερομηνία συλλογής, που φαίνεται στα Σχήματα 5.24, 5.25, 5.26.



**Σχήμα 5.24** Φάσματα Raman δειγμάτων Σ1, Σ2 και Σ3 από τους τρεις διαφορετικούς αμπελώνες με ημερομηνία δειγματοληψίας 8/8/2017

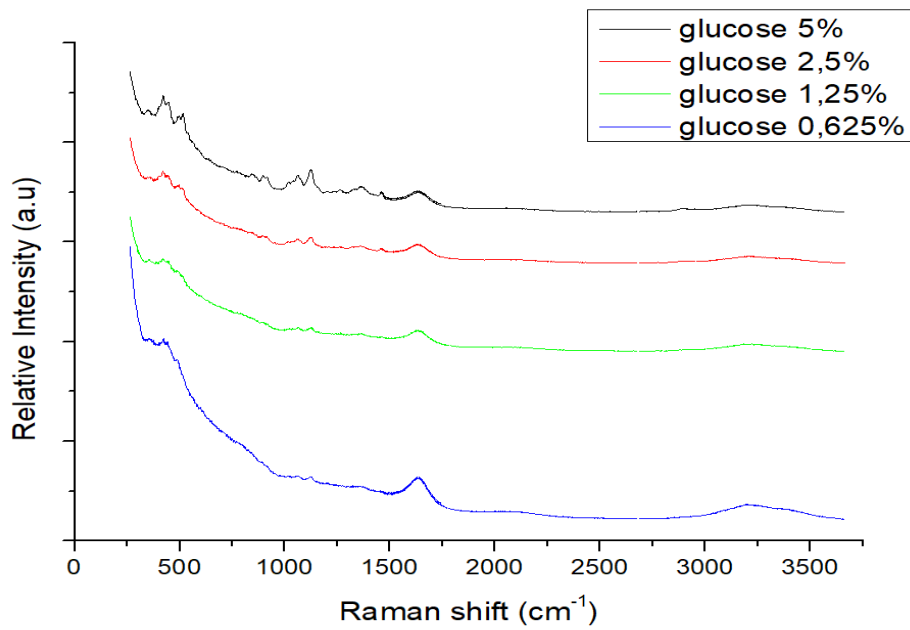


**Σχήμα 5.25:** Φάσματα Raman δειγμάτων Σ1, Σ2 και Σ3 από τους τρεις διαφορετικούς αμπελώνες με ημερομηνία δειγματοληψίας 13/8/2017

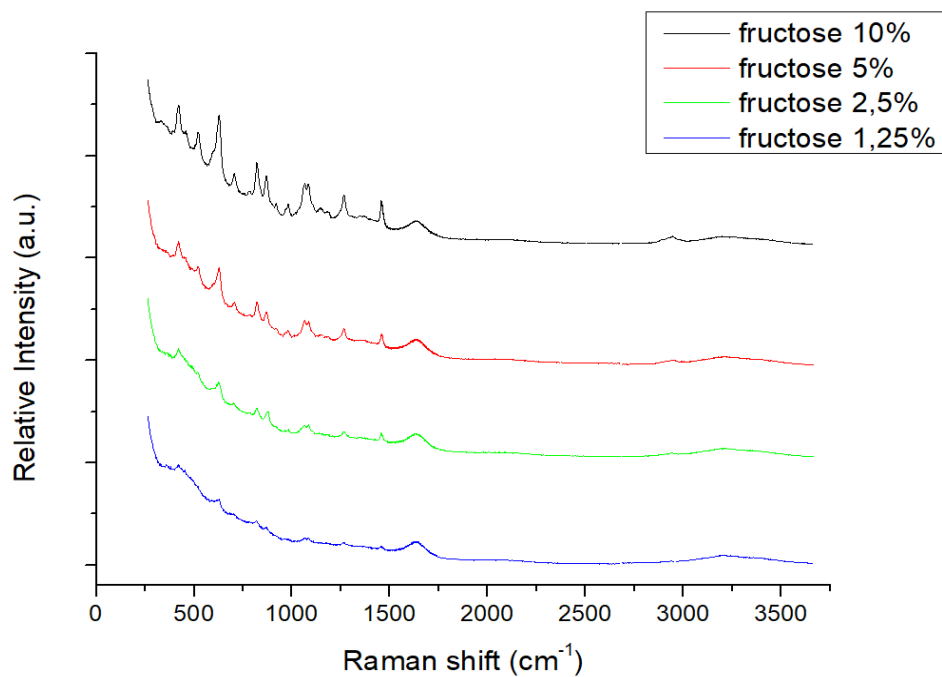


**Σχήμα 5.26:** Φάσματα Raman δειγμάτων Σ7, Σ8 και Σ9 από τους τρεις διαφορετικούς αμπελώνες με ημερομηνία δειγματοληψίας 18/8/2017

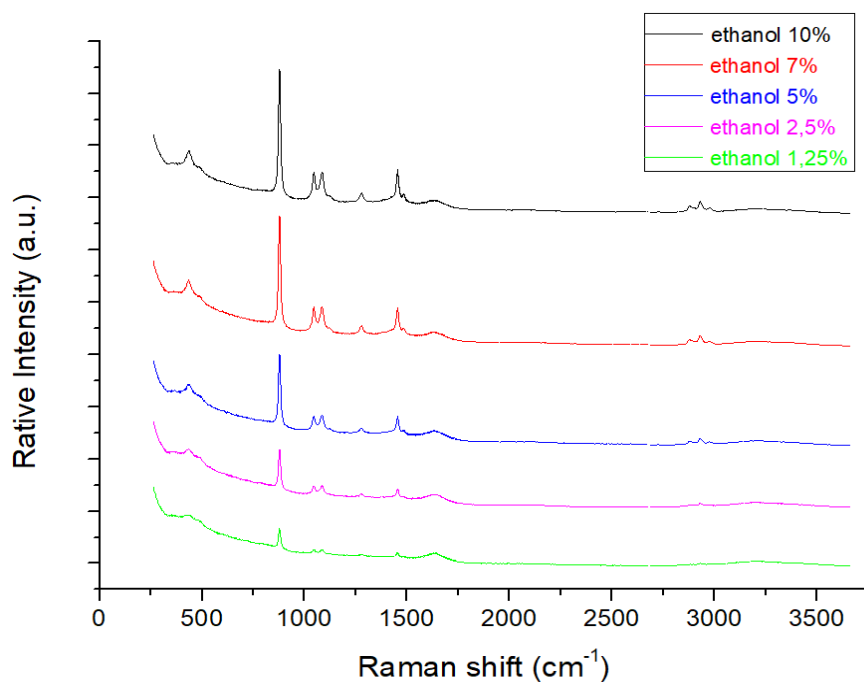
**5.2.3 Αποτελέσματα διαλυμάτων πρότυπων γλυκόζης, φρουκτόζης και αιθανόλης**  
 Για την επιβεβαίωση των υποθέσεων, δηλαδή ότι οι κορυφές των φασμάτων που παρατηρήθηκαν στα φάσματα των δειγμάτων γλεύκους και σταφυλιών, ότι αντιστοιχούν σε γλυκόζη, φρουκτόζη και αιθανόλη, έγιναν μετρήσεις πρότυπων ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις όπως παρουσιάζονται στα παρακάτω Σχήματα.



Σχήμα 5.27: Φάσματα Raman υδατικών διαλυμάτων γλυκόζης από 0.625 -1,25-2,5-5 % v/v

