



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ &
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ποσοτικός προσδιορισμός ελλαγικών τανινών σε
ελληνικούς οίνους με την τεχνική της φασματοσκοπίας
του μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)
και χημειομετρικές μεθόδους**

Βασιλική Κ. Λυμπέρη

Επιβλέπων: Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2016



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ &
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Βασιλική Κ. Λυμπέρη

**Ποσοτικός προσδιορισμός ελλαγικών τανινών σε
ελληνικούς οίνους με την τεχνική της φασματοσκοπίας
του μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)
και χημειομετρικές μεθόδους**

Επιβλέπων: Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ποσοτικός προσδιορισμός ελλαγικών τανινών σε ελληνικούς οίνους με την τεχνική της φασματοσκοπίας του μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και χημειομετρικές μεθόδους

Βασιλική Κ. Λυμπέρη

Επιβλέπων: Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α

Πέτρος Ταραντίλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Σταματίνα Καλλίθρακα, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οίνος παρουσιάζει μια ιδιαίτερα πολύπλοκη σύσταση που καθορίζεται από ποικίλους παράγοντες. Για τα κόκκινα κρασιά ένας πολύ σημαντικός παράγοντας διαμόρφωσης του οργανοληπτικού τους προφίλ είναι η ωρίμανση σε δρύινα βαρέλια ή σε αδρανή δοχεία με προσθήκη κυρίως δρύινων ρινισμάτων.

Το είδος της δρυός, ο τρόπος ψησίματος και ο χρόνος παραμονής του κρασιού στα δρύινα βαρέλια επηρεάζουν το χημικό προφίλ του οίνου. Συγκεκριμένα οι ελλαγιικές τανίνες, ουσίες που εκχυλίζονται από το βαρέλι στο κρασί, εξαρτώνται από τους παραπάνω παράγοντες.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εξετάζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός ελλαγιικών τανινών με την τεχνική της φασματοσκοπίας του μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και χημειομετρικές μεθόδους. Αρχικά, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις ελλαγιικών τανινών σε πενήντα ελληνικούς οίνους με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Στη συνέχεια λαμβάνονται τα φάσματα του μεσο-υπέρυθρου και συνδυάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα με αυτά του HPLC με χρήση της στατιστικής μεθόδου PLS (στατιστικό πακέτο TQ Analyst). Τελικώς γίνεται αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθόδου.

Τα προτερήματα της νέας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των ελλαγιικών τανινών στους οίνους είναι η ταχύτητα και το χαμηλό οικονομικό κόστος ενώ είναι εξίσου αξιόπιστη με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ελλαγιικές τανίνες · Παλαίωση · Ερυθρός οίνος · FT-IR · PLS

ABSTRACT

Quantitative identification of ellagitannins in greek wines with the technique of mid infrared spectroscopy with Fourier (FT-IR) transformation and chemometric methods.

Wine has a very complex composition determined by various factors. Especially for red wines the maturing in oak barrels or in inert containers with added, mainly oak shavings, is a very important factor shaping their organoleptic profile. The type of oak, the method of cooking and wine residence time in oak barrels affect the chemical profile of wine. Ellagitannins are substances that depend on the above factors since they are extracted from the barrel to the wine.

In this study we examined the quantitative identification of ellagitannins in greek wines with the technique of mid infrared spectroscopy with Fourier (FT-IR) transformation and chemometric method. Initially, the concentration of ellagitannins was identified in fifty Greek wines using the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). Then all the spectra of the medium infrared were combined with those of HPLC using a statistical PLS method (TQ Analyst statistical package).

The new method which quantifies the ellagitannins in wines is as reliable as the conventional methods of analysis with the extra advantages of speed and low cost.

KEYWORDS: Ellagitannins · Ageing process · Red wine · FT-IR · PLS

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κ. δρ. Χρήστο Παππά για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον και τον χρόνο που διέθεσε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Ταραντίλη Πέτρο και την επίκουρο καθηγήτρια Καλλίθρακα Σταματίνα για τη πολύτιμη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω ευχαριστίες προς τους καθηγητές, προσωπικό, συμφοιτητές και λοιπούς που με βοήθησαν με τον τρόπο τους κατά τη διάρκεια του προγράμματος.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε με κάθε τρόπο σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Βασιλική Κ. Λυμπέρη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|-----------------------|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 10 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΤΑΝΙΝΕΣ

| | |
|---|----|
| 1.1.1 Γενικά | 11 |
| 1.1.2 Οι τανίνες στον οίνο | 11 |
| 1.1.3 Ο ρόλος των τανινών στον οίνο | 12 |
| 1.1.4 Ταξινόμηση τανινών | 13 |
| 1.1.5 Συμπυκνωμένες τανίνες | 13 |
| 1.1.6 Υδρολύμενες τανίνες | 14 |

1.2 ΕΛΛΑΓΙΚΕΣ ΤΑΝΙΝΕΣ

| | |
|---|----|
| 1.2.1 Στερεοχημεία και Διαμόρφωση ελλαγικών τανινών | 15 |
| 1.2.2 Χημικές ιδιότητες ελλαγικών τανινών | 17 |
| 1.2.3 Μονομερείς ελλαγικές τανίνες | 17 |
| 1.2.4 Ολιγομερείς ελλαγικές τανίνες | 18 |
| 1.2.5 Βεσκαλαγίνη - Κασταλαγίνη | 19 |
| 1.2.6 Γραντινίνη - Ρομπουρίνη - Ακουτισιμίνη Α | 21 |

1.3 ΕΛΛΑΓΙΚΕΣ ΤΑΝΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΠΑΛΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

| | |
|---|----|
| 1.3.1 Ελλαγικές τανίνες στη βαρελοποιία | 23 |
| 1.3.2 Εναλλακτικά προϊόντα-chips | 23 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.3.3 | Ελλαγικές τανίνες ξύλου καστανιάς | 24 |
| 1.3.4 | Ελλαγικές τανίνες ξύλου δρυός | 24 |
| 1.3.5 | Η επίδραση του είδους δρυός στις ελλαγικές τανίνες | 26 |
| 1.3.6 | Η επίδραση της επεξεργασίας ξύλου δρυός στις ελλαγικές τανίνες | 27 |
| 1.3.7 | Ο ρόλος των ελλαγικών τανινών στον οίνο | 29 |
| 1.3.8 | Βιολογική δράση ελλαγικών τανινών | 31 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2⁰ – ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΛΑΓΙΚΩΝ ΤΑΝΙΝΩΝ

2.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC)

| | | |
|-------|-------------------------------------|----|
| 2.1.1 | Θεωρία | 34 |
| 2.1.2 | Οργανολογία - Λειτουργία HPLC | 35 |

2.2 ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR)

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2.1 | Βασικές Αρχές | 38 |
| 2.2.2 | Οργανολογία φασματοφωτομέτρου FT-IR | 39 |
| 2.2.3 | Λειτουργία φασματοφωτομέτρου FT-IR | 41 |
| 2.2.4 | Μετασχηματισμός Fourier | 43 |
| 2.2.5 | Χαρακτηριστικοί παράμετροι της φασματοσκοπίας FT-IR | 44 |
| 2.2.6 | Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR | 46 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3⁰ – ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PLS)

| | | |
|-------|----------------------|----|
| 3.1.1 | Γενικά | 48 |
| 3.1.2 | Το μοντέλο PLS | 49 |

| | |
|--|----|
| 3.1.3 Η γεωμετρική ερμηνεία του μοντέλου PLS | 51 |
| 3.1.4 Αλγόριθμοι PLS | 51 |
| 3.1.5 Αλγόριθμος NIPALS | 52 |
| 3.1.6 Η επαναληπτική διαδικασία PRESS | 53 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

| | |
|------------------------------------|----|
| 4.1.1 Σκοπός της μελέτης | 55 |
| 4.1.2 Οργανόγραμμα μελέτης | 55 |
| 4.1.3 Πρώτες ύλες - Δείγματα | 57 |

4.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ HPLC

| | |
|---|----|
| 4.2.1 Εξάτμιση - Συμπύκνωση | 59 |
| 4.2.2 Όξινη υδρόλυση | 59 |
| 4.2.3 Ανάλυση δειγμάτων οίνου με HPLC | 59 |
| 4.2.4 Βαθμονόμηση HPLC | 60 |
| 4.2.5 Μετρήσεις HPLC | 61 |

4.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΙΝΟΥ ΜΕ FT-IR

| | |
|---|----|
| 4.3.1 Ξήρανση δειγμάτων οίνου | 63 |
| 4.3.2 Καταγραφή και επεξεργασία των FT-IR φασμάτων των δειγμάτων | 63 |
| 4.3.3 Μετρήσεις FT-IR | 64 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ - TQ ANALYST

| | |
|--|----|
| 5.1.1 Εισαγωγή στοιχείων για στατιστική επεξεργασία στο TQ Analyst | 68 |
|--|----|

| | |
|---|-----------|
| 5.1.2 Εφαρμογή μοντέλου PLS στα πειραματικά δεδομένα στο TQ Analyst .. | 69 |
| 5.1.3 Κριτήρια επιλογής βέλτιστου μοντέλου | 72 |
| 5.1.4 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης – Συζήτηση | 74 |
| 5.1.5 Συμπέρασμα | 83 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| ΕΠΙΛΟΓΟΣ | 85 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 86 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 89 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κρασί είναι ένα ιδιαίτερα δημοφιλές ποτό που συνοδεύει ιδανικά τις περισσότερες τροφές είτε είναι απλές είτε σύνθετες. Το κρασί οργανοληπτικά καθορίζεται από την ποικιλία του σταφυλιού από το οποίο προέρχεται αλλά και από τους παράγοντες υπέδαφος, κλιματικές συνθήκες, χρονική στιγμή ωρίμανσης του σταφυλιού, καλλιεργητικές φροντίδες, μέθοδος οινοποίησης, εμφιάλωση και παλαιότητα.

Αξιοσημείωτο είναι ότι ο τρόπος παραγωγής του κρασιού σε παλαιότερες εποχές δεν διέφερε ουσιαστικά από τις σύγχρονες πρακτικές. Έτσι, αρχικά γίνεται μεταφορά του σταφυλιού στο εκραγιστήριο όπου εκτελείται η γλευκοποίηση, δηλαδή η έκθλιψη του μούστου καθώς και η αποβοστρύχωση (αφαίρεση κοτσανιών). Στη συνέχεια, σε δεξαμενές ζύμωσης εξελίσσεται η αλκοολική ζύμωση. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του γλεύκους από το κρασί στο πιεστήριο. Το κρασί επανατοποθετείται σε δεξαμενές για να ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση και να ακολουθήσει η μηλογαλακτική. Τέλος, επιτελείται το στάδιο της παλαίωσης που είναι κυρίως για τα κόκκινα κρασιά.

Παλαίωση ορίζεται ο χρόνος που περνάει το κρασί στη φιάλη μέχρι να καταναλωθεί. Η παλαίωση είναι σημαντικός παράγοντας για την βελτίωση της ποιότητας του κρασιού. Η υφή, η γεύση, το άρωμα και το χρώμα του κρασιού αλλάζουν με την πάροδο του χρόνου. Αυτό οφείλεται σε χημικές αντιδράσεις και ζυμώσεις που αφορούν σάκχαρα, οξέα και άλλα συστατικά όπως τανίνες.

Το κόκκινο κρασί αποκτά χρώμα από τις χρωστικές ουσίες που βρίσκονται στη φλούδα του σταφυλιού και μεταφέρθηκαν κατά την αλκοολική ζύμωση στο μούστο. Οι χρωστικές ουσίες είναι οι φαινολικές ενώσεις ανθοκυάνες (κόκκινο χρώμα) και τανίνες (κίτρινο χρώμα). Κατά την ωρίμανση οι ανθοκυάνες αποσυντίθενται και πέφτουν ως ίζημα ή ενώνονται με τις τανίνες.

Πολύ καθοριστικό είναι το πέρασμα ή η παραμονή του κόκκινου κρασιού σε δρύινο βαρέλι. Η είσοδος του οξυγόνου από τους πόρους του βαρελιού καθώς και η εκχύλιση ουσιών όπως τανινών που αλληλεπιδρούν με το κρασί διαμορφώνουν τελικά το μπουκέτο της παλαίωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΤΑΝΙΝΕΣ

1.1.1 Γενικά

Οι τανίνες είναι τα προϊόντα πολυμερισμού απλών φαινολών. Οι τανίνες επιτυγχάνουν να παράγουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και άλλα φυτικά πολυμερή όπως πολυσακχαρίτες.

Η διαμόρφωση των τανινών επηρεάζει σημαντικά τη δραστικότητά τους. Πιο συγκεκριμένα, για να συνδεθούν σταθερά οι τανίνες με τις πρωτεΐνες πρέπει να είναι ογκώδεις αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό, διότι θα είναι πολύ μακριά από τις ενεργές θέσεις των πρωτεϊνών. Τα μοριακά βάρη των ενεργών τανινών κυμαίνονται από 600 έως 3500 Dalton.

Οι τανίνες απαντώνται στο φυτικό βασίλειο όπως για παράδειγμα καφές, τσάι (κυρίως το πράσινο), κακάο, γλυκόριζα, αγκινάρες, λωτοί, φράουλες, καρύδια, φιστίκια, αμύγδαλα, κάστανα, φασόλια, ξύλο βελανιδιάς, σταφύλια.

1.1.2 Οι τανίνες στον οίνο

Οι τανίνες είναι ένα από τα κύρια συστατικά του οίνου. Υπάρχουν οι ενδογενής τανίνες δηλαδή όσες βρίσκονται φυσικά στο κρασί από τα συστατικά του σταφυλιού (φλοιός, σπόρος, βόστρυχες, σάρκα σταφυλιού) καθώς και οι τανίνες (π.χ. ελλαγιτανίνες) που εκχυλίζονται στο κρασί από τα βαρέλια (συνήθως δρύινα) κατά τη διάρκεια της παλαίωσης.

Από την ποσότητα των τανινών που περιέχονται στα σταφύλια (μέχρι 65% στα γίγαρτα, 22% στους βόστρυχες, 12% στους φλοιούς και 1% στη σάρκα) ελάχιστο ποσοστό μεταφέρεται στους οίνους. Στους ερυθρούς οίνους κυμαίνεται μεταξύ 1,5 και 4g/L (Σουφλερός, 2012, Τσακίρης, 1998).

Κάθε ποικιλία σταφυλιών έχει το δικό της τανικό προφίλ το οποίο επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων. Η ανομοιογένεια της υφής των τανινών εξαρτάται από την ποικιλία των σταφυλιών, τις κλιματολογικές συνθήκες και το είδος της οινοποίησης.

Στα ερυθρά κρασιά υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το τανικό προφίλ και σχετίζονται με το ξύλο από το οποίο προέρχεται το βαρέλι παλαίωσης

(βαθμός ψησίματος, είδος φυτού) αλλά και τον τρόπο, χρόνο της παλαίωσης. Επιπλέον, τα ερυθρά κρασιά εμφανίζουν μεγάλες ποσότητες ενδογενών τανινών λόγω της εκχύλισης από τη φλούδα του σταφυλιού.

Γενικά, τα ερυθρά κρασιά που προορίζονται για γρήγορη κατανάλωση έχουν μικρά μόνο μόρια τανινών τα οποία δεν αντέχουν στη παλαίωση. Έτσι, η ύπαρξη μόνο μικρών μορίων στο κρασί οφείλεται στο σύντομο χρόνο εκχύλισης που αποβλέπει περισσότερο στην παραλαβή χρώματος, δηλαδή ανθοκυανών.

Όσον αφορά τα νέα κρασιά που προορίζονται για παλαίωση δηλαδή προέρχονται από μια μακρόχρονη εκχύλιση, περιέχουν τανίνες κυρίως από τα γίγαρτα και είναι σε μεγάλο ποσοστό μεγάλα μόρια. Εκτός από την ποικιλία του σταφυλιού, αυτό που καθορίζει την ικανότητα παλαίωσης του κρασιού είναι η ωρίμανση του σταφυλιού καθώς εξαρτάται από αυτό ο βαθμός πολυμερισμού των τανινών.

1.1.3 Ο ρόλος των τανινών στον οίνο

Η σπουδαιότητα των τανινών οφείλεται στο γεγονός ότι συμμετέχουν περισσότερο από όλες τις άλλες φαινολικές ενώσεις στα διάφορα φαινόμενα και στάδια της παλαίωσης των ερυθρών οίνων (Σουφλερός, 1997).

Η ύπαρξη των τανινών του ξύλου είναι απαραίτητη στην παλαίωση των οίνων λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Έτσι, προστατεύεται ο οίνος από τις επιδράσεις του οξυγόνου. Κατά την παλαίωση σε ξύλινο βαρέλι χάρη στην επίδραση του οξυγόνου που είναι απαραίτητο σχηματίζονται μεγάλα πολυμερή στο κρασί. Αυτές οι μεγάλες τανίνες μπορούν να διατηρηθούν κατά τη γήρανση και επιπλέον έχουν την ιδιότητα να μη προκαλούν στυφή αίσθηση.

Επιπλέον, οι τανίνες συμμετέχουν στη διαύγαση (κολλάρισμα) των οίνων σχηματίζοντας μεγαλομοριακά σύμπλοκα τα οποία καθιζάνουν λόγω βάρους και παρασύρουν τα διάφορα αιωρήματα, ενώ παρεμποδίζουν και τη δράση των ενζύμων (Ribéreau-Gayon, 2006). Έτσι, μια από τις ιδιότητες των τανινών είναι να καθιζάνουν τις πρωτεΐνες και τις γλυκοπρωτεΐνες της σιέλου δημιουργώντας το αίσθημα της στυφής και πικρής γεύσης στους οίνους.

Κατά τη διατήρηση και παλαίωση των οίνων οι τανίνες εξακολουθούν να πολυμερίζονται ενώ παράλληλα αυξάνεται η ένταση των ιδιοτήτων τους μέχρι ενός σημείου, πέρα από το οποίο η ένταση μειώνεται. Παράδειγμα αποτελεί η μείωση της στυφής γεύσης κατά την παλαίωση των οίνων. Στην περίπτωση των ερυθρών

κρασιών οι τανίνες του ξύλου συνυπάρχουν αρμονικά με τις τανίνες του σταφυλιού. Ωστόσο είναι απαραίτητη προϋπόθεση το κρασί να περιέχει αρκετό ποσό τανινών ώστε να μην υπερισχύουν οι τανίνες του ξύλου.

Τέλος, η μεταβολή του χρώματος στους οίνους από ζωηρό ερυθρό σε κεραμιδί είναι αποτέλεσμα του πολυμερισμού των τανινών σε συνδυασμό με την επίδραση του O₂, του Fe αλλά και άλλων παραγόντων (Ribéreau-Gayon, 2006) διαμορφώνοντας ιζήματα χρωστικών ουσιών. Έτσι, οι τανίνες συμμετέχουν στο ανεπιθύμητο σιδηρικό θόλωμα μέσω των ενώσεων που σχηματίζουν με το σίδηρο.

1.1.4 Ταξινόμηση τανινών

Η συνηθέστερη ταξινόμηση των τανινών είναι η Freudenberg's (Farkaš, 1988):

Υδρολυόμενες τανίνες

- A) Γαλλοτανίνες
- B) Ελλαγιτανίνες
- Γ) Εστέρες των φαινολοκαρβοξυλικών οξέων χωρίς σάκχαρα

Συμπυκνωμένες τανίνες

- A) Τανίνες με βάση τις 3-φλαβανόλες
- B) Τανίνες με βάση τις 3,4-φλαβανοδιόλες
- Γ) Τανίνες με βάση τα υδροξυστιλβένια

1.1.5 Συμπυκνωμένες τανίνες

Οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι ουσίες που προέρχονται από τον πολυμερισμό της κατεχίνης και της λευκοανθοκυανιδίνης. Ακόμη, οι συμπυκνωμένες τανίνες χωρίζονται στις προανθοκυανιδίνες και τις προφισετινιδίνες.

Οι προανθοκυανιδίνες υπάρχουν φυσικά στα σταφύλια και αποτελούνται από διάφορα φλαβονοειδή που απελευθερώνουν ανθοκυάνες και άλλα αδιάλυτα μόρια όταν υποβάλλονται σε όξινη υδρόλυση. Βρίσκονται κυρίως στους φλοιούς και τους σπόρους του σταφυλιού και από εκεί εκχυλίζονται στα κόκκινα κρασιά. Ενώ, οι προφισετινιδίνες εκχυλίζονται στο κρασί από το ξύλο quebracho (*Schinopsis lorentzii*) και τη μμόζα (*Acacia mollissima*).

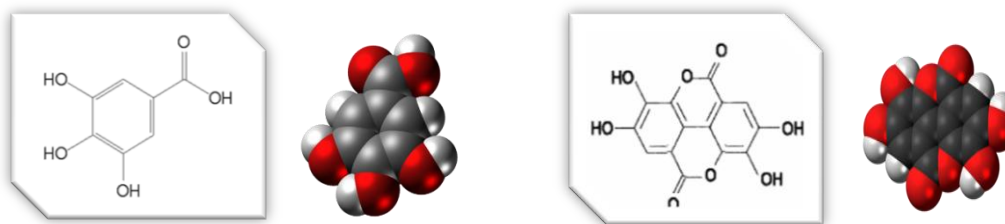
1.1.6 Υδρολυόμενες τανίνες

Όσον αφορά τις υδρολυόμενες τανίνες ή πυρογαλλοτανίνες, στο κέντρο του μορίου τους υπάρχει ένα σάκχαρο (συνήθως D-γλυκόζη) αλλά επίσης και κυκλιτόλες όπως κινικό ή σικιμικό οξύ. Οι υδροξυλομάδες του σακχάρου είναι μερικώς ή ολικώς εστεροποιημένες με φαινολικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, οι φαινολικές ομάδες είναι το γαλλικό οξύ στις γαλλοτανίνες και το ελλαγικό οξύ στις ελλαγιτανίνες. Ανά μόριο τανίνης περιέχονται 3 έως 12 μόρια γαλλικού οξέος.

Οι ελλαγιτανίνες διαφέρουν από τις γαλλοτανίνες, κατά το ότι οι γαλλοϋλομάδες τους συνδέονται μέσω δεσμών C-C, ενώ οι γαλλοϋλομάδες στις γαλλοτανίνες συνδέονται με εστερικούς δεσμούς. Οι εστερικοί δεσμοί μπορούν να σπάσουν υπό συνθήκες ήπιας υδρόλυσης και για αυτό ονομάζονται υδρολυόμενες τανίνες. Οι γαλλοτανίνες και οι ελλαγιτανίνες υδρολύονται από ασθενή οξέα ή ασθενείς βάσεις και απελευθερώνουν υδατάνθρακες και φαινολικά οξέα. Κατά τη θέρμανση με υδροχλωρικό ή θειικό οξύ δίνουν γαλλικό ή ελλαγικό οξύ.

Οι υδρολυόμενες τανίνες δεν βρίσκονται φυσικά στα σταφύλια αλλά εκχυλίζονται από το ξύλο του βαρελιού στο κρασί. Ειδικότερα, οι γαλλοτανίνες εξάγονται κυρίως από την τάρα (περουβιανή χαρουπιά) (*Caesalpinia spinosa*), τα κηκίδια (gallnuts) δρυός (*Quercus infectoria*) και το κινέζικο σουμάκι (*Rhus semialata*), παρουσιάζοντας κρεμώδη υφή και κιτρινωπό χρώμα. Οι γαλλοτανίνες δεν είναι πολύ στυφές και έχουν πικρή γεύση.

Όσον αφορά τις ελλαγιτανίνες έχουν πιο σκούρο χρώμα και είναι λιγότερο στυφές σε σύγκριση με τις γαλλοτανίνες ενώ έχουν μια χαρακτηριστική μυρωδιά ξύλου. Οι ελλαγιτανίνες υπάρχουν σε φρούτα (ρόδια, φράουλα, βατόμουρο, φραμπουάζ, φραγκοστάφυλο, μοσχοστάφυλο), βότανα, ξηρούς καρπούς (καρύδια, φυστίκια, κάσιους, κάστανα, βελανίδια, πεκάν) και σπόρους. Επιπλέον, οι ελλαγιτανίνες μπορεί να βρίσκονται και σε αλκοολούχα που παλαιώνουν σε ξύλινα βαρέλια. Αυτό οφείλεται στη μεταφορά των ελλαγιτανινών από το ξύλο στο αλκοόλ καθώς είναι ένα από τα συστατικά του ξύλου δρυός (*Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Quercus alba*) και του ξύλου καστανιάς (*Castanea sativa*). Το ελεύθερο ελλαγικό οξύ έχει βρεθεί και σε μερικά μέλια.



Εικόνα 1.1 Γαλλικό και ελλαγιικό οξύ

1.2 ΕΛΛΑΓΙΚΕΣ ΤΑΝΙΝΕΣ

1.2.1 Στερεοχημεία και Διαμόρφωση ελλαγιικών τανινών

Οι ελλαγιικές τανίνες είναι πολυφαινολικές ενώσεις που κατατάσσονται στις υδρολύσιμες τανίνες. Είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στα κενοτόπια των κυττάρων (Khadem και Marles, 2010).

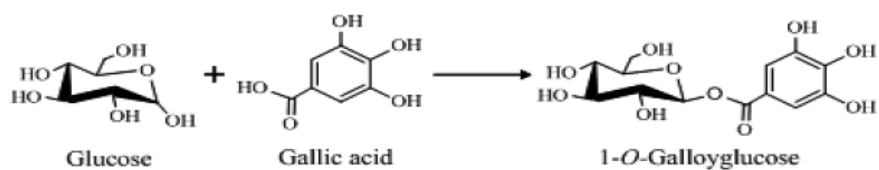
Ως ελλαγιικές τανίνες με τη στενή έννοια μπορούν να οριστούν οι εστέρες του εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος και του σακχάρου (συνήθως β-D-γλυκόζη) ή κυκλιτόλης (σικιμικό, κουινικό οξύ). Ενώ, ο ευρύτερος ορισμός των ελλαγιικών τανινών καλύπτει τις ενώσεις που προέρχονται από περαιτέρω οξειδωτικούς μετασχηματισμούς, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών ολιγομερισμού (Okuda et al., 1995).

Η βιοσύνθεση των ελλαγιικών τανινών ξεκινά όταν ένα μόριο γλυκόζης σχηματίζει με ένα μόριο γαλλικού οξέος την 1-O-γαλλοϋλογλυκόζη (Salminen et al., 2004). Έπειτα, σχηματίζεται η πρόδρομη ένωση 1,2,3,4,6-πεντα-O-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόζη (PGG) από την οποία προέρχονται οι γαλλοτανίνες και οι ελλαγιτανίνες.

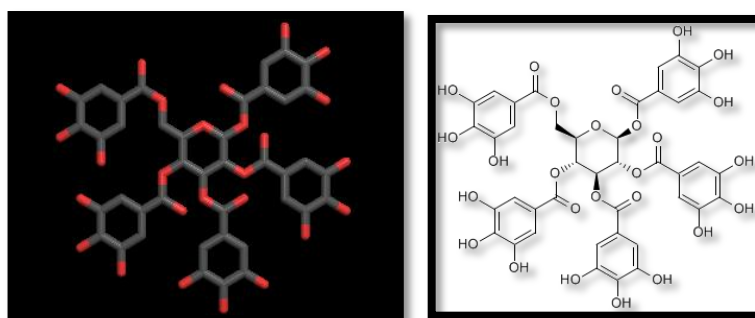
Στη συνέχεια, οι οξειδώσεις μεταξύ γαλλοϋλομάδων και PGG οδηγούν στο σχηματισμό του HHDP. Το HHDP είναι το καθοριστικό δομικό χαρακτηριστικό για όλες τις ελλαγιτανίνες. Η οξείδωση της PGG πραγματοποιείται από τη δράση του ενζύμου πολυφαινολοξειδάση (Niemetz και Gross, 2003). Έτσι, με την οξειδωτική αντίδραση μεταξύ δύο γαλλοϋλομονάδων στον 6 άνθρακα σχηματίζεται ένα μόριο εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος από το οποίο προκύπτει μια μονομερής ελλαγιτανίνη.

Οι ελλαγιτανίνες διαφέρουν από τις γαλλοτανίνες στο ότι μερικές μονάδες γαλλικού οξέος ή γαλλοϋλομάδες συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα σχηματίζοντας το 6,6'-δικαρβονυλο-2,2',3,3',4,4'-εξαϋδροξυδιφαινυλο τμήμα. Όσον αφορά τις γαλλοτανίνες έχουν μονάδες γαλλικού οξέος οι οποίες συνδέονται αποκλειστικά με εστερικό δεσμό με μονάδες γαλλικού οξέος οι οποίες

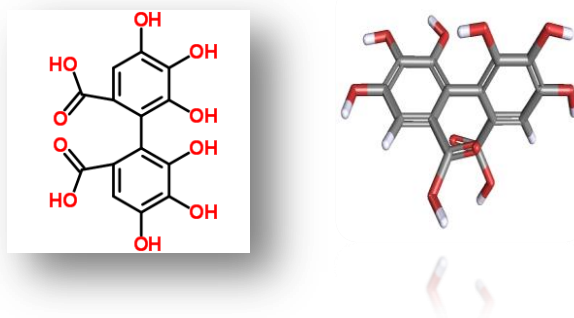
είναι ήδη εστεροποιημένες στη D-γλυκόζη. Ο βαθμός προσθήκης γαλλοϋλομονάδων μπορεί να φτάσει τις 10-12 γαλλοϋλομονάδες.



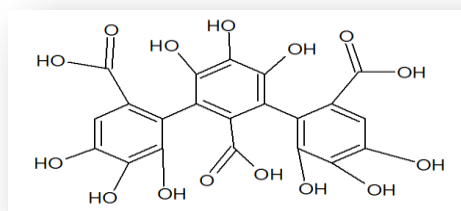
Εικόνα 1.2 Σχηματισμός της 1-O- γαλλοϋγλυκόζης



Εικόνα 1.3 1,2,3,4,6-πεντα-O-γαλλοϋλο-β-D-γλυκοκυρανόζη (PGG)



Εικόνα 1.4 Εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ (HHDP)



Εικόνα 1.5 Μη εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ (συστατικό της κασταλαγίνης, ρομπουρίνης A, B, C, D, γραντινίνης)

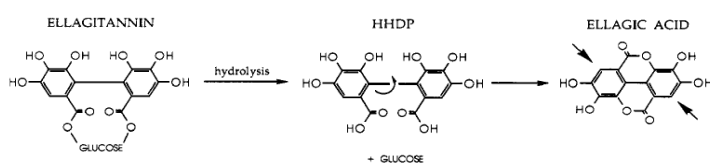
1.2.2 Χημικές ιδιότητες ελλαγιικών τανινών

Οι ελλαγιικές τανίνες μπορούν να υδρολυθούν και να δώσουν κατόπιν λακτονοποίησης ελλαγικό οξύ. Το αν θα δώσει η υδρόλυση των ελλαγιικών τανινών γαλλικό οξύ εξαρτάται από τη δομή τους. Αντίθετα οι γαλλοτανίνες απελευθερώνουν μόνο γαλλικό οξύ.

Οι ελλαγιτανίνες περιέχουν διάφορους αριθμούς εξαϋδροξυδιφαινυλομομάδων καθώς και γαλλοϋλομάδων και / ή σανγουσορβοϋλομάδων συνδεδεμένες με το σάκχαρο. Προκειμένου να καθοριστεί η ποσότητα της κάθε μεμονωμένης ομάδας, γίνεται υδρόλυση των εκχυλισμάτων με τριφθοροξικό οξύ σε μεθανόλη/νερό. Το εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ που δημιουργείται μετά την υδρόλυση, αυθόρμητα μετατρέπεται σε ελλαγικό οξύ, το σανγουισορβικό οξύ σε διλακτόνη του σανγουισορβικού οξέος ενώ το γαλλικό οξύ παραμένει άθικτο.

Οι ελλαγιικές τανίνες τείνουν να σχηματίζουν μεγάλου μοριακού βάρους διμερή και ολιγομερή. Έτσι, μπορεί να υπάρχουν μονομερή (νουφαρίνη Α, γερανίνη, τηλεμαγρανδίνη ΙΙ) και ολιγομερή (νουφαρίνη Ε, νουφαρίνη C, χιρτελλίνη Α). Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται μεταξύ 300 και 20.000 Da.

Η σταθερότητα των ελλαγιτανικών ενώσεων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH και το οξυγόνο. Η υδρόλυση και ο πολυμερισμός συμβαίνουν στις ελλαγιτανίνες με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η αστάθεια των ελλαγιτανινών μπορεί να φανεί από το γεγονός ότι οι ελλαγιτανίνες κασταλαγίνη, βεσκαλαγίνη, γραντινίνη και ρομπουρίνη Α-Ε μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της φυσικής ξήρανσης του ξύλου δρυός και με γρηγορότερο ρυθμό κατά τη διαδικασία του ψησίματος.



Εικόνα 1.6 Σχηματισμός ελλαγιικού οξέος από ελλαγιτανίνη

1.2.3 Μονομερείς ελλαγιικές τανίνες

Οι μονομερείς ελλαγιικές τανίνες αναφέρονται στις ελλαγιικές τανίνες που περιέχουν μόνο ένα πυρήνα γλυκόζης. Αναλυτικότερα, οι ενδομοριακοί οξειδωτικοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα μεταξύ των γαλλοϋλομονάδων μετατρέπουν τις

γαλλοϋλομονάδες σε HHDP μονάδες. Έτσι, το αποτέλεσμα είναι η μετατροπή του PGG σε μονομερή ελλαγιτανίνη.

Τα πιο κοινά σχήματα συζεύξεων των γαλλοϋλομονάδων είναι το 4,6 (σύζευξη μεταξύ γαλλοϋλομονάδων στο C4 και C6 της γλυκόζης) και το 2,3 (σύζευξη μεταξύ γαλλοϋλομονάδων στο C2 και στο C3 της γλυκόζης) παρόλο που μπορεί να βρεθεί και η σύζευξη μεταξύ 1,6-,1,3-,3,6- και 2,4- γαλλοϋλομονάδων. Αυτά τα διαφορετικής σύζευξης σχήματα έχουν σαν αποτέλεσμα τη δομική πολυπλοκότητα των μονομερών ελλαγιτανινών, η οποία περιπλέκεται περισσότερο από το διαφορετικό βαθμό της γαλλοϋλοποίησης, τη στερεοχημεία του HHDP, τη μορφή των αρωματικών γλυκοσιδών και την ανωμερή στερεοχημεία του πυρήνα γλυκόζης.

Οι πιο αξιοσημείωτες ελλαγιτανίνες είναι αυτές που σχηματίζουν 4,6-HHDP, 2,3-HHDP συζεύξεις ή και τις δύο μορφές. Οι τυπικές μονομερείς ελλαγιτανίνες, που αντιπροσωπεύουν τις 4,6-συζευγμένες HHDP, είναι η τελιμαγραντίνη II, I και στρικτινίνη. Οι ελλαγιτανίνες που φέρουν μόνο 2,3-συζευγμένες HHDP είναι π.χ. η περοκαριανίνη C, σανγκουίνη H5 και H4. Ακόμη, μια άλλη υποκλάση των ελλαγιτανινών εμφανίζει και τις δύο 4,6- και 2,3- συζεύξεις π.χ. η κασουαρικτίνη, η ποτεντιλίνη και η πεντακουλαγίνη.

Μια άλλη σημαντική ομάδα μονομερών ελλαγιτανινών σχηματίζει ακυκλικές αρωματικές γλυκοσίδες. Στην ομάδα αυτή ανήκουν η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη. Αυτές οι δύο αρωματικές γλυκοσίδες έχουν 4,6- HHDP σύζευξη και μια μοναδική φλαβογαλλονυλομάδα η οποία συνθέτεται από τρεις γαλλοϋλομονάδες συνδεδεμένες μεταξύ τους με δεσμούς άνθρακα-άνθρακα. Αυτές οι άκυκλες μονομερείς ελλαγιτανίνες και τα πολυμερή τους είναι οι κύριες ελλαγιτανίνες που βρίσκονται στις δρύες.

1.2.4 Ολιγομερείς ελλαγιτικές τανίνες

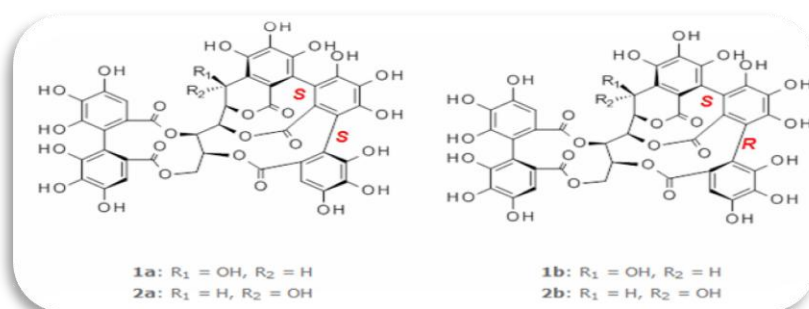
Οι μονομερείς ελλαγιτανίνες μπορούν να πολυμεριστούν και να σχηματίσουν ολιγομερείς ή πολυμερείς ελλαγιτανίνες οι οποίες βρίσκονται συχνά μαζί με τα μονομερή τους στα φυτά. Οι πιο συνηθισμένες ολιγομερείς ελλαγιτανίνες είναι διμερείς μέχρι τετραμερείς ελλαγιτανίνες. Ο πολυμερισμός των μονομερών ελλαγιτανινών είναι κατά κύριο λόγο μεταξύ γαλλοϋλομάδων και μεταξύ γαλλοϋλομάδας και HHDP με δεσμούς C-O, αλλά και μεταξύ γλυκόζης και HHDP με δεσμούς C-C στην κατάλληλη μονομερή ελλαγιτανίνη.

Οι ολιγομερείς ελλαγιτανίνες που έχουν οξειδωτική C-C σύζευξη μεταξύ μονομερών ελλαγιτανινών είναι τα διμερή βεσκαλαγίνης και κασταλαγίνης: η ρομπουρίνη A και η ρομπουρίνη D. Οι μονομερές ελλαγιτανίνες που υφίστανται την οξειδωτική C-C σύζευξη είναι τυπικά άκυκλες αρωματικές γλυκοσίδες.

1.2.5 Βεσκαλαγίνη – Κασταλαγίνη

Η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη βρίσκονται στα φυτά καθώς και στο κρασί και το ούισκι. Τα μόρια αυτά περιλαμβάνουν ένα μόριο εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος και ένα μόριο μη εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος, εστεροποιημένο από μια μη κυκλική γλυκόζη. Η μερική υδρόλυση της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης, που οδηγεί στην απώλεια του εξαϋδροξυδιφαινικού οξέος, παράγει βεσκαλίνη και κασταλίνη. Τα παραπάνω μόρια είναι διαλυτά στο νερό και διαλύονται ταχέως σε υδροαλκοολικά μέσα όπως κρασιά και αποστάγματα.

Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η στερεοχημεία του τριφαινυλοτμήματος. Η αρχική προτεινόμενη δομή για τα μόρια ήταν η (S,S)-διαμόρφωση (1a και 2a). Έπειτα από μελέτη μοριακής μηχανικής διαπιστώθηκε ότι η (S,R)-διαμόρφωση είναι χαμηλότερης ενέργειας οπότε και πιο πιθανή (1b και 2b). Ως εκ τούτου, η δομή της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης είναι η 1b και η 2b αντίστοιχα.