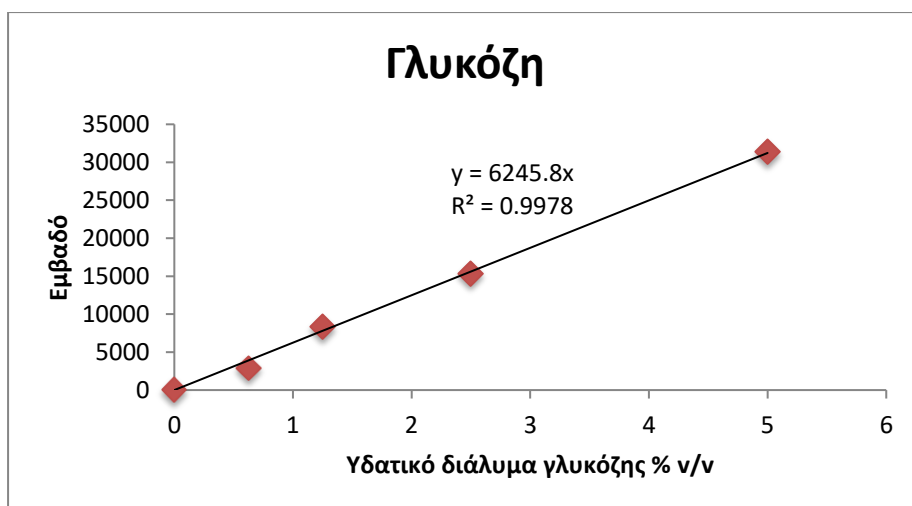


Σχήμα 5.28: Φάσματα Raman υδατικών διαλυμάτων φρουκτόζης 1.25-2,5-5-10 % v/v

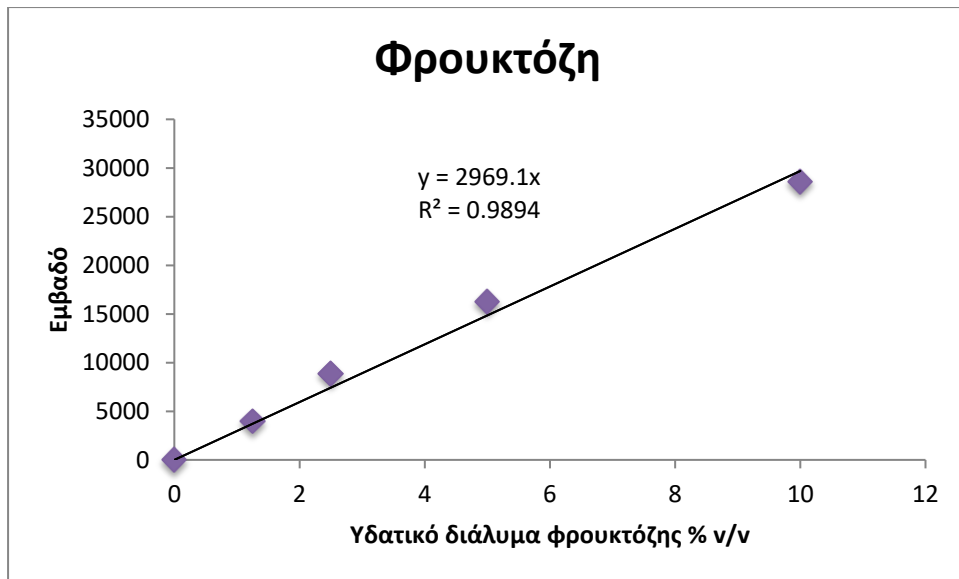


**Σχήμα 5.29:** Φάσματα Raman υδατικών διαλυμάτων αιθανόλης 1,25-2,5-5-10 % v/v

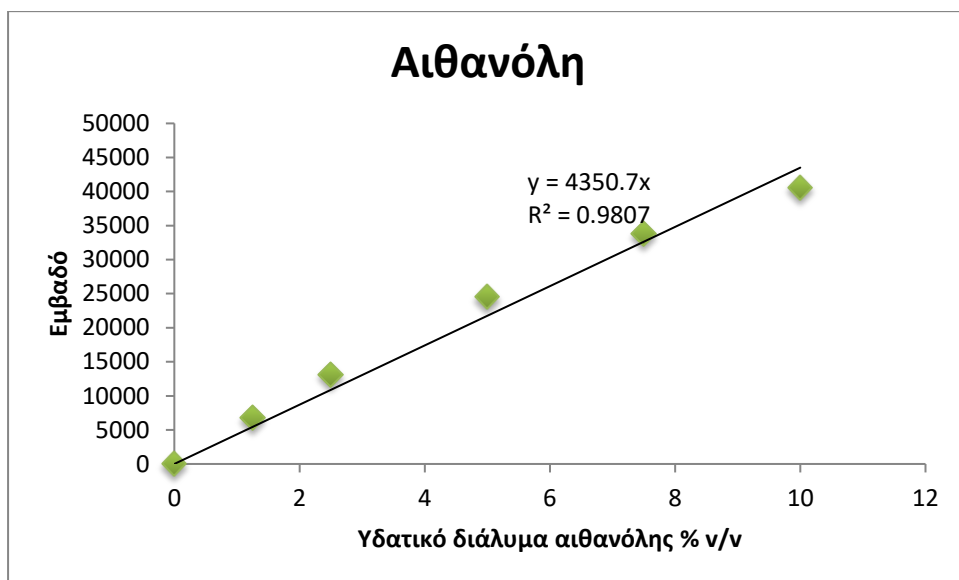
Έχοντας ως στόχο τον έλεγχο και την ημιποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε σάκχαρα και αλκοόλη, κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες για τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και την αιθανόλη. Για τη δημιουργία των καμπυλών αυτών έγινε εμβοδοποίηση των χαρακτηριστικών κορυφών των τριών προτύπων. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς που δημιουργήθηκαν βάσει χαρακτηριστικών κορυφών αιθανόλης, γλυκόζης και φρουκτόζης αντίστοιχα.



**Σχήμα 5.30** Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης μετά από παρασκευή υδατινών διαλυμάτων της 0.625 -1,25-2,5-5 % v/v



**Σχήμα 5.31:** Καμπύλη αναφοράς φρουκτόζης μετά από παρασκευή υδάτινων διαλυμάτων της 1.25–2,5-5-10 % v/v



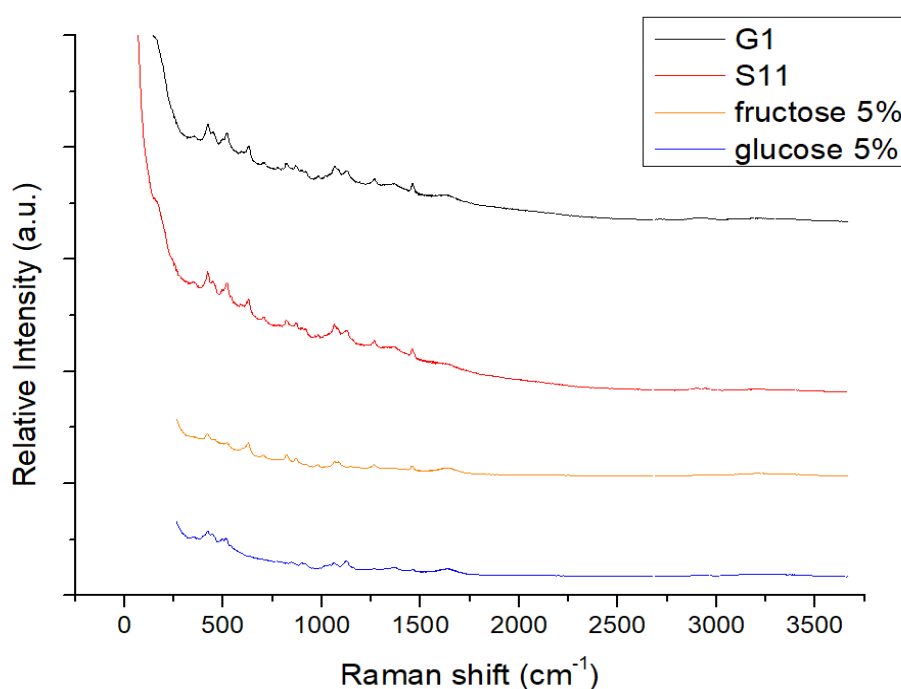
**Σχήμα 5.32:** Καμπύλη αναφοράς αιθανόλης μετά από παρασκευή υδάτινων διαλυμάτων της 1.25–2,5-5-10 % v/v

Από τα παραπάνω σχήματα παρατηρούνται αποκλίσεις σε κάποια δείγματα γλυκόζης και φρουκτόζης που πιθανόν να οφείλονται στο μικρό αριθμό διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς, ωστόσο θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για μια αρχική εκτίμηση της ποσότητας των σακχάρων στα δείγματα του γλεύκους και των σταφυλιών (ημιποσοτικοποίηση). Επιπλέον οι μεγαλύτερες αποκλίσεις, όπως αυτές που παρατηρούνται στην καμπύλη

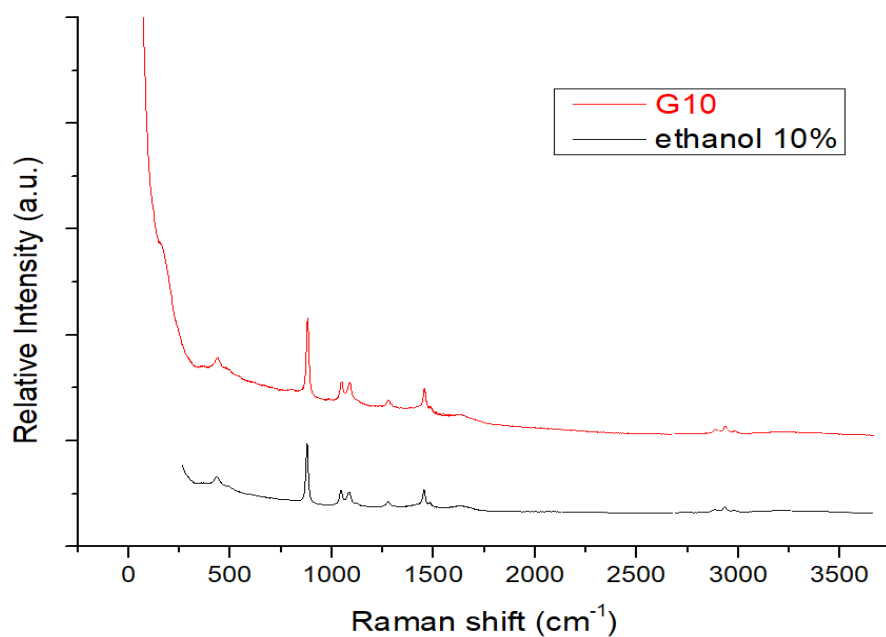
αναφοράς της αιθανόλης, πιθανότατα οφείλονται σε πειραματικό σφάλμα, για αυτό και δεν θεωρείται αξιόπιστη ούτε για εκτίμηση του αλκοολικού τίτλου των δειγμάτων.

Μέσω της εμβαδοποίησης των κορυφών παρατηρήθηκε ότι η αναλογία γλυκόζης - φρουκτόζης στο Γ1 είναι περίπου ίση με τη μονάδα και ότι κάθε μία από τις οποίες περιέχεται σε ποσότητα 80 - 90 g/L με συνολικό ποσοστό τους στο δείγμα περίπου 17 %. Όσον αφορά την αιθανόλη, εκτιμάται ότι το ποσοστό της στο δείγμα γλεύκους Γ10 είναι περίπου 11.5 %, αποτέλεσμα που προσεγγίζει πολύ κοντά στην πραγματική τιμή (12.1 %) που προέκυψε από τη μέτρηση του αλκοολικού τίτλου του δείγματος με αλκοολόμετρο μετά από απόσταξη στο οινοποιείο της Λήμνου. Κανονική ποσοτικοποίηση θα πραγματοποιηθεί μελλοντικά για την δημοσίευση της έρευνας.

Ακόμη, παρουσιάζονται συγκριτικά διαγράμματα φασμάτων των πρότυπων ενώσεων με φάσματα δειγμάτων γλεύκους και σταφυλιών, η παρατήρηση των οποίων οδήγησε στην εξαγωγή των ποιοτικών κυρίως αποτελεσμάτων που αναφέρθηκαν.



Σχήμα 5.33: Σύγκριση φασμάτων Γ1 (G1) - S11 (S11) με πρότυπα γλυκόζης και φρουκτόζης 5 %

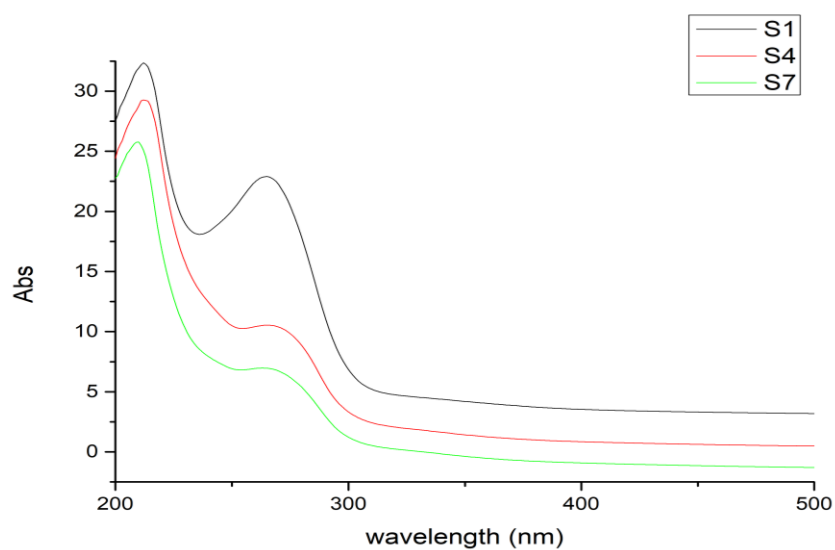


Σχήμα 5.34: Σύγκριση φασμάτων G10 με πρότυπο αιθανόλης 10 %

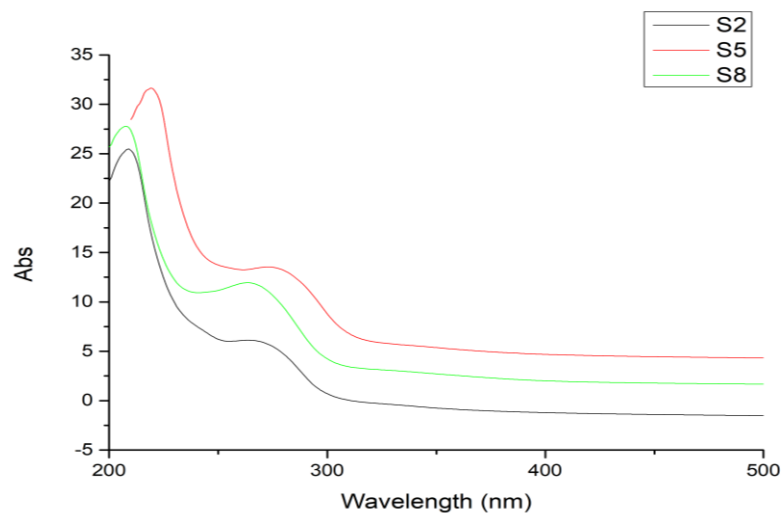
### 5.3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ – ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