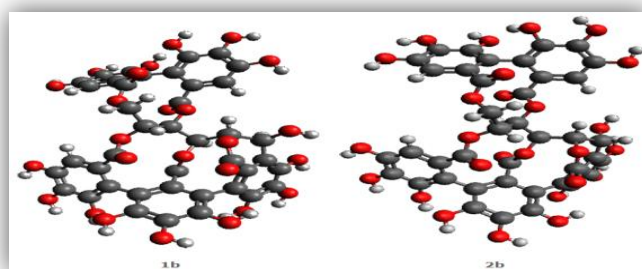
Εικόνα 1.7 Διαμορφώσεις του μορίου της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης. Η διαμορφώσεις 1b και 2b έχουν τη χαμηλότερη ενέργεια.

Η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη είναι ασταθείς ενώσεις σε υδατικά διαλύματα ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία οξυγόνου. Η κασταλαγίνη είναι συγκριτικά πιο σταθερή από τη βεσκαλαγίνη (471 kJ mol^{-1} vs 473 kJ mol^{-1}). Αυτή η ενέργεια ή η διαφορά σταθερότητας είναι λόγω ενός επιπλέον δεσμού υδρογόνου της υδροξυλομάδας στη θέση C1 στην κασταλαγίνη. Ο δεσμός

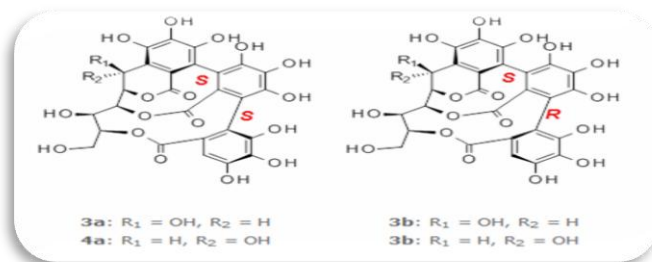
υδρογόνου συμβαίνει μεταξύ του C1 της υδροξυλομάδας και του υδροξυλίου της γαλλοϋλομάδας στη θέση C1 μέσω δακτυλίου με έξι άνθρακες. Αυτός ο δεσμός δεν μπορεί να δημιουργηθεί στη βεσκαλαγίνη στην οποία ο C1 της υδροξυλομάδας είναι μακριά από τη γαλλοϋλομάδα στη θέση C1.

Η συγκέντρωση της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης μειώνεται σε διάλυμα νερού και μεθανόλης και αυξάνεται ο ρυθμός αποδόμησης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της μεθανόλης. Επομένως και η μεθανόλη δεν είναι καλός διαλύτης για την εκχύλιση των ελλαγιτανινών. Το κιτρίνισμα των υδατικών διαλυμάτων ωφείλεται στη μείωση της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης καθώς η υδρόλυση είναι μία από τις διαδικασίες αποδόμησης των ελλαγιτανινών μέσα σε υδατικό διάλυμα που αποδίδει ελλαγικό οξύ.

Ακόμη, το οξυγόνο, η υψηλή θερμοκρασία και το PH αυξάνουν το ρυθμό αποδόμησης με τη θερμοκρασία να είναι ο κυριότερος παράγοντας. Με αύξηση της θερμοκρασίας από τη θερμοκρασία δωματίου (23°C) στους 60°C ο ρυθμός αποδόμησης της βεσκαλαγίνης δεκαοχταπλαδιάζεται και της κασταλαγίνης δεκαεπταπλασιάζεται υπό συνθήκες αζώτου και pH= 4. Με την αλλαγή του pH από 4 σε 7, σε θερμοκρασία δωματίου, ο ρυθμός αποδόμησης της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης επταπλασιάζεται ενώ με την παρουσία του οξυγόνου ο ρυθμός αποδόμησης διπλασιάζεται.



Εικόνα 1.8 Τρισδιάστατη μορφή του μορίου της βεσκαλαγίνης (1b) και της κασταλαγίνης (2b)



Εικόνα 1.9 Διαμορφώσεις του μορίου της βεσκαλίνης και της κασταλίνης

1.2.6 Γραντινίνη – Ρομπουρίνη – Ακουτισιμίνη Α

Η γραντινίνη είναι ελλαγιτανίνη που μπορεί να βρεθεί σε φύλλα του φυτού νιαουλί (*Melaleuca quinquenervia*) και σε είδη βελανιδιάς, π.χ. η λευκή βελανιδιά (*Quercus alba*) στη Βόρεια Αμερική και η Ευρωπαϊκή κόκκινη δρυς (*Quercus robur*).

Η γραντινίνη είναι ένα γλυκοσίδιο της κασταλαγίνης με λυξόζη. Η λυξόζη συνδέεται μέσω ενός δεσμού άνθρακα-άνθρακα στη θέση C-1 της γλυκοζυλομονάδος της κασταλαγίνης.

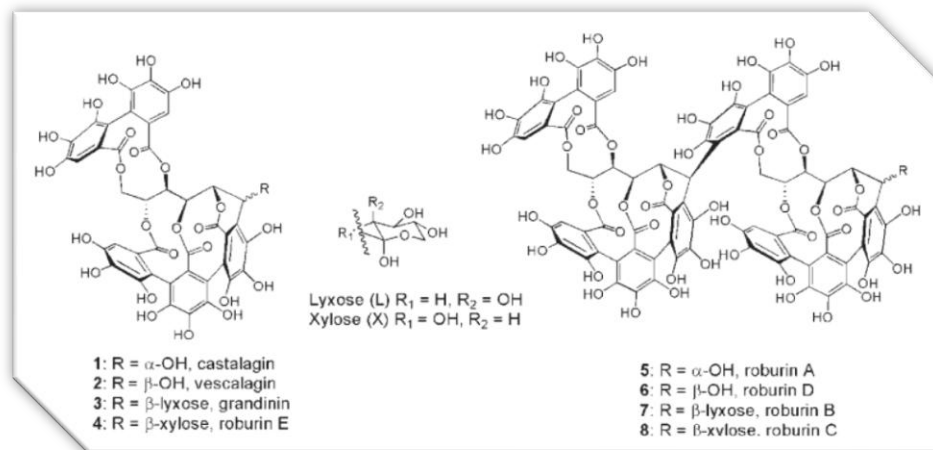
Ο Herve du Penhoat και οι συνεργάτες του (Herve du Penhoat et al.,1991) απομόνωσαν και ταυτοποίησαν πέντε διμερή που ονομάζονται ρομπουρίνες A, B, C, D και E, από βελανιδιές.

Η ρομπουρίνη A είναι μια διμερής ένωση, που αποτελείται από δύο υπομονάδες βεσκαλαγίνης, συνδεδεμένες με δεσμό μεταξύ της διφαινυλομάδας (εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ (HHDP)) της μιας υπομονάδας και του τριφαινυλοτμήματος (μη εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ) της άλλης υπομονάδας.

Οι ρομπουρίνες B και C είναι επίσης διμερή βεσκαλαγίνης, με τη σύνδεση μεταξύ των δύο ομάδων βεσκαλαγίνης να είναι η ίδια με εκείνη της ρομπουρίνης A περιέχοντας επιπλέον ομάδες πεντόζης. Η ρομπουρίνη B περιέχει ένα μόριο λυξόζης προσαρτημένο στον C-1 του δακτυλίου της γλυκόζης ενώ η ρομπουρίνη C περιέχει ένα μόριο ξυλόζης.

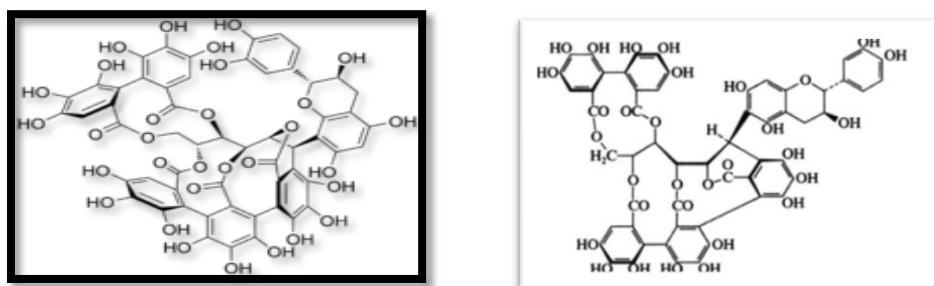
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έχει δείξει ότι η ρομπουρίνη E είναι μια δομή πεντόζης-βεσκαλαγίνης, αλλά στην περίπτωση αυτή η πεντόζη είναι ξυλόζη κι όχι λυξόζη. Χρησιμοποιώντας FAB-MS, βρήκαν ότι η ρομπουρίνη E έχει το ίδιο μοριακό βάρος με τη γραντινίνη, αλλά έχει υψηλότερο χρόνο κατακράτησης σε στήλη αντίστροφης φάσης. Οι άλλες τέσσερις ρομπουρίνες είναι διμερή της βεσκαλαγίνης ή/και της κασταλαγίνης.

Η ρομπουρίνη D είναι ένα διμερές της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης, στην οποία η HHDP ομάδα της κασταλαγίνης συνδέεται με τον άνθρακα C-1 του γλυκοζυλοϋπολείμματος της βεσκαλαγίνης, μέσω C-C δεσμού (Masson et al., 1995).

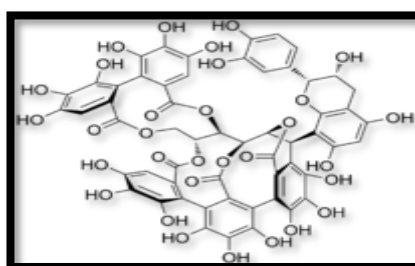


Εικόνα 1.10 Δομές ελλαγιτανινών της δρυός και του οίνου

Η ακουτισιμίνη A είναι μια φλαβονοελλαγιτανίνη, ένας τύπος τανίνης που σχηματίζεται από την σύνδεση ενός φλαβονοειδούς με ελλαγιτανίνη. Το 2003, οι επιστήμονες στο Ινστιτούτο Européen de Chimie et Biologie in Pessac στη Γαλλία, διαπίστωσαν ότι όταν η τανίνη της δρυός βεσκαλαγίνη αλληλεπιδρά με ένα φλαβονοειδές στο κρασί δημιουργείται η ακουτισιμίνη A.



Εικόνα 1.11 Η δομή του μορίου ακουτισιμίνη A και ακουτισιμίνη B



Εικόνα 1.12 Η δομή του μορίου επιακουτισιμίνη A

1.3 ΕΛΛΑΓΙΚΕΣ ΤΑΝΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΠΑΛΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΟΙΝΟΥ

1.3.1 Ελλαγιικές τανίνες στη βαρελοποιία

Τα ξύλινα βαρέλια χρησιμοποιούνταν αρχικά για τον εύκολο χειρισμό του κρασιού κατά την παραγωγή, την αποθήκευση και τη μεταφορά του. Ωστόσο, η επίδραση του ξύλου στην ανάπτυξη ευχάριστου αρώματος και στη ρύθμιση του κόκκινου χρώματος στον οίνο έδωσε στα βαρέλια επιπλέον ρόλο στην οινοποίηση. Έτσι, τα υψηλής ποιότητας κόκκινα κρασιά είναι παλαιωμένα παραδοσιακά σε ξύλινα βαρέλια από το τέλος της ζύμωσης μέχρι την εμφιάλωση.

Οι δύο κύριες ισομερείς ελλαγιτανίνες που έχουν βρεθεί στο ξύλο της *Castanea*, *Quercus* και χρησιμοποιούνται στη βαρελοποιία είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη, καθώς και δύο λιγότερο σημαντικές ενώσεις, η γραντινίνη και η ρομπουρίνη. Αυτές είναι οι κύριες εμπορικές τανίνες που είναι νόμιμα εξουσιοδοτημένες ως πρόσθετα στο κρασί.

Το ελλαγιικό οξύ στο κρασί προέρχεται είτε από τα ξύλινα βαρέλια είτε από την προσθήκη οινολογικών τανινών. Από την άλλη πλευρά, το γαλλικό οξύ το οποίο προέρχεται από τους φλοιούς και τους σπόρους είναι πάντα παρόν στο κρασί.

Οι ελλαγιτανίνες του ξύλου μπορεί να είναι διαλυτές ή αδιάλυτες. Οι διαλυτές ελλαγιτανίνες μπορούν να εκχυλιστούν με οργανικούς διαλύτες. Οι αδιάλυτες ελλαγιτανίνες μπορούν να αποσπαστούν μόνο με τη χημική αποδόμηση και είναι συνδεδεμένες με τα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων.

1.3.2 Εναλλακτικά προϊόντα – chips δρυός

Έχει διερευνηθεί η προσθήκη κομματιών ξύλου δρυός στον οίνο, που βρίσκεται σε αδρανή βαρέλια. Η προσθήκη εναλλακτικών προϊόντων στον οίνο, στη διαδικασία παλαίωσης του οίνου, σε διάφορα σχήματα π.χ. ρινίσματα (chips), κύβοι, σκόνη, ροκανίδια, μαστούνια και μπλοκ σχετικά πρόσφατα εγκρίθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση (CE 2165/2005 και CE 1507/2006). Σε ορισμένες χώρες, όπως η Αυστραλία, οι ΗΠΑ, η Νότια Αφρική και η Χιλή, η πρακτική αυτή χρησιμοποιείται πολλά χρόνια.

Με τα προϊόντα αυτά, σε σύγκριση με το δρύινο βαρέλι, μειώνεται ο χρόνος και αποφεύγεται η μείωση του όγκου του οίνου λόγω εξάτμισης από το βαρέλι. Ακόμη, η χρησιμοποίηση των chips προσθέτει την επιθυμητή γεύση και άρωμα στον οίνο. Με χρήση μικρών δρύινων chips (διάμετρος $\leq 1\text{mm}$), εκχυλίζονται περίπου το

90% των φαινολικών συστατικών σε μια εβδομάδα. Τα συστατικά του αρώματος διαρκούν περισσότερο, πιθανώς επειδή μερικά σχηματίζονται αργά στο κρασί.

Γενικότερα, οι παράγοντες μέγεθος κομματιού, αριθμός κομματιών που προστίθενται και χρόνος επαφής μεταξύ του ξύλινου κομματιού και του οίνου επηρεάζουν τα οργανοληπτικά και χημικά χαρακτηριστικά των οίνων που παλαιώνουν (Del Alamo Sanz, Nevares Domínguez, 2006, Frangipane, Santis, Ceccarelli, 2007).

1.3.3 Ελλαγιικές τανίνες ξύλου καστανιάς

Το ξύλο της καστανιάς (*Castanea sativa* Mill.) αποτελείται κατά 40% από κυτταρίνη, 20% ημικυτταρίνη, 25% λιγνίνη και 10% ελλαγιτανίνες. Οι κύριες ελλαγιτανίνες του εκχυλίσματος ξύλου καστανιάς είναι η βεσκαλαγίνη, η κασταλαγίνη, η γραντινίνη και η ρομπουρίνη Ε. Οι τανίνες του ξύλου καστανιάς συχνά χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση (Ricci et al., 2015). Η συγκέντρωση των αδιάλυτων ελλαγιτανινών στο δέντρο αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας, έτσι το 50% των ελλαγιτανινών που βρίσκονται κοντά στο κέντρο του κορμού της καστανιάς (μεγαλύτερης ηλικίας ξύλο) είναι αδιάλυτες στους συνήθεις διαλύτες.

Οι σύνθετες ή μικτές τανίνες που έχουν βρεθεί σε φυτά περιέχουν τόσο υδρολυμένες όσο και συμπυκνωμένες τανίνες. Έτσι, αποτελούν ομοιοπολικά σύμπλοκα μεταξύ ελλαγιτανινών και φλαβονολών (Han et al., 1994). Η ακουτισιμίνη Α, απομονώθηκε από το φλοιό της *Castanea sativa* (Ampere, 1998), κι είναι ένας εστέρας της κασταλαγίνης ή βεσκαλαγίνης και της κατεχίνης. Αυτά τα συστατικά, μαζί με ένα εστέρα κασταλαγίνης-μαλβιδίνης υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες σε κρασιά που έχουν παλαιωθεί σε ξύλινα βαρέλια (Jourdes et al., 2003).

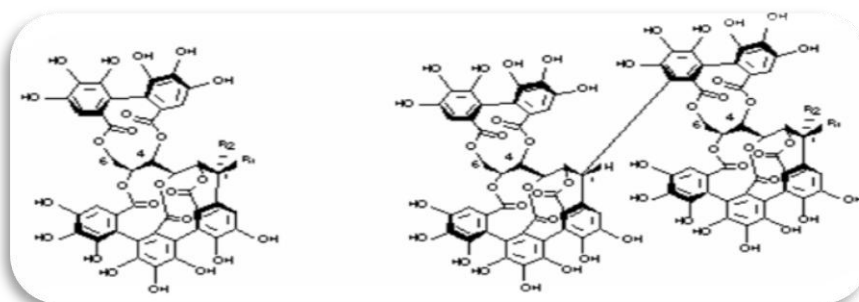
1.3.4 Ελλαγιικές τανίνες ξύλου δρυός

Οι δρύες είναι δέντρα πλούσια σε τανίνες στις οποίες ωφείλεται η γνωστή αντοχή του ξύλου αυτού του γένους. Στο φλοιό της δρυός βρίσκονται συμπυκνωμένες και υδρολυόμενες τανίνες, ωστόσο οι κυρίαρχες τανίνες που βρίσκονται στο εγκάρδιο τμήμα είναι οι ελλαγιτανίνες. Επίσης, το σομό ξύλο περιέχει ελλαγιτανίνες αλλά οι συγκεντρώσεις τους είναι πολύ χαμηλότερες σε σύγκριση με το εγκάρδιο τμήμα. Το εγκάρδιο τμήμα συνήθως περιέχει 7-10% των ελλαγιτανινών ενώ το σομό περιέχει 1-3% των ελλαγιτανινών (ξηρό βάρος).

Ο Mayer και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που απομόνωσαν ελλαγιτανίνες από εγκάρδιο ξύλο δρυός. Οι ελλαγιτανίνες που απομονώθηκαν ήταν οι C-γλυκοσιδικές κασταλαγίνη και βεσκαλαγίνη (Mayer et al., 1969, 1997). Οι δομές της βεσκαλαγίνης και της κασταλαγίνης αναθεωρήθηκαν είκοσι χρόνια μετά από τον Nonaka και τους συνεργάτες του και επιβεβαιώθηκαν αργότερα από τους Tang και Hancock. Ακόμη, ο Nonaka εντόπισε σε δρυ μια νέα C-γλυκοζιτοελλαγιτανίνη, τη γραντινίνη (Nonaka et al., 1989).

Ο Herve du Penhoat και οι συνεργάτες του (Herve du Penhoat et al., 1991) απομόνωσαν και ταυτοποίησαν πέντε διμερή από δρύες, τις ρομπουρίνες A, B, C, D, E. Τα τέσσερα μονομερή (κασταλαγίνη, βεσκαλαγίνη, γραντινίνη, ρομπουρίνη E) και τα τέσσερα διμερή (ρομπουρίνη A, B, Γ, Δ) βρίσκονται στα τρία είδη της ευρωπαϊκής δρυός, ενώ τα αμερικανικά είδη δεν έχουν σχεδόν καθόλου διμερή.

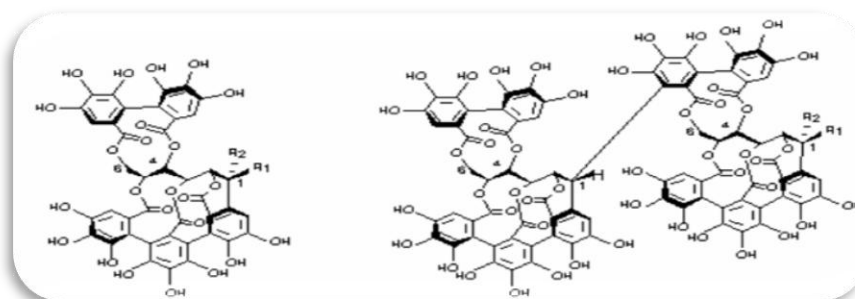
Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν περισσότερα διμερή (έξι) από μονομερή (δύο) στις δρύες, τα μονομερή αντιπροσωπεύουν το 40-70% του συνολικού ποσού των ελλαγιτανινών (Masson et al., 1995).



R1=H, R2=OH, βεσκαλαγίνη
R1=OH, R2=H, κασταλαγίνη

R1=H, R2=OH, ρομπουρίνη A
R1=OH, R2=H, ρομπουρίνη D

Εικόνα 1.13 Δομές μονομερών και διμερών ελλαγιτανινών



R1=H, R2=λυξόζη, γραντινίνη
R1=H, R2= ξυλόζη, ρομπουρίνη E

R1=H, R2= ξυλόζη, ρομπουρίνη B
R1=H, R2=λυξόζη, ρομπουρίνη C

Εικόνα 1.14 Δομές μονομερών και διμερών ελλαγιτανινών

1.3.5 Η επίδραση του είδους δρυός στις ελλαγιικές τανίνες

Το ξύλο δρυός (βελανιδιάς) χρησιμοποιείται πάνω από δύο χιλιάδες χρόνια για την κατασκευή βαρελιών. Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα είδη δρυός είναι τα *Quercus alba*, *Q. robur* και *Q. sessilis*.

Η *Quercus alba* και μια σειρά από έξι λευκές δρύες (*Q. bicolor*, *Q. lyrata*, *Q. macrocarpa*, *Q. muehlenbergii*, *Q. prinus*, *Q. stelata*) χρησιμοποιούνται στα αμερικάνικα δρύινα βαρέλια. Ωστόσο, η *Quercus alba* έχει τη μεγαλύτερη γεωγραφική κατανομή από όλα τα αμερικάνικα είδη λευκής βελανιδιάς, διότι διαθέτει το μέγεθος και τη δομή που προτιμάται για δρύινη ξυλεία. Έτσι, το 45% της άσπρης δρύινης ξυλείας που παράγεται στη Βόρεια Αμερική προέρχεται από τη *Quercus alba*. Γενικά, στη Βόρεια Αμερική οι περισσότερες δρύες που χρησιμοποιούνται για παραγωγή βαρελιών, προέρχονται από Kentucky, Missouri, Arkansas και Michigan.

Στην Ευρώπη, κυρίως η *Quercus robur* (*Q. pedunculata*) και η *Quercus sessilis* (*Q. petraea* ή *Q. sessiliflora*) είναι τα είδη λευκής δρυός που χρησιμοποιούνται στη βαρελοποιία. Η αναλογία του κάθε είδους, σε κάθε ευρωπαϊκή χώρα, εξαρτάται από το έδαφος και τις κλιματικές συνθήκες.

Οι δούγες που παράγονται από διαφορετικά είδη αμερικανικών λευκών δρυών δεν ξεχωρίζονται με γυμνό μάτι. Το ίδιο ισχύει και για τα δύο σημαντικά είδη λευκών δρυών στην Ευρώπη.

Γενικά, οι παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη του ξύλου δρυός, επιδρούν στην ανατομία και το χημικό του περιεχόμενο. Η απόθεση φαινολικών (τανίνες) λαμβάνει χώρα περίπου δέκα με δεκαπέντε χρόνια μετά το σχηματισμό του αγγείου, όταν το σομφό διαφοροποιείται σε εγκάρδιο. Επειδή η απόθεση συμβαίνει κυρίως στα μεγάλης διαμέτρου ανοιξιάτικα αγγεία, ο ρυθμός ανάπτυξης επηρεάζει έμμεσα το χημικό περιεχόμενο του εγκάρδιου ξύλου.

Διαφορές στην ανατομία και το περιεχόμενο του ξύλου παρουσιάζονται σε όλο το δέντρο. Υψηλότερα επίπεδα ελλαγιτανινών εμφανίζονται στο εγκάρδιο στη βάση του δέντρου από ότι κοντά στην κορυφή και μέσα στο εγκάρδιο ξύλο που είναι κοντά στο σομφό. Έτσι, οι αυξημένες φαινολικές αποθέσεις λαμβάνουν χώρα με την αύξηση της ηλικίας του δέντρου.

Αν και οι διαφοροποιήσεις, στο χημικό περιεχόμενο του ξύλου δρυός, προκύπτουν από το διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης και την ηλικία του δέντρου, οι περισσότερες προκύπτουν από γενετικές ανομοιότητες μεταξύ των ειδών. Έτσι,

μεταξύ της *Quercus alba* και των ευρωπαϊκών ειδών *Q.sessilis* και *Q.robur* σημειώνονται οι πιο σημαντικές διαφορές.

Η αμερικάνικη δρυς περιέχει περίπου το 40% των εκχυλίσμων φαινολικών των ευρωπαϊκών δρυών. Ακόμη, η *Quercus sessilis* περιέχει σημαντικά λιγότερα εκχυλίσιμα φαινολικά από τη *Quercus robur*. Παρόλο που υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των τανινών μεταξύ της αμερικάνικης και ευρωπαϊκής δρυός, η ένταση της δρύινης γεύσης είναι παρόμοια αν και με διαφορετικό χαρακτήρα.

Η διαλυτότητα των συστατικών του ξύλου δρυός και η αποικοδόμησή τους σε υποπροϊόντα ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. Συστατικά που εξάγονται σε μικρά ποσά ίσως επηρεάζουν μόνο το μπουκέτο, ενώ αυτά που εξάγονται σε μεγαλύτερα ποσά επιπλέον επηρεάζουν τη γεύση και την οπτική αίσθηση του κρασιού. Για παράδειγμα, το κρασί διαλύει γύρω στο 30% των τανινών από μερικά χιλιοστά της δρυός κι αυτό είναι επαρκές για να επηρεαστεί το χρώμα, η γεύση και το άρωμα. Σε αντίθεση, το κρασί εξάγει μόνο το 2% των λιγνάνων της δρυός.

Τα φαινολικά είναι η πιο σημαντική ομάδα των εκχυλισμάτων δρυός και από αυτά τα δύο τρίτα περίπου είναι μη φλαβονοειδή. Μη φλαβονοειδή είναι οι υδρολύσιμες τανίνες που συνθέτουν την πιο σημαντική υποομάδα της δρυός. Πιο συγκεκριμένα, οκτώ είδη ελλαγιτανινών έχουν εντοπιστεί σε δρύινα βαρέλια. Η συνηθέστερες ελλαγιτανίνες είναι τα στερεοϊσομερή βεσκαλαγίνη και κασταλαγίνη. Όσον αφορά τις αμερικάνικες δρύες χαρακτηρίζονται από συγκριτική έλλειψη των διμερών βεσκαλαγίνης και κασταλαγίνης.

Καθώς το ξύλο γερνάει, ο πολυμερισμός των συστατικών αυξάνεται. Ωστόσο αν και τα πολυμερή εκχυλίζονται γρήγορα στο κρασί, τείνουν να υδρολύονται σε πρόδρομες ελλαγιτικού οξέος. Αυτό εξηγεί, εν μέρει, την ελάχιστη επιρροή τους στη στυφάδα του λευκού κρασιού που ωριμάζει σε δρύινα βαρέλια.

1.3.6 Η επίδραση της επεξεργασίας του ξύλου δρυός στις ελλαγιτικές τανίνες

Η δρυς που χρησιμοποιείται στη παραγωγή βαρελιών ωρίμανσης οίνου περνάει από διάφορα στάδια επεξεργασίας που επηρεάζουν μετέπειτα σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Αφού κοπεί το ξύλο υποβάλλεται σε μία διαδικασία ξήρανσης με φυσικές ή τεχνητές μεθόδους, για να εξασφαλιστεί η μηχανική αντίσταση των βαρελιών. Πιο συγκεκριμένα, το επίπεδο υγρασίας της

δρυός θα πρέπει να είναι σε ισορροπία με αυτή της ατμόσφαιρας, της τάξης του 14-18% στις εύκρατες περιοχές, για να εξασφαλιστεί η μηχανική αντοχή του βαρελιού.

Η φυσική ξήρανση του ξύλου γίνεται στην ύπαιθρο, σε μεγάλους επίπεδους χώρους. Είναι επέμβαση που διαρκεί αρκετά χρόνια, γενικά εικοσιτέσσερις μήνες, για μπαστούνια 21 mm και 36 μήνες για πεντάγραμμο 28 mm. Αυτό το χρονικό διάστημα είναι απαραίτητο για να γίνει το ξύλο κατάλληλο για τη γήρανση και τη βελτίωση του οίνου (Taransaud, 1976).

Έχει υπολογιστεί ότι η δρυς ξηραίνεται με ένα ρυθμό περίπου 10 mm/έτος. Στην πραγματικότητα, η έντονη αφυδάτωση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια των πρώτων δέκα μηνών. Έπειτα, ακολουθεί η περίοδος κατά την οποία το ξύλο ωριμάζει, βελτιώνοντας έτσι τις φυσικές, αρωματικές και οργανοληπτικές του ιδιότητες. Η ξήρανση επιτελείται ανάλογα με τη θέση του ξύλου στο σωρό.

Γενικά, το εξωτερικό του σωρού των ξύλων δρυός είναι περισσότερο πλυμμένο, ενώ το κέντρο έρχεται ελάχιστα σε επαφή με τη βροχή ή ακόμα και με τον καταιονισμό κι έχει πάντα χαμηλότερο επίπεδο υγρασίας. Όταν το ξύλο διαβρέχεται, το κρασί γίνεται λιγότερο στυπτικό και λιγότερο χρωματισμένο. Ακόμη, οι ποσότητες των συστατικών, κυρίως ελλαγιτανίνες, που εκχυλίζονται από το ξύλο, μειώνονται.

Η μείωση των συστατικών λόγω πλύσης επηρεάζει κυρίως τα υδατοδιαλυτά μονομερή και ολιγομερή, ενώ οι πολυμερισμένες μορφές που είναι αδιάλυτες στο νερό μειώνονται μόνο όταν η διαδικασία της φυσικής ξήρανσης διαρκεί περισσότερο από τρία χρόνια. Η μείωση των ελλαγιτανινών οφείλεται σε χημικές και ενζυμικές υδρολύσεις (*Penicillium* και *Trichoderma*), καθώς επίσης και στην οξείδωση οποιουδήποτε ελλαγιτικού οξέος μπορεί να απελευθερωθεί.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις προκαλούνται από ένζυμα που εκκρίνονται από τη μυκητιακή μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται στο ξύλο. Ο μύκητας *Aureobasidium pullulans* είναι πάντα παρόν στο ξύλο κατά τη διάρκεια της ξήρανσης και αντιπροσωπεύει το 80% του συνόλου της μικροχλωρίδας. Ακόμη, έχουν εντοπιστεί οι μύκητες *Trichoderma harzianum* και *Trichoderma komingii*, αλλά αντιπροσωπεύουν ποσοστό μικρότερο του 20% του πληθυσμού.

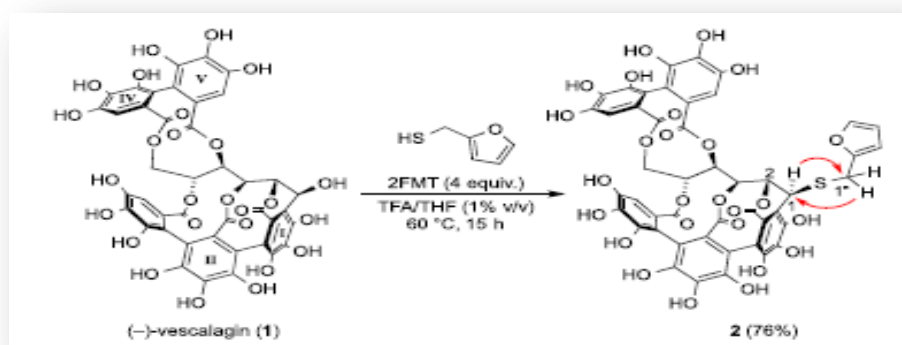
Για να δοθεί μορφή στα βαρέλια το ξύλο θερμαίνεται. Στο βαρελοποιείο χρησιμοποιούνται τρία είδη ψησίματος: ελαφρύ, μεσαίο και βαρύ. Αυτό το στάδιο θεωρείται ότι έχει την πιο σημαντική επιρροή στο χημικό περιεχόμενο του ξύλου δρυός. Η θερμική κατεργασία προκαλεί αποικοδόμηση ορισμένων συστατικών του ξύλου δρυός, παράγοντας πολυάριθμες πτητικές ενώσεις.

1.3.7 Ο ρόλος των ελλαγιτικών τανινών στον οίνο

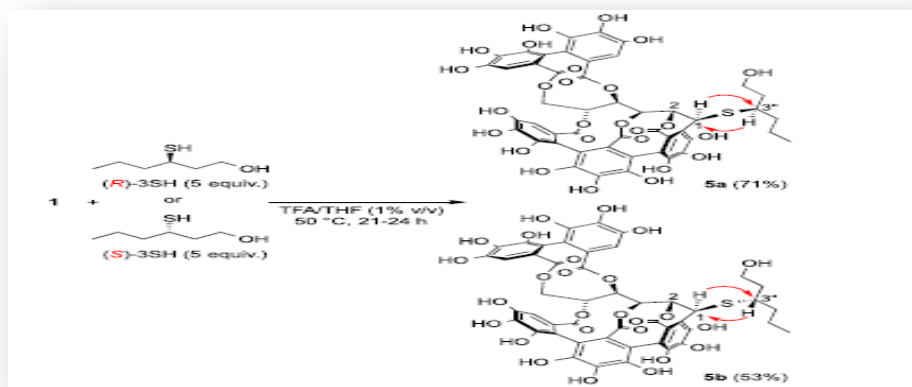
Τα κρασιά που ωριμάζουν σε δρύινα βαρέλια ή σε αδρανή δοχεία που περιέχουν δρύινα τσιπς έχουν σημαντικά ποσά C-γλυκοζιδικών ελλαγιτανινών. Αυτός ο τύπος μεταβολιτών δεν παραμένει αδρανής στο κρασί. Πιο συγκεκριμένα, υφίσταται διάφορες υδρολυτικές και οξειδωτικές μετατροπές και συμμετέχει σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης με άλλα συστατικά του κρασιού κατά τη διάρκεια της παλαίωσης και μέχρι την τελική κατανάλωση.

Για παράδειγμα, μερικές ελλαγιτανίνες, όπως η βεσκαλαγίνη, μπορούν να δεσμεύσουν αποτελεσματικά πυρηνόφιλα συστατικά από ελαφρά όξινο κρασί (pH περίπου 3-4), παρέχοντας ποικίλα συμπυκνωμένα προϊόντα τα οποία μπορούν να επιδράσουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού.

Οι C-γλυκοζιδικές ελλαγιτανίνες της δρυός μπορούν να παίξουν ρόλο στη μείωση των επιπέδων των θειολών του οίνου (2-φουρανομεθανοθειόλη (2-FMT), 3-σουλφανυλο-1-εξανόλη (3-SH)) κατά τη διάρκεια της παλαίωσης των οίνων σε δρύινα βαρέλια και σε φιάλες. Έτσι, σε μέτριας οξύτητας και σε οξυγονωμένα κρασιά, μία ελλαγιτανίνη δρυός όπως η βεσκαλαγίνη μπορεί αποτελεσματικά να παγιδεύσει την 2-FMT ή 3-SH με αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης.



Εικόνα 1.15 Αντίδραση της βεσκαλαγίνης με την 2-φουρανομεθανοθειόλη



Εικόνα 1.16 Αντίδραση της βεσκαλαγίνης με την 3-σουλφανυλο-1-εξανόλη (Petit et al., 2015)

Τα οργανοληπτικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με την παλαίωση του οίνου με χρήση δρύινων τσιπς μπορεί να διαφέρουν από τα αντίστοιχα της παλαίωσης με χρήση δρύινου βαρελιού. Αυτό μπορεί να προκύψει από την απουσία θέρμανσης που προκαλεί υδρόλυση των συστατικών εάν τα τσιπς δεν είναι ψημένα. Ακόμη η μειωμένη έκθεση στο οξυγόνο καθώς και οι διαφορές στη μικροβιακή τροποποίηση των συστατικών της δρυός κατά τη διάρκεια της φυσικής ξήρανσης του ξύλου ή κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του κρασιού είναι πιθανοί λόγοι.

Οι οίνοι που παλαιώνονται σε ψημένο ξύλο δρυός είναι γενικά πιο στυφοί και πιο πικροί. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στα υψηλότερα επίπεδα ελλαγιτανινών. Οι οίνοι με ελαφρά φρυγανισμένο ξύλο δρυός παρουσιάζουν την πιο πικρή γεύση και στυπτική αίσθηση στο στόμα, πιθανώς λόγω των αυξημένων ελλαγιτανινών σε αυτήν την ένταση ψησίματος.

Κατά την ωρίμανση του κρασιού σε δρύινο βαρέλι, η σχετική υγρασία επηρεάζει τους τύπους και τα ποσά των φαινολικών που εκχυλίζονται. Η χαμηλή σχετική υγρασία μειώνει τη συνολική πρόσληψη φαινολικών. Οι ελλαγιτανίνες από το δρύινο βαρέλι εκχυλίζονται ταχύτερα κατά τους τρεις πρώτους μήνες ενώ μετά από έξι μήνες παρατηρείται σημαντική μείωση. Ακόμη παρατηρείται ότι η δριμύτητα και η ένταση της πικρής γεύσης μειώνεται κατά τη διάρκεια του χρόνου επαφής. Η μείωση της αίσθησης στυφάδας θα μπορούσε να έχει προκληθεί από το σχηματισμό ενώσεων μεταξύ τανινών με πολυσακχαρίτες και πεπτίδια που εξέρχονται από το ξύλο της δρυός ή λόγω αντιδράσεων μεταξύ ελλαγιτανινών και μορίων του κρασιού.

Τα οξειδωτικά φαινόμενα στον οίνο που εμπλέκονται στο βαρέλι παλαίωσης δεν οφείλονται αποκλειστικά στην αύξηση της περιεκτικότητας του οξυγόνου. Οι

ελλαγιτανίνες που είναι διαλυμένες στο κρασί (κασταλαγίνη, βεσκαλαγίνη, ρομπουρίνες, κλπ), μειώνονται λόγω οξειδωτικών φαινομένων που καταλύονται από τις ίδιες τις ουσίες. Ακόμη και με απουσία του οξυγόνου, οι ελλαγιτανίνες είναι ικανές να τροποποιούν την τανινική δομή ενός οίνου.

Τέλος, οι ελλαγιτανίνες σε συνδυασμό με ανθοκυάνες επηρεάζουν τη σταθεροποίηση του χρώματος των ερυθρών οίνων (Jourdes et al., 2003).

1.3.8 Βιολογική δράση ελλαγιτικών τανινών

Όταν οι πολυφαινόλες είναι γλυκοσυλιωμένες ή με την μορφή πολυμερών δεν μπορούν να απορροφηθούν από τον οργανισμό. Οι ενώσεις αυτές θα πρέπει να υδρολυθούν για να μπορέσουν να απορροφηθούν. Το πρώτο στάδιο του μεταβολισμού τους είναι η απομάκρυνση του σακχάρου η οποία δεν συμβαίνει από τα ένζυμα του στομάχου αλλά από τα εντερικά ένζυμα όπως είναι τις β-γλυκοσιδάσες καθώς και από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου.

Οι πολυμερείς πολυφαινόλες όπως οι τανίνες έχοντας μεγάλο μοριακό βάρος δεν μπορούν να απορροφηθούν εύκολα. Κάτω από τις όξινες συνθήκες του στομάχου ή από την μικροχλωρίδα του εντέρου υδρολύονται σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους που είναι ευκολότερο να απορροφηθούν.