#### 5.3.1 Αποτελέσματα δειγμάτων σταφυλιού

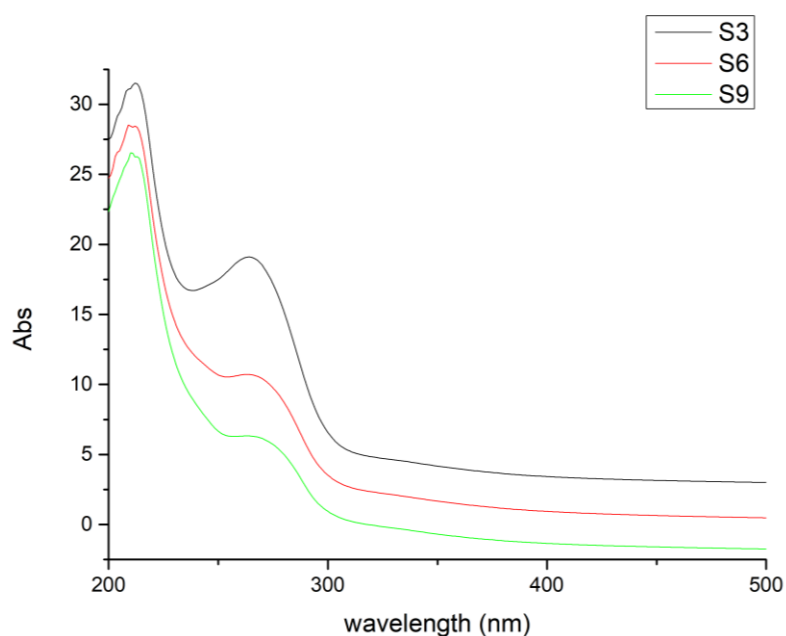
Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τα φάσματα UV-VIS των δειγμάτων για τους 3 αμπελώνες στις 3 διαφορετικές ημερομηνίες συγκομιδής. Τα δείγματα έχουν ονόματα που επεξηγούνται στον πίνακα 5.9.



Σχήμα 5.35: Φάσματα UV-Vis δειγμάτων σταφυλιού του αμπελώνα Μετόχα Παλιό



**Σχήμα 5.36:** Φάσματα δειγμάτων σταφυλιού του αμπελώνα Μετόχα πάνω

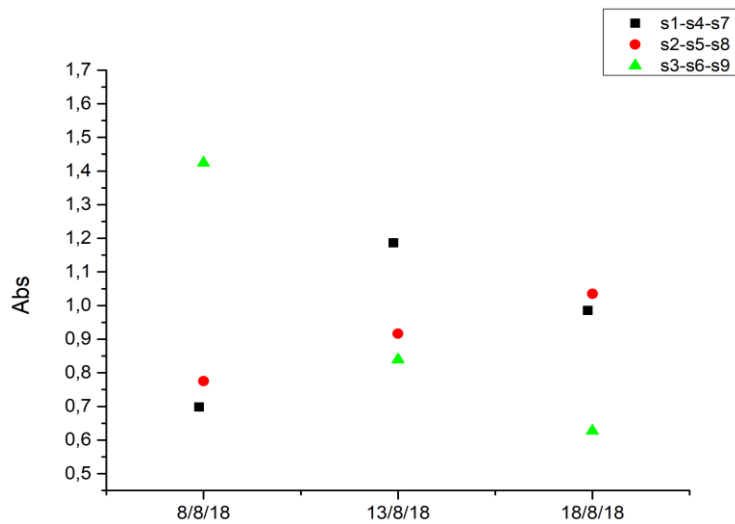


**Σχήμα 5.37:** Φάσματα δειγμάτων σταφυλιού του αμπελώνα Λαγοπάτι

Από τα σχήματα παραπάνω προκύπτει ότι η κορυφή οφείλεται σε κατηγορία ενώσεων και όχι σε κάποια ένωση μεμονωμένα. Με βάση τη βιβλιογραφία το προφίλ αυτό με μέγιστη απορρόφηση στα 264 nm δηλώνει την παρουσία υδροξικιναμμωνικών οξέων [94].

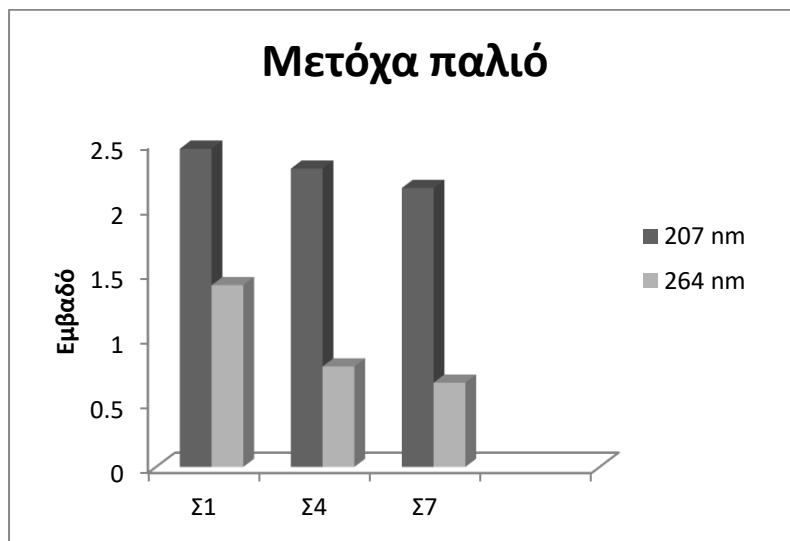
Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν και μετρήσεις φωτομετρίας στα 264 nm, που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



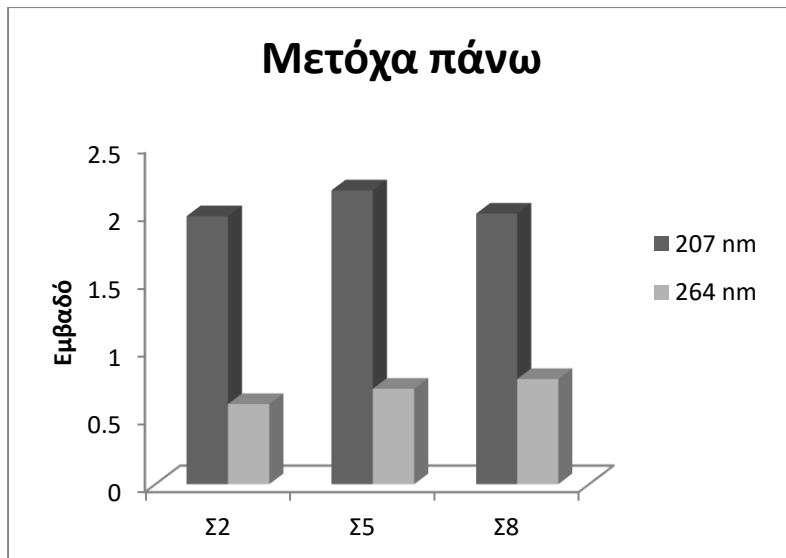


**Σχήμα 5.38:** Μετρήσεις φωτομετρίας ( $\lambda_{max} = 264 \text{ nm}$ ) δειγμάτων σταφυλιού

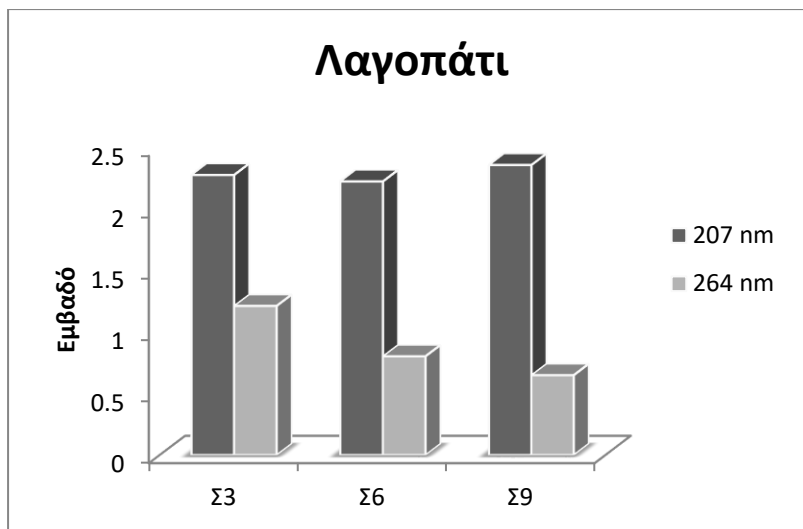
Εκτός από τις μετρήσεις φωτομετρίας που πραγματοποιήθηκαν, έγινε και εμβοδοποίηση των κορυφών των φασμάτων των δειγμάτων σταφυλιού, η οποία παρουσιάζεται στα ακόλουθα Σχήματα.



**Σχήμα 5.39** Εξέλιξη εμβασμού κορυφών αμπελιού Μετόχα παλιό στα 207 και 264 nm



Σχήμα 5.40: Εξέλιξη εμβαδού κορυφών αμπελιού Μετόχα πάνω στα 207 και 264 nm



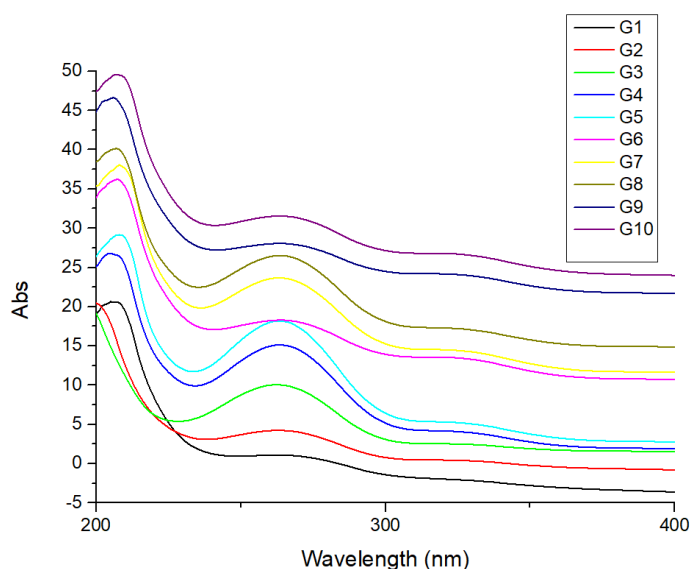
Σχήμα 5.41: Εξέλιξη εμβαδού κορυφών αμπελιού Λαγοπάτι στα 207 και 264 nm

Παρατηρείται ότι υπάρχει μία μικρή σταδιακή μείωση στα εμβαδά των κορυφών των 264 nm κυρίως για τα αμπέλια Μετόχα παλιό και Λαγοπάτι, η οποία με πιο αισθητή τη μείωση το αμπέλι Μετόχα παλιό στο οποίο υπάρχει και μείωση του εμβαδού της κορυφής των 207 nm. Από την άλλη πλευρά, στο αμπέλι μετόχα πάνω παρατηρείται μια μικρή αύξηση του εμβαδού της κορυφής των 264 nm.