Πιο συγκεκριμένα, στο στομάχι δεν μπορούν να απορροφηθούν οι ελλαγιτανίνες λόγω της σύνθετης χημικής δομής τους. Οι εστερικοί δεσμοί των ελλαγιτανινών υδρολύονται σχετικά αργά στο πεπτικό σύστημα απελευθερώνοντας ελλαγιτικό οξύ το οποίο μπορεί να απορροφηθεί. Το ελλαγιτικό οξύ εμφανίζει σημαντικές βιολογικές ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιυικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές.

Ειδικότερα, όταν οι ελλαγιτανίνες εκτίθενται σε οξέα ή βάσεις, οι εστερικοί δεσμοί υδρολύονται και απελευθερώνεται εξαυδροξυδιφαινικό οξύ (HHDP). Ωστόσο, το HHDP είναι ασταθές και χρειάζεται λακτονοποίηση για να σταθεροποιηθεί, οδηγώντας στο σχηματισμό μονομερούς (Aguilera-Carbó et al., 2008).

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων οφείλεται κυρίως στην αναγωγική τους ικανότητα. Αυτό είναι σημαντικό για την ουδετεροποίηση των ελεύθερων ριζών. Δεδομένου αυτής της ικανότητας των πολυφαινολών, τα ελλαγιτανικά μόρια ωφελούν την υγεία του ανθρώπου. Έτσι, η συμμετοχή των ελλαγιτανινών στην πρόληψη εκφυλιστικών ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι

καρδιαγγειακές παθήσεις αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (Manach και Scalbert, 2004, Madrigal et al, 2009). Οι μελέτες έδειξαν ότι η ακουτισιμίνη A είναι 250 φορές πιο αποτελεσματική από το φάρμακο ετοποσίδη, στη διακοπή της ανάπτυξης καρκινικών όγκων.

Επιπλέον, έχουν γίνει μελέτες για τις ελλαγιτανίνες που επιβεβαιώνουν τη συνεισφορά τους στην καταπολέμηση μικροοργανισμών (βακτηρίων, μυκήτων και ιών) και τους αποδίδουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι ελλαγιτανίνες οφείλουν την αντιμικροβιακή τους ικανότητα στην ιδιότητά τους να σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες εμποδίζοντας την μικροβιακή ανάπτυξη.

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη HIV-1 του νουκλεοκαψιδίου (NC) είναι μια συνοδός πρωτεΐνη νουκλεϊκού οξέος που εμπλέκεται σε διάφορα στάδια του κύκλου αναδιπλασιασμού του ιού και είναι ένας ελκυστικός νέος στόχος για την ανάπτυξη φαρμάκων. Οι πολυφαινόλες ακουτισιμίνες A και B ταυτοποιήθηκαν *in vitro*, ως ισχυροί αναστολείς της δράσης της NC, σε διάφορες δοκιμασίες.

Αναλυτικότερα, οι ακουτισιμίνες A και B είναι φλαβανοελλαγιτανίνες οι οποίες βρίσκονται στο κρασί που ωριμάζει σε δρύινα βαρέλια. Παρουσίασαν διαφορετικούς μηχανισμούς αναστολής της πρωτεΐνης και υψηλότερη ισχύ σε σχέση με τα επιμερή τους, επιακουτισιμίνη A και B, καθώς και με απλούστερες δομές που εκπροσωπούν κυρίως υδρολυτικά θραύσματα και μεταβολίτες τους.

Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη ότι οι μονάδες που απαρτίζουν τα παραπάνω μόρια είναι απλούστερες πολυφαινόλες, οι οποίες βρίσκονται κι αυτές στο κρασί αλλά βρέθηκαν να έχουν περιορισμένη ή καμία απολύτως δραστηριότητα. Ωστόσο, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ακουτισιμινών στο κρασί (0,30-0,40 mg / L) αποκλείουν ρητά κάθε ισχυρισμό ότι το κρασί μπορεί να χρησιμεύσει ως εναλλακτική θεραπεία για τον ιό HIV.

Η μελέτη της δραστηριότητας της βεσκαλαγίνης και της επιμερούς κασταλαγίνης έναντι του NC έδειξε αμελητέα δράση των μορίων. Επιπλέον, η βεσκαλίνη, η κασταλίνη και η κατεχίνη βρέθηκαν ανενεργές. Έτσι, φάνηκε ο σημαντικός ρόλος της υψηλής δομικής πολυπλοκότητας, που περιλαμβάνει το συνολικό μέγεθος και σχήμα, για την αναγνώριση της πρωτεΐνης στόχο. Ακόμη έχει δείχθει ότι οι ακουτισιμίνες και η βεσκαλαγίνη επάγουν ειδική αναστολή δεσμευμένων πρωτεϊνών (τοποϊσομεράση II) με νουκλεϊκά οξέα.

Το ελλαγικό οξύ, που παράγεται από την υδρολυτική διάσπαση των μονάδων HHDP των ελλαγιτανινών, αναστέλλει τη δράση του NC. Ωστόσο, οι μεταβολίτες του

ελλαγικού οξέος, οι μονολακτονικές ουρολιθίνες, που είναι τα σημαντικότερα προϊόντα των ελλαγιτανινών, βρέθηκαν να μην έχουν δραστικότητα έναντι του NC.

Η χημική δομή των ελλαγιτανινών έχει αντίκτυπο στην υδρολυτική τους ευαισθησία. Ακόμη, ως ενώσεις με πολύπλοκη δομή, οι ελλαγιτανίνες εύκολα υφίστανται χημικές αντιδράσεις (μετατροπής, ισομερισμού και ολιγομερισμού). Η υδρολυτική ευαισθησία των ελλαγιτανινών και η δομική τους ποικιλομορφία οδηγούν σε οφέλη στην υγεία του ανθρώπου εφόσον είναι ενταγμένες στη διατροφή του (Klimczak και Król, 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο- ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΛΑΓΙΚΩΝ ΤΑΝΙΝΩΝ

2.1 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY-HPLC)

2.1.1 Θεωρία

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης (High Pressure Performance Liquid Chromatography-HPLC) είναι μία μορφή χρωματογραφίας στήλης βελτιωμένη. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος και την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους.

Στην υγρή χρωματογραφία χαμηλής πίεσης, ο διαλύτης για να περάσει από τη στήλη βασίζεται στη δύναμη της βαρύτητας ενώ στην HPLC ο διαλύτης ωθείται μέσω υψηλών πιέσεων (50 – 400 bar) κι άρα κινείται ταχύτερα.

Λόγω της μικρής ποσότητας δείγματος που χρησιμοποιείται προς διαχωρισμό στην HPLC, οι τυπικές διαστάσεις της στήλης είναι 2,1–4,6 mm διάμετρος και 30–250 mm μήκος. Η στήλη είναι κατασκευασμένη με σωματίδια προσρόφησης 2–50 μm δίνοντας στην HPLC υψηλότερη αναλυτική ικανότητα στο διαχωρισμό μιγμάτων.

Ο διαχωρισμός των συστατικών του υπό εξέταση δείγματος στηρίζεται στην ύπαρξη αντλιών από τις οποίες περνάει υπό πίεση ο υγρός διαλύτης (κινητή φάση) μέσω μιας στήλης πληρωμένης με ένα στερεό προσροφητικό υλικό (στατική φάση).

Αναλυτικότερα, η στατική φάση είναι στερεό πορώδες υλικό ή υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα και αποτελείται από σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας, μικρής διαμέτρου 2-50 μm και μεγάλης αντίστασης (π.χ. σιλικόνη, πολυμερή κ.λπ.).

Η κινητή φάση είναι υγρό, διαλύτης ή σύστημα από δύο έως τέσσερις διαλύτες, π.χ. νερό, ακετονιτρίλιο και / ή μεθανόλη. Η διαβίβαση της κινητής φάσης γίνεται με χρήση αντλιών υψηλής πίεσης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα της παροχής της (ταχύτητα ροής). Επιπλέον, η σύνθεσή της και η θερμοκρασία παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία διαχωρισμού καθώς επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του δείγματος και του μέσου προσρόφησης. Πιο συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις αυτές συμβαίνουν

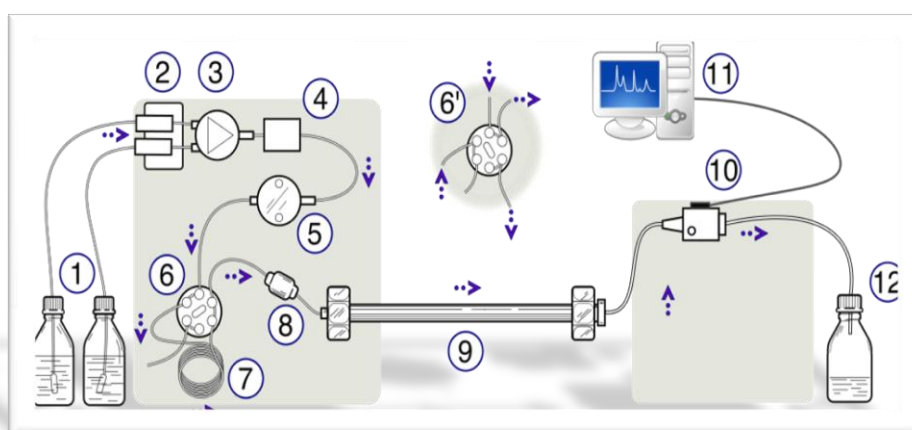
φυσικά στη φύση και είναι υδρόφοβες, διπόλου – διπόλου, υδρογόνου και ιοντικές ενώ πιο συχνά είναι συνδυασμός αυτών.

Κάθε συστατικό του δείγματος αλληλεπιδρά διαφορετικά με το προσροφητικό υλικό, προκαλώντας διαφορετικούς ρυθμούς ροής για τα διάφορα συστατικά και καταλήγοντας στο διαχωρισμό τους καθώς αυτά ρέουν έξω από τη στήλη. Επομένως, η HPLC στηρίζεται στην ισορροπία κατανομής του δείγματος μεταξύ στατικής και κινητής φάσης (διαλύτης).

Οι μηχανισμοί διαχωρισμού σε αυτό το είδος χρωματογραφίας είναι τα φαινόμενα προσρόφησης, κατανομής και ιονανταλλαγής. Απαραίτητη προϋπόθεση για τον διαχωρισμό είναι το δείγμα να μοιάζει χημικά, ως προς την πολικότητα, με τη στατική φάση και να διαφέρει ως προς αυτή με την κινητή φάση (Snyder L.S. et al, 1997).

Η HPLC χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς αλλά και στη βιομηχανία. Στην οινολογία γίνεται χρήση της HPLC για τον προσδιορισμό φαινολικών συστατικών, σακχάρων, οξέων, αμινοξέων και γενικά συστατικών, τα οποία δεν είναι πτητικά. Γενικότερα, μπορεί να διαχωρίσει και να συνεισφέρει στον ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ενώσεων (Gerber et al, 2004, Τσακίρης, 1998).

2.1.2 Οργανολογία - Λειτουργία HPLC



Εικόνα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση μονάδας HPLC. (1) Δοχεία διαλυτών, (2) Απαερωτής διαλύτη, (3) Βαλβίδα βαθμίδωσης, (4) Δοχείο ανάμιξης για διανομή της κινητής φάσης, (5) Αντλία υψηλής πίεσης, (6) Βαλβίδα διακόπτη σε θέση ένεσης, (6')

Βαλβίδα διακόπτη σε θέση γεμίματος, (7) Κύκλωμα ένεσης δείγματος, (8) Προστήλη (στήλη ασφαλείας), (9) Στήλη ανάλυσης, (10) Ανιχνευτής (π.χ.. IR, UV), (11) Καταγραφή δεδομένων, (12) Συλλέκτης αποβλήτων ή κλασμάτων

Η οργανολογία της HPLC (Εικ. 2.1) μπορεί να περιλαμβάνει σύστημα αυτόματης δειγματοληψίας, καθώς επίσης προστήλη, στήλη, σύστημα αντλίας, ανιχνευτή και υπολογιστή. Ο δειγματολήπτης φέρνει το μίγμα στην έξοδο κινητής φάσης, η οποία το μεταφέρει μέσα στη στήλη. Οι αντλίες διανέμουν την επιθυμητή ροή και σύνθεση της κινητής φάσης μέσω της στήλης.

Ο ανιχνευτής παράγει ένα σήμα ανάλογο της ποσότητας του συστατικού του δείγματος που εξέρχεται από τη στήλη, επιτρέποντας έτσι την ποσοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος. Ο χρόνος εξόδου είναι χαρακτηριστικός για κάθε συστατικό και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος που αναλύεται. Ένας ψηφιακός μικροεπεξεργαστής και λογισμικό ελέγχουν το όργανο της HPLC και παρέχουν ανάλυση δεδομένων.

Με την αντλία μπορεί να συνδυαστεί:

- σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), όπου μπορεί να γίνει ανάμιξη πολλαπλών διαλυτών σε διάφορες αναλογίες οι οποίες αλλάζουν με το χρόνο, συνεπώς αλλάζει βαθμιαία η σύσταση της κινητής φάσης
- σύστημα ισοκρατικής έκλουσης κατά το οποίο η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση

Ο χρόνος που απαιτείται για να ταξιδέψει ένα συγκεκριμένο συστατικό από τη στήλη έως τον ανιχνευτή ονομάζεται χρόνος συγκράτησής του και μετράται από τη στιγμή που γίνεται δειγματοληψία (ένεση) έως τη στιγμή στην οποία η οθόνη δείχνει το μέγιστο ύψος κορυφής για αυτό το συστατικό. Τα διαφορετικά συστατικά έχουν διαφορετικούς χρόνους συγκράτησης και για κάθε συστατικό ο χρόνος αυτός εξαρτάται από:

- την πίεση που χρησιμοποιείται, καθώς επηρεάζει το ρυθμό ροής του διαλύτη
- τη φύση της στατικής φάσης, όχι μόνο από τι είναι φτιαγμένο το υλικό αλλά και από το μέγεθος των σωματιδίων
- την ακριβή σύσταση του διαλύτη
- τη θερμοκρασία της στήλης

Στην περίπτωση χρησιμοποίησης των χρόνων συγκράτησης ως μέθοδο ταυτοποίησης συστατικών, οι συνθήκες πρέπει να ελέγχονται πολύ προσεκτικά.

Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής φάσης διακρίνεται σε :

- Κανονικής φάσης (normal phase), όπου η στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλύονται τελευταίες από την στήλη. Με αύξηση της πολικότητας του διαλύτη, ελαττώνεται ο χρόνος κατακράτησης των συστατικών
- Ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου το μέγεθος της στήλης είναι ίδιο με της κανονικής φάσης, αλλά η στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών. Αυτή η μορφή HPLC είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη

Ανάλογα με τη φύση του δείγματος που πρόκειται να αναλυθεί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές: φωτόμετρο UV-Vis, διαφορικό διαθλασίμετρο, φθορισμόμετρο, ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, φασματόμετρο μαζών.

Το φωτόμετρο UV-Vis είναι ο συνηθέστερος τύπος ανιχνευτή για την HPLC. Οι ουσίες, που αναλύονται με αυτόν τον τύπο, πρέπει να απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 200-800 nm. Σε αυτόν τον ανιχνευτή υπάρχουν τρία είδη: ο ανιχνευτής σταθερού μήκους κύματος, ο ανιχνευτής πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος και ο ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος.

Ο ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος βοηθά στη διαπίστωση της καθαρότητας μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή εάν αυτή οφείλεται σε μια μόνο ουσία. Το διαφορικό διαθλασίμετρο καταγράφει τις διαφορές στο δείκτη διάθλασης μεταξύ καθαρού διαλύτη και προϊόντων, ενώ το φθορισμόμετρο χρησιμοποιείται για ανάλυση ουσιών που φθορίζουν. Ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (αμπερομετρικός) χρησιμοποιείται στο διαχωρισμό ουσιών που ανάγονται ή οξειδώνονται. Τέλος το φασματόμετρο μαζών θραυματοποιεί τη χημική ένωση και προσδιορίζει τα ιοντικά θραύσματα.

Με το καταγραφικό το σήμα του ανιχνευτή μετατρέπεται σε καμπύλη (χρωματογράφημα). Στα σύγχρονα συστήματα HPLC ο καταγραφέας έχει αντικατασταθεί από ηλεκτρονικό υπολογιστή και εκτυπωτή. Η θέση της καμπύλης καθορίζεται από το είδος του συστατικού, σε συγκεκριμένο πρόγραμμα του οργάνου, και το εμβαδόν της είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του συστατικού αυτού στο δείγμα. Με το χρωματογράφημα δίνονται: ο χρόνος συγκράτησης t_R , το εμβαδόν της

καμπύλης και η εκατοστιαία σύσταση των συστατικών του δείγματος. Τα μεγέθη αυτά χρησιμοποιούνται στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων.

Στην HPLC μπορεί να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός ποικιλοτρόπως, δηλαδή με τον κατάλληλο συνδυασμό των δύο φάσεων, τη βαθμιδωτή έκλουση, όπου η σύσταση (πολικότητα) της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία, τη χρήση ποικιλίας ανιχνευτών ανάλογα με τη φύση του δείγματος, την επιλογή βέλτιστης ταχύτητας ροής της κινητής φάσης, τη χρήση μικρότερων κόκκων πλήρωσης και πιο ομοιόμορφων στη χρωματογραφική στήλη και την ελάττωση του μεγέθους του δείγματος.

2.2 ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR)

2.2.1 Βασικές αρχές

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infra Red spectroscopy, IR) είναι μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, είτε ολόκληρα είτε ορισμένες ταινίες απορρόφησής τους με άλλα γνωστά. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές η ταυτοποίηση αγνώστων οργανικών ουσιών, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Για το λόγο αυτό η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην οργανική και φαρμακευτική χημεία, στη φαρμακογνωσία και στην ανάλυση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων, τροφίμων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.α.

Η υπέρυθρη (IR) περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm) και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: Άπω υπέρυθρη (Far IR, FIR) (50-1000 μm), μέσο υπέρυθρη (Mid IR, MIR) (2,5-50 μm) και εγγύς υπέρυθρη (Near IR, NIR) (0,75-2,5 μm). Συνήθως όμως στο IR αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού ($\bar{\nu}$) ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός ($\nu/c=1/\lambda$). Έτσι, με βάση τα παραπάνω, η συνήθης περιοχή του MIR, καλύπτει την περιοχή 4000-400 cm^{-1} . Η πλέον αξιοποιήσιμη περιοχή είναι αυτή από 4000 έως 600 cm^{-1} .

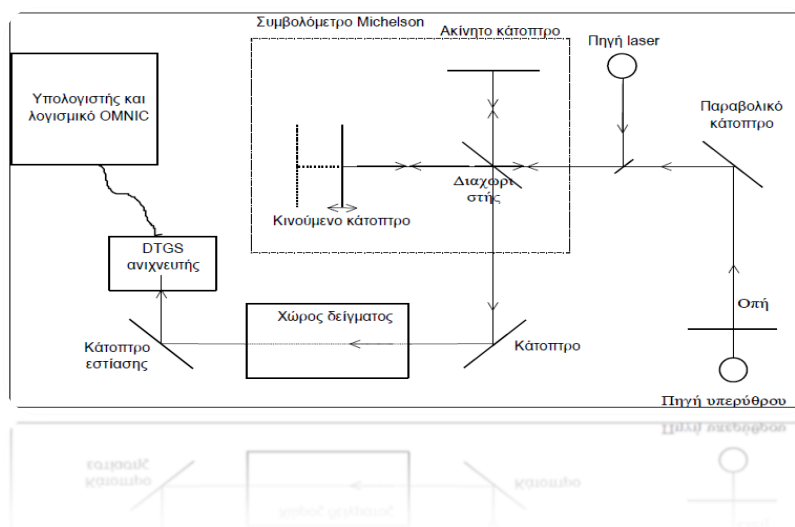
Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο προκαλεί διεγέρσεις στις δονήσεις των ατόμων σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες. Απαραίτητη όμως προϋπόθεση για την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής του κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός. Έτσι εξηγείται το γεγονός ότι τα πολύ συμμετρικά μόρια δεν απορροφούν στη περιοχή αυτή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Οι δονήσεις είναι δονήσεις τάσης, στις οποίες μεταβάλλεται μόνο το μήκος του δεσμού, και δονήσεις κάμψης στις οποίες μεταβάλλεται μόνον η γωνία μεταξύ των δεσμών.

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνουμε δύο κυρίως περιοχές. Τη περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (O-H, NH₂, C≡N, C=O κλπ) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στη περιοχή 4000-1400 cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, η δε δεύτερη στην περιοχή 1400-600 cm⁻¹ στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολοκλήρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το «δακτυλικό αποτύπωμα» κάθε ένωσης.

Στην παραπάνω περιοχή (από 4000-600 cm⁻¹), που συνήθως χρησιμοποιείται στο IR, η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο "θόρυβος" να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία αυτή των κοινών φασματοφωτομέτρων υπερνικήθηκε με την φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR).

2.2.2 Οργανολογία φασματοφωτομέτρου FT-IR

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα: την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας, την πηγή λέιζερ, το συμβολόμετρο Michelson και τον ανιχνευτή. Στην εικόνα φαίνεται το σχηματικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series).



Εικόνα 2.2 Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR της εταιρείας Nicolet (750 Magna series)

Πηγή ακτινοβολίας

Η λυχνία νικελίου – χρωμίου (Nicrome) είναι η πλέον γνωστή πηγή ακτινοβολίας για συστήματα μικρού κόστους. Είναι μικρής ισχύος και αερόψυκτη. Η θερμοκρασία που αναπτύσσει είναι 1200 – 1250 °C και εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία στην περιοχή του μέσο-υπερύθρου. Το μειονεκτήματα της πηγής αυτής είναι ότι έχει μικρή σταθερότητα και σχετικά μικρή περίοδο ζωής.

Πηγή λέιζερ

Η παραγωγή της ακτίνας λέιζερ γίνεται με τη διέγερση ατόμων ηλίου και νέου (HeNe).

Συμβολόμετρο Michelson

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR είναι χωρίς επιλογή μήκους κύματος αλλά η λειτουργία τους στηρίζεται στο φαινόμενο της συμβολής με τη βοήθεια ενός συμβολόμετρου Michelson. Ονομάστηκε έτσι προς τιμή του ανθρώπου που το κατασκεύασε (1891) και ασχολήθηκε με τη διαίρεση μιας φωτεινής δέσμης σε δύο.

Το συμβολόμετρο αποτελείται από μία ημιδιαφανή πλάκα (το διαχωριστή δέσμης) κατασκευασμένη από βρωμιούχο κάλιο, που δεν απορροφά στο υπέρυθρο, και δύο κάτοπτρα. Το ένα είναι σταθερό και το άλλο κινείται με σταθερή ταχύτητα.

Ανιχνευτής

Ο σκοπός του ανιχνευτή είναι να «αισθανθεί» την υπέρυθη ακτινοβολία, που έχει διέλθει μέσα από το δείγμα. Ένας από τους πιο συνηθισμένους τύπους ανιχνευτή, τον οποίο διαθέτει και το φασματοφωτόμετρο FT-IR της Nicolet (750 Magna series), είναι ο θερμικός, κατασκευασμένος από δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (Deuterated TriGlycine Sulfate, DTGS).

Η λειτουργία του ανιχνευτή αυτού στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, όταν δέχεται υπέρυθη ακτινοβολία. Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας δημιουργεί μια διαφορά δυναμικού. Οποιαδήποτε διακύμανση της ενέργειας της υπέρυθρης ακτινοβολίας, λόγω απορρόφησης από το δείγμα, εκφράζεται από τον ανιχνευτή σαν μεταβολή τάσης και σαν τέτοια την στέλνει στη συνέχεια στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Ανιχνευτές αυτού του είδους έχουν τα πλεονεκτήματα ότι ανταποκρίνονται σε μεγάλη περιοχή του υπέρυθρου, παράγουν μικρό «θόρυβο» και δεν χρειάζονται ψύξη. Τα μειονεκτήματά τους είναι η σχετικά μικρή ευαισθησία τους και ο σχετικά μεγάλος χρόνος απόκρισής τους.

2.2.3 Λειτουργία φασματοφωτομέτρου FT-IR

Η πηγή εκπέμπει υπέρυθη ακτινοβολία η οποία μέσω ενός παραβολικού κατόπτρου προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης. Εκεί διαχωρίζεται σε δύο δέσμες εκ των οποίων η μία τον διαπερνά και προσπίπτει στο κινούμενο κάτοπτρο και η άλλη κατευθύνεται στο ακίνητο. Οι δύο δέσμες επιστρέφουν στο διαχωριστή δέσμης όπου λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της συμβολής και προκύπτει μια συνελιγμένη δέσμη.

Το διπλάσιο της διαφοράς των αποστάσεων των δύο κατόπτρων, άρα των διαδρομών των δύο δεσμών, ονομάζεται καθυστέρηση και συμβολίζεται με το ελληνικό γράμμα δ . Όταν $\delta = k\lambda$ (όπου $k=0,1,2,\dots$ και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας) τότε το σήμα παίρνει τη μέγιστη τιμή ενώ όταν $\delta = (2k+1)\lambda/2$ τότε το σήμα μηδενίζεται. Σε κάθε άλλη περίπτωση το σήμα λαμβάνει ενδιάμεση τιμή.

Η πηγή εκπέμπει μια σειρά από συχνότητες μονοχρωματικής ακτινοβολίας (ν_1, ν_2, \dots), οι οποίες ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία δημιουργούν ένα περίπλοκο σήμα, τη συνολική συνελιγμένη δέσμη, που στην πραγματικότητα αποτελείται από ένα μίγμα ακτινοβολιών.

Η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του δείγματος. Από το δείγμα απορροφώνται ολικά ή μερικά ορισμένες συχνότητες και ακολούθως η δέσμη εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Στον ανιχνευτή προκαλείται μεταβολή στη θερμοκρασία του, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαφοράς δυναμικού.

Η μεταβολή της τάσης μετατρέπεται από αναλογικό σε ψηφιακό σήμα για να γίνει αντιληπτό από τον υπολογιστή και με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού (OMNIC ver. 8.2.0.387) λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Το συμβολόγραμμα υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier και τελικά εμφανίζεται σαν τυπικό FT-IR φάσμα.

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR μπορούν, χάρις στο συμβολόμετρο, να εξετάζουν ταυτόχρονα πολλά σημεία του φάσματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε 10-20 s και επαναλαμβάνεται συνήθως 20-100 φορές. Το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των επαναλήψεων “σαρώσεων” που έχουν εκτελεστεί. Με αυτόν τον τρόπο όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο «θόρυβος» μειώνεται και οι εντάσεις των απορροφήσεων βελτιώνονται σημαντικά.

Η εξασφάλιση ότι το συμβολόγραμμα εξετάζει κάθε φορά τα ίδια σημεία του φάσματος γίνεται με τη βοήθεια μονοχρωματικής ακτινοβολίας λέιζερ. Η εξέταση πολλών ταυτόχρονα σημείων προσδίδει σε αυτού του τύπου τα φασματοφωτόμετρα πολύ μεγάλη ταχύτητα. Σε αντίθεση στα συμβατικά φασματοφωτόμετρα IR, κάθε σημείο εξετάζεται διαδοχικά και μια φορά.

Η καταγραφή φασμάτων με το μετασχηματισμό Fourier παρουσιάζει, εκτός της υψηλής ταχύτητας καταγραφής, τα πλεονεκτήματα της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και του χαμηλού «θορύβου». Επιπλέον μπορούν να αφαιρεθούν ή να προστεθούν δύο φάσματα, να μεγεθυνθεί τμήμα του φάσματος, να διορθωθεί η βασική γραμμή κλπ.

Αρνητικοί παράγοντες στην ποιότητα των μεσο-FT-IR φασμάτων είναι: α) η υγρασία του δείγματος και β) η υγρασία του χώρου τοποθέτησης του δείγματος. Η υγρασία του δείγματος πρέπει να είναι όσο το δυνατόν χαμηλή. Αυτό σε μεγάλο βαθμό μπορεί να λυθεί με την τεχνική της λυοφιλίωσης των δειγμάτων. Η υγρασία του χώρου του δείγματος μειώνεται με την τοποθέτηση μέσα σ' αυτόν αφυδραντικών (π.χ. silica gel) ή τη διαβίβαση ξηρού αέρα ή αζώτου.

Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, το φάσμα που καταγράφεται «λαμβάνει υπόψη» του και εκείνα τα αέρια συστατικά που

απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί και διοξείδιο του άνθρακα). Για το λόγο αυτό πριν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος καταγράφεται φάσμα αναφοράς.

Το φάσμα αναφοράς λαμβάνεται με τον υποδοχέα του δείγματος χωρίς δείγμα, αλλά περιέχοντας κατά περίπτωση βρωμιούχο κάλιο ή το διαλύτη διάλυσης του δείγματος ή μόνον τον ατμοσφαιρικό αέρα. Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια αφαιρείται αυτόματα, με τη βοήθεια του λογισμικού, από το συνολικό φάσμα.

Πριν από την καταγραφή φασμάτων πρέπει να γίνεται ευθυγράμμιση των οπτικών μερών του φασματοφωτομέτρου. Η διαδικασία αυτή γίνεται αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού του οργάνου. Κύρια η ευθυγράμμιση αποσκοπεί στο να είναι οι γωνίες που σχηματίζει ο διαχωριστής δέσμης με το κινούμενο και το ακίνητο κάτοπτρο ίσες.

2.2.4 Μετασχηματισμός Fourier

Το σήμα που στέλνει η πηγή υπέρυθρου είναι συνάρτηση συχνοτήτων και συνεπώς κυματαριθμών. Όταν το σήμα εισέλθει στο συμβολόμετρο υπόκειται σε συμβολή με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Ο τύπος όμως της συμβολής ουσιαστικά εξαρτάται από την καθυστέρηση του κινουμένου κατόπτρου και επομένως το συμβολόγραμμα, είναι συνάρτηση της καθυστέρησης και ως τέτοια φθάνει στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένα μαθηματικό «εργαλείο» με τη βοήθεια του οποίου το συμβολόγραμμα μετασχηματίζεται ξανά σε συνάρτηση κυματαριθμών με βάση τον τύπο

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) e^{-i2\pi\bar{\nu}\delta} d\delta$$

όπου $B(\bar{\nu})$ η συνάρτηση των κυματαριθμών, όπως αυτοί εκπέμπονται από την πηγή, και $I(\delta)$ η συνάρτηση καθυστέρησης. Ο παραπάνω τύπος αποτελεί το γρήγορο μετασχηματισμό Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) όπως αυτός διαμορφώθηκε από τους Cooley και Tukey και με τη βοήθεια του οποίου ο αριθμός των σημείων που εξετάζονται και υπόκεινται στο μετασχηματισμό είναι μειωμένος και επομένως η όλη διαδικασία γίνεται ταχύτερη.

Ουσιαστικά με το μετασχηματισμό Fourier προκύπτουν όλες οι συχνότητες της περιοχής του υπέρυθρου φάσματος που μελετάται. Δηλαδή τα κενά των

συχνοτήτων που απορροφήθηκαν από το δείγμα (μερικά ή ολικά) μετασχηματίζονται μαζί με τις συχνότητες που δεν απορροφήθηκαν, σε τυπικό IR φάσμα.

2.2.5 Χαρακτηριστικοί παράμετροι της φασματοσκοπίας FT-IR

Διαχωριστική ικανότητα

Ως διαχωριστική ικανότητα ορίζεται η ικανότητα του οργάνου να ξεχωρίζει κορυφές απορρόφησης που αντιστοιχούν σε πολύ κοντινούς κυματαριθμούς. Η χρήσιμη διαχωριστική ικανότητα ξεκινά από 10 cm^{-1} και φθάνει σε ορισμένα όργανα τα $0,06\text{ cm}^{-1}$. Συνήθως χρησιμοποιείται αυτή των 4 cm^{-1} και η οποία επιλέγεται πριν από την καταγραφή του φάσματος.

Λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio, RSN)

Η ποιότητα ενός φάσματος καθώς και η αξιολόγησή του εξαρτάται από τον "θόρυβο" που παρουσιάζει. Ως «θόρυβος» εννοούνται όλα εκείνα τα σήματα τα οποία καταγράφονται και δεν ανταποκρίνονται σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος αλλά σε άλλους λόγους. Για να αξιολογηθούν τα σήματα χρησιμοποιείται ο όρος «λόγος σήματος προς θόρυβο».

Η αξιολόγηση του RSN επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό της τετραγωνικής ρίζας του μέσου όρου του αθροίσματος των τετραγώνων (Root Mean Square, RMS) των RSN όλων των σημείων μίας περιοχής για την οποία υπάρχει απόλυτη βεβαιότητα ότι δεν υπάρχει κορυφή που να αποδίδεται στο δείγμα. Μια τέτοια περιοχή είναι αυτή μεταξύ 2050 και 1950 cm^{-1} . Το RMS υπολογίζεται με τη χρήση αλγορίθμων. Ένας από τους αλγόριθμους που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι και αυτός των Savitsky-Golay.

Η αξιολόγηση όμως δεν είναι εύκολη υπόθεση και γίνεται πάντα σε συνδυασμό με την απόδοση της κορυφής αυτής σε κάποια δόνηση. Ο RSN είναι αντιστρόφως ανάλογος της τετραγωνικής ρίζας του αριθμού των επαναλήψεων. Επομένως αυξανόμενου του αριθμού των επαναλήψεων ο θόρυβος μειώνεται.

Οι κυριότερες αιτίες που δημιουργούν θόρυβο οφείλονται α) στην κατάσταση του δείγματος, το οποίο όταν είναι σε στερεά κατάσταση ή δεν έχει διαλυθεί πλήρως στο διαλύτη διαχέει μέρος της προσπίπτουσας σε αυτό ακτινοβολίας, β) στην πηγή, γ) στο συμβολόμετρο, δ) στον ανιχνευτή, ε) στην ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος

(αποδισμός), στ) στην υψηλή διαχωριστική ικανότητα που έχει ζητηθεί και ζ) σε διάφορους θορύβους ηλεκτρονικής ή τυχαίας φύσης.

Ο RMS βοηθά στην αξιολόγηση μιας κορυφής, μικρής έντασης, αν είναι πραγματική κορυφή, δηλαδή κορυφή που οφείλεται στο δείγμα, ή πρόκειται για θόρυβο. Υπολογίζεται από το λογισμικό που συνοδεύει όλα τα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier.

Υψηλή διαχωριστική ικανότητα οδηγεί σε αύξηση του θορύβου ενώ όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο θόρυβος μειώνεται. Όμως ο αυξημένος αριθμός επαναλήψεων οδηγεί σε αύξηση του χρόνου καταγραφής του φάσματος. Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα παραμένει εκτιθέμενο στην υπέρυθη ακτινοβολία για περισσότερο χρόνο με κίνδυνο, ανάλογα με τη σύστασή του, να υποστεί αλλοιώσεις.

Αποδισμός

Το κινούμενο κάτοπτρο του συμβολομέτρου, έχει μια μέγιστη καθυστέρηση (Δ) και όχι άπειρη. Έτσι η καθυστέρηση δ κυμαίνεται μεταξύ $-\Delta$ και $+\Delta$ και επομένως το συμβολόγραμμα, το οποίο είναι μια ατέλειωτη σειρά, πρέπει να περιοριστεί σε όσες πληροφορίες βρίσκονται μεταξύ $-\Delta$ και Δ . Αυτό επιτυγχάνεται θεωρώντας κάθε πληροφορία που υπάρχει στα όρια αυτά πολλαπλασιασμένη επί 1 και κάθε άλλη επί 0.

Με τη μαθηματική αυτή τεχνική, γνωστή σαν “boxcar truncation”, γίνεται η ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος η οποία όμως οδηγεί στο σχηματισμό λοβών γύρω από τις κορυφές ενός φάσματος. Η μείωση του φαινομένου αυτού λέγεται αποδισμός, από την ελληνική λέξη α-ποδός (=χωρίς πόδια) επειδή οι λοβοί ονομάζονται και «πόδια». Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται είναι ενσωματωμένος, κατά κανόνα, στο λογισμικό που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο FT-IR.

Για τη διαδικασία του αποδισμού, το φασματοφωτόμετρο της Nicolet (750 Magna series) χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο Happ-Genzel η εξίσωση του οποίου είναι

$$A(\delta) = 0,54 + 0,46 \cos \pi \frac{\delta}{\Delta}$$

όπου δ η καθυστέρηση και Δ η μέγιστη καθυστέρηση.

2.2.6 Επεξεργασία των φασμάτων FT-IR

Οι συνήθεις επεξεργασίες που γίνονται στα FT-IR φάσματα είναι η εξομάλυνση του σήματος, η διόρθωση της βασικής γραμμής, η κανονικοποίηση και ο μέσος όρος φασμάτων. Οι επεξεργασίες αυτές αποσκοπούν στη βελτίωση της εικόνας του φάσματος και βοηθούν στους ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς.

Αυτόματη εξομάλυνση (Automatic smooth)

Με την εξομάλυνση δεν απομακρύνεται ο θόρυβος αλλά μειώνεται αισθητά χωρίς να παραποιείται η εικόνα του φάσματος, με βάση μία μαθηματική επεξεργασία με αποτέλεσμα να βελτιώνεται ο λόγος RSN. Για την βελτίωση του RSN χρησιμοποιείται η διαδικασία του RMS, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο των Savitsky-Golay. Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιεί ένα πολυωνυμικό μοντέλο, τις πληροφορίες για το RSN επιλεγμένων σημείων και με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων προσαρμόζει την καμπύλη του φάσματος. Η λειτουργία “αυτόματη εξομάλυνση” του λογισμικού Omnic 8.2.0.387 των φασματομέτρων της εταιρείας Nicolet, χρησιμοποιεί τον παραπάνω αλγόριθμο με πολυωνυμικό μοντέλο δευτέρου βαθμού και πέντε επιλεγμένα σημεία.

Διόρθωση βασικής γραμμής (Automatic baseline correct)

Η βασική γραμμή των φασμάτων FT-IR συνήθως αποτελείται και από σημεία των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν, γι' αυτό συνήθως γίνεται διόρθωσή της. Η διόρθωση της βασικής γραμμής δεν γίνεται μόνον για λόγους εμφάνισης των φασμάτων, αλλά είναι αναγκαία όταν πρόκειται να συγκριθούν δύο φάσματα ή να χρησιμοποιηθούν για ποσοτική ανάλυση.

Η διόρθωση της βασικής γραμμής γίνεται είτε με αυτόματη διαδικασία από το λογισμικό είτε καθοδηγούμενη. Στη δεύτερη περίπτωση οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η γραμμική, της κυβικής σφήνας και η πολυωνυμική.

Στην γραμμική τεχνική επιλέγονται τα σημεία τα οποία θεωρούνται ότι έ-χουν απορρόφηση μηδέν και όλο το φάσμα προσαρμόζεται κατάλληλα, ενώ στην τεχνική της κυβικής σφήνας, διαδοχικές ομάδες τεσσάρων σημείων υπόκεινται σε προσαρμογή τριτοβάθμιου πολυωνύμου. Τέλος με την πολυωνυμική τεχνική, γίνεται προσαρμογή της γραμμής βάσης σε πολυώνυμο ο βαθμός του οποίου αυξάνει (με μέγιστο βαθμό 6) ανάλογα με τα σημεία που επιλέγονται.