Γενικά, η βασικότερη διαφορά μεταξύ των αμπελώνων Μετόχα παλιό και Λαγοπάτι με τον αμπελώνα Μετόχα πάνω είναι η ηλικία της αμπέλου (το αμπέλι Μετόχα πάνω, είναι ένα νεαρό σε ηλικία αμπέλι σε σύγκριση με τα άλλα δύο) και πιθανόν αυτό να επηρεάζει την ανάπτυξη κατηγοριών ενώσεων στα σταφύλια.

### 5.2.1 Αποτελέσματα δειγμάτων γλεύκους

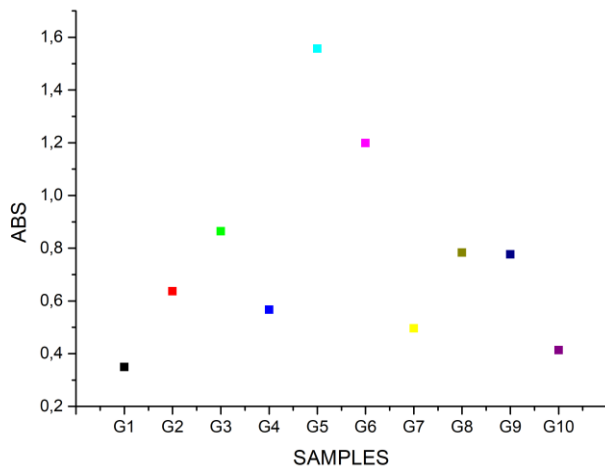
Στο Σχήμα 5.42 παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis που προέκυψαν από τη μέτρηση των 10 δειγμάτων γλεύκους αφού προηγήθηκε 20 φορές αραίωση των δειγμάτων και διέλευσή τους από φιλτράκια 0.22  $\mu\text{m}$ .



Σχήμα 5.42: Overlay διάγραμμα UV-Vis δειγμάτων γλεύκους

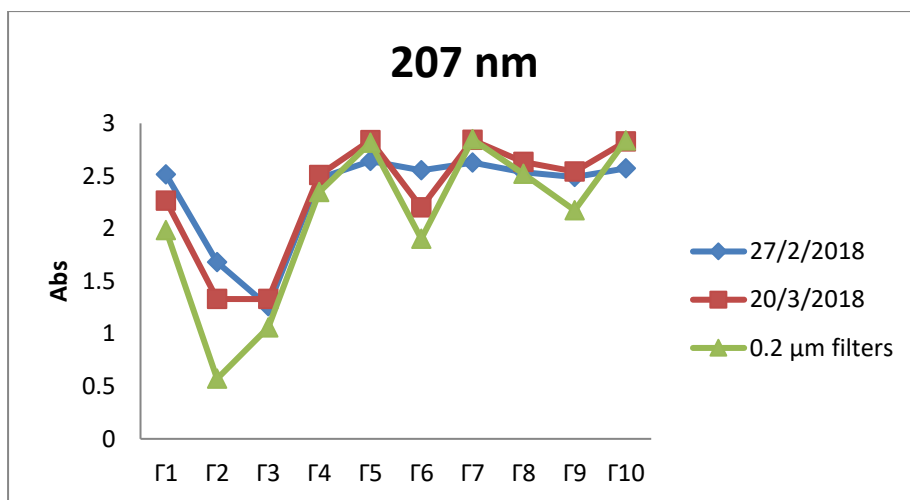
Από το διάγραμμα φαίνεται ότι δεν υπάρχει συγκεκριμένη αύξηση ή μείωση της απορρόφησης για τις κορυφές 207 nm και 264 nm που να δείχνει κάποια διαφοροποίηση συγκεκριμένη, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η απορρόφηση αυτή δίνεται όχι μόνο από μία ένωση, η οποία επηρεάζεται από την αλκοολική ζύμωση, αλλά από μια κατηγορία ενώσεων που στην προκειμένη περίπτωση φαίνεται να είναι τα υδρουκινναμωμικά και υδροξυβενζοϊκά οξέα [94], όπως παρατηρήθηκε και στα δείγματα σταφυλιών.

Πραγματοποιήθηκαν, επίσης, μετρήσεις φωτομετρίας, αφού βρέθηκαν από το φάσμα τα μέγιστα μήκη κύματος των δειγμάτων για την ένδειξη της απορρόφησης στο μήκος κύματος αυτό. Στο Σχήμα 5.43 παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των δειγμάτων στο  $\lambda_{\text{max}}$  (με κουκίδες).

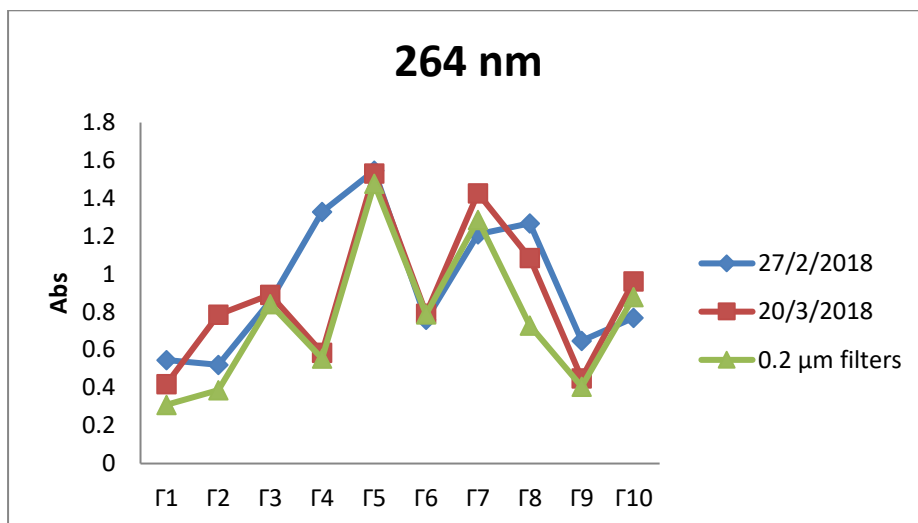


**Σχήμα 5.43:** Μετρήσεις φωτομετρίας με τις απορροφήσεις των δειγμάτων γλεύκους σε  $\lambda_{max} = 264 \text{ nm}$

Οι μετρήσεις των δειγμάτων γλεύκους με τη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού πραγματοποιήθηκαν 3 φορές και για την επιβεβαίωση της μη ύπαρξης σωματιδίων στα διαλύματα που να εμποδίζουν την ανάλυση, έγιναν μετρήσεις και μία φορά μετά από διέλευσή τους από φιλτράκια. Στα σχήματα παρακάτω παρουσιάζονται οι διαφορές στις απορροφήσεις που προέκυψαν σε κάθε περίπτωση στα 207 nm και 264 nm αντίστοιχα. Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Origin Pro 9.0.



**Σχήμα 5.44:** Συγκριτικό διάγραμμα απορροφήσεων ( $\lambda_{max} = 207 \text{ nm}$ ) για τις 3 μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν

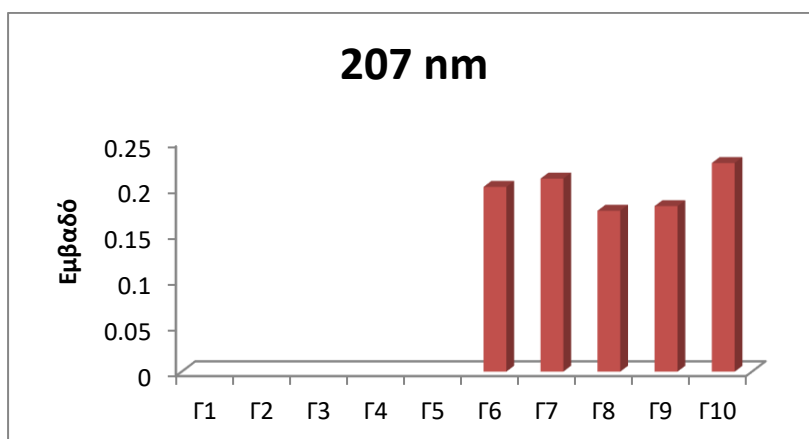


Σχήμα 5.45: Συγκριτικό διάγραμμα απορροφήσεων ( $\lambda_{max}=264\text{ nm}$ ) για τις 3 μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν

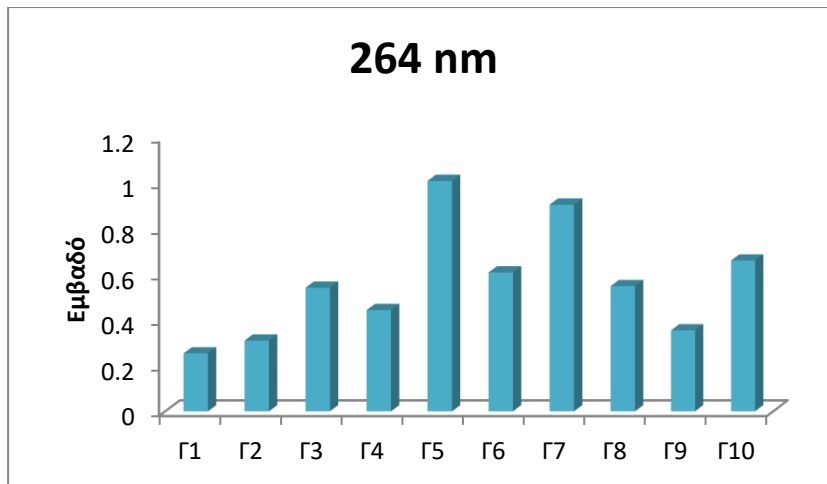
Από τα παραπάνω σχήματα παρατηρείται ότι με τη χρήση φίλτρων 0.2 μm προκύπτουν μικρότερες απορροφήσεις, που οφείλονται στα σωματίδια που πιθανόν υπήρχαν πριν το φιλτράρισμα και τα οποία προκαλούν σκέδαση και φαινομενική αύξηση της απορρόφησης. Επιπλέον αποκλίσεις μπορεί να οφείλονται είτε στη σκέδαση από σωματίδιο είτε σε σφάλμα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Ακόμη, μετρήθηκε και το εμβαδόν της κορυφής κάθε δείγματος. Έτσι, εμβαδοποιήθηκαν οι κορυφές που εμφανιζόνταν στα 207 nm και 264 nm.

Η κορυφή που εμφανίζεται στα 207 nm, δεν είναι ευδιάκριτη σε όλα τα δείγματα, γι' αυτό και η εμβαδοποίηση πραγματοποιήθηκε μόνο σε όσα δείγματα ήταν δυνατό.



Σχήμα 5.46 Εξέλιξη εμβαδού κορυφών δειγμάτων γλεύκους στα 207 nm



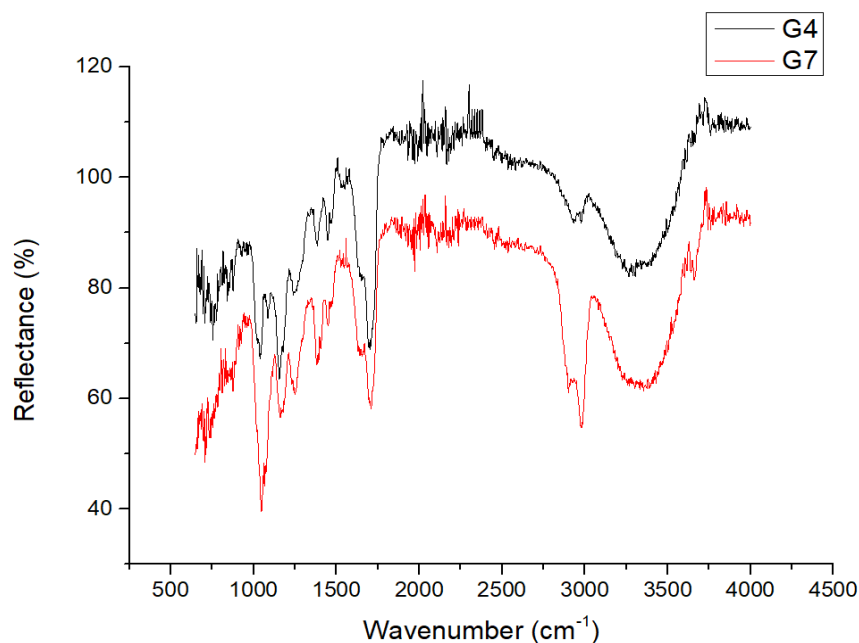
Σχήμα 5.47 Εξέλιξη εμβασού κορυφής των δειγμάτων γλεύκους στα 264 nm

Αν συγκριθούν αυτά τα δύο σχήματα παρατηρείται ότι, είτε η ανάλυση γίνει με εμβασοποίηση είτε με απορρόφηση από την φωτομετρία, προκύπτει το ίδιο μοτίβο εξέλιξης των κορυφών. Αυτό ενισχύει την περίπτωση της κατηγορίας ενώσεων και ελαχιστοποιεί το πειραματικό σφάλμα που θα μπορούσε να έχει συμβεί.

#### 5.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ATR-FT-IR

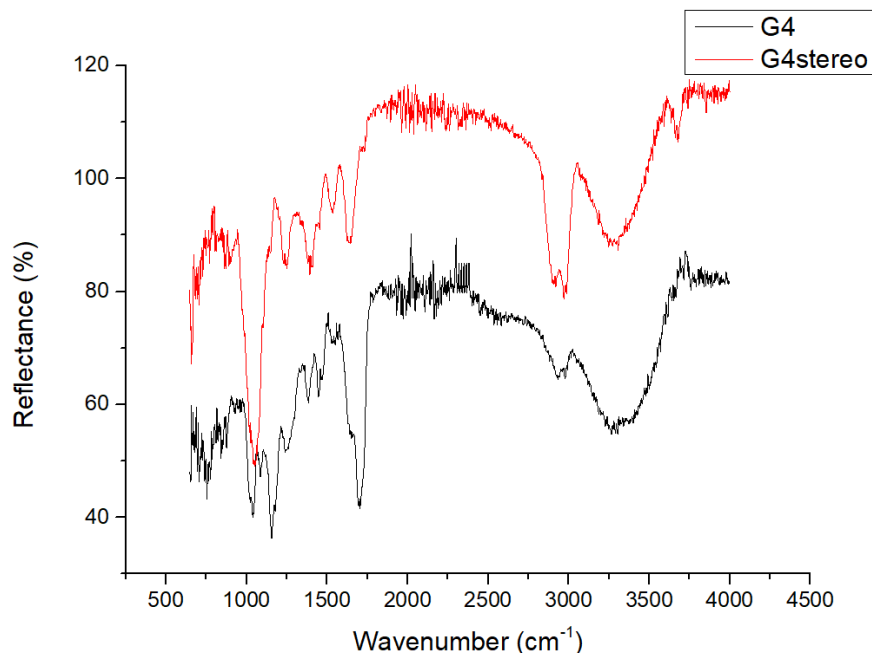
Η φασματοσκοπία υπερύθρου ATR-FT-IR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του ιζήματος των δειγμάτων γλεύκους μετά από την φυγοκέντρισή τους.

Στο Σχήμα 5.48 εμφανίζονται τα αποτελέσματα σύγκρισης των φασμάτων των δειγμάτων Γ4 και Γ7 σε υγρή μορφή, πριν την εξάτμιση του νερού με άζωτο.

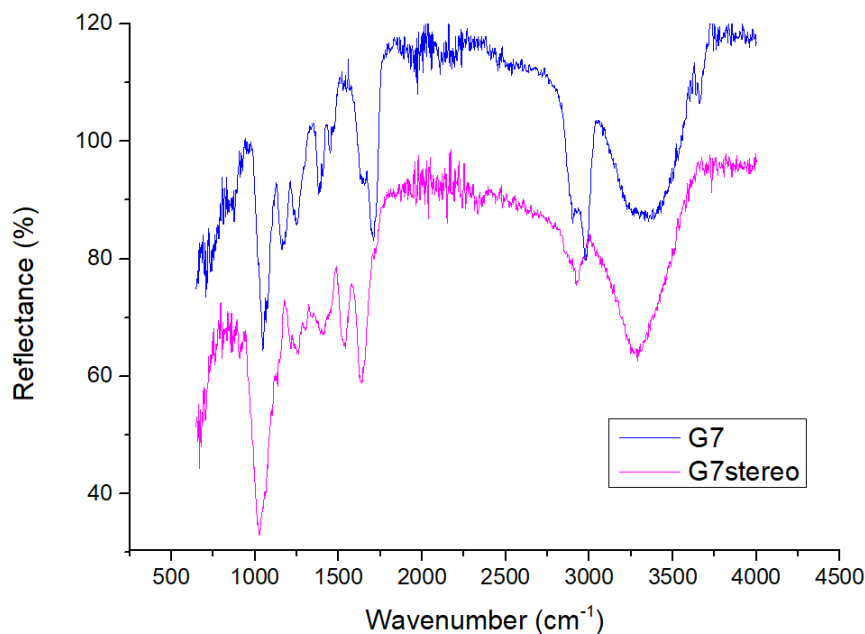


Σχήμα 5.48: Φάσματα υγρών δειγμάτων Γ4 και Γ7

Στα Σχήματα 5.49 και 5.50 συγκρίνονται τα φάσματα των ιζημάτων πριν και μετά την εξάτμιση του νερού με άζωτο για τα δείγματα Γ4 και Γ7 αντίστοιχα.



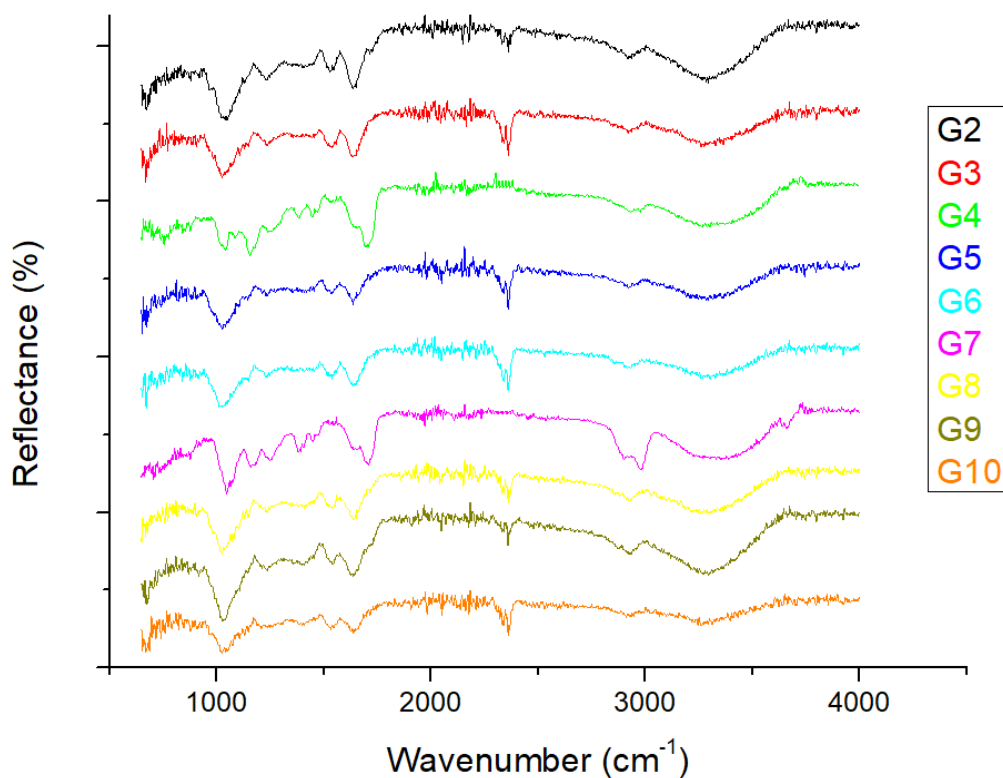
Σχήμα 5.49: Φάσματα υγρού και στερεού δείγματος Γ4



Σχήμα 5.50: Φάσματα υγρού και στερεού δείγματος Γ7

Από τα Σχήματα 5.49 και 5.50 παρατηρείται πως μετά την εξάτμιση του νερού, κάποιες κορυφές είναι πιο ευδιάκριτες και ίσως και μεγαλύτερες, και πιθανόν να επικαλύπτονταν από τις κορυφές που δημιουργούσε το νερό. Σύμφωνα με αυτά τα

αποτελέσματα, οι σαρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε στερεά δείγματα, μετά την εξάτμιση του νερού. Στο Σχήμα 5.51 παρουσιάζονται συνολικά όλα τα φάσματα των ιζημάτων εκτός από το δείγμα Γ1 για το οποίο δεν υπήρχε επαρκές δείγμα για ανάλυση.