Κανονικοποίηση (Normalize scale)

Με την κανονικοποίηση αλλάζει η κλίμακα του άξονα Y ενός φάσματος. Οι τιμές των δεδομένων του άξονα Y θα κυμαίνονται από 0 για το χαμηλότερο σημείο μέχρι 1 για την υψηλότερη κορυφή σε μονάδες απορρόφησης ή από 10% έως 100% για την διαπερατότητα. Έτσι, μπορεί να γίνει σύγκριση στα ύψη των κορυφών των φασμάτων πολλαπλασιάζοντας με έναν συντελεστή που κάνει τα φάσματα συγκρίσιμα. Οι κανονικές κλίμακες είναι οι τυπικές κλίμακες των φασμάτων σε εμπορικές φασματικές βιβλιοθήκες.

Μέσος όρος φασμάτων

Το λογισμικό του οργάνου έχει τη δυνατότητα να υπολογίζει το μέσο όρο φασμάτων. Η λειτουργία αυτή επιτρέπει την καταγραφή περισσότερων του ενός φασμάτων και στη συνέχεια τον υπολογισμό του μέσου όρου των φασμάτων. Το μέσο φάσμα είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικό.

3.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ (PARTIAL LEAST SQUARES, PLS)

3.1.1 Γενικά

Η Μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares- PLS) αναπτύχθηκε από τον Herman Wold ως οικονομετρική τεχνική. Έχει εφαρμογή σε πολιτικές επιστήμες στον τομέα της οικονομίας, υπολογιστική χημεία στην οργανοληπτική αξιολόγηση, βιοπληροφορική, τρόφιμα, ιατρική, φαρμακολογία, κοινωνικές επιστήμες, κ.α.

Η PLS διακρίνεται σε δυο συσχετιζόμενες μεθόδους, τη συμμετρική PLS ή PLSC (Partial Least Squares Correlation) και την ασύμμετρη PLS ή PLSR (Partial Least Squares Regression). Η μέθοδος PLSC βρίσκει αποκλειστικά εφαρμογή στη νευροαπεικόνιση.

Η μέθοδος PLS είναι συνδυασμός τόσο της Παλινδρόμησης Κυρίων Συνιστωσών όσο και της Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης. Σε περιπτώσεις όπου οι παράγοντες (μεταβλητές) είναι λίγοι σε αριθμό, μη συγγραμμικοί και έχουν μια καλά κατανοητή σχέση με τις αποκρίσεις χρησιμοποιείται η Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση. Ωστόσο όταν τουλάχιστον μια από τις παραπάνω προϋποθέσεις δεν ισχύει χρησιμοποιείται η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων.

Η γενική ιδέα της PLS είναι η εξαγωγή των λανθανουσών μεταβλητών, δηλαδή των συνιστωσών του X, οι οποίες ερμηνεύουν το μέγιστο της διασποράς στην απόκριση και προβλέπουν με τον καλύτερο τρόπο το Y. Πολύ βασικό είναι αυτές οι συνιστώσες να ερμηνεύουν τη μέγιστη δυνατή συνδυασπορά μεταξύ των X και Y.

Ο σκοπός του ερευνητή που χρησιμοποιεί τη μέθοδο PLS είναι να δημιουργήσει ένα κατάλληλο μοντέλο για πρόβλεψη αποκρίσεων. Αυτό προκύπτει από ένα πολύ μεγάλο αριθμό μεταβλητών (αρκετά μεγαλύτερος από τον αριθμό των παρατηρήσεων) που ενδέχεται να είναι άκρως συγγραμμικοί και χωρίς να γίνεται κατανοητή η σχέση τους.

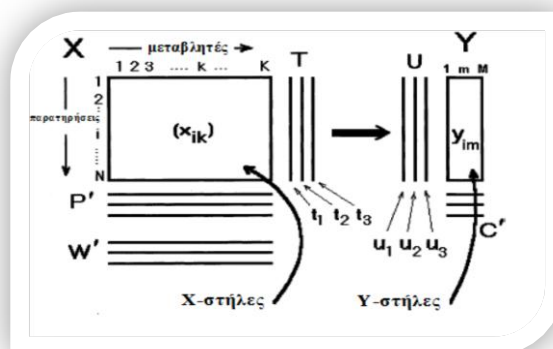
Η PLS χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπική ανάλυση ως μέθοδος βαθμονόμησης για την εκτίμηση της ποσότητας διαφόρων ενώσεων σε ένα χημικό δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβλητές είναι οι μετρήσεις που περιλαμβάνουν το

φάσμα και μπορούν να ανέρχονται σε εκατοντάδες ή και χιλιάδες ενώ πολύ πιθανόν να είναι κι εξαιρετικά συγγραμμικές. Τέλος, οι αποκρίσεις συσχετίζονται με τη συγκέντρωση του συστατικού που προβλέπεται στα νέα δείγματα.

Η PLS προτείνεται στις περιπτώσεις όπου το μέγεθος του δείγματος είναι μικρό. Η εξομοίωση Monte Carlo που πραγματοποιήθηκε από τους Chin και Newsted (1999) έδειξε ότι η PLS μπορεί να εκτελεστεί με μέγεθος δείγματος ακόμα και 50 (Chin, Marcolin, Newsted, 2003).

3.1.2 Το μοντέλο PLS

Αρχικά, ονομάζουμε K τις ανεξάρτητες μεταβλητές (προβλέπουσες) των N παρατηρήσεων που συλλέγονται στον πίνακα X και M τις εξαρτημένες μεταβλητές (αποκρίσεις) των N παρατηρήσεων που συλλέγονται στον πίνακα Y . Τα δεδομένα αυτά υπόκεινται σε διαδικασία μετασχηματισμού (Wold et al., 2001).



Εικόνα 3.1 Ο αλγόριθμος PLS

Κατόπιν βρίσκονται οι νέες μεταβλητές που καλούνται X-scores και είναι εκτιμήτριες των λανθανουσών μεταβλητών. Οι X-scores είναι οι εκτιμήσεις t_a , $a=1,2,\dots$, όπου a ο αριθμός των συνιστωσών, κι είναι ορθογώνια. Ακόμη, είναι προβλέπουσες του πίνακα Y , μοντελοποιούν τον πίνακα X και είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών X_k μεταβλητών με τους συντελεστές (βάρη) που ονομάζονται W^*_{ka} , $a=1,2,\dots, A$.

$$T_{ia} = \sum X_{ik} W^*_{ka}$$

Αναλυτικότερα, η μέθοδος PLS δουλεύει με το να εξάγει ένα παράγοντα τη φορά. Έστω $X=X_0$ είναι ο πίνακας των μέσων πρόβλεψης και $Y=Y_0$ είναι ο πίνακας

των τιμών απόκρισης. Η PLS μέθοδος ξεκινά με ένα γραμμικό συνδυασμό $t=X_0w$ των μέσων πρόβλεψης όπου t ονομάζεται το score διάνυσμα και το w είναι το συσχετιζόμενο με αυτό διάνυσμα βάρους. Η μέθοδος PLS προβλέπει τόσο το X_0 όσο και το Y_0 με τη παλινδρόμηση σε t :

$$\hat{X}_0 = tp', \text{ όπου } p' = (t't)^{-1}t'X_0$$

$$\hat{Y}_0 = tc', \text{ όπου } c' = (t't)^{-1}t'Y_0$$

Τα διανύσματα p και c ονομάζονται X και Y -loadings (φορτία) αντίστοιχα. Ο ειδικός γραμμικός συνδυασμός $t=X_0w$ είναι αυτός που έχει τη μέγιστη συνδιακύμανση του με μερική απόκριση γραμμικού συνδυασμού $u=Y_0q$. Ένα άλλο χαρακτηριστικό είναι ότι τα w και q που είναι βάρη των X και Y αντίστοιχα, είναι ανάλογα με τα πρώτα αριστερά και δεξιά μοναδικά διανύσματα της μήτρας συνδιακύμανσης $X_0'Y_0$ ή ισοδύναμα τα πρώτα ιδιοδιανύσματα των $X_0'Y_0Y_0'X_0$ και $Y_0'X_0X_0'Y_0$ αντίστοιχα.

Αυτό εξηγεί πώς εξάγεται ο πρώτος PLS παράγοντας. Ο δεύτερος παράγοντας εξάγεται με τον ίδιο τρόπο με την αντικατάσταση του X_0 και του Y_0 με τα X και Y υπόλοιπα από τον πρώτο παράγοντα:

$$X_1 = X_0 - \hat{X}_0$$

$$Y_1 = Y_0 - \hat{Y}_0$$

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όσους εξαγόμενους παράγοντες επιθυμούμε.

Εξ ορισμού οι προγνωστικοί παράγοντες και οι αποκρίσεις είναι κεντραρισμένες και κλιμακώνονται για να έχουν μέση τιμή 0 και τυπική απόκλιση 1. Το κεντράρισμα στους προγνωστικούς παράγοντες (λανθάνων διανύσματα) και στις αποκρίσεις εξασφαλίζει ότι το κριτήριο για την επιλογή διαδοχικών παραγόντων βασίζεται στο πόση διακύμανση εξηγούν είτε στους προγνωστικούς παράγοντες είτε στις αποκρίσεις είτε και στα δύο.

Χωρίς κεντράρισμα τόσο η μέση τιμή της μεταβλητής όσο και η διακύμανση γύρω από αυτό το μέσο εμπλέκονται στην επιλογή παραγόντων. Η κλιμάκωση (scaling) χρησιμεύει για να τοποθετήσουμε όλα τα προγνωστικά και απαντήσεις επί ίσοις όροις σε σχέση με την διακύμανσή τους στα δεδομένα. Για παράδειγμα, αν ο χρόνος και η θερμοκρασία είναι δύο από τους παράγοντες πρόβλεψης, στη συνέχεια, η κλιμάκωση λέει ότι η αλλαγή του std (Time) στο χρόνο είναι περίπου ισοδύναμη με την αλλαγή του std (Temp) στο Temp.

3.1.3 Η Γεωμετρική ερμηνεία του μοντέλου PLS

Η Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων ερμηνεύεται ως η προβολή ενός πίνακα X , με N σημεία σε χώρο διάστασης K , η οποία είναι υπερεπίπεδο διάστασης A , έτσι ώστε οι συντεταγμένες της προβολής δηλαδή τα X -scores να είναι καλές προβλέπουσες του Y .

Η κατεύθυνση του επιπέδου εκφράζεται με τη μορφή κλίσεων δηλαδή το συνημίτονο της γωνίας μεταξύ της κάθε κατεύθυνσης κάθε συνιστώσας του επιπέδου και κάθε άξονα συντεταγμένων X_k .



Εικόνα 3.2 Γεωμετρική αναπαράσταση της PLS

3.1.4 Αλγόριθμοι PLS

Οι αλγόριθμοι που υπάρχουν για τον υπολογισμό του μοντέλου PLSR είναι ο NIPALS (nonlinear iterative partial least squares - μη γραμμικά επαναληπτικά μερικά ελάχιστα τετράγωνα), ο Kernel καθώς και διάφορες παραλλαγές ανάλογα με τα δεδομένα. Ο αλγόριθμος NIPALS έχει προταθεί από τον Word, τον Sjostrom και τον Eriksson (2001). Πιο αναλυτικά, ο αλγόριθμος NIPALS, χρησιμοποιεί τους αρχικούς πίνακες X και Y , με τα δεδομένα τυποποιημένα και κεντροποιημένα, ενώ ο αλγόριθμος Kernel χρησιμοποιεί τους πίνακες διασποράς-συνδυασποράς, $X^T X$, $Y^T Y$ και $X^T Y$.

3.1.5 Αλγόριθμος NIPALS

Αρχικά έχουμε τα δεδομένα των πινάκων X και Y τα οποία είναι ενδεχομένως τυποποιημένα και κεντροποιημένα. Εάν έχουμε μια μόνο Y -μεταβλητή ο αλγόριθμος δεν είναι επαναληπτικός.

1° Βήμα

Παίρνουμε ένα αρχικό διάνυσμα y , που συνήθως είναι μια στήλη του Y και το ονομάζουμε u .

2° Βήμα

Υπολογίζουμε τα X -βάρη, w , όπου:

$$w = \frac{X^T u}{u^T u}$$

3° Βήμα

Υπολογίζουμε τα X -scores, t :

$$t = Xw$$

4° Βήμα

Υπολογίζουμε τα Y -βάρη, c :

$$c = \frac{Y^T t}{t^T t}$$

5° Βήμα

Υπολογίζουμε ένα νέο πλήθος Y -scores, u :

$$u = \frac{Yc}{c^T c}$$

6° Βήμα

Ελέγχουμε τη σύγκλιση του t . Υπολογίζουμε την ποσότητα:

$$\frac{\|t_{old} - t_{new}\|}{\|t_{new}\|}$$

Εάν η ποσότητα είναι μικρότερη από μια προκαθορισμένη μικρή ποσότητα ϵ , όπου ϵ της τάξεως του 10^{-6} ή του 10^{-8} , τότε η σύγκλιση επιτυγχάνεται. Εάν δεν συγκλίνει

επιστρέφουμε στο 2 βήμα, ενώ αν συγκλίνει συνεχίζουμε στο 7 βήμα και μετά στο 1 βήμα. Στην περίπτωση ύπαρξης μιας μόνο Y μεταβλητής, δηλαδή $M=1$, η διαδικασία συγκλίνει σε μια μόνο επανάληψη και ακολουθείται το 7 βήμα.

7^ο Βήμα

Αφαιρούμε την τρέχουσα συνιστώσα από τα X και Y και κατόπιν χρησιμοποιούμε αυτούς τους πίνακες ως X και Y πίνακες στην επόμενη συνιστώσα. Η διαδικασία αυτή είναι προαιρετική όσον αφορά τον Y πίνακα αφού τα αποτελέσματα παραμένουν ίδια.

$$p = \frac{X^T t}{t^T t}$$

$$X = X - tp^T$$

$$Y = Y - tc^T$$

8^ο Βήμα

Συνεχίζουμε με την επόμενη συνιστώσα (επιστροφή στο Βήμα 1^ο) μέχρι η τεχνική Cross-Validation να υποδείξει ότι δεν υπάρχει περαιτέρω σημαντική πληροφορία στον X σχετικά με τον Y .

3.1.6 Η επαναληπτική διαδικασία PRESS

Ο βέλτιστος αριθμός των κύριων συνιστωσών επιλέγεται με τη μέθοδο της διασταυρωμένης επικύρωσης (Cross Validation, CV) σε συνδυασμό με την επαναληπτική διαδικασία του προβλεπόμενου υπολοίπου του αθροίσματος των τετραγώνων των σφαλμάτων (Predicted Residual Error Sum of Squares, PRESS).

Αρχικά, επιλέγεται η πρώτη κύρια συνιστώσα. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τη μέθοδο του CV, τα δεδομένα των πινάκων X και Y χωρίζονται σε ένα συγκεκριμένο αριθμό m ομάδων (συνήθως 5-10). Στη συνέχεια, αφαιρείται η πρώτη ομάδα από τα δεδομένα και κατασκευάζεται το μοντέλο βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας τις υπόλοιπες $m-1$ ομάδες. Οι τιμές που προβλέπει το μοντέλο που προέκυψε, για τα στοιχεία του πίνακα Y που έμειναν εκτός της διαδικασίας κατασκευής του μοντέλου βαθμονόμησης, \hat{y}_{im} , συγκρίνονται με τις πραγματικές τους τιμές y_{im} δίνοντας έτσι την τιμή της παραμέτρου PRESS:

$$PRESS = \sum_i \sum_m (y_{im} - \hat{y}_{im})^2$$

Ακολούθως χρησιμοποιείται και η δεύτερη κύρια συνιστώσα και προσδιορίζεται και πάλι η τιμή του PRESS. Η διαδικασία είναι επαναληπτική και συνεχίζεται m φορές, δηλαδή μέχρι να απορριφθεί κάθε τιμή του Y μία φορά. Αν με την προσθήκη της δεύτερης κύριας συνιστώσας προκύπτει μικρότερη τιμή για το PRESS, η διαδικασία συνεχίζεται με την εισαγωγή και τρίτης κύριας συνιστώσας.

Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν προκύψει κύρια συνιστώσα η οποία προκαλεί την αύξηση της τιμής του PRESS, οπότε και διατηρούνται όλες οι πριν από αυτήν κύριες συνιστώσες. Επομένως, ένα αρκετά ικανοποιητικό μοντέλο θα απαιτούσε οι τιμές PRESS να προσεγγίζουν το μηδέν, κάτι που σημαίνει ότι $\hat{y}_{im} \rightarrow y_{im}$ κάνοντας το μοντέλο να προβλέπει πολύ καλά νέες τιμές (άγνωστα δείγματα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

4.1.1 Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των ελλαγιικών τανινών σε ελληνικούς οίνους με την τεχνική της φασματοσκοπίας του μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) και χημειομετρικές μεθόδους. Πιο συγκεκριμένα, θα επιχειρηθεί η ανάπτυξη φασματοσκοπικής μεθόδου εκτίμησης της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών στον οίνο με τη στατιστική μέθοδο PLS. Η προτεινόμενη μέθοδος θα αξιολογηθεί με την αντίστοιχη του HPLC και με βάση το στατιστικό πακέτο (TQ Analyst) που θα χρησιμοποιηθεί.

4.1.2 Οργανόγραμμα μελέτης

Αρχικά, έγινε συλλογή των εμφιαλωμένων ελληνικών ερυθρών οίνων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατάλληλη επεξεργασία στα δείγματα (συμπύκνωση, όξινη υδρόλυση) για να γίνει η ανάλυσή τους με την τεχνική του HPLC. Έτσι, επιτεύχθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός των ελλαγιτανινών για κάθε δείγμα οίνου.

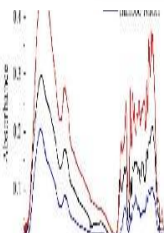
Ακολούθησε η καταγραφή των FT-IR φασμάτων των δειγμάτων οίνου με την τεχνική της φασματοσκοπίας του μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR). Στη συνέχεια, τα φάσματα του FT-IR επεξεργάστηκαν (λείανση – διόρθωση της βασικής τους γραμμής) με το λογισμικό OMNIC (εταιρεία Thermo, έκδοση 7.3). Έπειτα, έγινε λήψη του μέσου φάσματος για κάθε οίνο με χρήση του παραπάνω λογισμικού. Τα επεξεργασμένα φάσματα εισήχθησαν στο λογισμικό πακέτο TQ Analyst και έγινε αντιστοίχιση με τις συγκεντρώσεις ελλαγιτανινών που προέκυψαν από το HPLC. Με χρήση της παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) συνδυάστηκαν τα δεδομένα.



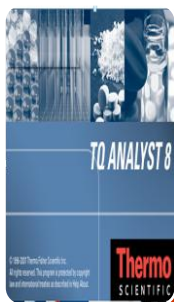
Εμφιαλωμένοι ερυθροί ελληνικοί οίνοι



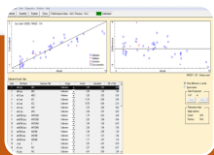
1. Συμπύκνωση των δειγμάτων μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα
2. Επαναδιάλυση με μεθανόλη και υδρόλυση με υδροχλωρικό οξύ
3. Ανάλυση με HPLC και ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος
4. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ελλαγικού οξέος και σχεδιασμός καμπύλης βαθμονόμησης
5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ελλαγικών τανινών με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης και τα εμβαδά των δειγμάτων οίνου στα 370 nm



1. Ξήρανση των δειγμάτων στους 40 °C (1,5 ώρες)
2. Καταγραφή και επεξεργασία φασμάτων FT-IR



1. Συνδιασμός των επεξεργασμένων φασμάτων και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων ελλαγιτανινών από το HPLC με χρήση της στατιστικής μεθόδου PLS και του TQAnalyst
2. Δημιουργία μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των ελλαγικών τανινών



Αξιολόγηση της νέας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των ελλαγικών τανινών

Εικόνα 4.1 Στάδια πειραματικής διαδικασίας

4.1.3 Πρώτες ύλες - Δείγματα

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πενήντα εμφιαλωμένοι ελληνικοί ερυθροί οίνοι από τρύγο του 2013. Αναλυτικότερα, οι δεκατέσσερις φιάλες με οίνο ποικιλίας Monterulciano, προέρχονταν από το κτήμα Κυρ-Γιάννη της περιοχής του Αμύνταιου. Οι δεκαπέντε φιάλες ξινόμαυρου προέρχονταν από το οινοποιείο Σεμέλη στη Νάουσα κι οι υπόλοιπες εικοσιμία φιάλες με αγιοργίτικο προέρχονταν από την περιοχή της Νεμέας και οινοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ποικιλία ξινόμαυρο, μαζί με την ποικιλία αγιοργίτικο θεωρούνται οι ευγενέστερες ερυθρές ελληνικές ποικιλίες.

Για την ωρίμανση των οίνων χρησιμοποιήθηκαν τσιπς δρυός γαλλικά, αμερικάνικα, σλαβονικά καθώς και τσιπς ακακίας. Ορισμένα τσιπς είχαν μέτριο ψήσιμο (medium), Noisette ή καθόλου ψήσιμο. Ακόμη τα δείγματα διαφέρουν στην ποσότητα των τσιπς που έχουν μπει ανά λίτρο οίνου. Επιπλέον τα τσιπς στους διάφορους οίνους έχουν παραμείνει διαφορετικό χρονικό διάστημα οπότε και έγινε η δειγματοληψία (4,8,12 μήνες).

Πίνακας 4.1 Κωδικοί δειγμάτων οίνου, είδος καψίματος και ονομασία προέλευσης chips, ποικιλία και τύπος προέλευσης οίνου, οινοποιείο

| α/α | Κωδικός δείγματος | Ονομασία προέλευσης ξύλου (τσιπς) | Κάψιμο ξύλου (τσιπς) | Ποικιλία και προέλευση οίνου | Οινοποιείο |
|-----|-------------------|-----------------------------------|--|------------------------------|---|
| 1 | C | Μάρτυρας (χωρίς τσιπς) | Medium (2gr chips/L) | Αγιοργίτικο Νεμέας | Εργαστήριο Οινολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών |
| 2 | FR1 | Γαλλικά (δρυός) | Μήνας δειγματοληψίας: 12 1,2: επαναλήψεις | | |
| 3 | FR2 | Γαλλικά (δρυός) | | | |
| 4 | AM1 | Αμερικανικά (δρυός) | | | |
| 5 | AM2 | Αμερικανικά (δρυός) | | | |
| 6 | FA1 | Γαλλικά 50% + Αμερικανικά 50% | | | |
| 7 | FA2 | Γαλλικά 50% + Αμερικανικά 50% | | | |
| 8 | SL1 | Σλαβονικά (δρυός) | | | |
| 9 | SL2 | Σλαβονικά (δρυός) | | | |
| 10 | AC1 | Τσιπς Ακακίας | | | |

| | | | | | | | | |
|----|-----------|--|-------------------------------------|-------------------------|---------------------|--|--------------------------|--------|
| 11 | AC2 | Τσιπς Ακακίας | | | | | | |
| 12 | XB4 | Αριθμός τσιπς ξύλου δρυός: (18) ή (34) Μήνας δειγματοληψίας : 4, 8, 12 | MT:Medium N:Noisette B:Τίποτα | X: Ξινόμαυρο Νάουσας | Κτήμα Κυρ-Γιάννη | | | |
| 13 | XMT(18)4 | | | | | | | |
| 14 | XMT(34)4 | | | | | | | |
| 15 | XN(18)4 | | | | | | | |
| 16 | XN(34)4 | | | | | | | |
| 17 | XB8 | | | | | | | |
| 18 | XMT(18)8 | | | | | | | |
| 19 | XMT(34)8 | | | | | | | |
| 20 | XN(18)8 | | | | | | | |
| 21 | XN(34)8 | | | | | | | |
| 22 | XB12 | | | | | | | |
| 23 | XMT(18)12 | | | | | | | |
| 24 | XMT(34)12 | | | | | | | |
| 25 | XN(18)12 | | | | | | | |
| 26 | XN(34)12 | | | | | | | |
| 27 | AB4 | | | | | | A: Αγιωργίτικο Νεμέας | Σεμέλη |
| 28 | AMT(18)4 | | | | | | | |
| 29 | AMT(34)4 | | | | | | | |
| 30 | AN(18)4 | | | | | | | |
| 31 | AN(34)4 | | | | | | | |
| 32 | AB8 | | | | | | | |
| 33 | AMT(18)8 | | | | | | | |
| 34 | AMT(34)8 | | | | | | | |
| 35 | AN(18)8 | | | | | | | |
| 36 | AB12 | | | | | | | |
| 37 | MB4 | | M: Monterulciano Αμυνταίου | Κτήμα Άλφα | | | | |
| 38 | MMT(18)4 | | | | | | | |
| 39 | MMT(34)4 | | | | | | | |
| 40 | MN(18)4 | | | | | | | |
| 41 | MN(34)4 | | | | | | | |
| 42 | MMT(18)8 | | | | | | | |
| 43 | MMT(34)8 | | | | | | | |
| 44 | MN(18)8 | | | | | | | |
| 45 | MN(34)8 | | | | | | | |
| 46 | MB12 | | | | | | | |
| 47 | MMT(18)12 | | | | | | | |
| 48 | MMT(34)12 | | | | | | | |
| 49 | MN(18)12 | | | | | | | |
| 50 | MN(34)12 | | | | | | | |

4.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ -ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕ HPLC

4.2.1 Εξάτμιση -Συμπύκνωση

Η διαδικασία κατεργασίας των δειγμάτων για HPLC ξεκινάει με την εξάτμιση 50mL δείγματος οίνου μέχρι ξηρού, στους 50°C, με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτήρα (rotary evaporation). Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα μεθανόλης (MeOH). Στη συνέχεια μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 20mL και συμπληρώνεται ο όγκος με MeOH. Το αιώρημα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων συχνότητας 30 για 10 min.

4.2.2 Όξινη υδρόλυση

Για την παρασκευή του μάρτυρα (χωρίς υδρόλυση) μεταφέρθηκαν 2mL από το δείγμα οίνου σε ογκομετρική φιάλη των 5mL και συμπληρώθηκε ο όγκος με MeOH. Έπειτα, για την παρασκευή του δείγματος μεταφέρθηκαν σε δύο σωλήνες pyrex με πόμα από teflon (ο ένας χρησιμοποιείται ως επανάληψη) 4mL αιωρήματος στον καθένα. Στη συνέχεια, σε κάθε σωλήνα προστέθηκε 1mL πυκνό HCl 37% (v/v) και μεταφέρθηκαν σε ελαιόλουτρο στους 100°C όπου παρέμειναν για δύο ώρες. Τέλος, αφότου κρύωσαν οι σωλήνες τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 10mL και συμπληρώθηκαν μέχρι τη χαραγή με MeOH.

4.2.3 Ανάλυση δειγμάτων οίνου με HPLC

Έγινε φιλτράρισμα στα δείγματα και στο μάρτυρα με φίλτρο σύριγγας 0,2μm. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC (Jasco AS-1555) και ακολούθησε η χρωματογραφία.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η Pinnacle II C18 (5 μm, 4.6x250mm) (Restek) ενώ η κινητή φάση είναι νερό με 0,4% (v/v) μυρμηκικό οξύ (διαλύτης A) και μεθανόλη με 0,4% μυρμηκικό οξύ (v/v) (διαλύτης B). Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στο 1mL/min, ο όγκος έκχυσης του δείγματος στα 20μL, και η ανίχνευση στα 370nm. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι βαθμιδωτή έκλυση.

Πίνακας 4.2 Βαθμιδωτή έκλυση

| Χρόνος (min) | Διαλύτης Α (0,4% μυρμηκικό οξύ σε dH ₂ O) | Διαλύτης Β (0,4% μυρμηκικό οξύ σε MeOH) |
|------------------|---|--|
| αρχικές συνθήκες | 100 | 0 |
| 1 | 99 | 1 |
| 5 | 65 | 35 |
| 30 | 55 | 45 |
| 35 | 0 | 100 |
| 40 | 0 | 100 |
| 44 | 100 | 0 |

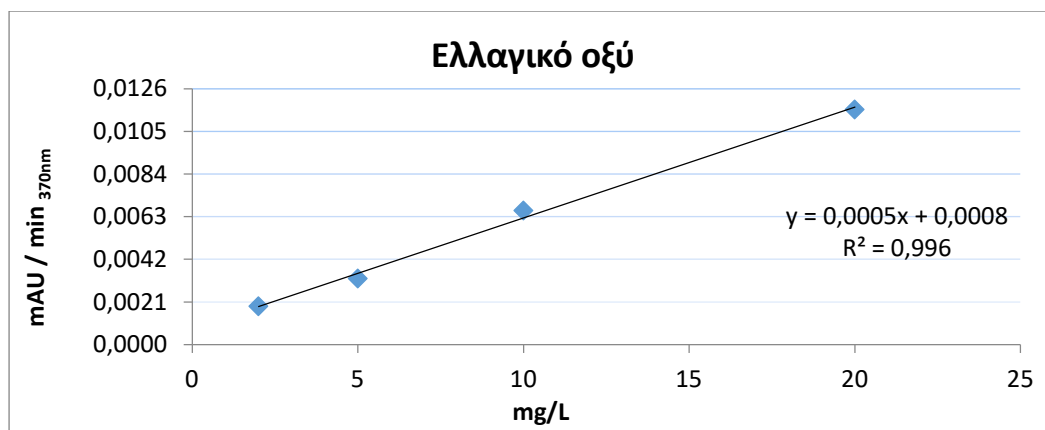
4.2.4 Βαθμονόμηση HPLC

Για τη ταυτοποίηση του ελλαγικού οξέος στα δείγματα οίνου συγκρίνεται ο χρόνος κατακράτησης με βάση την πρότυπη καμπύλη ελλαγικού οξέος. Για τη βαθμονόμηση της HPLC παρασκευάζεται ένα πρότυπο διάλυμα 100mg/L ελλαγικού οξέος σε διαλύτη Β και αραιώνεται σε τελικό όγκο 1mL.

Πίνακας 4.3 Βαθμονόμηση HPLC για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης ελλαγικού οξέος

| Τελική συγκέντρωση ελλαγικού οξέος (mg/L) | Πρότυπο διάλυμα ελλαγικού οξέος (μL) | Διαλύτης Β (0,4% (v/v) μυρμηκικό οξύ σε MeOH) (μL) |
|---|--------------------------------------|--|
| 2 | 20 | 980 |
| 5 | 50 | 950 |
| 10 | 100 | 900 |
| 20 | 200 | 800 |

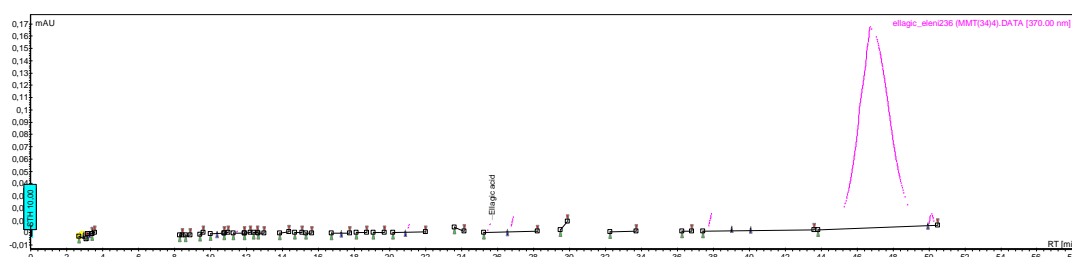
Στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις του ελλαγικού οξέος συσχετίζονται με τα αντίστοιχα εμβαδά της κορυφής του στο χρωματογράφημα και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη. Στη συνέχεια με χρήση της πρότυπης καμπύλης και αφαιρώντας τη συμμετοχή του μάρτυρα κάθε δείγματος, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του ελλαγικού στα δείγματα του κρασιού.



Εικόνα 4.2 Πρότυπη καμπύλη ελλαγικού οξέος

4.2.5 Μετρήσεις HPLC

Η συγκέντρωση των ελλαγικών τανινών προσδιορίστηκε σε όλα τα δείγματα με την ποσοτικοποίηση του ελλαγικού οξέος που απελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης.



Εικόνα 4.3 Τυπικό χρωματογράφημα δείγματος οίνου, στο οποίο φαίνεται η κορυφή του ελλαγικού οξέος

Πίνακας 4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των ελλαγικών τανινών (mg/L) με HPLC

| Κωδικός Δείγματος | Μέσος όρος συγκέντρωσης (mg/L) |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| ΚΤΗΜΑ ΚΥΡ-ΓΙΑΝΝΗ - ΞΙΝΟΜΑΥΡΟ | |
| XB4 | 0 |
| XMT(18)4 | 0 |
| XMT(34)4 | 0 |
| XN(18)4 | 0 |
| XN(34)4 | 0,47 |

| | |
|--|------|
| XB8 | 0,31 |
| XMT(18)8 | 0 |
| XMT(34)8 | 0 |
| XN(18)8 | 0 |
| XN(34)8 | 0,32 |
| XB12 | 0,92 |
| XMT(18)12 | 0,14 |
| XMT(34)12 | 0,26 |
| XN(18)12 | 0,28 |
| XN(34)12 | 0,38 |
| ΚΤΗΜΑ ΣΕΜΕΛΗ - ΑΓΙΩΡΓΗΤΙΚΟ | |
| AB4 | 2,04 |
| AMT(18)4 | 1,75 |
| AMT(34)4 | 1,84 |
| AN(18)4 | 1,60 |
| AN(34)4 | 1,72 |
| AB8 | 2,69 |
| AMT(18)8 | 2,62 |
| AMT(34)8 | 3,38 |
| AN(18)8 | 1,74 |
| AB12 | 3,29 |
| ΚΤΗΜΑ ΑΛΦΑ - ΜΟΝΤΕΡΟΥΛΚΙΑΝΟ | |
| MB4 | 3,97 |
| MMT(18)4 | 4,37 |
| MMT(34)4 | 4,39 |
| MN(18)4 | 5,56 |
| MN(34)4 | 7,53 |
| MMT(18)8 | 4,09 |
| MMT(34)8 | 5,34 |
| MN(18)8 | 7,45 |
| MN(34)8 | 6,34 |
| MB12 | 4,15 |
| MMT(18)12 | 3,89 |
| MMT(34)12 | 7,41 |
| MN(18)12 | 7,49 |
| MN(34)12 | 6,74 |
| ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ Γ.Π.Α - ΑΓΙΩΡΓΗΤΙΚΟ | |
| C | 4,52 |
| FR1 | 7,48 |
| FR2 | 5,84 |
| AM1 | 3,78 |
| AM2 | 3,94 |
| FA1 | 3,27 |

| | |
|-----|-------|
| FA2 | 4,41 |
| SL1 | 8,3 |
| SL2 | 5,76 |
| AC1 | 11,03 |
| AC2 | 10,78 |

4.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ -ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ FT-IR

4.3.1 Ξήρανση δειγμάτων οίνου

Οι οίνοι είναι εμφιαλωμένοι οπότε αρχικά αφαιρούμε το φερό του μπουκαλιού με ένα τριμπουσόν και αμέσως γεμίζουμε ένα ποτήρι ζέσεως με επαρκή ποσότητα. Στη συνέχεια, με τη χρήση πιπέτας παίρνουμε 100μL οίνου απο το ποτήρι ζέσεως και τα τοποθετούμε επάνω σε δισκίο ZnSe. Χρησιμοποιούμε συνολικά πέντε δισκία για κάθε οίνο, τα οποία τοποθετούνται σε ένα τρυβλίο. Το τρυβλίο αφήνεται σε κλίβανο στους 40°C όπου γίνεται ξήρανση του οίνου για δύο ώρες περίπου.



Εικόνα 4.3 Προετοιμασία δειγμάτων και τοποθέτηση για ξήρανση στο φούρνο

4.3.2 Καταγραφή και επεξεργασία των FT-IR φασμάτων των δειγμάτων

Τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν με φασματόμετρο υπερύθρου Thermo Nicolet 7600. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με το ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία τους. Εφαρμόστηκε η τεχνική δισκίου ZnSe.

Για κάθε οίνο καταγράψαμε 5 φάσματα. Πριν καταγράψουμε τα φάσματα, ελήφθη υπόβαθρο (background) με ZnSe ως φάσμα αναφοράς. Το υπόβαθρο λαμβανόταν σε κάθε αλλαγή του δείγματος. Οι παράμετροι καταγραφής των

φασμάτων ήταν: 100 «σαρώσεις», διαχωριστική ικανότητα του οργάνου 4 cm^{-1} , ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου $0,3165\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Όλα τα φάσματα που ελήφθησαν εξομαλύνθηκαν, έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής των φασμάτων και κανονικοποιήθηκε η κλίμακά τους. Οι επεξεργασίες αυτές έγιναν με τη βοήθεια των λειτουργιών αυτόματης εξομάλυνσης, αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής και κανονικοποίησης της κλίμακας του λογισμικού OMNIC 7.3. Ακόμη, με αυτό το λογισμικό λήφθηκε ο μέσος όρος τριών φασμάτων για κάθε δείγμα. Τα τρία φάσματα επιλέχθηκαν με το κριτήριο της ομοιότητας μεταξύ τους. Επομένως, ελήφθησαν 50 επεξεργασμένα μέσα φάσματα από τα 50 δείγματα (Παράρτημα).



Εικόνα 4.4 Φασματοόμετρο υπερύθρου Thermo Nicolet 7600

4.3.3 Φασματοσκοπική μελέτη

Σύμφωνα με τα επεξεργασμένα φάσματα των δειγμάτων παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται σε απορροφήσεις λόγω δονήσεων συγκεκριμένων ομάδων των ελλαγιτανικών μορίων. Από τη μελέτη της χημικής δομής των ελλαγιτανινών διακρίνουμε τις χαρακτηριστικές ομάδες οι οποίες είναι: αρωματικοί δακτύλιοι, -OH, -COO-, -C-O-C- (αιθερομάδα).

Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που αποδίδονται σε απορροφήσεις συγκεκριμένων ομάδων των υδρολυόμενων τανινών σύμφωνα με στοιχεία από τη διεθνή βιβλιογραφία. Για τις ελλαγιτανίνες δεν σημειώνονται χαρακτηριστικές κορυφές αλλά η παρουσία τους στο φάσμα σημειώνεται με την εύρεση των χαρακτηριστικών κορυφών των υδρολυόμενων τανινών (Arriana Ricci, Application).