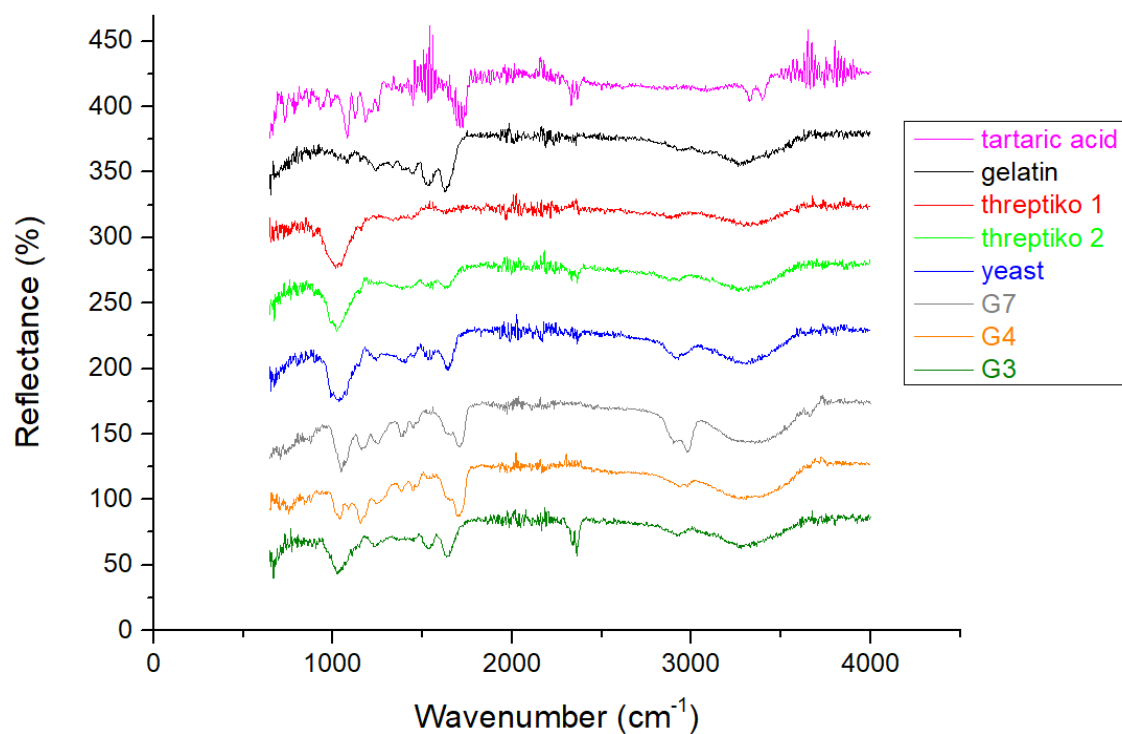
Σχήμα 5.51: Φάσματα FT-IR ιζήματος δειγμάτων γλεύκους

Παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα εμφανίζουν περίπου την ίδια μορφή, με διαφορετικό ύψος κορυφών (ένταση κορυφής). Συμπεραίνεται λοιπόν πως όλα τα ιζήματα οφείλονται στις ίδιες ενώσεις και πως τα φάσματά τους αντικατοπτρίζουν τις ποσότητές τους, οι οποίες διέφεραν σε καθένα από αυτά.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων είναι δύσκολη διαδικασία, καθώς οι κορυφές αντιστοιχούν σε χημικούς δεσμούς, οι οποίοι μπορεί να προέρχονται από πάρα πολλές ενώσεις.

Για την επιβεβαίωση των υποθέσεων πως το ίζημα οφείλεται στις ζύμες και τα θρεπτικά υλικά, έγιναν αναλύσεις πρότυπων ενώσεων που προστέθηκαν στο γλεύκος κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Στο Σχήμα 5.52 παρουσιάζεται το διάγραμμα των πρόσθετων με κάποια φάσματα δειγμάτων γλεύκους για τη σύγκρισή τους.





Σχήμα 5.52 Φάσματα FT-IR πρότυπων ενώσεων που προστίθενται στο γλεύκος κατά τη ζύμωση σε σύγκριση με δείγματα του γλεύκους

Από τη σύγκριση προκύπτει ότι όλες οι κορυφές προέρχονται από τη ζύμη, τα θρεπτικά και τη ζελατίνη. Με το τρυγικό οξύ δεν παρατηρείται αντιστοιχία. Στο πλαίσιο δημοσίευσης της ερευνητικής εργασίας θα γίνει προσπάθεια ποσοτικοποίησης των ενώσεων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ελληνικό κρασί έχει ιστορία και παράδοση χιλιετιών, παρόν που γρήγορα εξελίσσεται και μέλλον πολλά υποσχόμενο. Η παραγωγή ποιοτικού και αυθεντικού οίνου, καθώς και η συμμόρφωση σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία είναι ζητήματα που απασχολούν τους Έλληνες οινολόγους. Στο πλαίσιο αυτό, λοιπόν, τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για τη μελέτη και τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου με σύγχρονες και αξιόπιστες αναλυτικές μεθόδους.

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, που στόχος της ήταν η ανίχνευση και η μελέτη όσων το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών που απαντώνται σε σταφύλια και γλεύκος της ποικιλίας Μοσχάτου Αλεξανδρείας της νήσου Λήμνου και η παρακολούθηση των διαφοροποιήσεων των ενώσεων αφενός σε διαφορετικούς αμπελώνες και χρόνους ωρίμανσης των σταφυλιών και αφετέρου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης του γλεύκους. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν ως κύριες αναλυτικές τεχνικές η υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (LC-MS) και η φασματοσκοπία Raman με συμπληρωματικές τις φασματοσκοπίες υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και υπέρυθρου (ATR-FT-IR) και πραγματοποιήθηκε η ελάχιστη δυνατή προκατεργασία των δειγμάτων για να μη χαθεί πληροφορία.

Με υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας μελετήθηκε το μεταβολικό αποτύπωμα των συστατικών των δειγμάτων γλεύκους κάθε μέρας της αλκοολικής ζύμωσης όσο και των σταφυλιών που συλλέχθηκαν από διαφορετικούς αμπελώνες της Λήμνου σε διαφορετικές χρονικές περιόδους συλλογής. Με τη μέθοδο αυτή και με πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα σταφυλιών είχαν την τάση να διαχωριστούν ανάλογα με τον αμπελώνα που καλλιεργήθηκαν, γεγονός που δείχνει πως ακόμη και στο ίδιο νησί, παρουσιάζονται εδαφικές διαφορές από παράγοντες όπως η διαφορά στο υψόμετρο, η ηλικία του αμπελώνα κτλ που επηρεάζουν και την καλλιέργεια και άρα τη σύσταση των σταφυλιών. Οι μεταβολίτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για τον διαχωρισμό αυτό ήταν ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες κυρίως των αμινοξέων, οργανικών οξέων, πολυαμινών, γ-λακταμων και φλαβονολών.

Επίσης, διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε και στα δείγματα σταφυλιών που είχαν συλλεχθεί διαφορετικές χρονικές περιόδους, άρα βρίσκονταν σε διαφορετικά επίπεδα

ωρίμανσης, γεγονός που δηλώνει ότι τα συστατικά του σταφυλιού συνεχώς εξελίσσονται από μέρα σε μέρα κατά την ωρίμανσή τους. Αυτό καθιστά τον καθορισμό της εποχής του τρυγητού κρίσιμο σημείο για την ποιότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αραγόμενου οίνου. Οι μεταβολίτες που θεωρήθηκαν υπεύθυνοι για αυτόν τον διαχωρισμό και ταυτοποιήθηκαν ήταν κυρίως κυρίως αμινοξέα, βιογενείς αμίνες, λιπαρά οξέα, σάκχαρα, οργανικά οξέα, φλαβονόλες. Και στις δύο περιπτώσεις μελετήθηκε η εξέλιξη των χρωματογραφικών κορυφών των υπεύθυνων μεταβολιτών και καταγράφηκε η πορεία τους.

Επιπλέον, ταυτοποίηση των πιθανών μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε και στα δείγματα γλεύκους αλκοολικής ζύμωσης, οι οποίοι συνολικά ήταν 26 και ανήκαν στις κατηγορίες των αμινοξέων, των αλκοολών, των οργανικών οξέων, των φαινολικών οξέων, των φλαβονολών και των ανθοκυανών. Οι ενώσεις αυτές είναι υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου και κυρίως της γεύσης. Ύστερα, μελετήθηκε η εξέλιξη των κορυφών που παρουσιάζονταν στα χρωματογραφήματα του γλεύκους και προέκυψε πως κάθε μεταβολίτης επηρεαζόταν με διαφορετικό τρόπο με την πρόοδο της αλκοολικής ζύμωσης, αφού το εμβαδόν κάποιων κορυφών άρα και η συγκέντρωσή τους αυξομειωνόταν, άλλων ελαττωνόταν αισθητά και έφτανε να υπάρχουν ως και ίχνη, ενώ άλλων αυξανόταν σημαντικά. Οι περισσότερες κορυφές που παρατηρήθηκαν είχαν αρκετά μικρές εντάσεις και με την ταυτοποίηση κάποιων από αυτές των ενώσεων, συμπεραίνεται ότι πολλές από τις ενώσεις αυτές, βρίσκονταν στο φλοιό των σταφυλιών, οι οποίοι αφαιρούνται από τα πρώτα στάδια της λευκής οινοποίησης άρα είναι αναμενόμενο η παρουσία τους στα χρωματογραφήματα να είναι μικρή.

Στα χρωματογραφήματα της LC-MS εμφανίστηκαν κάποιες μεγάλες κορυφές σε αρκετά μικρό χρόνο έκλουσης (περίπου 1 min), μία από τις οποίες αποδόθηκε στη γλυκόζη. Η LC-MS μέθοδος που εφαρμόστηκε δεν είναι, ωστόσο, η καταλληλότερη για τον προσδιορισμό των σακχάρων, αφού αυτά δεν συγκρατώνται από τη στήλη στη συγκεκριμένη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, γι' αυτό και η μελέτη τους πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία Raman. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τα σταφύλια, προέκυψε ότι η εξέλιξη των σακχάρων δεν είναι η ίδια στους τρεις αμπελώνες που μελετήθηκαν, ωστόσο φάνηκε να φτάνουν σε ίδια περιεκτικότητα στα δείγματα των τριών αμπελώνων στην τελευταία ημερομηνία συγκομιδής τους, η οποία ήταν και πιο κοντά χρονικά με τον τρυγητό. Όσον αφορά

τα δείγματα του γλεύκους, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των σακχάρων στο πρώτο το δείγμα (Γ1) της αλκοολικής ζύμωσης και της αιθανόλης στο τελευταίο (Γ10). Το δείγμα Γ1 παρουσίασε αναλογία γλυκόζης - φρουκτόζης περίπου 1:1 και συνολική περιεκτικότητα των σακχάρων στο δείγμα περίπου 170 g/L, ενώ στο δείγμα Γ10 εκτιμήθηκε αιθανόλη 11.5 % v/v. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τις πραγματικές τιμές που έχουν μετρηθεί στο οινοποιείο της Λήμνου (210 g/L συνολικών σακχάρων και αλκοολικός τίτλος 12.1 % v/v) με άλλες τεχνικές. Φαίνεται πως με βελτιστοποίηση της μεθόδου, η φασματοσκοπία Raman μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο στην οινοποιητική διαδικασία και στον καθορισμό της έναρξης του τρυγητού με τον γρήγορο προσδιορισμό των σακχάρων και της αλκοόλης, κάτι που μπορεί να είναι εφικτό και μέσα στα επόμενα χρόνια, καθώς κυκλοφορούν ήδη στην αγορά φορητές συσκευές Raman που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτό.