Πίνακας 4.5 Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις - χαρακτηριστικές ομάδες των ταννινών (κοινές απορροφήσεις υδρολυόμενων και συμπυκνωμένων)

| Κυματαριθμός (cm ⁻¹) | Λειτουργική ομάδα και είδος δόνησης |
|----------------------------------|---|
| 1615-1606 (ισχυρή) | C=C , Αρωματικός δακτύλιος, δόνηση τάσης |
| 1518-1507 (ασθενής) | Δονήσεις (skeletal vibrations) αρωματικού δακτυλίου |
| 1452-1446 (ισχυρή) | C=C, Αρωματικός δακτύλιος, δόνηση τάσης |
| 1211-1196 (ισχυρή) | C-O, δόνηση τάσης |
| 1043-1030 (ισχυρή) | C-O, δόνηση τάσης |

Πίνακας 4.6 Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις - χαρακτηριστικές ομάδες των υδρολυόμενων ταννινών

| Κυματαριθμός (cm ⁻¹) | Λειτουργική ομάδα και είδος δόνησης |
|----------------------------------|---|
| 1731-1704 | Δονήσεις τάσης καρβονυλομάδας |
| 1600,1447 | C=C, συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσεως σε αρωματικό δακτύλιο |
| 1509 (μέτρια) | Φαινολικός δακτύλιος, εντός επιπέδου τάση παραμόρφωσης |
| 1325-1317 | C-O, συμμετρική δόνηση τάσης εστερομάδας |
| 1350,1145-1150 | Συνδυασμός δόνησης τάσης (C-O) και παραμόρφωσης (deformation motions) (-OH) στην καρβοξυλομάδα (COOH) |
| 1197,1032 | C-O, συμμετρική και αντισυμμετρική δόνηση τάσεως |
| 1077 | C-H, εντός επιπέδου αρωματικές κάμψεις |

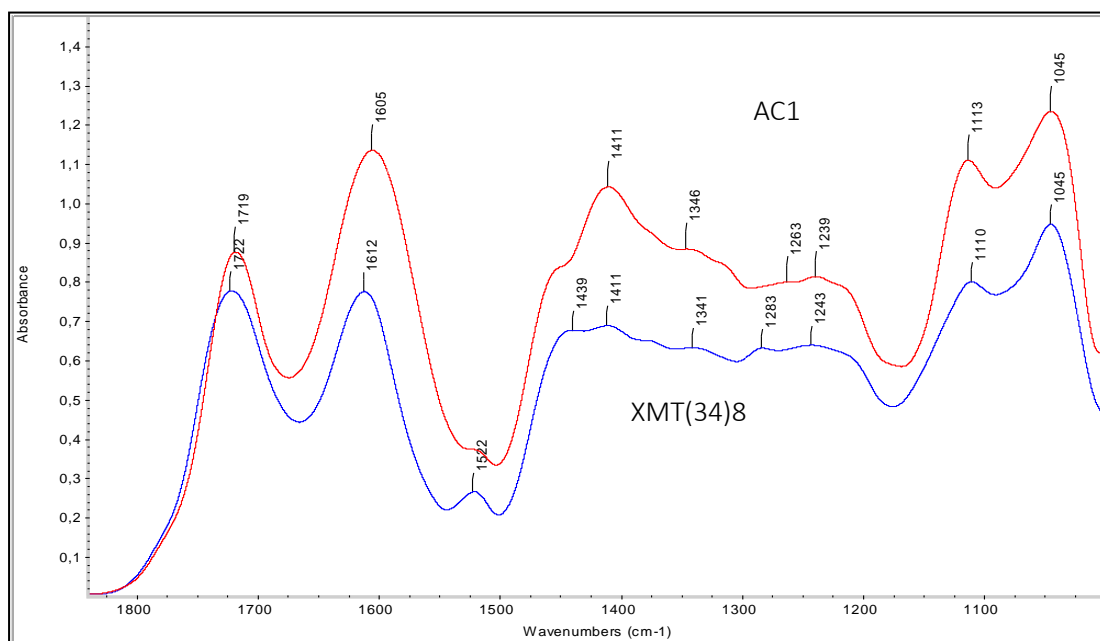
Πίνακας 4.7 Αντιπροσωπευτικές απορροφήσεις - χαρακτηριστικές ομάδες των συστατικών των υδρολυόμενων ταννινών

| | Κυματαριθμός (cm ⁻¹) | Λειτουργική ομάδα και είδος δόνησης |
|--------------|----------------------------------|---|
| Ελλαγικό οξύ | 1318 | Φαινολικός δακτύλιος, ισχυρή κορυφή |
| Γαλλικό οξύ | 1318 | Φαινολικός δακτύλιος, ισχυρή διπλή κορυφή |

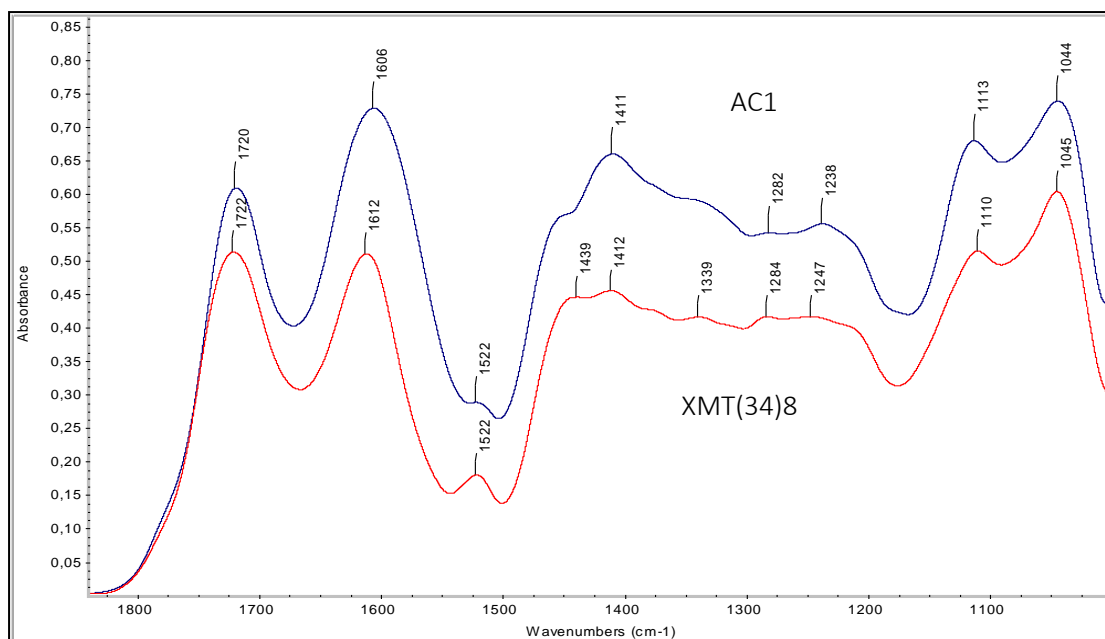
Γνωρίζοντας το δείγμα οίνου με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ελλαγιτανινών (AC1) καθώς και το δείγμα με τη μηδενική συγκέντρωση (XMT(34)8) από τα αποτελέσματα του HPLC τα επιλέγουμε και εξετάζουμε τα επεξεργασμένα (με smoothing ή normalized) φάσματά τους με το λογισμικό OMNIC 7.3.

Στην περιοχή $1840-1000\text{ cm}^{-1}$ απαντώνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των υδρολυόμενων τανινών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Έτσι, σημειώνονται οι κορυφές από τα επεξεργασμένα με smoothing φάσματα AC1 ($1719, 1605, 1411, 1346, 1263, 1239, 1113, 1045\text{ cm}^{-1}$) και XMT(34)8 ($1722, 1612, 1522, 1411, 1341, 1283, 1243, 1110, 1045\text{ cm}^{-1}$) αλλά και οι κορυφές από τα επεξεργασμένα με normalize φάσματα AC1 ($1720, 1606, 1522, 1411, 1282, 1238, 1113, 1044\text{ cm}^{-1}$) και XMT(34)8 ($1722, 1612, 1522, 1412, 1284, 1247, 1110, 1045\text{ cm}^{-1}$).

Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα βλέπουμε ότι το δείγμα AC1 (με την υψηλότερη συγκέντρωση ελλαγιτανινών) εμφανίζει υψηλότερες τιμές απορρόφησης σε όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές των υδρολυόμενων τανινών. Αυτό αποτελεί έμμεση απόδειξη για την καταλληλότητα της περιοχής $1840-1000\text{ cm}^{-1}$ για τη μελέτη των ελλαγιτανινών.



Εικόνα 4.5 Τα FT-IR φάσματα (επεξεργασμένα με smoothing) των δειγμάτων AC1 (περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ελλαγιτανινών) και XMT(34)8 (δεν περιέχει ελλαγιτανίνες) με τις κορυφές τους



Εικόνα 4.6 Τα FT-IR φάσματα (επεξεργασμένα με normalize) των δειγμάτων AC1(περιέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ελλαγικών τανινών) και XMT(34)8 (δεν περιέχει ελλαγικές τανίνες) με τις κορυφές τους

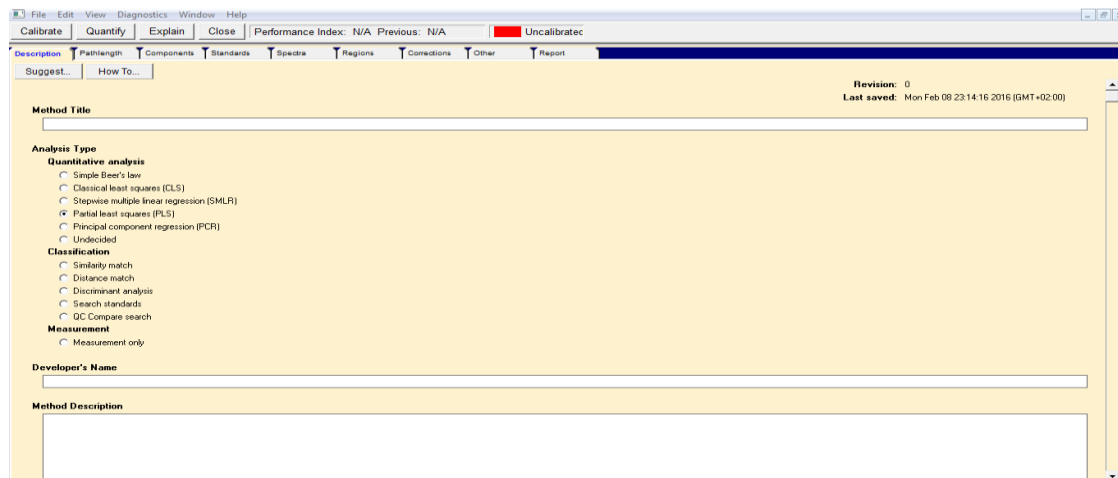
Στη φασματική περιοχή $1722-1702\text{ cm}^{-1}$ παρατηρούνται οι δονήσεις τάσης του C=O των εστέρων των υδρολυόμενων τανινών. Στην φασματική περιοχή $1611-1444\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των C=C-C αρωματικών, στην περιοχή $1368-1157\text{ cm}^{-1}$ και $1031-1023\text{ cm}^{-1}$ οι δονήσεις των C-O δεσμών και στη περιοχή $1134-1068\text{ cm}^{-1}$ οι δονήσεις παραμόρφωσης εντός επιπέδου του C-H. Ακόμη, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι υδρολυόμενες τανίνες δεν απορροφούν στα $1361-1340\text{ cm}^{-1}$ και $1284-1283\text{ cm}^{-1}$ όπου αποδίδεται απορρόφηση μόνο στις συμπυκνωμένες τανίνες λόγω της δόνησης τάσης του C-O πυρανοδακτυλίου (Dos Santos Grasel et al., 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

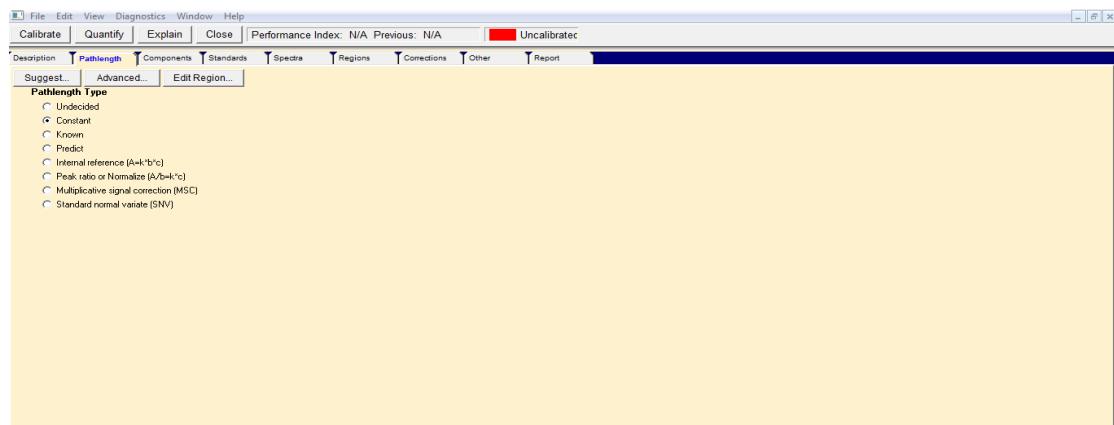
5.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ - TQ ANALYST

5.1.1 Εισαγωγή στοιχείων για στατιστική επεξεργασία στο TQ Analyst

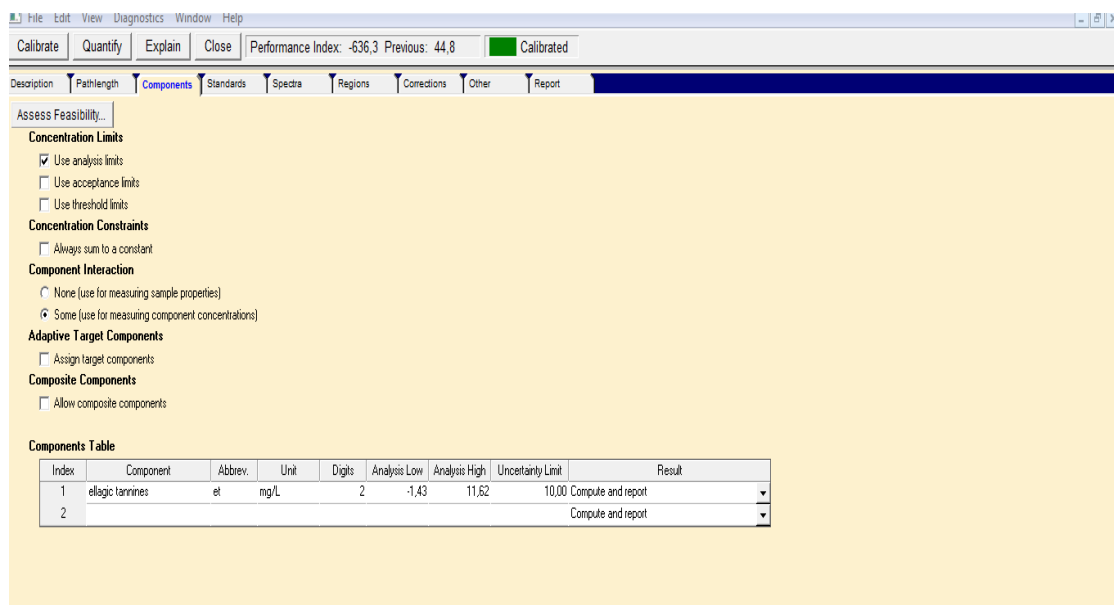
Αρχικά, ανοίγοντας το λογισμικό TQ Analyst (ver. 8.0.0.245) της εταιρείας Thermo από το Description επιλέγουμε το Partial least squares (PLS):



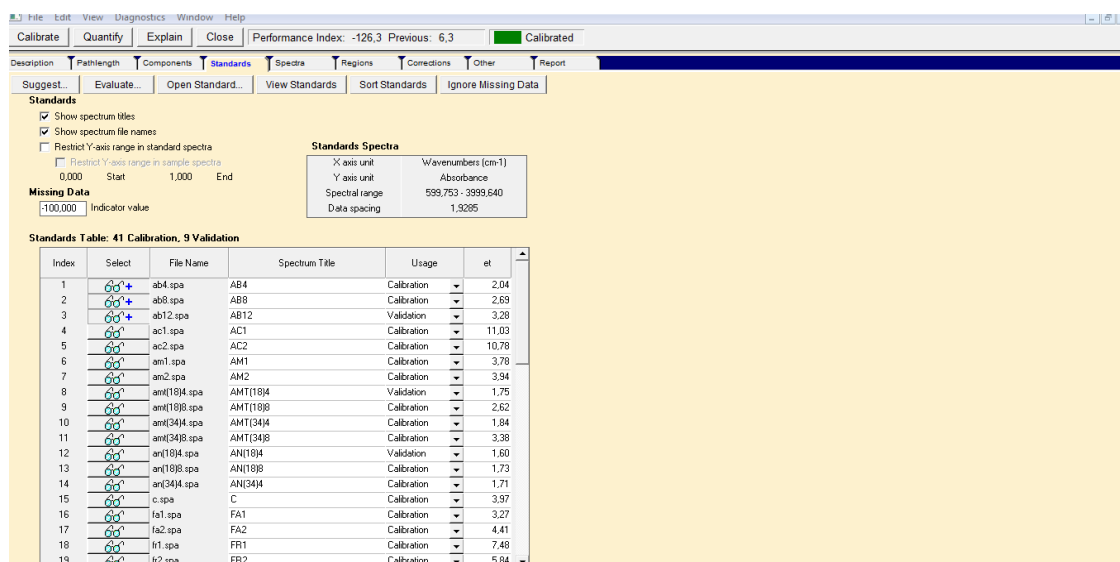
Στη συνέχεια στο Pathlength επιλέγουμε constant αφού το μήκος της διαδρομής είναι σταθερό:



Στην παράμετρο Components συμπληρώνουμε τον πίνακα με το όνομα των συστατικών που μελετάμε, τη μονάδα μέτρησης, τα δεκαδικά ψηφία και το επιτρεπόμενο κάτω και άνω όριο των μετρήσεων. Στην προκειμένη περίπτωση εξετάζουμε τη συγκέντρωση των ελλαγιικών τανινών:



Στην παράμετρο Standards επιλέγουμε την εντολή Open Standard και εισάγουμε τα επεξεργασμένα είτε με smoothing είτε με normalized φάσματα των δειγμάτων. Στον πίνακα που εμφανίζεται πληκτρολογούμε στη στήλη τη συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (Y) που λάβαμε από το HPLC για το αντίστοιχο φάσμα. Στόχος είναι η κατασκευή μοντέλου που να συνδέει τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δειγμάτων οίνου με τη συγκέντρωση των ελλαγικών τανινών σε αυτά:



5.1.2 Εφαρμογή μοντέλου PLS στα πειραματικά δεδομένα στο TQ Analyst

Στην παράμετρο Regions επιλέγοντας την εντολή Edit Regions διαλέγουμε την περιοχή του φάσματος στην οποία θα εφαρμοστεί η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS):



Στον πίνακα με τις περιοχές που έχουμε επιλέξει μπορούμε να ορίσουμε αν θα χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο η φασματική περιοχή με ή χωρίς φασματικά φίλτρα (1^η και 2^η παράγωγος). Τα φασματικά φίλτρα είναι μαθηματικοί αλγόριθμοι διόρθωσης του σήματος. Με την εφαρμογή της πρώτης παραγώγου επιτυγχάνεται καλύτερη διακριτικότητα στις κορυφές ενώ με την εφαρμογή της διπλής παραγώγου απαλείφεται η επίδραση του φαινομένου τυχαίας σκέδασης και τα φάσματα αποκτούν ίδια γραμμή βάσης. Το μειονέκτημα της χρήσης της 2^{ης} παραγώγου είναι ότι λαμβάνονται και ελάχιστα τα οποία δεν αντιπροσωπεύουν πραγματικές δονήσεις αλλά οφείλονται στην προσαρμογή της καμπύλης του φάσματος κατά τη διαδικασία της ψηφοποίησης του σήματος.

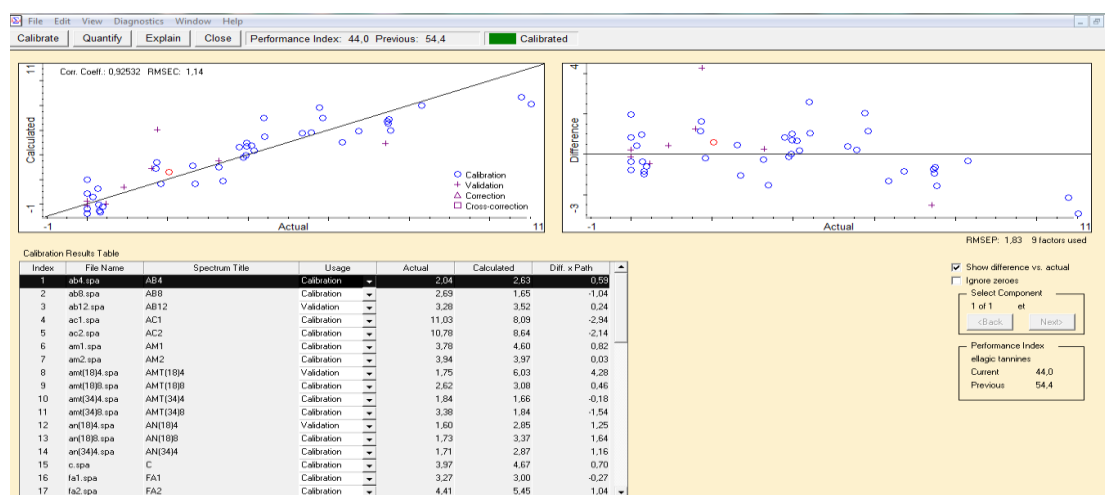
| Index | Region Type | Location | % or Ht | Baseline Type | Point 1 | Point 2 | Offset |
|-------|----------------|----------------------|---------|---------------|---------|---------|--------|
| 1 | Spectrum Range | 1,544.36 1,005.74 | | None | | | |
| 2 | | | | | | | |

| Index | Measurement Location / Range | et |
|-------|------------------------------|----|
| 1 | 1544.36 - 1005.74 | + |

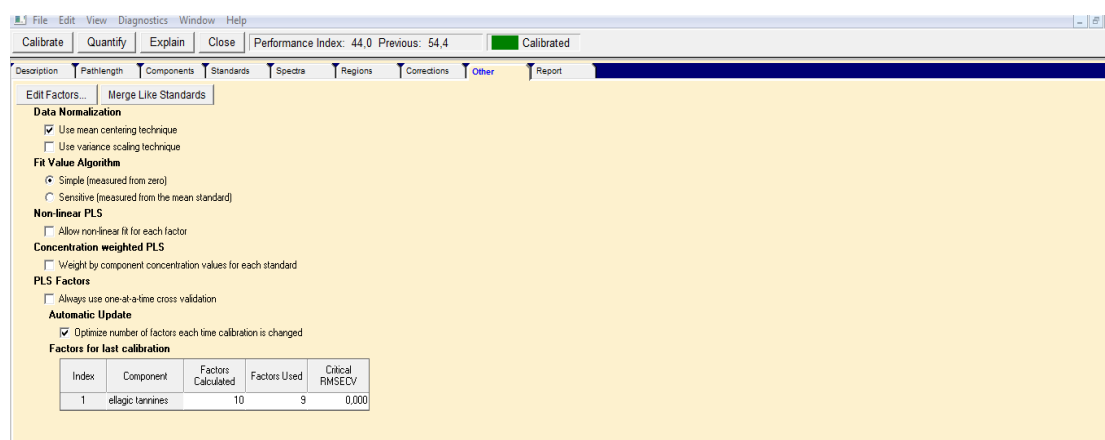
Επιλέγοντας την εντολή Calibrate with validation (βαθμονόμηση με ταυτόχρονη επικύρωση) πραγματοποιείται η βαθμονόμηση της μεθόδου και διαπιστώνεται κατά πόσο η μέθοδος λειτουργεί για τις παραμέτρους που έχουν οριστεί. Κατά τη διάρκεια

της στατιστικής αυτής διαδικασίας το λογισμικό χρησιμοποιεί περίπου τα 2/3 των φασμάτων για τη βαθμονόμηση (calibration spectra) και το 1/3 για επικύρωση (validation spectra). Για καλύτερα αποτελέσματα γίνεται έλεγχος για απομακρυσμένες τιμές (outliers). Στα δείγματα αυτά (outliers) δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ X και Y δηλαδή αποκλίνουν από τη γραμμικότητα οπότε αν αγνοηθούν το μοντέλο βελτιώνεται.

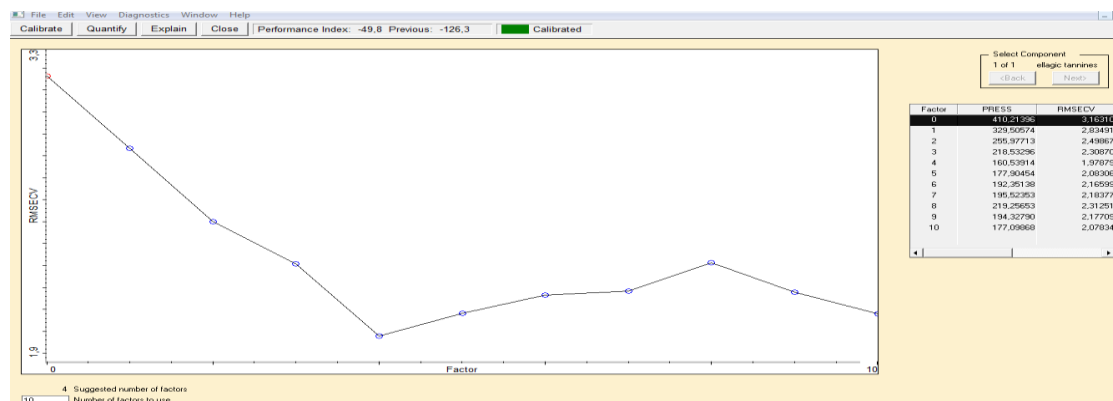
Το μέτρο της γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών είναι ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation Coefficient, Corr. Coeff.). Η τιμή "ένα" στον Corr. Coeff. υπονοεί ότι υπάρχει άμεση γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών ενώ η τιμή "μηδέν" υπονοεί ότι δεν υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών:



Τέλος, από την παράμετρο Other εάν επιλέξουμε την εντολή Edit Factors μπορούμε να αυξήσουμε τον αριθμό των κύριων συνιστωσών (factors) μέχρι 10 για να πάρουμε έναν καλύτερο Corr. Coefficient:



Η μέση τετραγωνική ρίζα σφάλματος επικύρωσης (Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV) συναρτήσεως των κύριων συνιστωσών για το μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγικών τανινών παρουσιάζεται στο διάγραμμα:



5.1.3 Κριτήρια επιλογής βέλτιστου μοντέλου βαθμονόμησης

Για τη συσχέτιση των φασμάτων FT-IR με τις μετρήσεις του HPLC απαιτείται η ανάπτυξη ενός κατάλληλου μοντέλου βαθμονόμησης. Η ποιότητα ενός μοντέλου βαθμονόμησης μπορεί να ελεγχθεί με βάση ορισμένα κριτήρια.

Από το διάγραμμα των πραγματικών τιμών έναντι των προβλεπόμενων τιμών λαμβάνουμε πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο το μοντέλο προσεγγίζει τα πειραματικά δεδομένα. Έστω x_i (πραγματικές τιμές, actual) και y_i (προβλεπόμενες τιμές, calculated) είναι οι συντεταγμένες ενός σημείου. Λόγω τυχαίων σφαλμάτων κατά τη διάρκεια των μετρήσεων τα πειραματικά σημεία δεν θα βρίσκονται πάνω στην ευθεία της μορφής $y=ax+b$. Τότε η \hat{x}_i που είναι η οριζόντια προβολή του σημείου πάνω στην προκύπτουσα ευθεία δημιουργεί το σημείο (\hat{x}_i, y_i) . Όσο μικρότερη είναι η απόσταση $|x_i - \hat{x}_i|$ τόσο καλύτερα προσεγγίζει η ευθεία τα πειραματικά δεδομένα.

Επομένως, μια παράμετρος της προσεγγιστικής ικανότητας της προκύπτουσας ευθείας είναι η τυπική απόκλιση της διαφοράς $(x_i - \hat{x}_i)$ όλων των πειραματικών σημείων, η οποία καλείται RMSEE (Root Mean Square Error of Estimation):

$$RMSEE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \hat{x}_i)^2}{N - 2}}$$

Όπου N ο αριθμός των πρότυπων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της ευθείας βαθμονόμησης. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του RMSEE τόσο καλύτερα προσεγγίζονται τα πειραματικά σημεία από την ευθεία βαθμονόμησης.

Η παραπάνω παράμετρος αν και είναι καλή ένδειξη της ποιότητας της προκύπτουσας ευθείας σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένα δεν δίνει καμία πληροφορία για την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου. Επομένως, για αυτό το σκοπό γίνεται χρήση της τυπικής απόκλισης των διαφορών μεταξύ γνωστών τιμών και των αντίστοιχων τιμών που προκύπτουν από το μοντέλο βαθμονόμησης, δηλαδή του όρου RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_t} (x_i^{st} - \hat{x}_i)^2}{N_t}}$$

Όπου x_i^{st} γνωστή εκ των προτέρων τιμή για το μέγεθος x η οποία δε χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της ευθείας βαθμονόμησης και \hat{x}_i η υπολογιζόμενη με τη βοήθεια της εξίσωσης βαθμονόμησης τιμή για το x . Ο όρος N_t αντιστοιχεί στον αριθμό των δειγμάτων που περιέχονται στο σύνολο δοκιμής.

Η διαφορά του RMSEE από το RMSEP είναι ότι η παράμετρος RMSEP υπολογίζεται από τα σημεία τα οποία δε συμμετέχουν στην κατασκευή της ευθείας βαθμονόμησης και ουσιαστικά υπολογίζονται ως άγνωστα δείγματα με τη βοήθεια της ευθείας βαθμονόμησης, των οποίων όμως οι πραγματικές τιμές είναι γνωστές. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του RMSEP τόσο πιο κοντά στις πραγματικές είναι οι τιμές που υπολογίζονται από τις εξισώσεις βαθμονόμησης και συνεπώς τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα του αντίστοιχου μοντέλου να προβλέψει σωστά τη συγκέντρωση των ελλαγικών τανινών σε άγνωστα δείγματα.

Ακόμη, για να θεωρηθεί μια μέθοδος εύρωστη θα πρέπει η παράμετρος Ανάκτηση (πηλίκo προβλεπόμενων προς πραγματικές τιμές επί εκατό) να είναι για τα περισσότερα δείγματα μεταξύ των τιμών 80 και 120. Ο όρος Ανάκτηση (Recovery) δείχνει πόσο τοις εκατό ακρίβεια προσφέρει η μέθοδος.

Τέλος, η σημαντικότερη παράμετρος που εξετάζεται για να επιτευχθεί το βέλτιστο μοντέλο είναι ο συντελεστής συσχέτισης (Correlation Coefficient, Corr. Coeff.). Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο Corr. Coeff. είναι το μέτρο της γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών (πραγματικές και προβλεπόμενες τιμές). Όσο η τιμή του Corr. Coeff. πλησιάζει το "ένα" βελτιώνεται η γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών. Ικανοποιητική τιμή θεωρείται η από 0,98 και πάνω.

5.1.4 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης – Συζήτηση

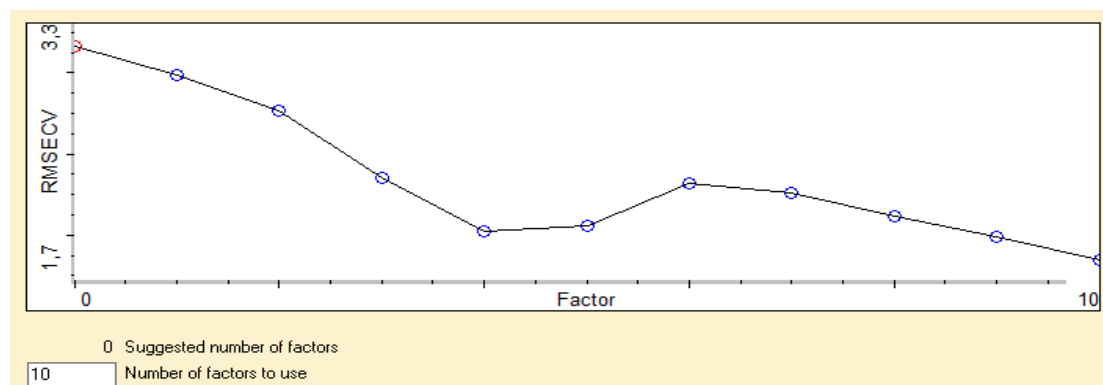
Στην παρούσα μελέτη για την ανάπτυξη του βέλτιστου μοντέλου βαθμονόμησης απαιτήθηκαν αρκετές δοκιμές. Ωστόσο παρακάτω γίνεται παρουσίαση μόνο των πέντε επικρατέστερων μοντέλων (που ανήκουν στη μέθοδο smoothing) για να γίνει τελικά από αυτά η επιλογή του βέλτιστου. Ακόμη, παρουσιάζονται τέσσερα επιπλέον μοντέλα που ανήκουν στη μέθοδο normalize για λόγους σύγκρισης με τη μέθοδο smoothing.

Οι επιλεχθείσες φασματικές περιοχές στα μοντέλα προέρχονται από περιοχές στις οποίες αντιστοιχούν οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των ελλαγικών τανινών. Στα φάσματα έχει γίνει εφαρμογή φασματικών φίλτρων (1^η παράγωγος). Παράλληλα, έγινε επιλογή του κατάλληλου αριθμού factors για κάθε μοντέλο.

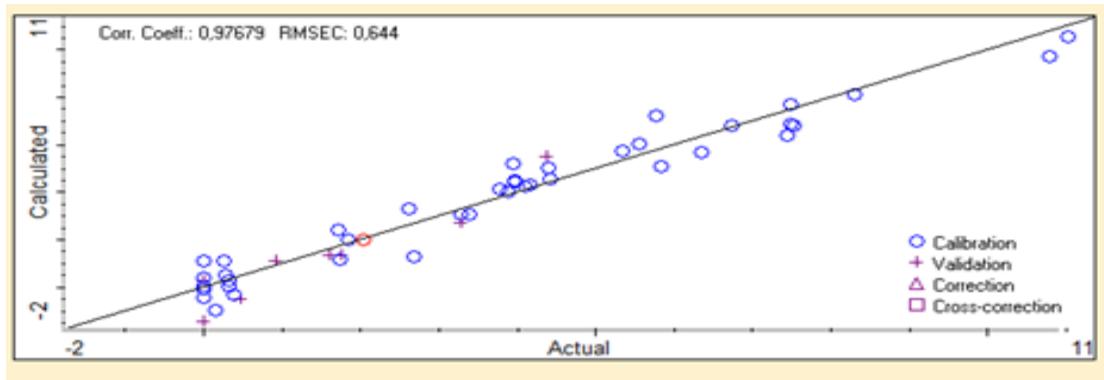
1^ο Μοντέλο

Από τα πενήντα επεξεργασμένα με smoothing φάσματα τα σαρανταένα χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra, τα οκτώ ως validation spectra ενώ το φάσμα του δείγματος MMT(34)12 αγνοήθηκε ως outlier. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1821-1543, 1524-1282,5 και 1165-1008 cm^{-1} με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Οι factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δέκα.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει υψηλό Corr. Coeff. (0,98) και χαμηλές τιμές RMSEC (0,644) και RMSEP (0,791). Επιπλέον οι τιμές των RMSEC και RMSEP είναι πολύ κοντινές. Η ανάκτηση για τα δεκατέσσερα από τα σαρανταεννιά χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο είναι αξιόπιστο και εύρωστο.



Εικόνα 5.1 RMSECV συναρτήσεως των factors για το 1^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγικών τανινών



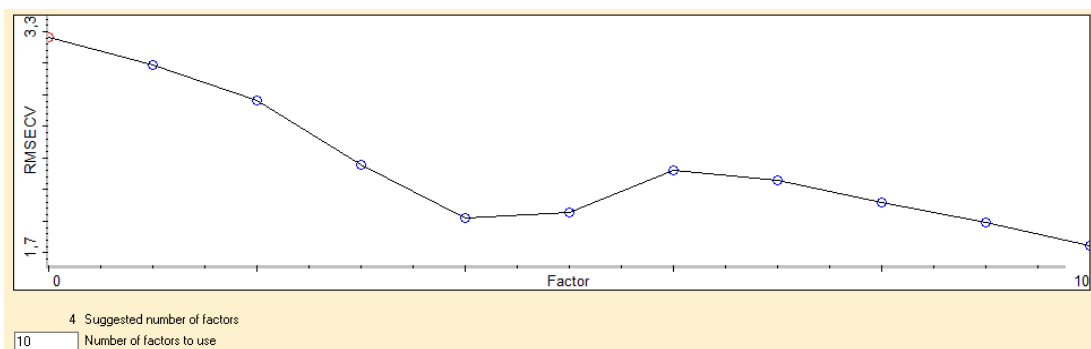
Εικόνα 5.2. Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

2^ο Μοντέλο

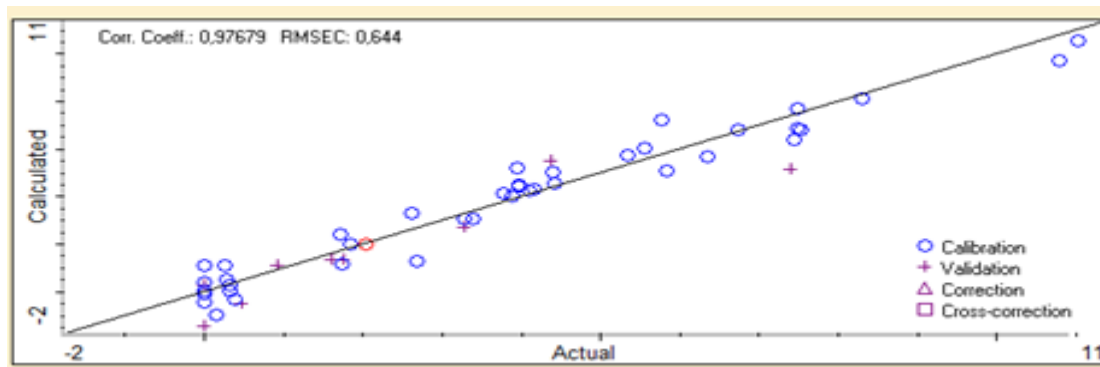
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με smoothing φάσματα χρησιμοποιήθηκαν τα σαρανταένα ως calibration spectra και τα εννιά ως validation spectra. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1821-1543, 1524-1282,5 και 1165-1008 cm^{-1} με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Οι factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δέκα.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει υψηλό Corr. Coeff. (0,98) και χαμηλές τιμές RMSEC (0,644) και RMSEP (1,06). Επιπλέον οι τιμές των RMSEC και RMSEP είναι πολύ κοντινές. Η ανάκτηση για τα δεκαπέντε από τα πενήντα χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο είναι αξιόπιστο και εύρωστο.

Στο 2^ο μοντέλο εμφανίζεται υψηλό Corr. Coeff. (0,98) όπως στο 1^ο μοντέλο αλλά αυξάνεται η παράμετρος RMSEP και η διαφορά RMSEP – RMSEC. Οπότε το 1^ο μοντέλο αξιολογείται ως καλύτερο από το 2^ο μοντέλο.