Επίπρόσθετα, η ύπαρξη υδροξυκιναμωμικών οξέων στα δείγματα ανιχνεύθηκε με τη φασματοσκοπία UV-Vis. Τα δείγματα εμφάνισαν απορρόφηση περίπου στα 265 nm, χαρακτηριστική κορυφή για τα υδροξυκιναμωμικά οξέα. Από την αυξομείωση τόσο της απορρόφησης όσο και του εμβαδού της κορυφής προκύπτει ότι η καμπύλη που εμφανίστηκε δεν οφείλεται σε μία μόνο ένωση αλλά σε μια κατηγορία ενώσεων. Τέλος, συμπληρωματικά έγινε χρήση της φασματοσκοπίας ATR-FT-IR για τη μελέτη των ιζημάτων που προέκυψαν κατά την προκατεργασία των δειγμάτων του γλεύκους με φυγοκέντριση. Από τα φάσματα που προέκυψαν, εκτιμήθηκε ότι οι κορυφές οφείλονται σε ζύμες και πρόσθετα του γλεύκους, γεγονός που επιβεβαιώθηκε ποιοτικά μετά από ανάλυση πρότυπων ζυμών και άλλων προσθέτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη ζύμωση του γλεύκους από το οποίο προέκυψαν τα δείγματα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Φούρναρης Π., Κρασί: Από την αρχαία Ελλάδα μέχρι σήμερα, 1η έκδ., Toubi's, Αθήνα, 2008
- [2] <http://www.tmth.gr/sciencerelated/64-arxaia-elliniki-technology/404-ampelourgia-kai-paraskevi-oinou> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [3] Ζαρμπούτης, Ι., Τσιβεριώτου, Μ., Στοιχεία αμπελουργίας και οινολογίας. 1η έκδ. Εκδόσεις Ίων Αθήνα 2003.
- [4] Εγκυκλοπαίδεια του κρασιού, μετάφρ. Ταμπακοπούλου Χ, Κοκκωνίδης Μ., Φ. 1η έκδ. Οξύ Αθήνα 2009
- [5] <http://www.limnoswines.gr> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [6] <http://greekwinefederation.gr> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [7] Τσακίρης, Α., Οινολογία, έρευνα και εφαρμογές Εκδόσεις Ψύχαλου Αθήνα 2005
- [8] Σουφλερός Ε., Οινολογία. Επιστήμη και τεχνογνωσία, Εκδόσεις Σουφλερός, Θεσσαλονίκη, 1997, Τόμος ΙΙ.
- [9] <http://www.greekwineinsider.com> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [10] Αλεξιάκης Α., Το κρασί και η παραγωγή του, Εκδόσεις Σιδερή, Αθήνα 2000.
- [11] <http://www.minagric.gr> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [12] Σκουρλή Α., Νομοθεσία Ελληνικών Οίνων Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π) Περιφέρεια Δυτικής Ελλάδος – Ιόνιων Νήσων, Επισήμανση – Παρουσίαση – Κριτική Αξιολόγηση Ετικετών, Αθήνα 2014
- [13] Τσακίρης, Α., Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί, 8η εκδ Εκδόσεις Ψύχαλου. Αθήνα 2017.
- [14] Τσελέπος Α., Μελέτη της Εξέλιξης των Φαινολικών Συστατικών του Κρασιού κατά την Οινοποίηση και την Αποθήκευση σε Τροποποιημένη Ατμόσφαιρα, Αθήνα , 2015
- [15] Souquet J.M., Labarbe B., Le Guernevé C., Cheynier V. and Moutounet M., J. Agric. Food Chem., 2000, **48** (4), 1076–1080
- [16] Σουφλερός, Ε., Οίνος και Αποστάγματα, Εκδόσεις Σουφλερός Θεσσαλονίκη 2000
- [17] Καρβέλας Ε., Διαφάνειες παρουσίασης 2010
- [18] Ρούσσης Ι., Διαφάνειες Παραδόσεων Οινολογίας, Ιωάννινα, 2015-2016

- [19] J. Marais S. Afr. J. Enol. Vitic., 1983, 4 (2)
- [20] <https://www.awri.com.au> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [21] <http://waterhouse.ucdavis.edu> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [22] K.M. Sumbly, Food Chemistry, 2010, **12**, 1-16
- [23] M. Mathlouthi, Food Chemistry, 1984, Food Chemistry, **13** (1), 1-16
- [24] S. Foley, Free Radical Biology & Medicine, 1999, **26**, 1202–1208
- [25] M.A. Rodriguez-Delgado, Gonzalez-Hernandez G., Conde-Gonzalez J.E. and Perez-Trujillo J.P., Food Chemistry, 2002, **78**, 523-532
- [26] Κουράκου – Δραγώνα, Σ., Θέματα Οινολογίας. Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα 1998
- [27] Βέκιος, Γ., Κούκης, Δ., Τσακίρης, Α., Το Βιβλίο Του Κρασιού, Β' Έκδ. Εκδόσεις Ψύχαλου, Αθήνα 1997
- [28] Cubero-Leon, E., Penalver, R. and Maquet, A. Food Research International 2014 **60** 95-107
- [29] Wishart D. S., Bioanalysis, 2009, **1** (9), 1579–1596
- [30] Cevallos-Cevallos, J.M. , Reyes-De-Corcuera, I.J., Etxeberria, E., Danyluk, D.M. and Rodrick, E.G., Trends in Food Science & Technology, 2009, **20**, 557-566
- [31] H. G. Gika, G. A. Theodoridis, R. S. Plumb and I. D. Wilson, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, **87**, 12– 25
- [32] H.S.Son, K. M. Kim, Frans van den Berg, G.S. Hwang, W.M. Park, C.H. Lee and Y.S. Hong, J. Agric. Food Chem., 2008, **56** (17), 8007–8016
- [33] Roullier-Gall C., M.Witting, D.Tziotis, A.Ruf, R.D.Gougeon and P.Schmitt-Kopplin Tetrahedron, 2015, **71**, 2983–2990
- [34] E. Vaudour, E. Costantini, G.V. Jones, and S. Mocali, SOIL, 2015, **1** (1), 287-312
- [35] P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud, Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications, 2nd Ed., John Wiley and Sons Ltd, 2006
- [36] Alanon, M.E., Perez-Coelo, M.S and Marina, M.L. Trends in Analytical Chemistry, 2016, **74**,1–20
- [37] M.Katajamaa, M. Orešič, Journal of Chromatography A, 2007, **1158** (1–2), 318-328

- [38] Ali K., Maltese F., Toepfer R., Choi Y.H. and Verpoorte R., *J Biomol NMR*, 2011, **49**, 255–266
- [39] Amaral F. and Caro S.B.M., *Food Chemistry*, 2005, **93**, 507–510
- [40] S. Prakash, N. Iturmendi, A. Grelard, V. Moine and E. Dufourc, *Food Chemistry*, 2016, **199**, 229–237
- [41] E. Lopez-Rituerto, F. Savorani, A. Avenozza, J. H. Busto, J. M. Peregrina and S.B. Engelsen, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 3452–3461
- [42] Barnaba C., Dellacassa E., Nicolini G., Nardin T., Malacarne M. and Larcher R., *Journal of Chromatography A*, 2015, **1423**, 124–135
- [43] Barnaba C., Dellacassa E., Nicolini G., Nardin T., Malacarne M. and Larcher R., *Food Chemistry*, 2016, **206**, 260–266
- [44] Arbulu M., Sampedro M.C., Gomez-Caballero A. and Barrio R.J., *Analytica Chimica Acta*, 2015, **858**, 32–41
- [45] Jaitz L., Siegl K., Eder R., Rak G., Abranko L., Koellensperger G. and Hann S., *Food Chemistry*, 2010, **122**, 366–372
- [46] Pantelic M.M., Dabic- Zagorac C.D., Davidovic M.S., Todic R.S., Bešlic S.Z., Gašić M.U., Tešić Lj.Z. and Natic M.M., *Food Chemistry*, 2016, **211**, 243–252
- [47] Arapitsas P., Della Corte A., Gika H., Narduzzi L., Mattivi F. and Theodoridis G., *Food Chemistry*, 2016, **197**, 1331-1340
- [48] Zhu J., Goodall D. and Wren S., *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*, LCGC London, 2005, pp. 54-72
- [49] Παπαδοπούλου Ε. και Πατσιάς Ι., *Χρωματογραφία και Εργαστηριακές Τεχνικές*, Εκδόσεις Μέθεξις, Αθήνα 2009
- [50] Παπαδογιάννης Ν.Ι., Σαμανίδου Φ.Β, *Ενόργανη χημική ανάλυση*, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2001
- [51] Χατζιωάννου Θ.Π., *Ενόργανη ανάλυση*, Εκδόσεις Μαυρομάτη, Αθήνα 2014
- [52] Skoog H.N., Holler F.J. and Crouch S.R., *Αρχές ενόργανης ανάλυσης*, 6η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη 2000, σελ. 816-837
- [53] Λιοδάκης Σ., *Αναλυτική Χημεία*, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα 2001
- [54] Θεοδωρίδης Γ., *Φασματομετρία Μαζών σε Ειδικές και Διαχωριστικές Μεθόδους Ανάλυσης*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 2005
- [55] [www.ionizationpandai.blogspot.com](http://www.ionizationpandai.blogspot.com) (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)

- [56] [www.cheng.auth.gr](http://www.cheng.auth.gr) (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [57] Eliuk S. and Makarov A., *Ann Rev Anal Chem* 2015 **8** 61-80
- [58] D. Garcia, M. Reichenbacher and K. Danzer, *J. High Resol. Chromatogr.*, 1998, **21**, 373–377
- [59] S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo and M. A. Coimbra, *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, 5142-5151
- [60] J.J. Rodríguez-Bencomo, J.E. Conde, M.A. Rodríguez-Delgado, F. García-Montelongo and J.P. Pérez-Trujillo, *Journal of Chromatography A*, 2002, **963**, 213–223
- [61] J. Torrens, M. Riu-Aumatell, E. López-Tamames and S. Buxaderas, *Journal of Chromatographic Science*, 2004, **42**
- [62] Perestrelo R., Barros S.A., Rocha M.S, Camara S.J., *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 3186–3204
- [63] Perestrelo R., Barros S.A., Rocha M.S, Camara S.J., *Talanta* 2011 **85** 1483-1493
- [64] C.G. Forde, A. Cox, E.R. Williams, and P.K. Boss, *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 2573–2583
- [65] A.C. Pereira, M.S. Reis, P.M. Saraiva and J.C. Marques, *Analytica Chimica Acta*, 2010, **660**, 8–21
- [66] E.G. Garcia-Carpintero, E.Sánchez-Palomo, M.A.G. Gallego, M.A. and Gonzalez-Vipas, *Food Chemistry*, 2012, **131**, 90–98
- [67] V.P. Jofre, M.V. Assof, M.L. Fanzone, H.C. Goicoechea, L.D. Martvnez and M.F. Silva, *Analytica Chimica Acta*, 2010, **683**, 126–135
- [68] Sánchez-Palomo E., Trujillo M., García Ruiz A. and González-Viñas, M.A, *Food Research International*, 2017, **100** Part 1, 201-208
- [69] T.Rodríguez-Cabo, I.Rodríguez, M.Ramil, A. Silva and R.Cela, *Journal of Chromatography A*, 2016, **1442**, 107-117
- [70] Yadav, L.D.S., *Organic spectroscopy*, Springer Science and Business Media Dordrecht 2005, p.7, 43, 107, 108
- [71] Meyers R.A., *Applications, Theory and Instrumentation*, Encyclopedia of analytical chemistry, Wiley 2000, pp. 4024-4026
- [72] <https://ir.thermofisher.com> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)
- [73] Παλούρα Ε.Κ., *Οπτοηλεκτρονική, Σημειώσεις μαθήματος του ΠΜΣ «Φυσική και Τεχνολογία Υλικών»*, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 2016