Εικόνα 5.3 RMSECV συναρτήσεως των factors για το 2^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



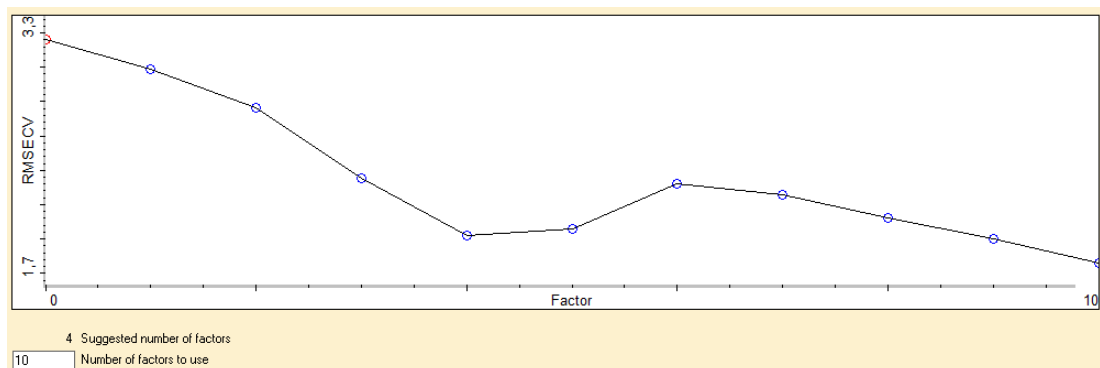
Εικόνα 5.4. Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

3^ο Μοντέλο

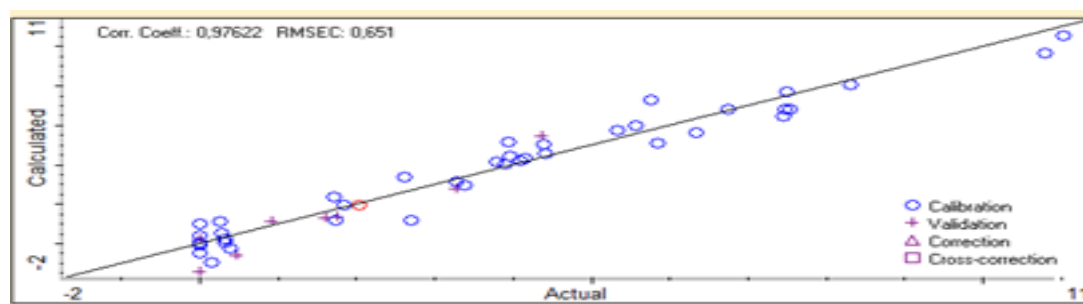
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με smoothing φάσματα τα σαρανταένα χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα οκτώ ως validation spectra. Το φάσμα του δείγματος MMT(34)12 αγνοήθηκε διότι ήταν outlier. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1819-1543, 1523,5-1280 και 1164-1008 cm^{-1} με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Οι factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν δέκα.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει υψηλό Corr. Coeff. (0,98) και χαμηλές τιμές RMSEC (0,651) και RMSEP (0,785). Επιπλέον οι τιμές των RMSEC και RMSEP είναι πολύ κοντινές. Η ανάκτηση για τα δεκατέσσερα από τα σαρανταενιά χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο είναι αξιόπιστο και εύρωστο.

Στο 3^ο μοντέλο το Corr. Coeff. είναι καλό (0,98) όπως στο 1^ο μοντέλο, έχει εξίσου χαμηλά RMSEC, RMSEP αλλά η διαφορά τους (RMSEP- RMSEC) είναι ελαφρώς μικρότερη. Οπότε τα μοντέλα 1 και 3 θεωρούνται ισοδύναμα.



Εικόνα 5.5 RMSECV συναρτήσει των factors για το 3^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών

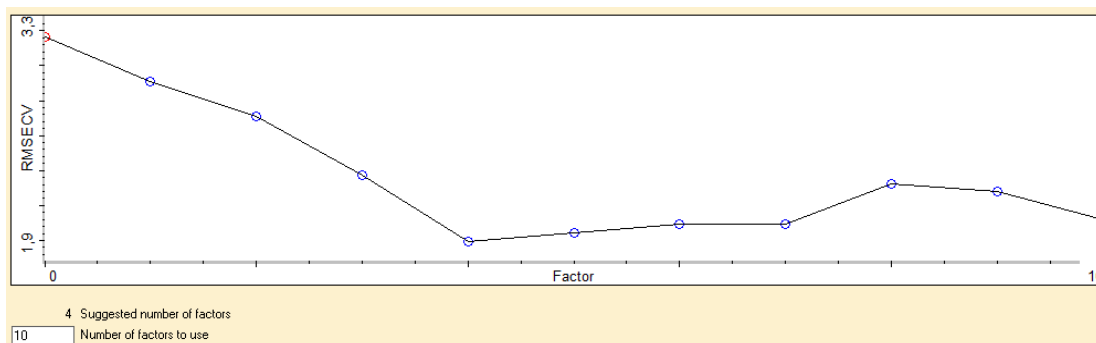


Εικόνα 5.6 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

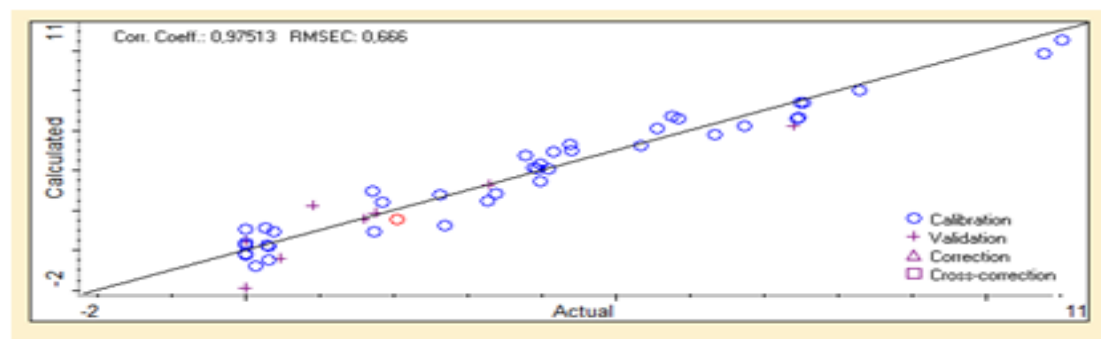
4^ο Μοντέλο

Από τα πενήντα επεξεργασμένα με smoothing φάσματα τα σαρανταένα χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα οκτώ ως validation spectra. Το φάσμα του δείγματος MMT(18)4 αγνοήθηκε διότι θεωρήθηκε outlier. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1839,76-1670 και 1523,49-1004 cm^{-1} με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις δύο. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο δέκα factors.

Στο 4^ο μοντέλο επιχειρήθηκε η χρησιμοποίηση δύο φασματικών περιοχών σε αντίθεση με τα μοντέλα 1,2,3. Το Corr. Coeff. (0,98) είναι υψηλό και τα RMSEC (0,666), RMSEP (0,982) είναι χαμηλά όπως στα μοντέλα 1, 2 και 3 αλλά η διαφορά του RMSEC και RMSEP είναι μεγαλύτερη. Ακόμη, η ανάκτηση για τα δεκαπέντε από τα σαρανταεννιά χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο είναι αξιόπιστο και εύρωστο αλλά όχι καλύτερο από τα υπόλοιπα.



Εικόνα 5.7 RMSECV συναρτήσεως των factors για το 4^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



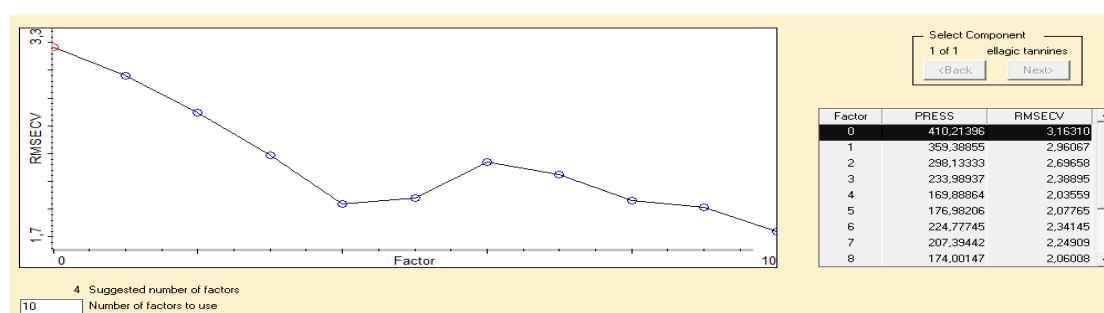
Εικόνα 5.8 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

5^ο Μοντέλο

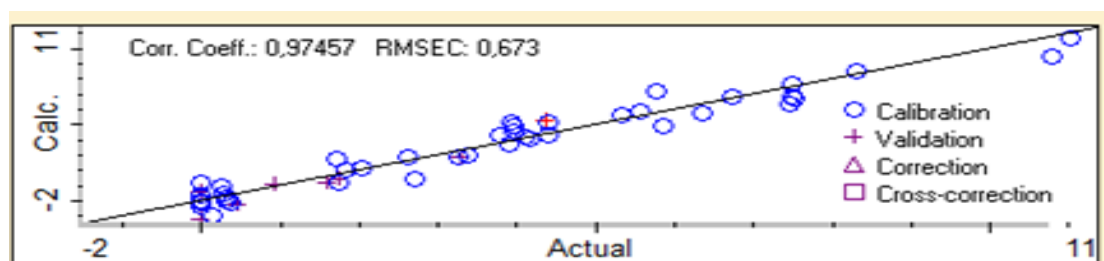
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με smoothing φάσματα τα σαρανταένα χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα οκτώ ως validation spectra. Το φάσμα του δείγματος MMT(34)12 αγνοήθηκε διότι θεωρήθηκε outlier.

Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1819-1543,01, 1533,51-1303 και 1164,79-1008,59 cm^{-1} με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκαν δέκα factors.

Το Corr. Coeff. είναι υψηλό (0,98), τα RMSEC (0,673) και RMSEP (0,674) είναι αρκετά χαμηλά και η διαφορά τους (RMSEP-RMSEC) σχεδόν μηδενική. Η ανάκτηση για τα δεκατρία από τα σαρανταεννιά χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο είναι αξιόπιστο και εύρωστο. Σε σύγκριση με τα μοντέλα 1,2,3,4 μπορούμε να το θεωρήσουμε ως το βέλτιστο μοντέλο.



Εικόνα 5.9. RMSECV συναρτήσεϊ των factors για το 5^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



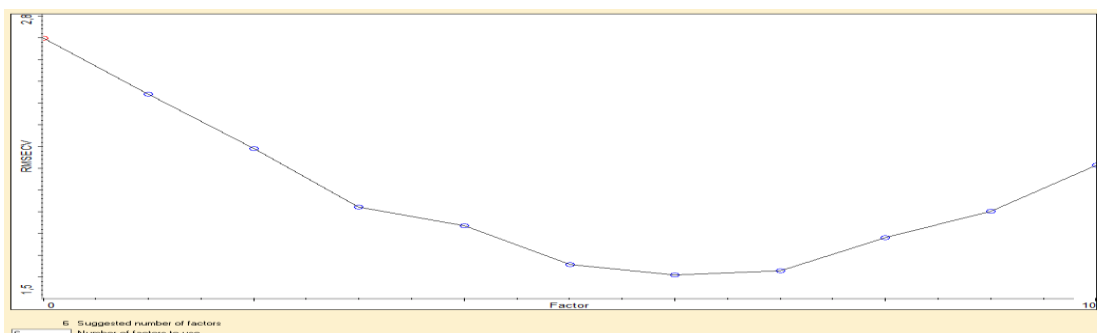
Εικόνα 5.10 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

6^ο Μοντέλο

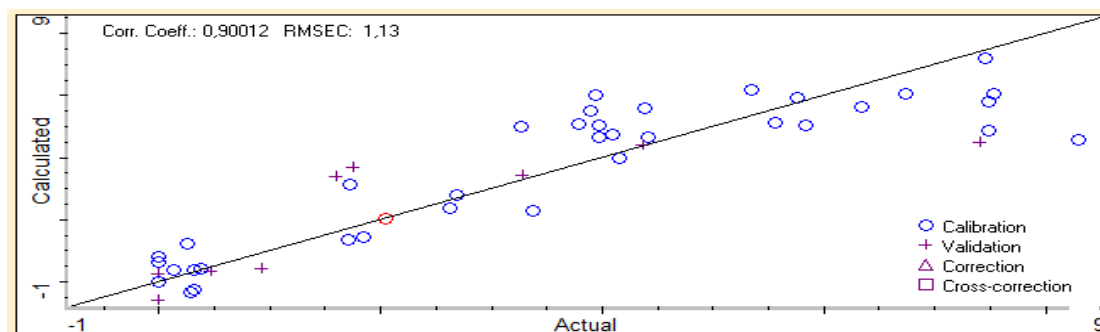
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με normalize φάσματα τα τριανταεννιά χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα εννιά ως φάσματα επικύρωσης validation spectra. Τα φάσματα των δειγμάτων AC1 και AC2 αγνοήθηκαν διότι ήταν outliers. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1821-1543, 1524-1282,5 και

1165-1008 cm^{-1} με εφαρμογή της $1^{\text{ης}}$ παραγώγου και στις τρεις. Ακόμη, τα factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έξι.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει χαμηλό Corr. Coeff. (0,9) και υψηλές τιμές RMSEC (1,13) και RMSEP (1,34). Η ανάκτηση για τα εικοσιτέσσερα από τα σαρανταοκτώ χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο δεν είναι αξιόπιστο και εύρωστο.



Εικόνα 5.11. RMSECV συναρτήσεϊ των factors για το 6^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



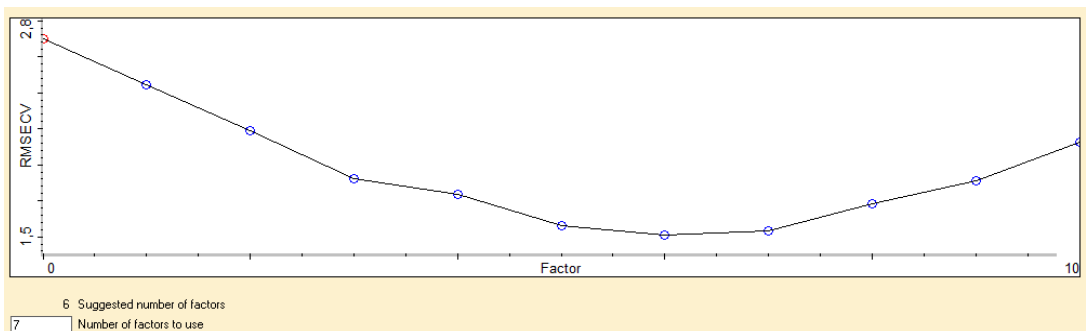
Εικόνα 5.12 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

7^ο Μοντέλο

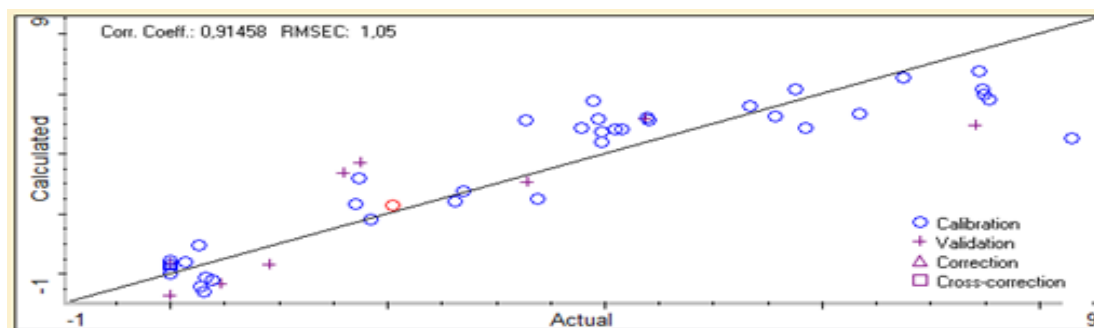
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με normalize φάσματα τα τριανταεννιά χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα εννιά ως validation spectra. Τα φάσματα των δειγμάτων AC1 και AC2 αγνοήθηκαν διότι ήταν outliers. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1819-1543, 1523,5-1280 και 1164-1008

cm⁻¹ με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Ακόμη, τα factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επτά.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει χαμηλό Corr. Coeff. (0,92) και υψηλές τιμές RMSEC (1,05) και RMSEP (1,31). Η ανάκτηση για τα είκοσι από τα σαρανταοκτώ χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο δεν είναι αξιόπιστο και εύρωστο.



Εικόνα 5.13. RMSECV συναρτήσεϊ των factors για το 7^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



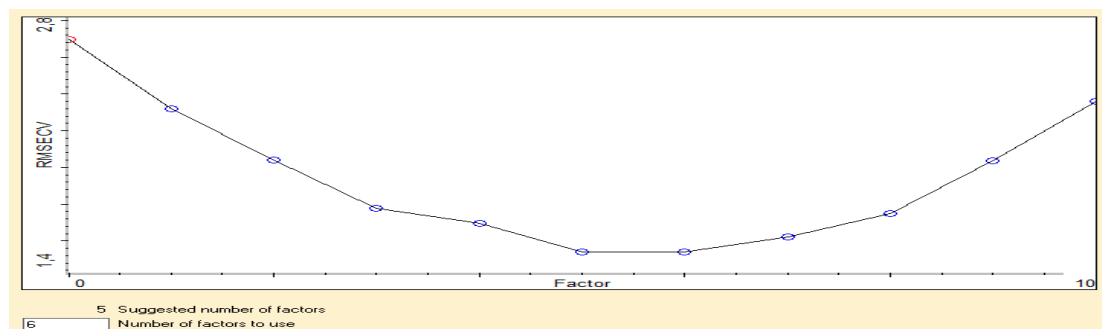
Εικόνα 5.14 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

8^ο Μοντέλο

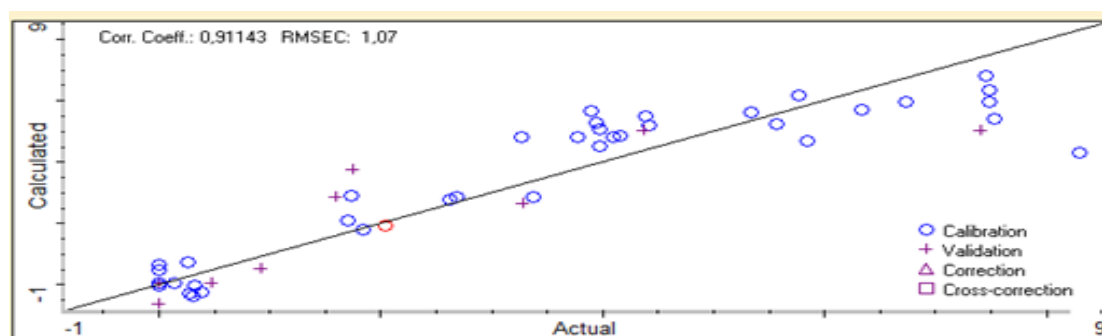
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με normalize φάσματα τα τριανταεννιά χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα εννιά ως validation spectra. Τα φάσματα των δειγμάτων AC1 και AC2 αγνοήθηκαν διότι ήταν outliers. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματικές περιοχές 1839,76-1670, 1523,49-1004 cm⁻¹ με

εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Ακόμη, τα factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έξι.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει χαμηλό Corr. Coeff. (0,91) και υψηλές τιμές RMSEC (1,07) και RMSEP (1,19). Η ανάκτηση για τα εικοσιδύο από τα σαρανταοκτώ χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο δεν είναι αξιόπιστο και εύρωστο.



Εικόνα 5.15 RMSECV συναρτήσεϊ των factors για το 8^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



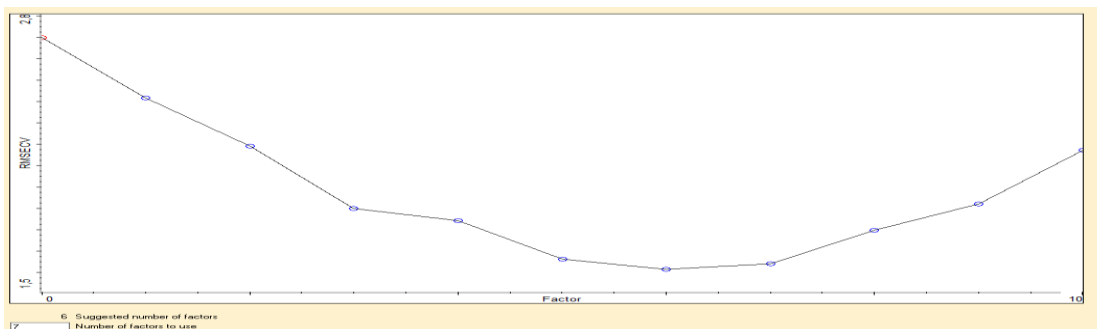
Εικόνα 5.16 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

9^ο Μοντέλο

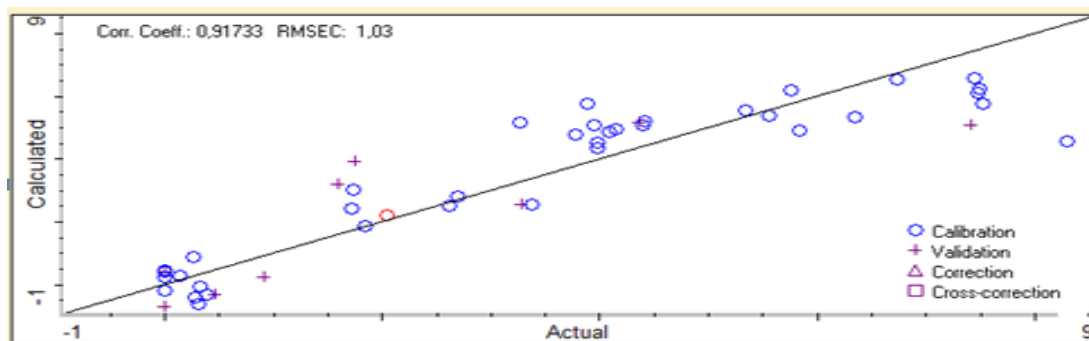
Από τα πενήντα επεξεργασμένα με normalize φάσματα τα τριανταεννιά χρησιμοποιήθηκαν ως calibration spectra και τα εννιά ως validation spectra. Το φάσμα του δείγματος AC1 και AC2 αγνοήθηκαν ως outliers. Χρησιμοποιήθηκαν οι

φασματικές περιοχές 1819-1543, 1533-1303 και 1164-1008 cm^{-1} με εφαρμογή της 1^{ης} παραγώγου και στις τρεις. Ακόμη, τα factors που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επτά.

Παρατηρούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει χαμηλό Corr. Coeff. (0,92) και υψηλές τιμές RMSEC (1,03) και RMSEP (1,32). Η ανάκτηση για τα εικοσιδύο από τα σαρανταοκτώ χρησιμοποιούμενα δείγματα είναι εκτός των ορίων (80-120) και τα επτά δείγματα δεν έδωσαν τιμή. Αυτό σημαίνει ότι το αναπτυχθέν μοντέλο δεν είναι αξιόπιστο και εύρωστο.



Εικόνα 5.17 RMSECV συναρτήσε των factors για το 9^ο μοντέλο της συγκέντρωσης ελλαγιικών τανινών



Εικόνα 5.18 Καμπύλη συσχέτισης των πραγματικών τιμών της συγκέντρωσης των ελλαγιικών τανινών όπως αυτές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC (actual) και των αντίστοιχων τιμών όπως προσδιορίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο FT-IR (calculated)

5.1.5 Συμπέρασμα

Από την παραπάνω μελέτη φαίνεται ότι το καλύτερο μοντέλο είναι το 5^ο. Δηλαδή το μοντέλο που χρησιμοποιεί τις φασματικές περιοχές 1819-1543,01, 1533,51-1303 και 1164,79-1008,59 cm^{-1} με χρήση της 1^{ης} παραγώγου και δέκα factors. Γενικότερα τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν από επεξεργασμένα φάσματα

με την τεχνική smoothing προέκυψαν εύρωστα και αξιόπιστα ενώ τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν από επεξεργασμένα φάσματα με την τεχνική normalize δεν ήταν.

Επειδή και τα υπόλοιπα μοντέλα (1,2,3,4) είναι εξίσου καλά σύμφωνα με τα κριτήρια που έχουμε θέσει για την αξιολόγηση των μοντέλων βαθμονόμησης αποδεικνύεται ότι οι επιλεγθείσες φασματικές περιοχές σε συνδυασμό με τη χρήση του στατιστικού μοντέλου PLS μπορούν να προσδιορίσουν ποσοτικά τις ελλαγιικές τανίνες.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ωρίμανση του οίνου είναι στάδιο της οινοποιητικής δραστηριότητας που παίζει αποδεδειγμένα καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του οίνου. Είτε σε δρύινα βαρέλια είτε με την προσθήκη δρύινων ρινισμάτων (chips) σε ανοξείδωτα βαρέλια, η ωρίμανση αποτελεί μια σύγχρονη πρόκληση για τους οιολόγους που επιθυμούν υψηλή προστιθέμενη αξία στον οίνο.

Για τον επιτυχή έλεγχο όλων των παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της ωρίμανσης του οίνου απαιτείται πολύς χρόνος και επένδυση. Επομένως προκύπτει η ανάγκη για ανάπτυξη και χρήση μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών του παλαιωμένου οίνου με την ελάχιστη επιβάρυνση. Στην παρούσα εργασία επιλέχτηκε η φασματοσκοπία μεσο-υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier σε συνδυασμό με τη στατιστική ανάλυση πολλών μεταβλητών (PLS) και έδωσε αξιόπιστα, γρήγορα και με μικρό κόστος ποσοτικά αποτελέσματα για τις ελλαγιικές τανίνες σε ελληνικούς οίνους.

Τέλος, σύμφωνα με τα παραπάνω η βελτιστοποίηση της παραγωγής του εκάστοτε οίνου εναπόκειται στη βελτιστοποίηση των χημειομετρικών μοντέλων PLS με την συλλογή, επεξεργασία και προσθήκη επιπλέον φασμάτων από παλαιωμένους οίνους διαφόρων ποικιλιών. Με τις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης το πρόβλημα της πολυπλοκότητας της σύστασης του οίνου γίνεται πλέον τεχνολογικό εργαλείο στα χέρια των οιολόγων για την οργανοληπτική τελειοποίησή του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγγλόφωνη

Ascacio-Valdés, J. A., Buenrostro-Figueroa, J. J., Aguilera-Carbo, A., Prado-Barragán, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2011). Ellagitannins: biosynthesis, biodegradation and biological properties. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4696-4703.

Auzanneau, C., Montaudon, D., Jacquet, R., Puyo, S., Pouységu, L., Deffieux, D., ... & Pourquier, P. (2012). The polyphenolic ellagitannin vescalagin acts as a preferential catalytic inhibitor of the α isoform of human DNA topoisomerase II. *Molecular pharmacology*, 82(1), 134-141.

Çakar, S., Güy, N., Özacar, M., & Fındık, F. (2016). Investigation of Vegetable Tannins and Their Iron Complex Dyes for Dye Sensitized Solar Cell Applications. *Electrochimica Acta*, 209, 407-422.

Chira, K., & Teissedre, P. L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food chemistry*, 140(1), 168-177.

Crestini, C., & Lange, H. (2015). A novel and efficient immobilised tannase coated by the layer-by-layer technique in the hydrolysis of gallotannins and ellagitannins. *Microchemical Journal*, 123, 139-147.

Dos Santos Grasel, F., Ferrão, M. F., & Wolf, C. R. (2016). Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 94-101.

Falcão, L., & Araújo, M. E. M. (2013). Tannins characterization in historic leathers by complementary analytical techniques ATR-FTIR, UV-Vis and chemical tests. *Journal of Cultural Heritage*, 14(6), 499-508.

Farkaš, J. (1988). *Technology and Biochemistry of Wine (Vol. 2)*. AMACOM Div American Mgmt Assn.

Hussein, R. H., & Khalifa, F. K. (2014). The protective role of ellagitannins flavonoids pretreatment against N-nitrosodiethylamine induced-hepatocellular carcinoma. *Saudi journal of biological sciences*, 21(6), 589-596.

Iyer, M. R. (2007). Studies on the stability and reactivity of 2, 4-hexahydroxy-diphenoyl (HHDP)-bearing ellagitannin monomeric unit (Doctoral dissertation, The Pennsylvania State University).

Jackson, R. S. (2000). *Wine science: principle, practice, perception*. Academic Press. Canada.

Lei, Z. (2002). Monomeric ellagitannins in oaks and sweetgum (Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University).

Lipińska, L., Klewicka, E., & Sójka, M. (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(3), 289-299.

Michel, J., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P. L. (2013). Influence of wood barrels classified by NIRS on the ellagitannin content/composition and on the organoleptic properties of wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 11109-11118.

Michel, J., Jourdes, M., Silva, M. A., Giordanengo, T., Mourey, N., & Teissedre, P. L. (2011). Impact of concentration of ellagitannins in oak wood on their levels and organoleptic influence in red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5677-5683.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., & Ito, H. (2009). Ellagitannins renewed the concept of tannins. *Chemistry and biology of ellagitannins*, 122, 1-54.

Petit, E., Jacquet, R., Pouységu, L., Deffieux, D., & Quideau, S. (2015). About the impact of oak ellagitannins on wine odoriferous thiols under acidic and oxidation conditions. *Tetrahedron*, 71(20), 2991-2998.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of enology. The chemistry of wine and stabilisation and treatments*, vol. 2.

Ricci, A., Lagel, M. C., Parpinello, G. P., Pizzi, A., Kilmartin, P. A., & Versari, A. (2016). Spectroscopy analysis of phenolic and sugar patterns in a food grade chestnut tannin. *Food chemistry*, 203, 425-429.

Ricci, A., Parpinello, G. P., Olejar, K. J., Kilmartin, P. A., & Versari, A. (2015). Attenuated Total Reflection Mid-Infrared (ATR-MIR) Spectroscopy and Chemometrics for the Identification and Classification of Commercial Tannins. *Applied spectroscopy*, 69(11), 1243-1250.

Ricci, A., Olejar, K. J., Parpinello, G. P., Kilmartin, P. A., & Versari, A. (2015). Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the characterization of tannins. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(5), 407-442.

Sepúlveda, L., Ascacio, A., Rodríguez-Herrera, R., Aguilera-Carbó, A., & Aguilar, C. N. (2011). Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4518-4523.

Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies: table and charts. *Ltd WJS*, 1-347.

Sosic, A., Cappellini, M., Sinigaglia, L., Jacquet, R., Deffieux, D., Fabris, D., & Gatto, B. (2015). Polyphenolic C-glucosidic ellagitannins present in oak-aged wine inhibit HIV-1 nucleocapsid protein. *Tetrahedron*, 71(20), 3020-3026.

Ελληνόφωνη

Καράμπας, Ι. (2011). Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για την εκτίμηση της ποιότητας των οστών (Διδακτορική διατριβή).

Παππάς, Χ. (2000). Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού Κενάφ (*Hibiscus Cannabinus L.*) (Διδακτορική διατριβή).

Σιδερούδη, Θ. (2006). Φασματοσκοπική μελέτη οφθαλμικών παθήσεων και ανίχνευση μορίων φαρμάκων (Διδακτορική διατριβή).

Ταραντίλης, Π, Παππάς, Χ. (2016). Τεχνικές εκχύλισης και απόσταξης, χρωματογραφικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης – Παραλαβή, διαχωρισμός, απομόνωση, καθαρισμός και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων, Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Μοντέλο 1 και 2. Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία automatic smooth στα φάσματα)

| 1821-1543, 1524-1282,5, 1165-1008 cm ⁻¹ | | | | | |
|---|-------------------|-------------|--|---|--------------|
| R:0,98, RMSEC: 0,644, RMSEP: 0,791, παράγοντες:10, 1 ⁿ παράγωγος, με MMT(34)12 | | | | | |
| R:0,98, RMSEC: 0,644, RMSEP: 1,06, παράγοντες:10, 1 ⁿ παράγωγος, χωρίς MMT(34)12 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση (%) |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 4,50 | 113 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,87 | 92 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 5,10 | 87 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,11 | 109 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 5,21 | 132 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 3,08 | 94 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 4,58 | 104 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 8,10 | 98 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 7,22 | 125 |
| 10 | AC1 | calibration | 11,03 | 10,56 | 96 |
| 11 | AC2 | calibration | 10,78 | 9,72 | 90 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | 0,29 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | -1,44 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,03 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,39 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | -0,51 | 209 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | 0,28 | 90 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | -0,42 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 1,08 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | -0,07 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | 0,04 | 13 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 1,10 | 120 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | -0,95 | 779 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 1,13 | 435 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | 0,50 | 179 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | -0,30 | 179 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 1,97 | 97 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|------|-----|
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 1,34 | 77 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 1,99 | 108 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 1,33 | 83 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,39 | 140 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 1,27 | 47 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 3,31 | 126 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 3,05 | 90 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 1,19 | 69 |
| 36 | AB12 | calibration | 3,28 | 2,72 | 83 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,41 | 111 |
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 5,51 | 126 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,04 | 115 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 6,03 | 108 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 6,83 | 91 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,26 | 104 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,74 | 107 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,42 | 86 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,68 | 90 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,29 | 103 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 4,03 | 104 |
| 48 | MMT(34)12 | validation | 7,41 | 5,16 | 70 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 7,71 | 103 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 6,83 | 101 |

Πίνακας 2. Μοντέλο 3. Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία automatic smooth στα φάσματα)

| 1819-1543, 1523,5-1280, 1164-1008 cm ⁻¹ | | | | | |
|---|-------------------|-------------|--|---|--------------|
| R:0,98, RMSEC: 0,651, RMSEP: 0,785, factors:10, 1 ^η παράγωγος, χωρίς MMT(34)12 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση (%) |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 4,45 | 112 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,85 | 92 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 5,12 | 88 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,13 | 109 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 5,18 | 131 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 3,17 | 97 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 4,57 | 104 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 8,06 | 97 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 7,28 | 126 |
| 10 | AC1 | calibration | 11,03 | 10,54 | 96 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|-------|-------|-----|
| 11 | AC2 | calibration | 10,78 | 9,69 | 90 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | 0,22 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | -1,42 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,07 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,40 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | -0,58 | 223 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | 0,27 | 87 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | -0,44 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 1,01 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | -0,07 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | 0,04 | 13 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 1,10 | 120 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | -0,95 | 779 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 1,15 | 442 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | 0,52 | 186 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | -0,24 | 163 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 1,94 | 95 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 1,35 | 77 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 1,98 | 108 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 1,28 | 80 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,36 | 138 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 1,20 | 45 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 3,35 | 128 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 3,00 | 89 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 1,19 | 69 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 2,79 | 85 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,44 | 112 |
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 5,48 | 125 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,06 | 115 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 6,02 | 108 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 6,82 | 91 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,24 | 104 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,78 | 108 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,45 | 87 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,66 | 89 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,32 | 104 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 4,06 | 104 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 7,71 | 103 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 6,84 | 101 |

Πίνακας 3. Μοντέλο 4. Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία automatic smooth στα φάσματα)

| 1839,76-1670, 1523,49-1004 cm ⁻¹ | | | | | |
|--|-------------------|-------------|--|---|-----------|
| R:0,98, RMSEC: 0,666, RMSEP: 0,982, factors:10, 1 ^η παράγωγος, χωρίς MMT(18)4 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση% |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 3,49 | 88 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,64 | 89 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 6,61 | 113 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,74 | 125 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 4,06 | 103 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 2,48 | 76 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 5,02 | 114 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 8,04 | 97 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 6,72 | 117 |
| 10 | AC1 | calibration | 11,03 | 10,56 | 96 |
| 11 | AC2 | calibration | 10,78 | 9,87 | 92 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | 0,43 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | -1,89 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | -0,21 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,26 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | -0,39 | 183 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | 0,23 | 74 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | -0,19 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 1,09 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | 0,39 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | -0,50 | 256 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 2,24 | 243 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | -0,77 | 650 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 1,15 | 442 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | 0,24 | 86 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | 0,96 | 253 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 1,58 | 77 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 1,86 | 106 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 2,41 | 131 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 1,53 | 96 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,98 | 174 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 1,22 | 45 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 2,76 | 105 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 2,84 | 84 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|------|-----|
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 0,94 | 54 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 3,30 | 101 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,35 | 110 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,32 | 121 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 6,13 | 110 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 7,39 | 98 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,06 | 99 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,22 | 98 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,61 | 89 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,82 | 92 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,97 | 120 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 4,11 | 106 |
| 48 | MMT(34)12 | validation | 7,41 | 6,20 | 84 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 7,38 | 99 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 6,25 | 93 |

Πίνακας 4. Μοντέλο 5. Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία automatic smooth στα φάσματα)

| 1819-1543, 1533-1303,1164-1008 cm ⁻¹ | | | | | |
|---|-------------------|-------------|---|--|--------------|
| R:0,98, RMSEC: 0,673, RMSEP: 0,674, factors:10, 1 ^η παράγωγος, χωρίς MMT(34)12 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση (%) |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 4,95 | 125 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,86 | 92 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 4,87 | 83 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,33 | 115 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 5,18 | 131 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 2,86 | 87 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 4,28 | 97 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,30 | 8,47 | 102 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 7,19 | 125 |
| 10 | AC1 | calibration | 11,03 | 10,66 | 97 |
| 11 | AC2 | calibration | 10,78 | 9,53 | 88 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | 0,63 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | -1,19 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,01 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,40 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | -0,26 | 155 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | 0,27 | 87 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|-------|-----|
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | -0,33 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 1,23 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | -0,14 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | -0,01 | 103 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 1,07 | 116 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | -0,91 | 750 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 0,91 | 350 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | 0,51 | 182 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | -0,08 | 121 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 2,14 | 105 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 1,47 | 84 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 2,05 | 111 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,60 | 1,21 | 76 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,80 | 164 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 1,44 | 54 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 2,86 | 109 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 3,05 | 90 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 1,16 | 67 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 2,92 | 89 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,55 | 115 |
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 5,33 | 122 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,20 | 118 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 5,83 | 105 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 6,67 | 89 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,15 | 101 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,69 | 107 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,37 | 86 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,81 | 92 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,07 | 98 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 3,74 | 96 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 7,74 | 103 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 6,84 | 101 |

Πίνακας 5. Μοντέλο 6. Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία normalize στα φάσματα)

| 1821-1543, 1524-1282,5, 1165-1008 cm ⁻¹ | | | | | |
|--|-------------------|-------------|--|---|--------------|
| R:0,9, RMSEC:1,13, RMSEP:1,34, factors:6, 1 ^η παράγωγος, χωρίς AC1, AC2 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση (%) |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 5,06 | 127 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 5,80 | 78 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 5,04 | 86 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 5,09 | 135 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 6,00 | 152 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 4,98 | 152 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 4,67 | 106 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 5,93 | 71 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 5,93 | 103 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | -0,59 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | 0,24 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,65 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,82 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | 0,36 | 77 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | -0,25 | 181 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | 0,02 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 0 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | 0 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | 0,37 | 116 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 0,44 | 48 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | 0,38 | 271 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 1,23 | 473 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | -0,35 | 225 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | 0,43 | 113 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 2,02 | 99 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 3,68 | 210 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 3,41 | 213 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 1,34 | 78 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 2,80 | 104 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 2,39 | 91 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 2,29 | 68 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 3,12 | 180 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 3,43 | 105 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,67 | 118 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|------|-----|
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 4,40 | 101 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,61 | 128 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 5,11 | 92 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 5,63 | 75 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,76 | 116 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 6,18 | 116 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 7,18 | 96 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 6,04 | 95 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 3,98 | 96 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 5,49 | 141 |
| 48 | MMT(34)12 | validation | 7,41 | 4,49 | 61 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 4,86 | 65 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 4,59 | 68 |