- [74] Ιωάννου Π. Χ., Προχωρημένη Αναλυτική Χημεία, Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Μαθήματος Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Ε.Κ.Π.Α., Αθήνα 2015
- [75] Cozzolino, D., *J Sci. Food Agric.*, 2015, **95**, 861–868
- [76] Gallego A.L., Guesalaga A.G., Bordeu E. and González A.S., *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 2014, **60** (2)
- [77] Martin C., Bruneel J.L., Guyon F., Médina B., Jourdes M., Teissedre P.L. and Guillaume F., *Food Chemistry*, 2015, **181**, 235-240
- [78] Harris D.C., Ποσοτική Χημική Ανάλυση, (Ν. Χανιωτάκης, Μ. Φουσκάκη, Κ. Περδικάκη, Β. Βαμβάκη, Μ. Χατζημαρινάκη, Μεταφρ.), Ηράκλειο Κρήτης 2009
- [79] Ντουρτόγλου, Β., Χατζηλαζάρου, Α. και Ντορτόγλου, Ε., Σημειώσεις ανοικτού ακαδημαϊκού μαθήματος "Σύγχρονες Μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης", ΤΕΙ Αθήνας 2018
- [80] Teixeira dos Santos C.A., Pascoa R. N.M.J. and Lopes J.A., *Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **88**, 100-118
- [81] Θεοφανίδης, Θ., Αναστασοπούλου, Ι., Φασματοσκοπία Δονήσεων-Συμμετρία, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 1997
- [82] Όξενκιουν-Πετροπούλου, Μ., Φασματομετρικές Μέθοδοι, 3η Έκδ., Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα 2012
- [83] Khan J.I., Kennedy T.J. and Christian, *Basic principles of forensic chemistry*, Springer Science and Business Media LLC 2012 p. 111, 127-132
- [84] Χειλάκου, Ε., Η εφαρμογή των Φασματοσκοπικών και Μη Καταστρεπτικών Μεθόδων στον χαρακτηρισμό, τον έλεγχο της φθοράς και τη συντήρηση-αποκατάσταση ιστορικών έργων, Διδακτορική Διατριβή στον Τομέα Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών της Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα 2011
- [85] Κουή, Μ., Μέθοδοι και Τεχνικές Ανάλυσης και Χαρακτηρισμού των Υλικών, Ε.Μ.Π., Αθήνα 2005
- [86] Chitarrini C., Soini E., Riccadonna S., Franceschi P., Zulini L., Masuero D., Vecchione A., Stefanini M., Di Gaspero G., Mattivi F. and Vrhovsek U., *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**, 1524
- [87] Wang Y., Catana F., Yang Y., Roderick R. and Van Breemen R., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 431-435
- [88] Sprenger S., Hirn S., Dietrich H. and Will F., (2015), *Eur Food Res Technol.*, 2015, **241**, 785–791

[89] Αρβανιτίδης, Ι., Μελέτη της επίδρασης υψηλών πιέσεων στις οπτικές ιδιότητες των φουλερενίων και των παραγώγων τους, Διδακτορική διατριβή Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη 2001

[90] <https://massbank.eu> (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)

[91] [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com) (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)

[92] [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca) (τελευταία επίσκεψη Σεπτέμβριος 2018)

[93] G.Theodoridis, H.Gika, P.Franceschi, L. Caputi, P.Arapitsas, M.Scholz, D. Masuero, R.Werens, U.Vrhovsek and F.Mattivi, *Metabolomics*, 2012, **8**, 175-185

[94] R. Sanna C.Piras F.C. Marincola, V.Lecca, S.Maurichi and P. Scano (2014), *Journal of Agricultural Science*, 2014, **6** (12)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **Ανάλυση Δειγμάτων Σταφυλιού και Γλεύκους Ποικιλίας Μοσχάτου Αλεξανδρείας με LC-MS και Φασματοσκοπία Raman**

Το κρασί είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ποτά που καταναλώνεται παγκοσμίως οπότε είναι εύκολα αντιληπτό πόσο σημαντικό είναι ο προσδιορισμός των ενώσεων στο σταφύλι και στο γλεύκος που επηρεάζουν την ποιότητα των οίνων και στον έλεγχο της εξέλιξης αυτών με σκοπό την παραγωγή οίνων υψηλών προδιαγραφών και αρίστης ποιότητας. Οι διάφορες υπηρεσίες απαιτούν βελτιωμένες μεθόδους για να επιβεβαιώσουν την συμμόρφωση με τις προδιαγραφές της ετικέτας, της αυθεντικότητας του κρασιού και τις απαιτήσεις ασφαλείας. Με αυτό κατά νου, έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι ανάλυσης τα τελευταία χρόνια για να εξασφαλιστεί η αυθεντικότητα του οίνου, αλλά και να βελτιωθούν οι διαδικασίες και τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την οινοποίηση και έχουν εφαρμοστεί ποικίλες αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των ενώσεων σε κρασί και σταφύλια. Η εφαρμογή σύγχρονων αναλυτικών φασματοσκοπικών τεχνικών για τον προσδιορισμό ενώσεων σε σταφύλια, γλεύκος και κρασί συνεχίζουν να αποτελούν, ωστόσο, πρόκληση.

Σε αυτή την εργασία, δημιουργήθηκε και μελετήθηκε το προφίλ των ενώσεων σε σταφύλια και γλεύκος. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν δείγματα σταφυλιών ποικιλίας Μοσχάτο Αλεξανδρείας και δείγματα γλεύκους από κάθε μέρα τη αλκοολικής ζύμωσης με μη στοχευμένη μεταβολομική μέθοδο LC-HRMS και φασματοσκοπία Raman. Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να ληφθεί το συνολικό προφίλ των μεταβολιτών που είναι παρόντες στα δείγματα, να ταυτοποιηθούν και να παρακολουθηθεί η διαφοροποίησή τους ανάλογα με τον αμπελώνα, την περίοδο ωρίμανσης, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια τη αλκοολικής ζύμωσης.

Τα σταφύλια συλλέχθηκαν από τρία διαφορετικά αμπέλια από το νησί της Λήμνου, ενώ τα δείγματα γλεύκους ευγενικά παραχωρήθηκαν από το οινοποιείο του Αγροτικού Συνεταιρισμού της Λήμνου «η ΛΗΜΝΟΣ». Εφαρμόστηκε μία UPLC μέθοδος, χρησιμοποιώντας στήλη UPLC C18 σε σύζευξη με ένα υβρίδιο Ion Trap-Orbitrap αναλυτή μάζας με θετική ESI πολικότητα. Ταυτοποιήθηκαν αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες (φαινόλες, αμινοξέα, ανθοκυάνες) και καταγράφηκε οι χρωματογραφικές κορυφές τους σε όλα τα δείγματα. Η πολυπαραγοντική ανάλυση

που εφαρμόστηκε αποκάλυψε ότι υπάρχει τάση διάκρισης των δειγμάτων ανάλογα με την τοποθεσία καλλιέργειάς ή την περίοδο ωρίμανσής τους.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία Raman για να διερευνηθούν οι δυνατότητες αυτής της τεχνικής στην ανάλυση δειγμάτων κρασιού. Η εγγύς υπέρυθρη γραμμή λέιζερ στα 785 nm, από τα διαθέσιμα μήκη κύματος στα 515, 633 και 785 nm, θεωρήθηκε η πιο κατάλληλη στην περίπτωση μας για την διέγερση του φάσματος Raman. Τα σήματα που προέκυψαν δήλωναν ειδικά «δακτυλικά αποτυπώματα» σακχάρων (συγκεκριμένα φρουκτόζης και γλυκόζης). Χρησιμοποιώντας πρότυπες ενώσεις μελετήθηκε η πορεία μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη και πραγματοποιήθηκε ημιταυτοποίηση αυτών των ενώσεων (φρουκτόζης, γλυκόζης, αιθανόλης).

Ακόμη, έγινε ανάλυση όλων των δειγμάτων με φασματοσκοπία υπεριώδου-ορατού για να αποκτήσουμε μια πιο πλήρη φασματοσκοπική εικόνα των δειγμάτων και τέλος τα ιζήματα που προέκυψαν μετά από φυγοκέντριση των δειγμάτων γλεύκους αναλύθηκαν με φασματοσκοπία υπέρυθρου (ATR-FT-IR) για να ερευνησουμε τη σύστασή τους.

**Λέξεις-κλειδιά:** κρασί, μεταβολικό προφίλ, UPLC-HRMS, φασματοσκοπία RAMAN

**Λίβα Κωνσταντίνα**

## **ABSTRACT**

### **Analysis of Muscat of Alexandria Grapes and Grape Must by LC-MS and Raman Spectroscopy**

Wine is one of the most popular beverages in the world. Different analytical techniques have been developed for the determination of several constituents in wine samples and grapes. Regulatory agencies are demanding improved methods to ensure compliance with labelling, safety requirements and wine authenticity. In that frame, robust analytical methods have been developed in recent years to enable wines' authenticity, but also to improve the winemaking process and technology. The application of modern analytical spectroscopic techniques on the determination of constituents of grapes, must and wine, continue to present tremendous challenges. In this study, the profiling of grapes and must constituents was performed. In particular, grapes from Muscat of Alexandria variety, as well as grape must sampled at different days of alcoholic fermentation were analysed by an untargeted LC-HRMS profiling method and Raman spectroscopy. The aim of this work was to obtain a comprehensive profile of the metabolites present in the samples, to identify them and monitor their differentiation among vineyards, grape ripening periods and throughout the alcoholic fermentation period.

Grapes were collected from three vineyards from Lemnos island, Greece, while the grape must samples were kindly donated by the winery of the Agriculture Cooperative of Lemnos. An UHPLC method, utilizing an UPLC C18 column, in hyphenation with Ion Trap-Orbitrap hybrid mass spectrometer in positive ESI mode was performed. Several secondary metabolites were identified (phenols, stilbenes, amino acids) and their peak area was monitored in all samples. Multivariate analysis was performed to reveal trends in the samples in relation to sampling location or ripeness.

Furthermore, Raman spectroscopy was utilized to investigate its potential in wine analysis. The near infrared laser line at 785 nm, from the available wavelengths at 515, 633 and 785 nm, was best suited for excitation of the Raman spectra in our case. The resulting signals indicated specific fingerprints of sugars (fructose and glucose in particular), ethanol and water. Using standard compounds, the conversion of sugars to ethanol was monitored and a semi-quantification of these compounds was performed.

An analysis was, also, carried out by ultraviolet visible (UV-VIS) spectroscopy to obtain a full spectroscopic view of the samples

Lastly, the sediments which emerged after the centrifugation of the grape must samples were analyzed by ultraviolet spectroscopy (ATR-FT-IR) to investigate their components.

**Keywords:** wine, profiling, UHPLC-HRMS, Raman spectroscopy

**Liva Konstantina**

«Το έργο συγχρηματοδοτείται στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και Εθνικούς πόρους»

«The project is co-financed within Op. Education by the ESF (European Social Fund) and National Resources»