Πίνακας 6. Μοντέλο 7. Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία normalize στα φάσματα)

| 1819-1543, 1523,5-1280, 1164-1008 cm ⁻¹ | | | | | |
|---|-------------------|-------------|--|---|-----------|
| R:0,92, RMSEC:1,05, RMSEP:1,31, factors:7, 1 ⁿ παράγωγος, χωρίς AC1, AC2 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση% |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 4,72 | 119 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,14 | 82 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 4,84 | 83 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,89 | 129 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 5,18 | 131 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 5,11 | 156 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 5,11 | 116 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 4,52 | 54 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 6,15 | 107 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | -0,72 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | 0,34 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,31 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,44 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | -0,33 | 170 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | -0,58 | 287 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | 0,02 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 0,18 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | 0,18 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | -0,12 | 138 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|-------|-----|
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 0,29 | 32 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | 0,39 | 279 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 0,94 | 362 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | -0,40 | 243 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | -0,21 | 155 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 2,29 | 112 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 3,72 | 213 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 1,80 | 98 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 3,35 | 209 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,34 | 137 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 2,75 | 102 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 2,43 | 93 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 2,48 | 73 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 3,20 | 185 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 3,04 | 93 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,37 | 110 |
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 5,15 | 118 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,20 | 118 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 5,27 | 95 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 5,80 | 77 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,83 | 118 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,60 | 105 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,77 | 91 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,33 | 84 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,83 | 116 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 5,76 | 148 |
| 48 | MMT(34)12 | validation | 7,41 | 4,94 | 67 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 5,98 | 80 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 6,55 | 97 |

Πίνακας 7. Μοντέλο 8. Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία normalize στα φάσματα)

| 1839,76-1670, 1523,49-1004 cm ⁻¹ | | | | | |
|---|-------------------|-------------|---|--|--------------|
| R:0,91, RMSEC:1,07, RMSEP:1,19, factors:6, 1 ⁿ παράγωγος, χωρίς AC1, AC2 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση (%) |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 5,06 | 127 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,34 | 85 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 4,70 | 80 |

| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|-------|-----|
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,83 | 128 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 5,30 | 135 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 4,82 | 147 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 5,21 | 118 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 4,29 | 52 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 6,19 | 107 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | -0,62 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | 0,07 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,51 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,66 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | 0,06 | 13 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | -0,36 | 216 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | -0,01 | - |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 0,07 | - |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | 0,07 | - |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | 0 | 0 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 0,55 | 60 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | 0,06 | 43 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 0,76 | 292 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | -0,28 | 200 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | -0,24 | 163 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 1,95 | 96 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 3,78 | 216 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 1,82 | 99 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 2,85 | 178 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,12 | 124 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 2,87 | 107 |
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 2,76 | 105 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 2,86 | 85 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 2,92 | 169 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 2,64 | 80 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 3,97 | 100 |
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 5,01 | 115 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,51 | 126 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 5,24 | 94 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 5,40 | 72 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,83 | 118 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,61 | 105 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,82 | 92 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,72 | 90 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,84 | 117 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 5,68 | 146 |
| 48 | MMT(34)12 | validation | 7,41 | 5,04 | 68 |

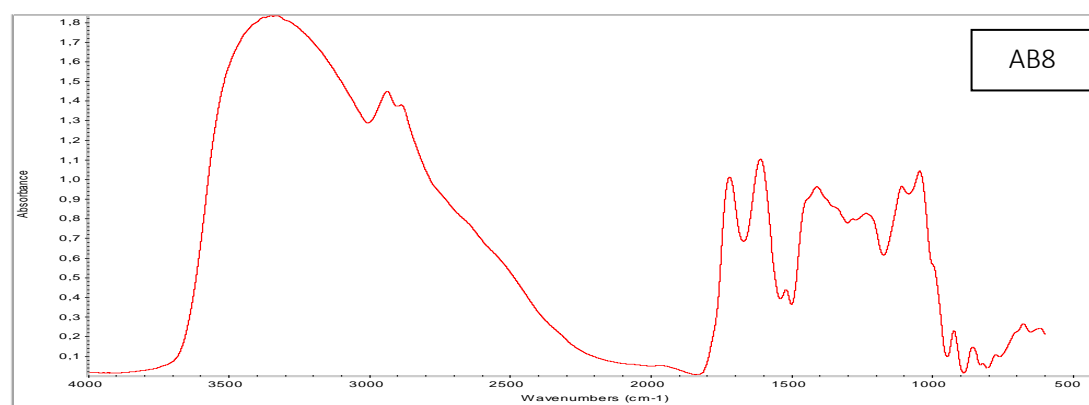
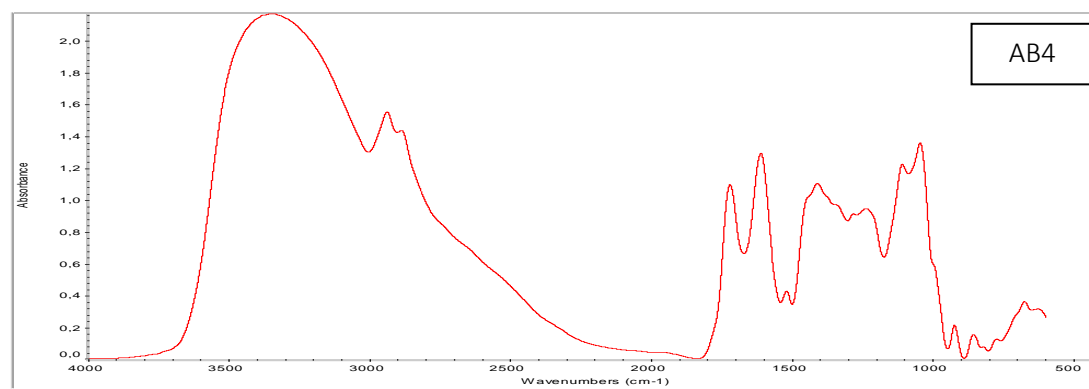
| | | | | | |
|----|----------|-------------|------|------|----|
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 5,95 | 79 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 5,98 | 89 |

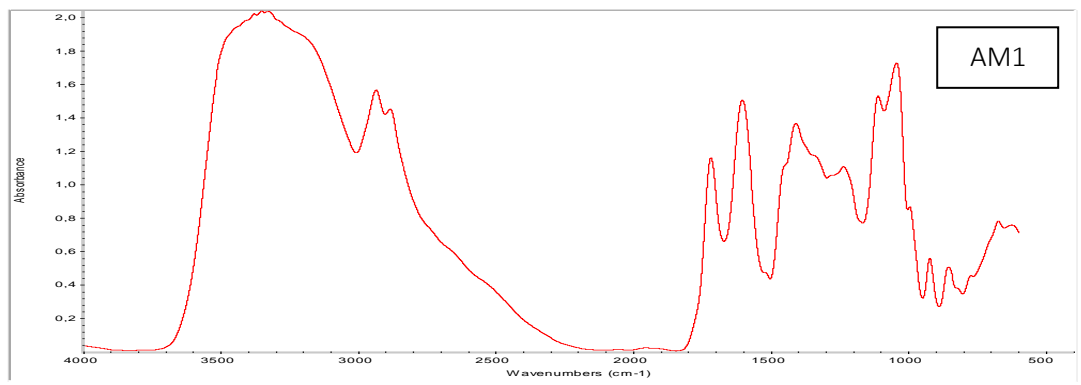
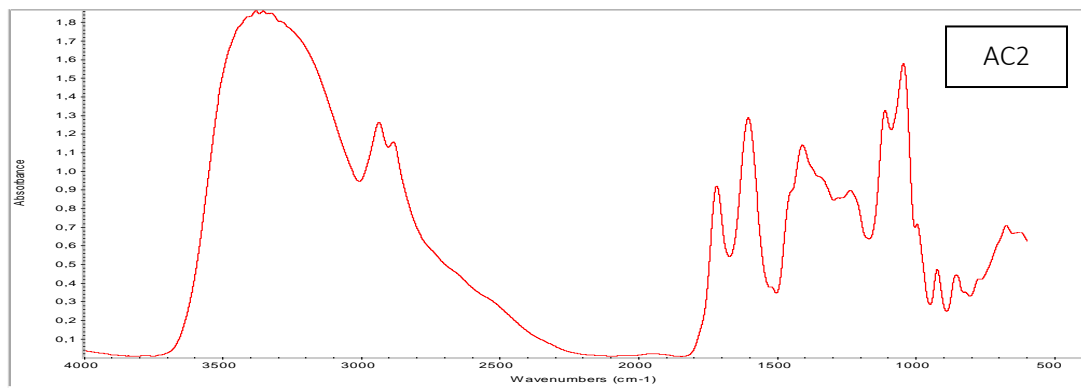
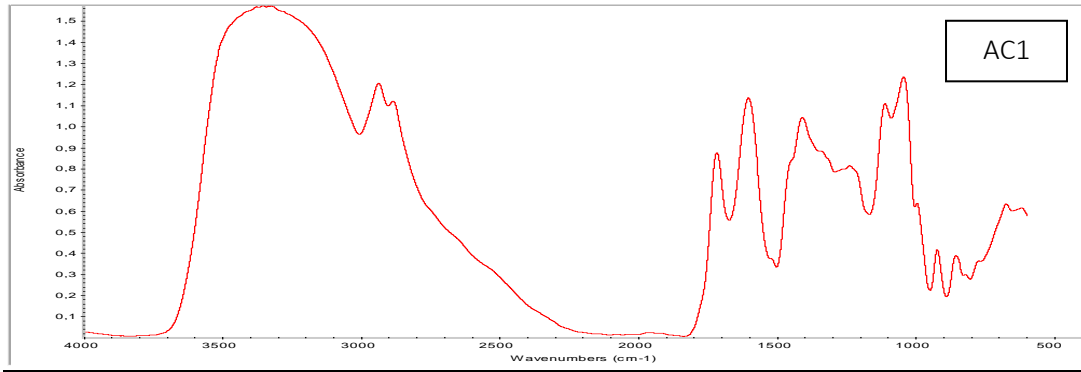
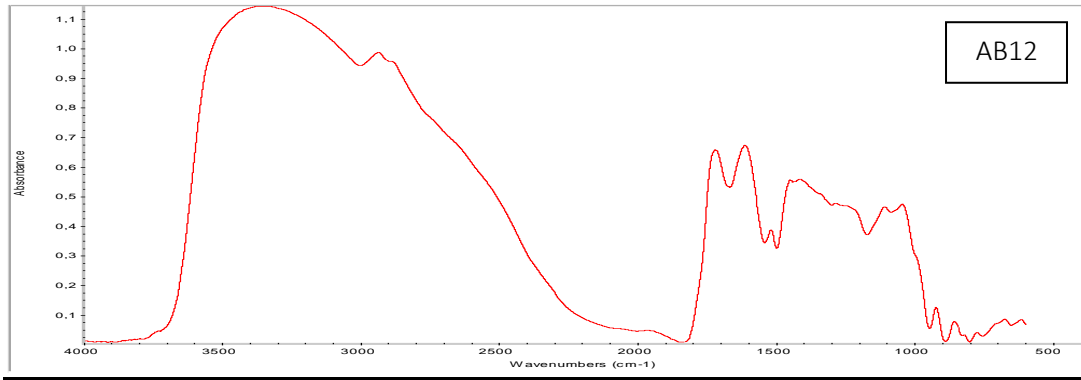
Πίνακας 8. Περίπτωση 9. Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών στα δείγματα οίνου προσδιορισμένες με HPLC και FT-IR (επεξεργασία normalize στα φάσματα)

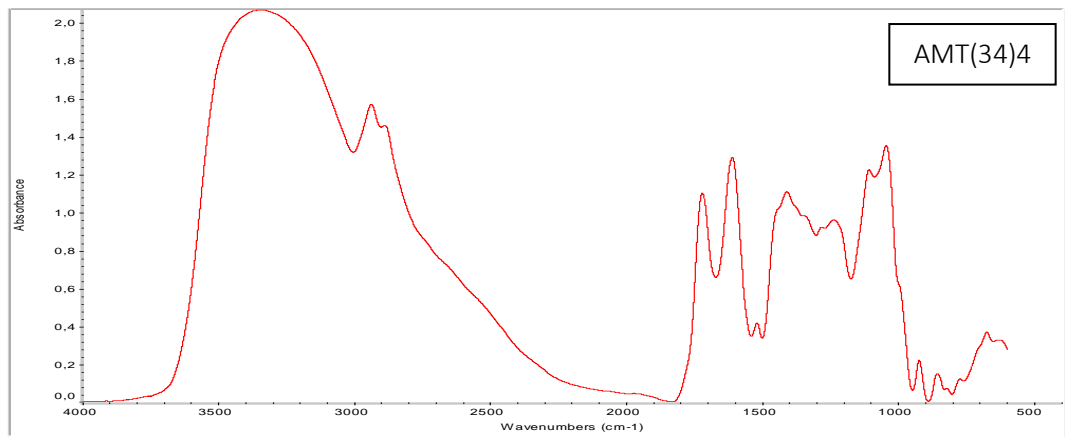
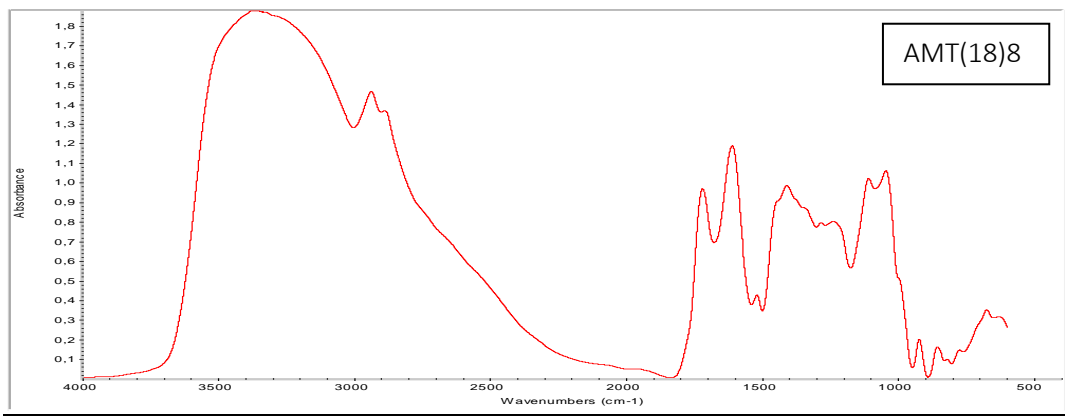
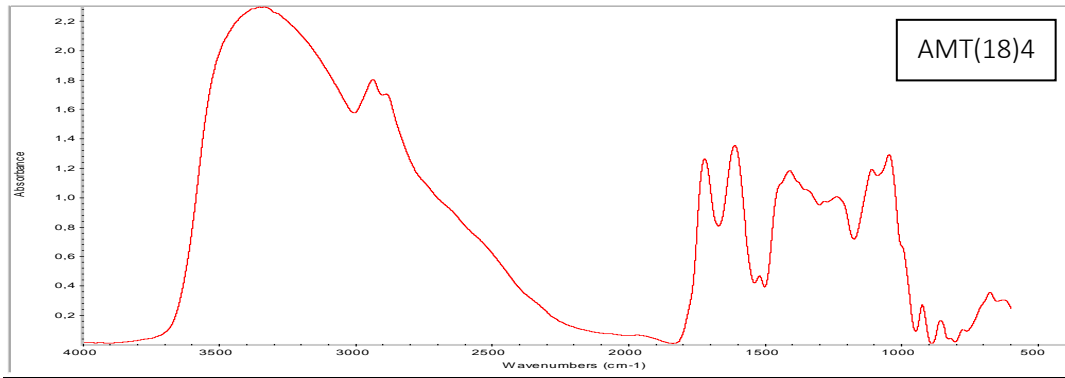
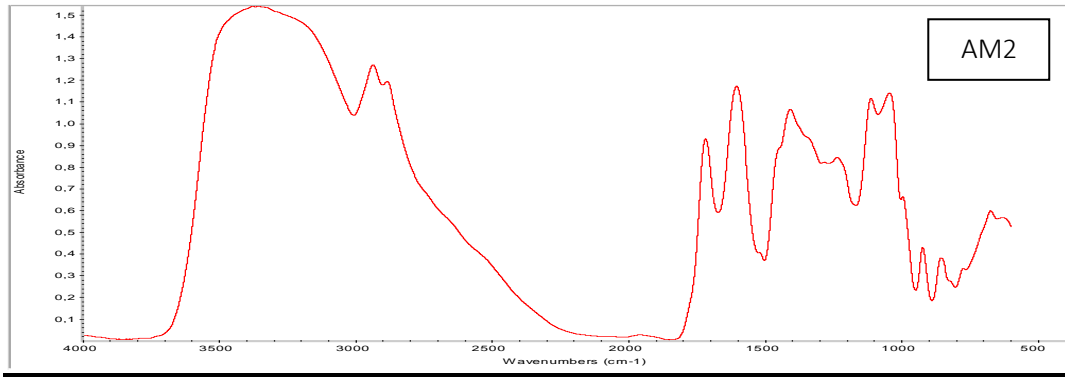
| 1819-1543, 1533-1303, 1164-1008 cm ⁻¹ | | | | | |
|--|-------------------|-------------|---|--|-----------|
| R:0,92, RMSEC:1,03, RMSEP:1,32, factors:7, 1 ⁿ παράγωγος, χωρίς AC1,AC2 | | | | | |
| α/α | Κωδικός δείγματος | Χρήση | Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με HPLC | Συγκέντρωση ελλαγιικών τανινών (mg/L) προσδιορισμένες με FT-IR | Ανάκτηση% |
| 1 | C | calibration | 3,97 | 4,53 | 114 |
| 2 | FR1 | calibration | 7,48 | 6,10 | 82 |
| 3 | FR2 | calibration | 5,84 | 4,92 | 84 |
| 4 | AM1 | calibration | 3,78 | 4,77 | 126 |
| 5 | AM2 | calibration | 3,94 | 5,09 | 129 |
| 6 | FA1 | calibration | 3,27 | 5,18 | 158 |
| 7 | FA2 | calibration | 4,41 | 5,21 | 118 |
| 8 | SL1 | calibration | 8,3 | 4,56 | 55 |
| 9 | SL2 | calibration | 5,76 | 6,21 | 108 |
| 12 | XB4 | validation | 0 | -0,70 | - |
| 13 | XMT(18)4 | validation | 0 | 0,41 | - |
| 14 | XMT(34)4 | calibration | 0 | 0,40 | - |
| 15 | XN(18)4 | calibration | 0 | 0,46 | - |
| 16 | XN(34)4 | validation | 0,47 | -0,32 | 168 |
| 17 | XB8 | calibration | 0,31 | -0,63 | 303 |
| 18 | XMT(18)8 | calibration | 0 | -0,17 | 0 |
| 19 | XMT(34)8 | calibration | 0 | 0,23 | 0 |
| 20 | XN(18)8 | calibration | 0 | 0,57 | 0 |
| 21 | XN(34)8 | calibration | 0,32 | -0,05 | 116 |
| 22 | XB12 | validation | 0,92 | 0,26 | 28 |
| 23 | XMT(18)12 | calibration | 0,14 | 0,30 | 214 |
| 24 | XMT(34)12 | calibration | 0,26 | 0,88 | 338 |
| 25 | XN(18)12 | calibration | 0,28 | -0,42 | 250 |
| 26 | XN(34)12 | calibration | 0,38 | -0,30 | 179 |
| 27 | AB4 | calibration | 2,04 | 2,23 | 109 |
| 28 | AMT(18)4 | validation | 1,75 | 3,93 | 225 |
| 29 | AMT(34)4 | calibration | 1,84 | 1,87 | 102 |
| 30 | AN(18)4 | validation | 1,6 | 3,20 | 200 |
| 31 | AN(34)4 | calibration | 1,71 | 2,41 | 141 |
| 32 | AB8 | calibration | 2,69 | 2,60 | 97 |

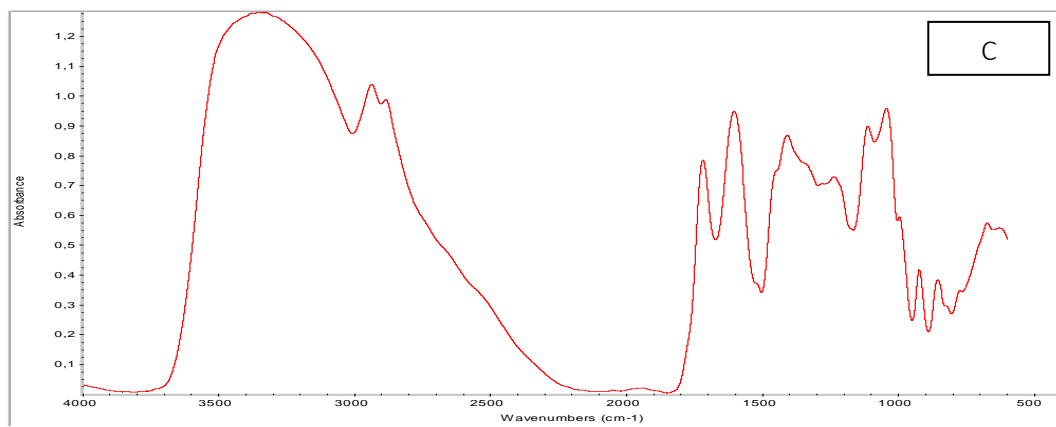
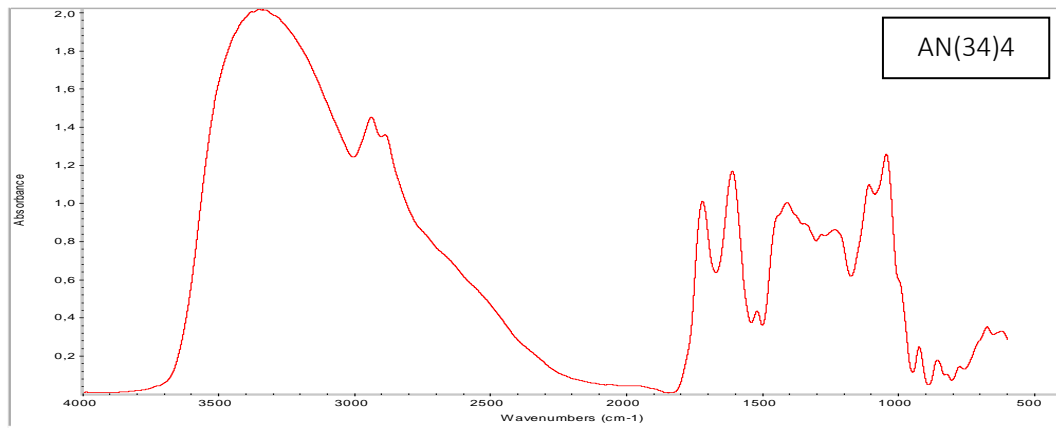
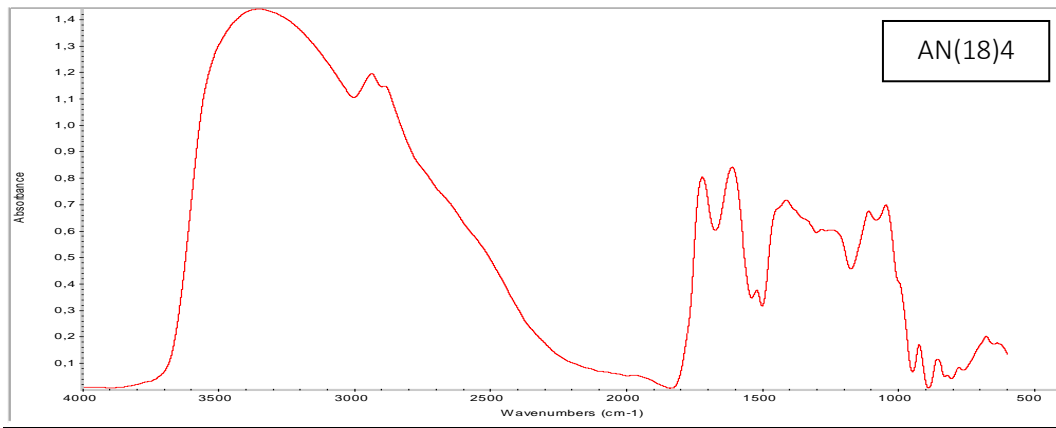
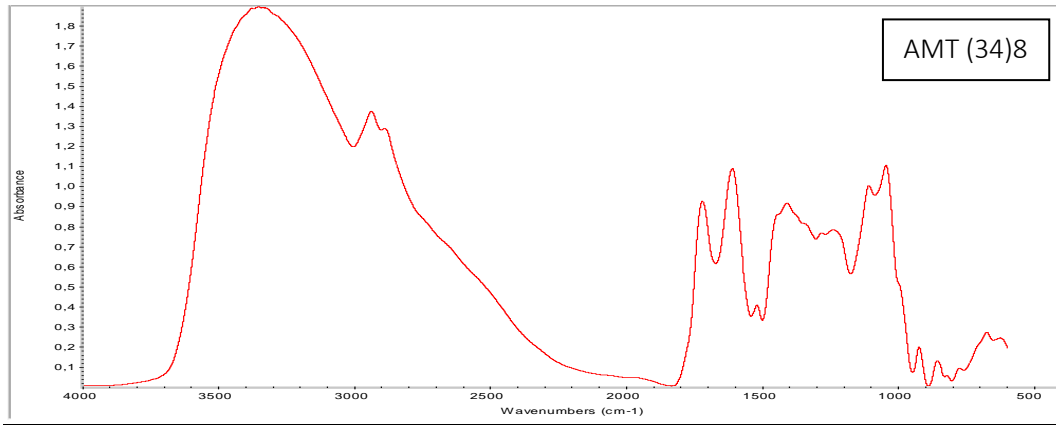
| | | | | | |
|----|-----------|-------------|------|------|-----|
| 33 | AMT(18)8 | calibration | 2,62 | 2,80 | 107 |
| 34 | AMT(34)8 | calibration | 3,38 | 2,58 | 76 |
| 35 | AN(18)8 | calibration | 1,73 | 3,04 | 176 |
| 36 | AB12 | validation | 3,28 | 2,54 | 77 |
| 37 | MB4 | calibration | 3,97 | 4,36 | 110 |
| 38 | MMT(18)4 | validation | 4,37 | 5,19 | 119 |
| 39 | MMT(34)4 | calibration | 4,39 | 5,10 | 116 |
| 40 | MN(18)4 | calibration | 5,56 | 5,39 | 97 |
| 41 | MN(34)4 | calibration | 7,53 | 5,79 | 77 |
| 42 | MMT(18)8 | calibration | 4,09 | 4,89 | 120 |
| 43 | MMT(34)8 | calibration | 5,34 | 5,54 | 104 |
| 44 | MN(18)8 | calibration | 7,45 | 6,59 | 88 |
| 45 | MN(34)8 | calibration | 6,34 | 5,33 | 84 |
| 46 | MB12 | calibration | 4,15 | 4,94 | 119 |
| 47 | MMT(18)12 | calibration | 3,89 | 5,76 | 148 |
| 48 | MMT(34)12 | validation | 7,41 | 5,07 | 68 |
| 49 | MN(18)12 | calibration | 7,49 | 6,22 | 83 |
| 50 | MN(34)12 | calibration | 6,74 | 6,53 | 97 |

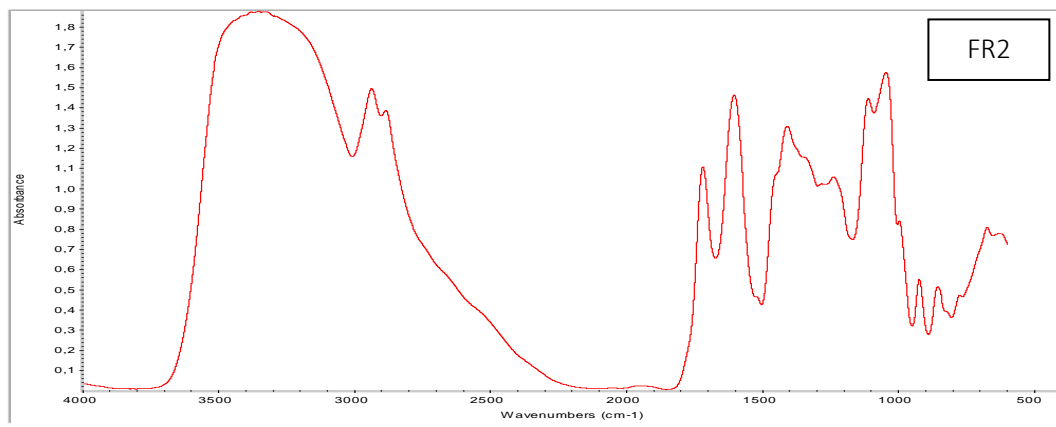
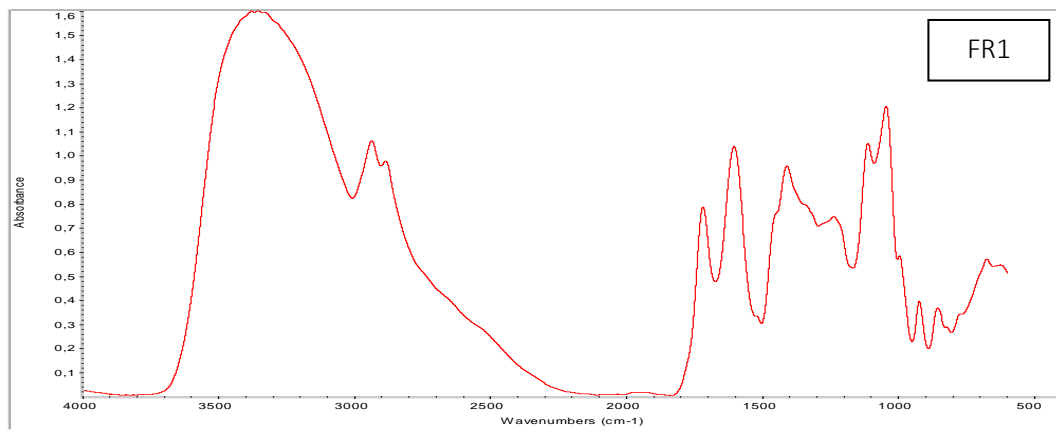
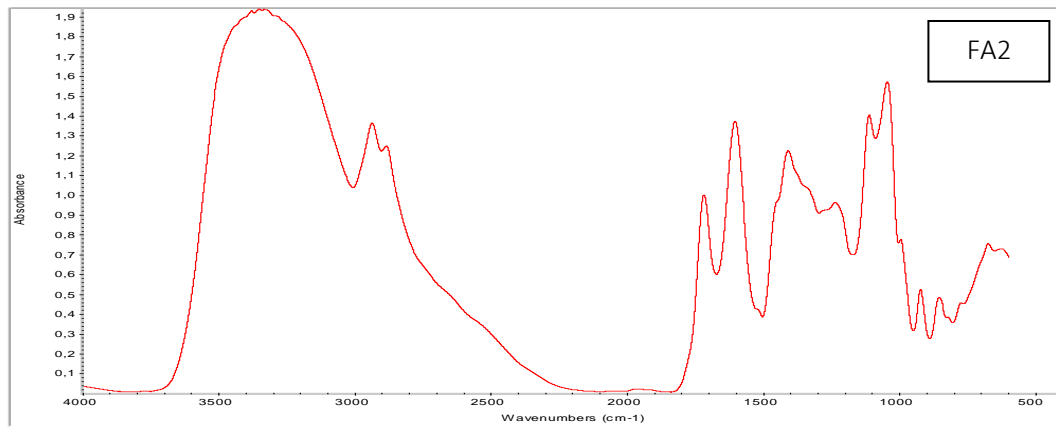
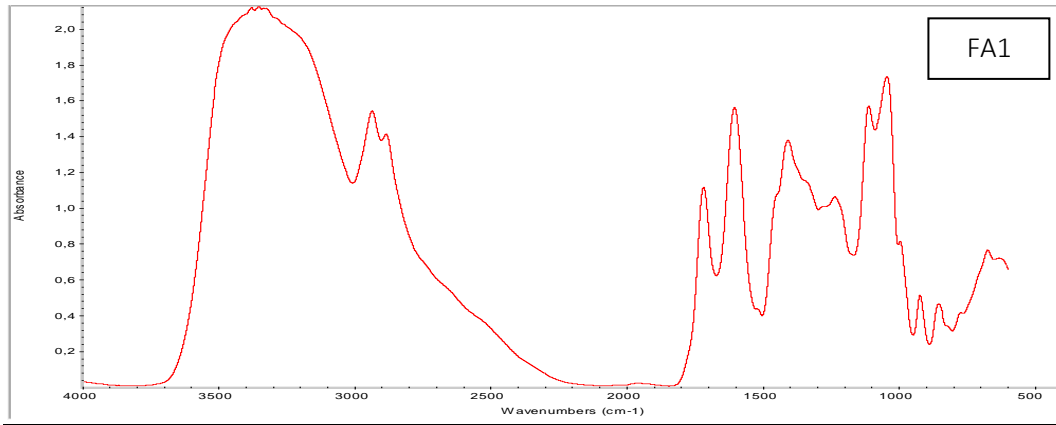
Μέσα φάσματα επεξεργασμένα με smoothing

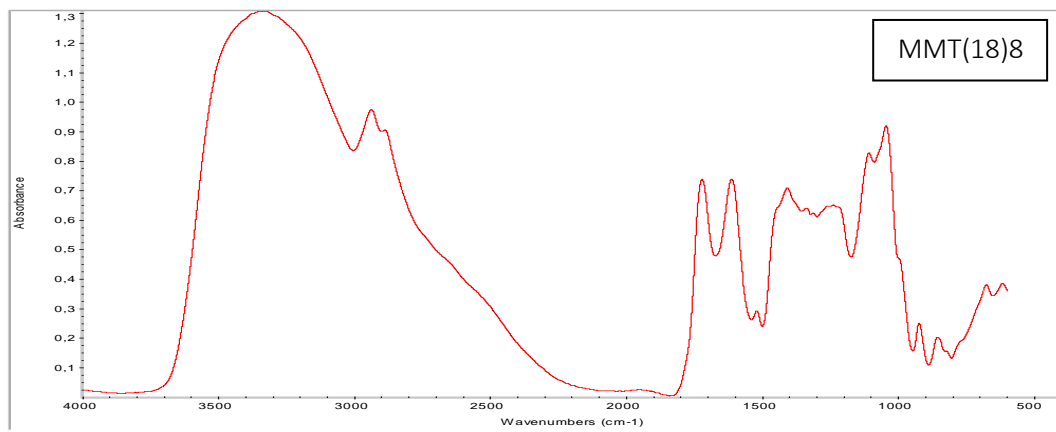
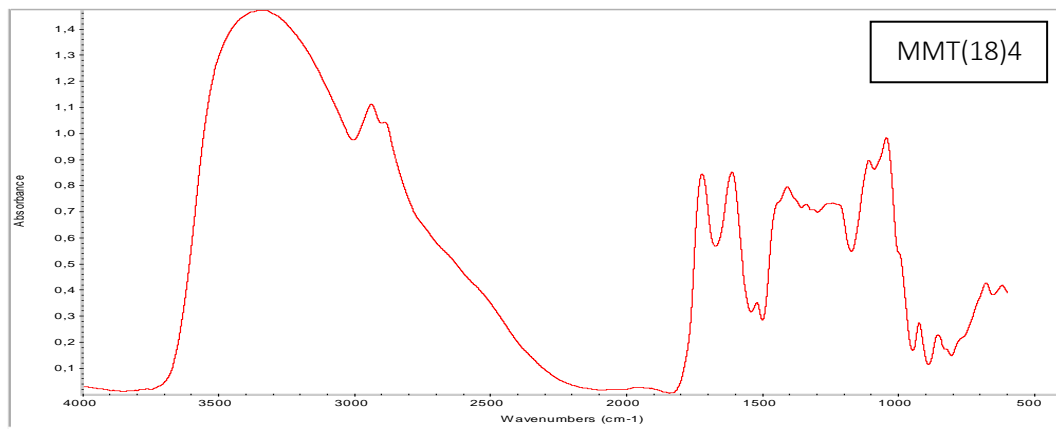
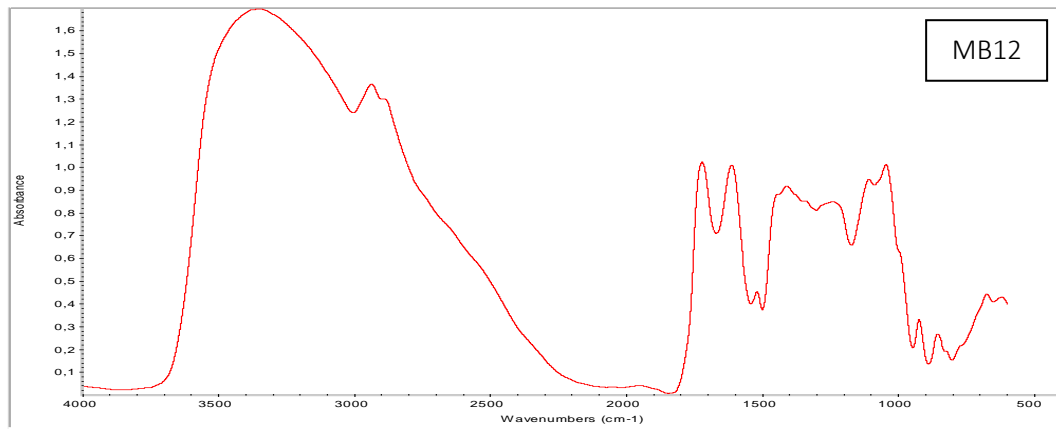
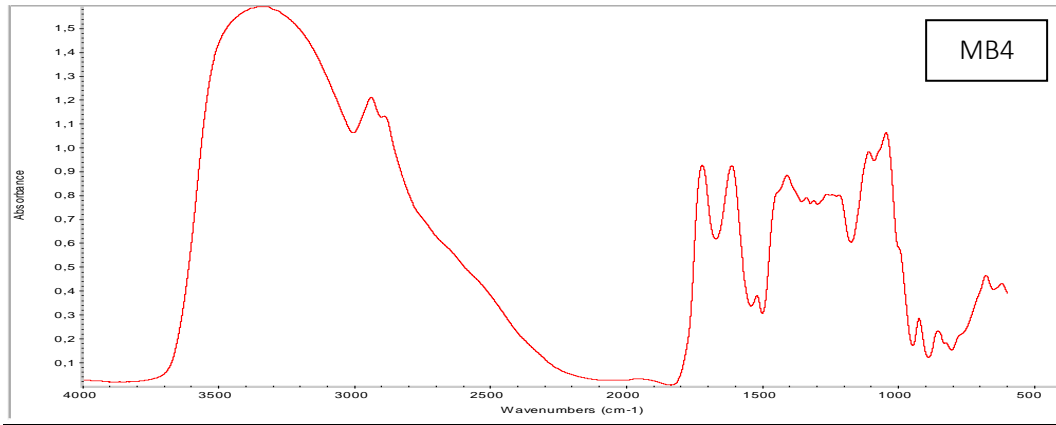


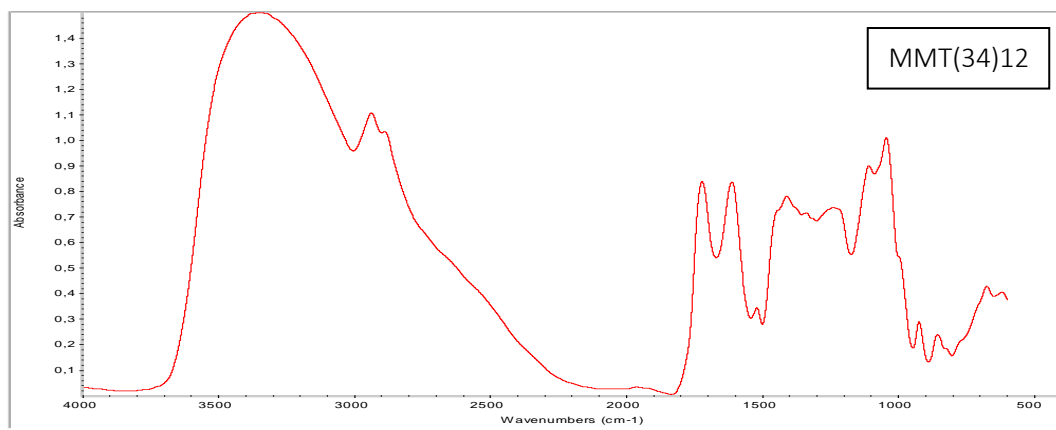
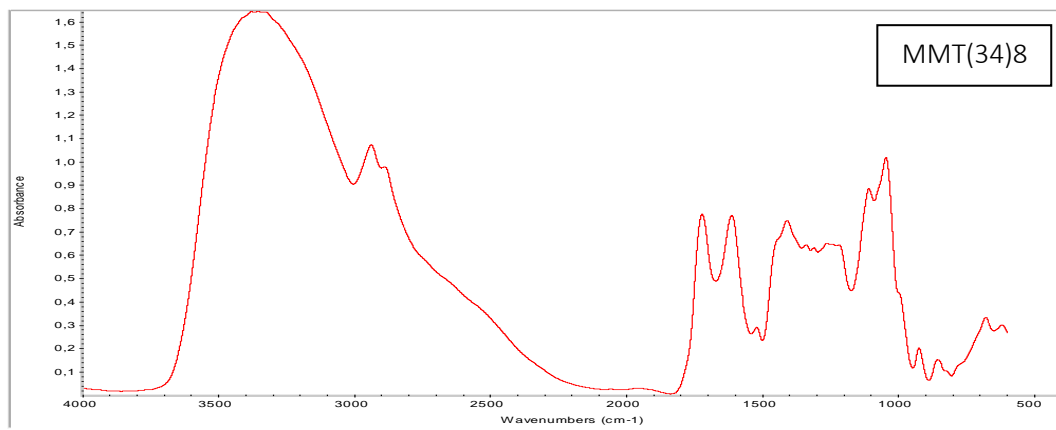
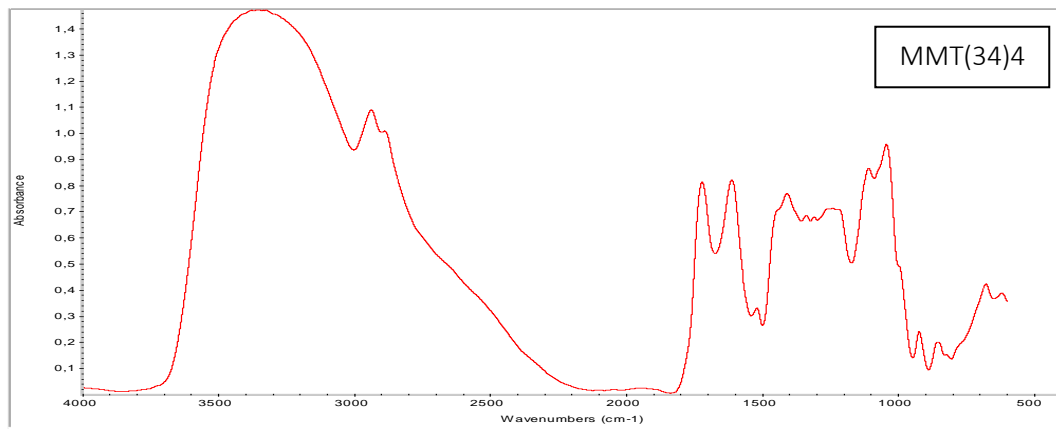
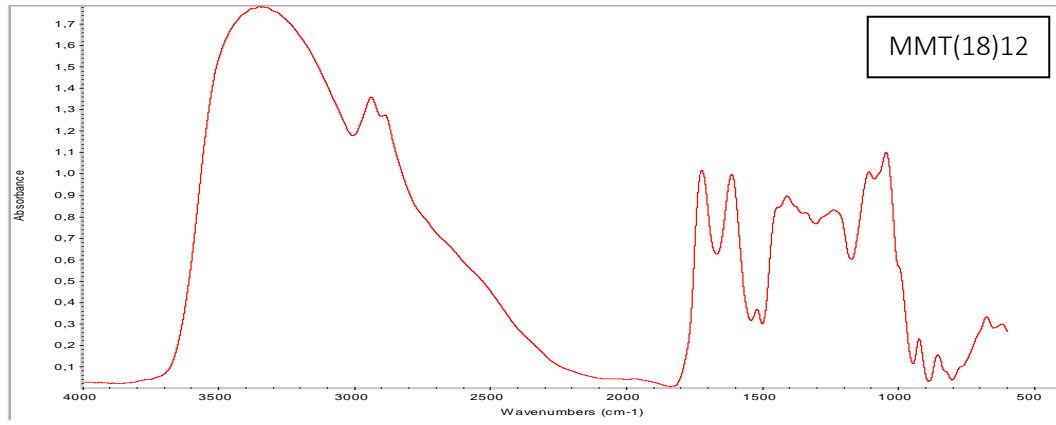


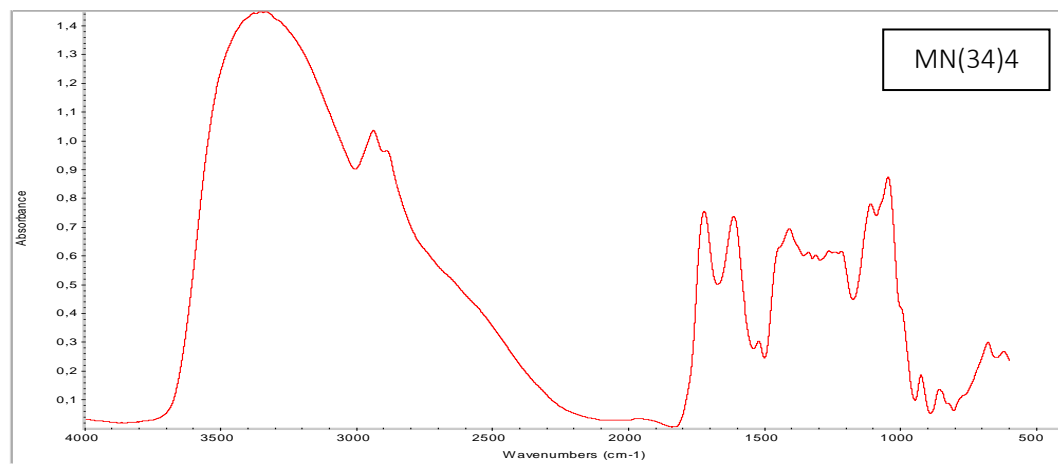
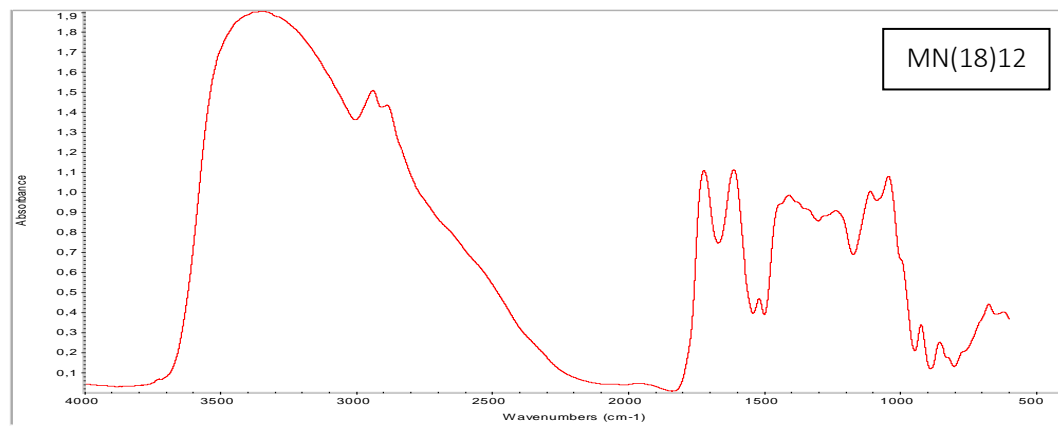
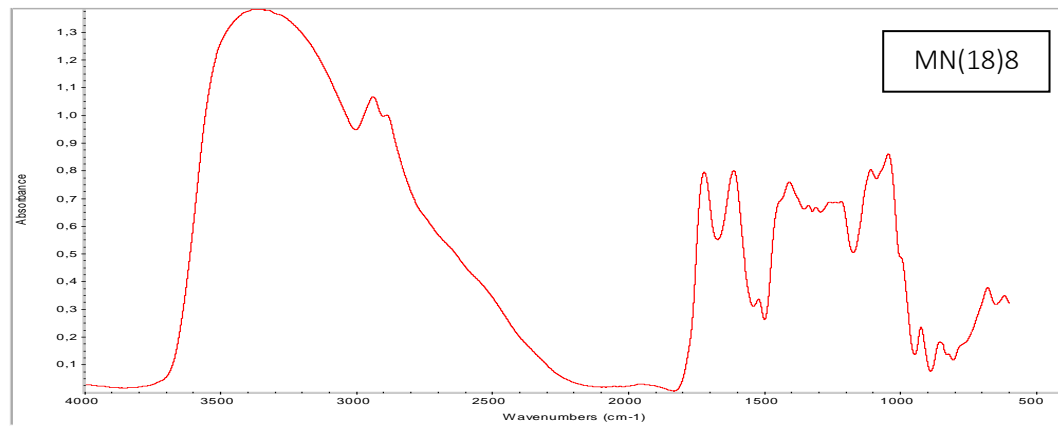
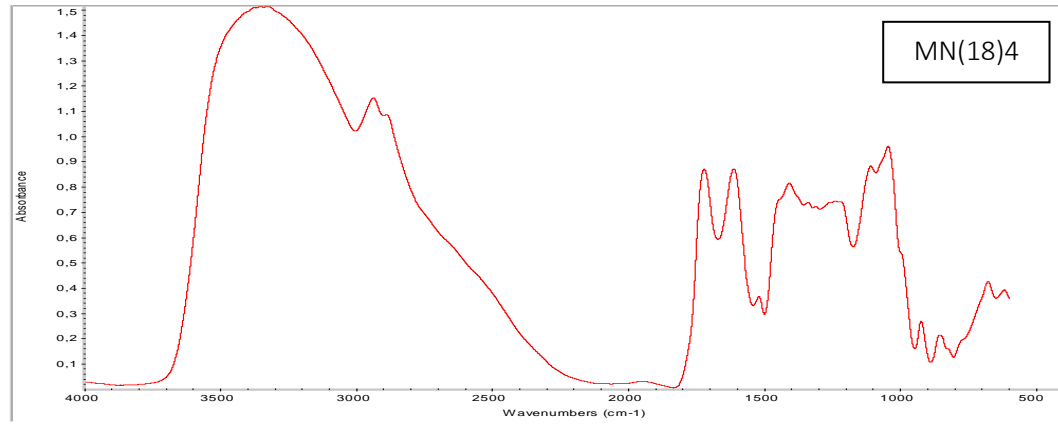


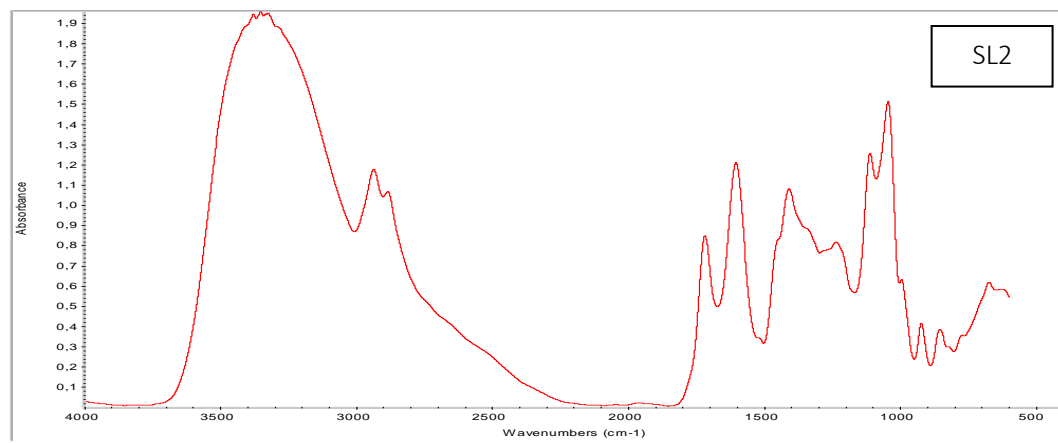
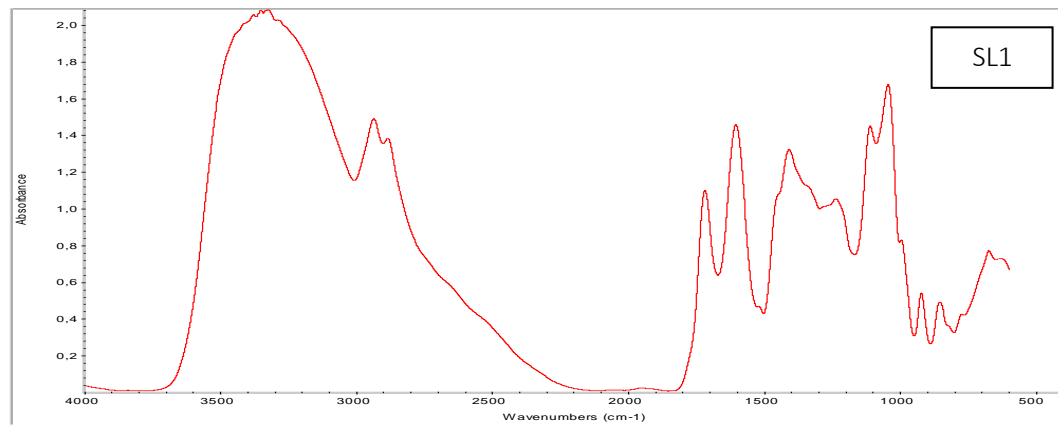
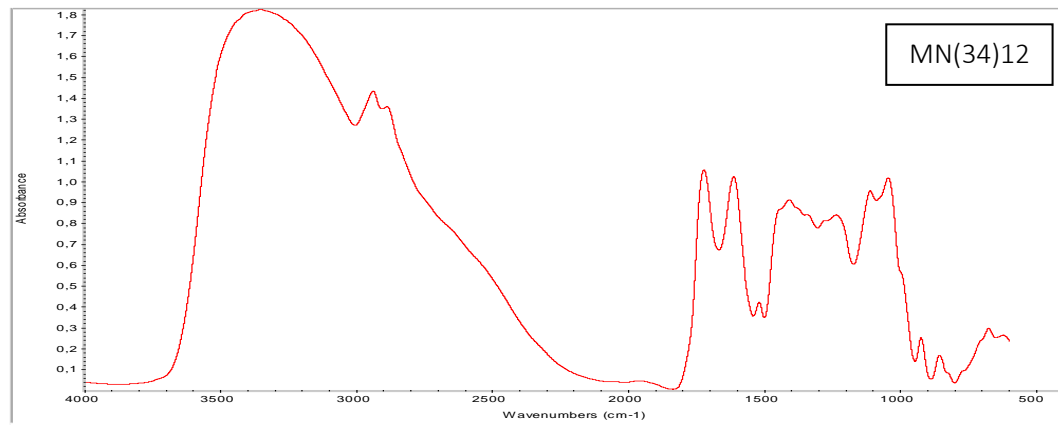
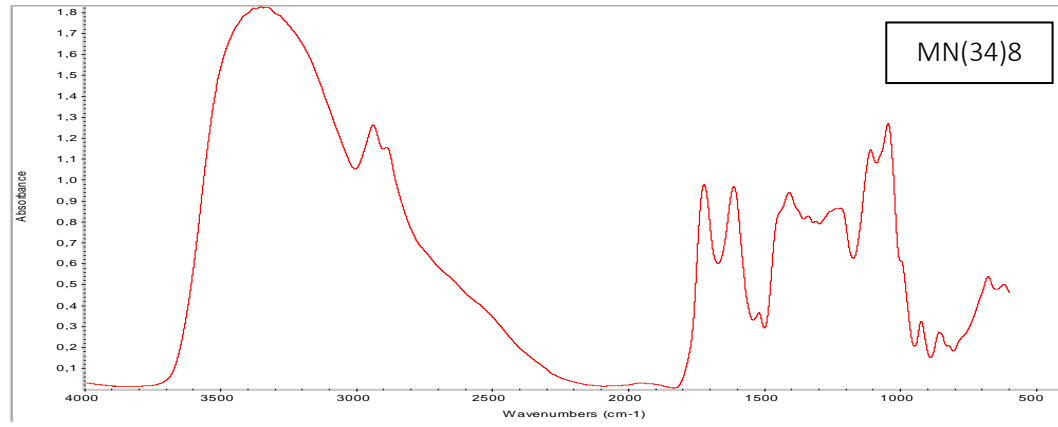


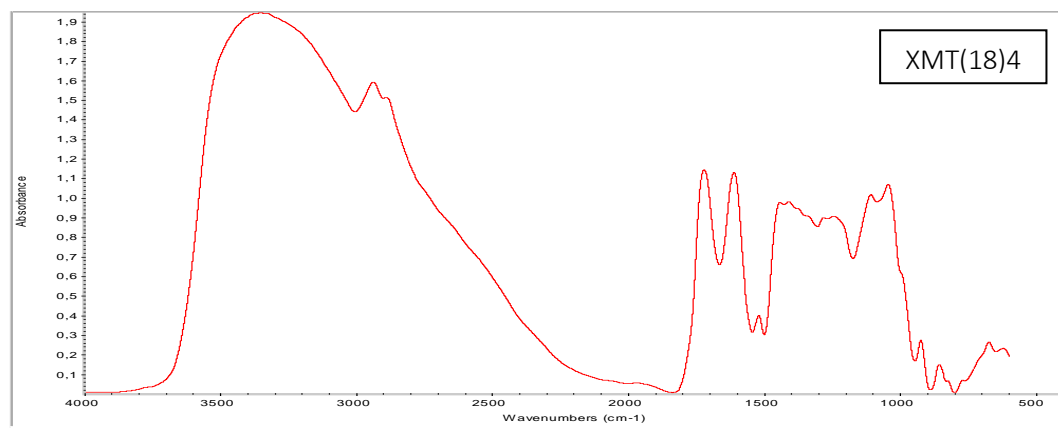
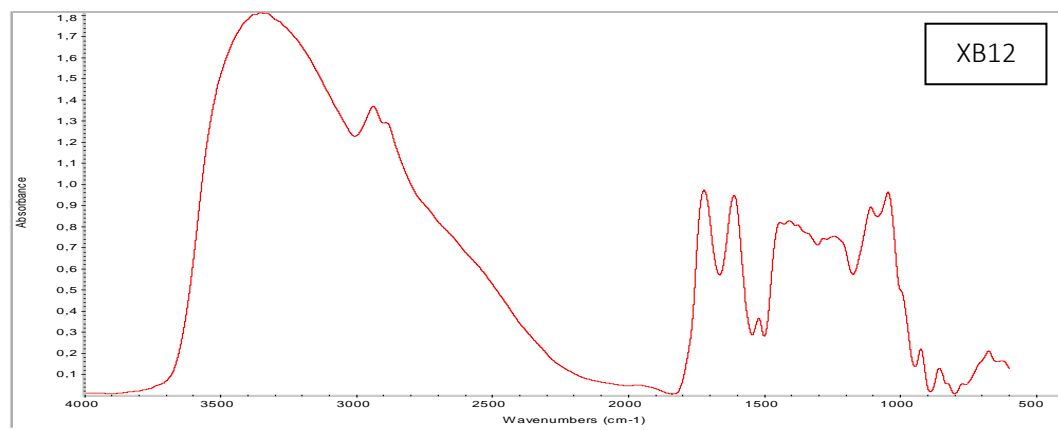
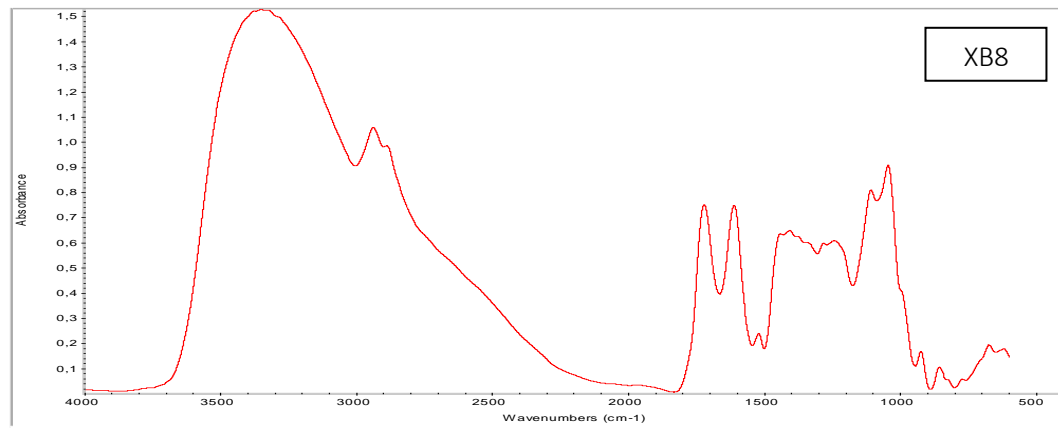
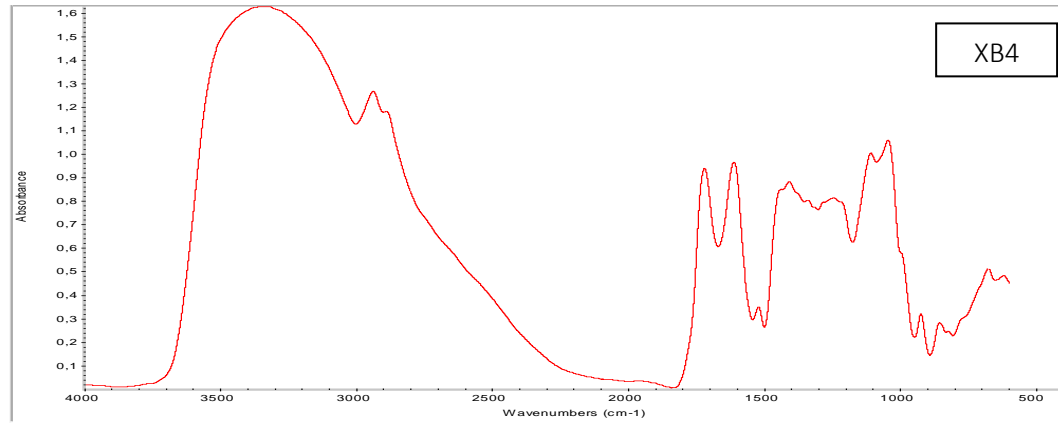


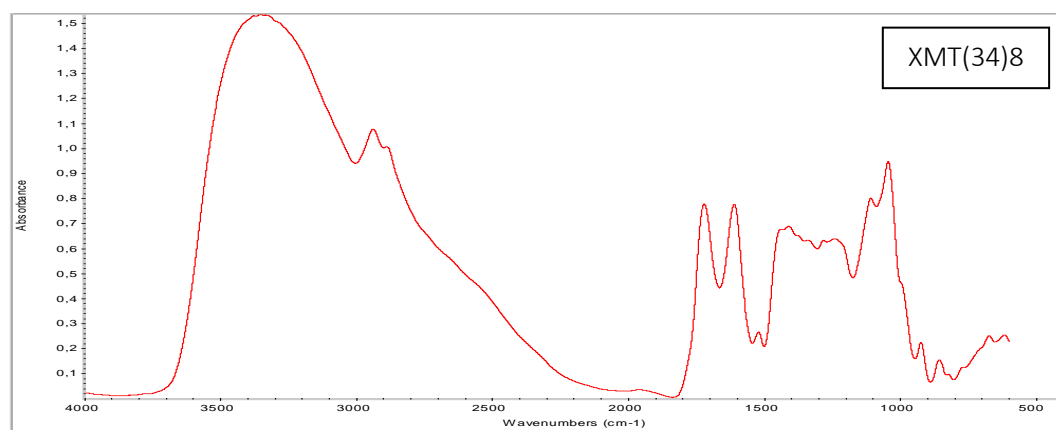
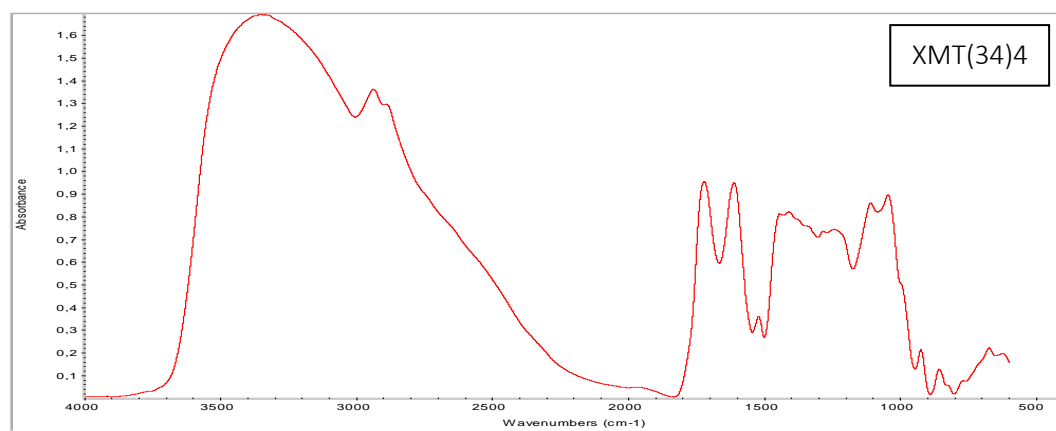
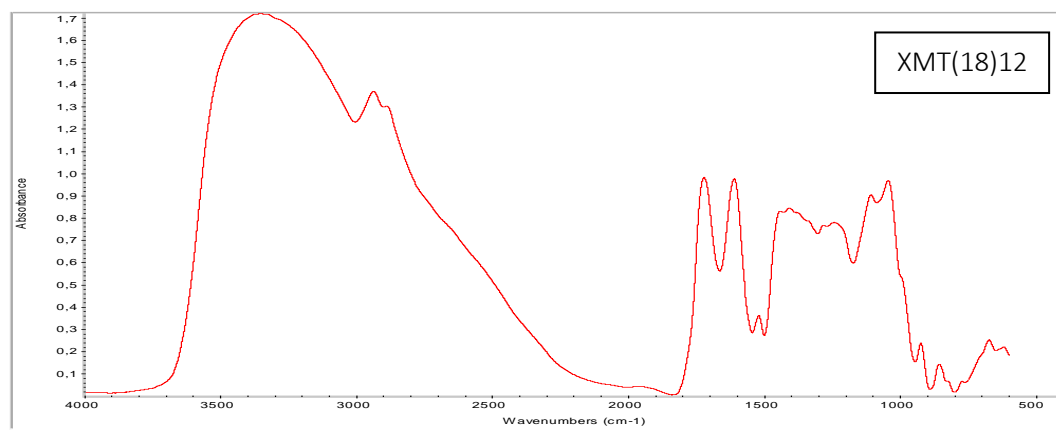
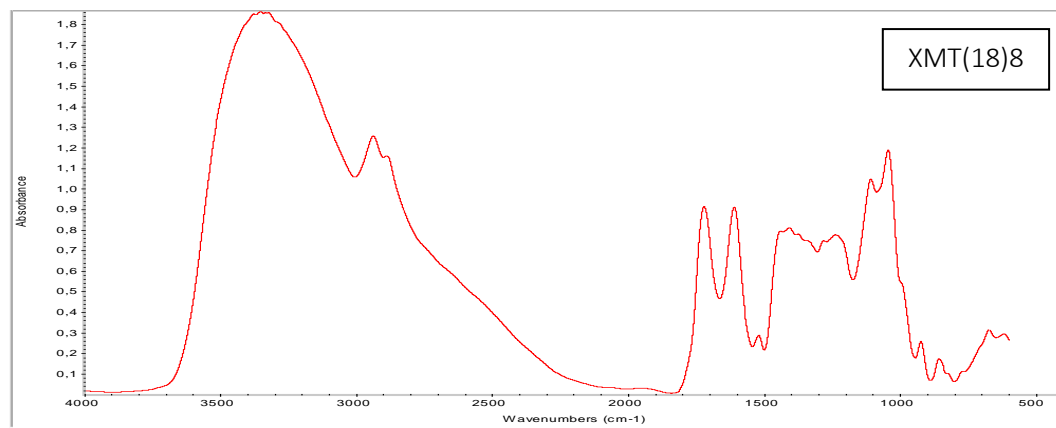


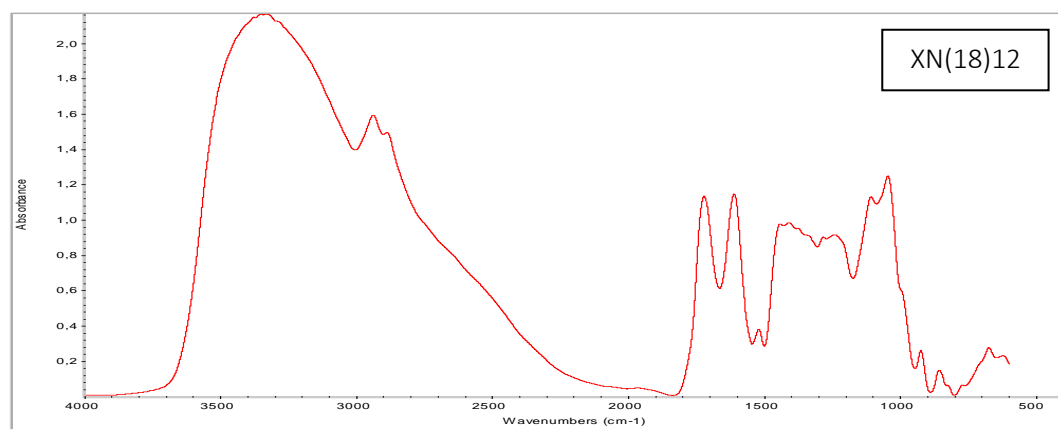
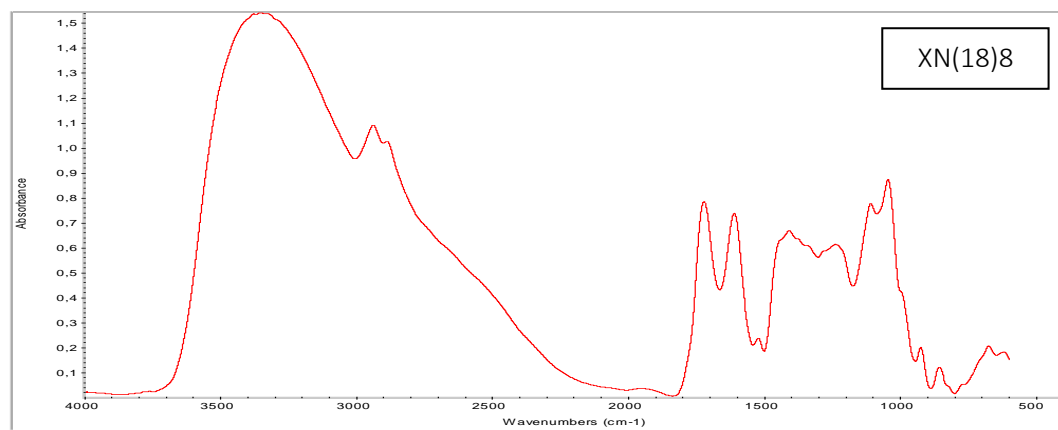
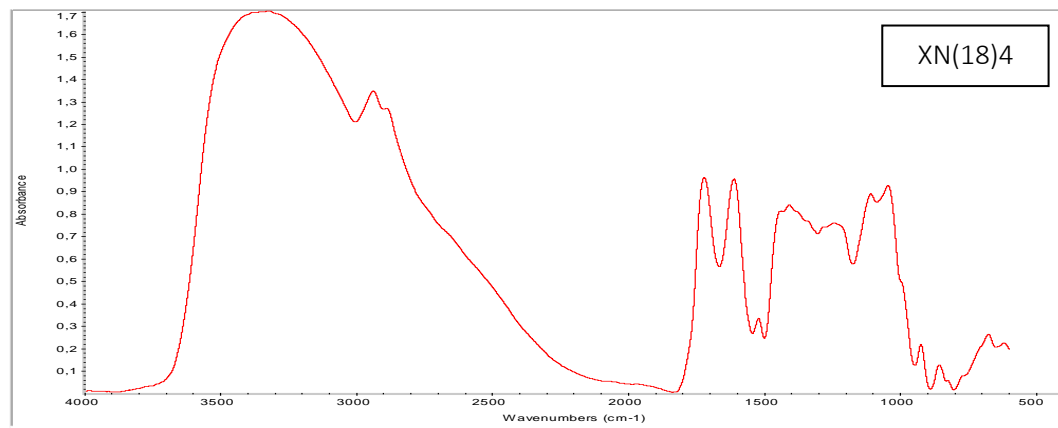
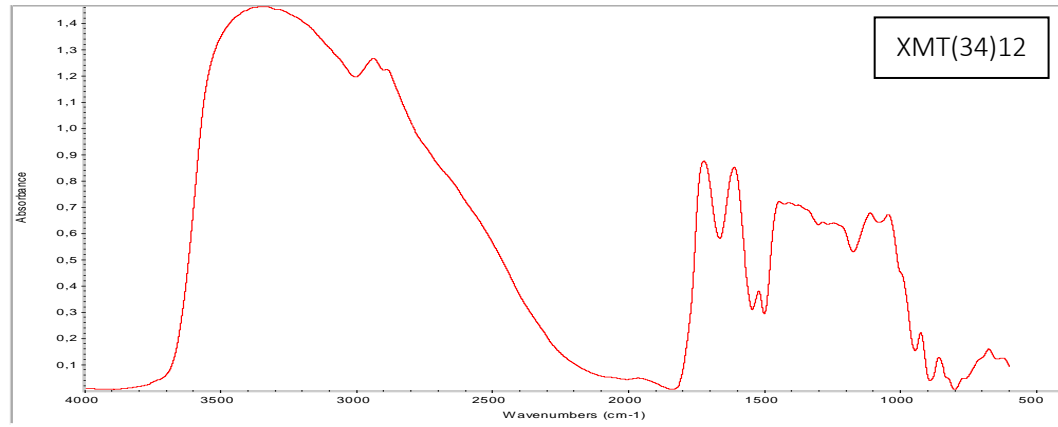


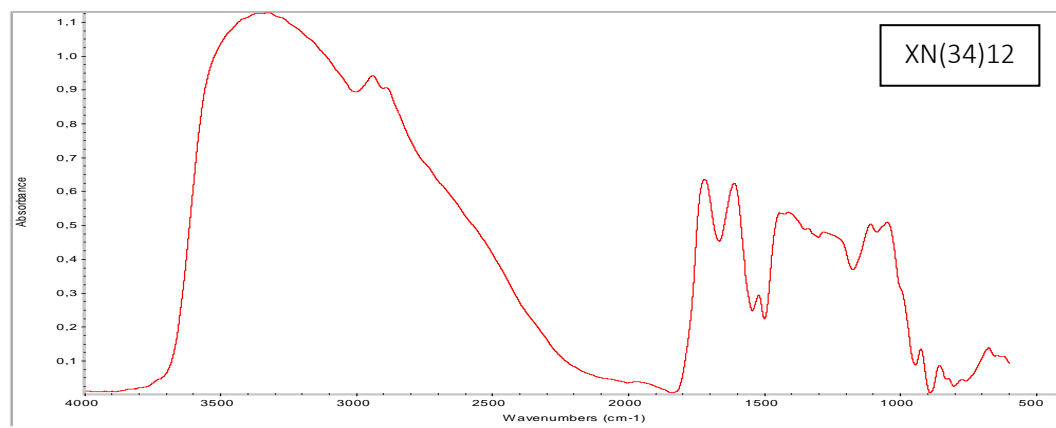
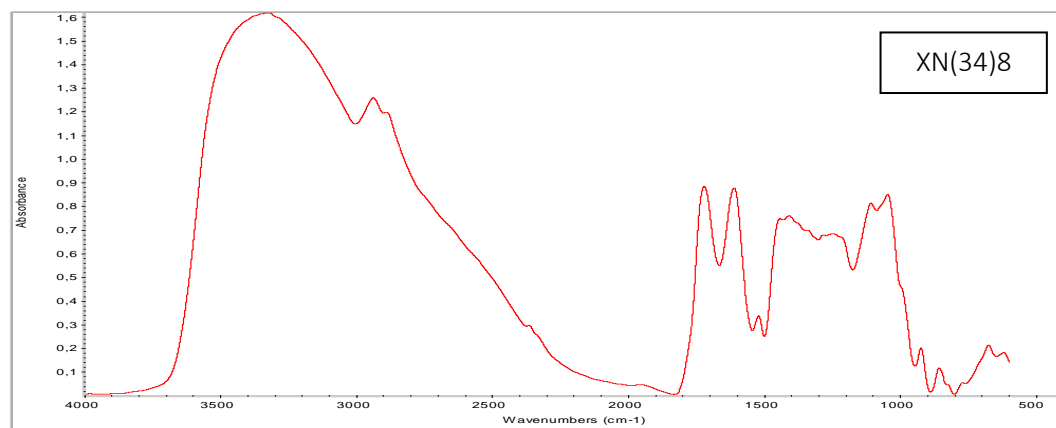
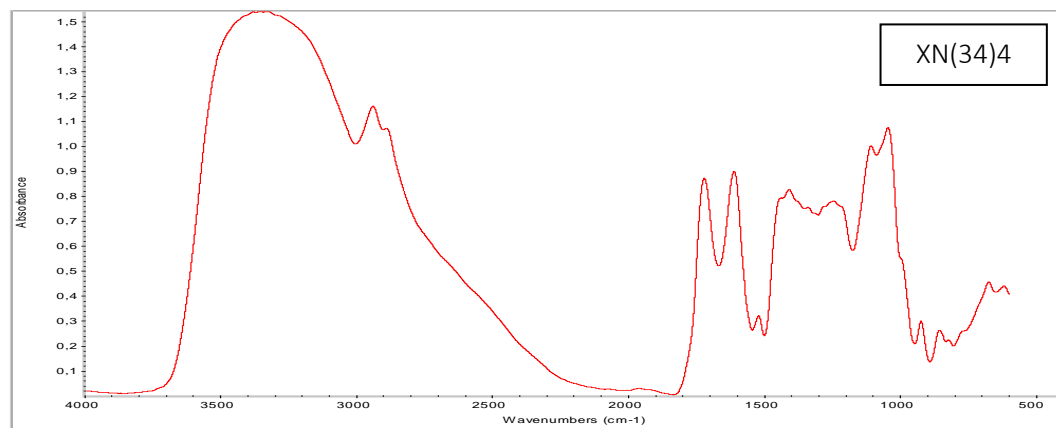












Μέσα φάσματα επεξεργασμένα με normalize

