



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων Και Διατροφής του Ανθρώπου

Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΩΝ
ΙΟΝΙΩΝ ΝΗΣΙΩΝ»**



ΜΑΡΙΝΟΣ Β. ΞΑΓΟΡΑΡΗΣ

BSc Food Science and Nutrition MSc Natural Products

ΑΘΗΝΑ 2018



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακή Μελέτη

«Μελέτη της χημικής σύστασης και αντιοξειδωτικής ικανότητας φαινολικών συστατικών
στέμφυλων προερχομένων από ποικιλίες των Ιονίων νήσων»

ΜΑΡΙΝΟΣ Β. ΞΑΓΟΡΑΡΗΣ

BSc Food Science and Nutrition MSc Natural Products

Επιβλέπων καθηγητής: Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Τίτλος διατριβής

«Μελέτη της χημικής σύστασης και αντιοξειδωτικής ικανότητας φαινολικών συστατικών
στέμφυλων προερχομένων από ποικιλίες των Ιονίων νήσων»

ΜΑΡΙΝΟΣ Β. ΞΑΓΟΡΑΡΗΣ

BSc Food Science and Nutrition MSc Natural Products

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α (Επιβλέπων)

Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α

στους δικούς μου ανθρώπους,

Μια πολύ πεινασμένη αλεπού περπατούσε ψάχνοντας να βρει κάτι να φάει κι έτσι έφτασε σε ένα αμπέλι γεμάτο ζουμερά σταφύλια. Τα σταφύλια φαινόταν πεντανόστιμα αλλά κρεμόταν από τα κλαδιά και τα κλαδιά ήταν ψηλά. Στην προσπάθειά της να αρπάξει τους ζουμερούς καρπούς η αλεπού προσπάθησε να τους φτάσει πηδώντας. Πηδούσε και προσπαθούσε, πηδούσε και προσπαθούσε για πολύ ώρα, αλλά δεν κατάφερε να τα φτάσει, παρ' όλες τις προσπάθειες...

Όταν μετά από ώρα κουρασμένη από την προσπάθεια κατάλαβε ότι δε θα τα φτάσει κούνησε το κεφάλι και είπε στον εαυτό της: «Εντάξει δεν πειράζει... Τα σταφύλια άλλωστε φαίνονται ζινά δε θα 'ναι και τόσο νόστιμα...»

Ηθικό Δίδαγμα: Είναι εύκολο να υποτιμάμε αυτό που δεν μπορούμε να καταφέρουμε.

-ΑΙΣΩΠΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο Γενικής Χημείας Τροφίμων, του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με κατεύθυνση Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2016-2018.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον εισηγητή της παρούσας διπλωματικής, τον κ. Παππά Χρηστό, Αναπληρωτή Καθηγητή. Τον ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή του και το ενδιαφέρον που έδειξε σε όλη τη διάρκεια της μελέτης μου, καθώς με το άρτιο επιστημονικό υπόβαθρό του, την ακρίβεια και τη σαφήνεια του λόγου του, με βοήθησε να υπερνικήσω τις δυσκολίες που αντιμετώπισα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Ταραντίλη Πέτρο για την πολύτιμη βοήθειά του, τις συμβουλές και την καθοδήγησή του για την ορθή εκπόνηση της μελέτης μου.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην κα. Δήμητρα Δαφερέρα, Μέλος ΕΔΠ, και στην κα. Ασπρακά Νάντια, μέλος ΕΔΠ, για την πολύτιμη συμβολή τους και τις γνώσεις τους, οι οποίες αποτέλεσαν σημαντική βοήθεια για την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Τέλος, νιώθω χρέος μου να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της Κατεύθυνσης των Φυσικών Προϊόντων, τόσο για τις γνώσεις που απλόχερα μού πρόσφεραν και συνέβαλαν στην επιστημονική μου κατάρτιση, όσο και για το ήθος τους που συνέβαλε στην πνευματική μου εξέλιξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένεια μου και την κοπέλα μου Ελισάβετ Λαζάρου για την ενθάρρυνση και αμέριστη υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Μαρίνος Β. Ξαγοράρης

BSc Food Science and Nutrition MSc Natural Products

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρπός της αμπέλου *Vitis vinifera L.*, θεωρείται ένας από τους πιο νόστιμους και διατροφικά άριστους καρπούς λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε βιοδραστικές ουσίες. Οι ρώγες σταφυλιού αποτελούν την πρώτη ύλη του κρασιού κατά την διαδικασία της οينوποίησης κατά την οποία γίνεται έκθλιψη των σταφυλιών με αποτέλεσμα την εκροή του χυμού της σάρκας και την επαφή του με τα στερεά μέρη των σταφυλιών.

Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, (ΥΠΑΑΤ), στα Ιόνια νησιά την περίοδο 2017 παράχθηκαν 1.179,25 τόνοι σταφύλια προς οينوποίηση και εκ των όποιων πρόεκυψαν 175,12 τόνοι στέμφυλα. Τα στέμφυλα αποτελούν το στερεό υπόλειμμα (φλοιός και γίγαρτα).

Στην Ελλάδα τα περισσότερα οινοποιεία είναι επιχειρήσεις μικρής κλίμακας που δεν έχουν τη δυνατότητα να διαχειριστούν κατάλληλα τα απόβλητά που προκύπτουν κατά την οينوποίηση. Τα απόβλητα περιλαμβάνουν μεταξύ των άλλων, μίσχους σταφυλιών, στέμφυλα, γίγαρτα σταφυλιού και ελαίου αυτών, οινολάσπη, μαγιά, τρυγικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα και λύματα. Συνήθως, αυτά εναποτίθενται σε αγρούς όπου μετατρέπονται σε λίπασμα, μέσα από διαδικασίες αερόβιας διάσπασης και αποτελούν μία συνεχή εστία μόλυνσης. Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των αποβλήτων δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων οδηγούν στην εμφάνιση βιοτοξικών φαινομένων που υποβαθμίζουν το φυσικό περιβάλλον.

Στο συγκεκριμένο τμήμα της μεταπτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας γρήγορης, οικονομικής και φιλικής προς το περιβάλλον διαδικασίας για την ολοκληρωμένη διαχείριση των στέμφυλων. Πραγματοποιήθηκε ανάκτηση εκχυλισμάτων, τα οποία προορίζονται για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ή εναλλακτικά σε καλλυντικά προϊόντα.

Στο πρώτο στάδιο τα στέμφυλα εκχυλίστηκαν με χρήση διαλύτη νερό-γλυκερόλη. Το εκχύλισμα περιείχε κυρίως πολυφαινόλες. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με βάση τη μελέτη της βιβλιογραφίας και εργαστηριακές δοκιμές, με σκοπό τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Στο δεύτερο στάδιο έγινε διαχωρισμός, απομόνωση και ταυτοποίηση των συστατικών με τεχνικές ενόργανης ανάλυσης. Έγινε χρήση χρωματογραφιών και φασματοσκοπικών τεχνικών και συγκεκριμένα UV-Vis, HPLC-DAD, LC-MS, FT-IR, RAMAN. Οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις που απομονώθηκαν από τα στέμφυλα είναι οι κατεχίνες

(κατεχίνη και επικατεχίνη) και τα πολυμερή τους, οι προκυανιδίνες.

Στο τρίτο στάδιο στα εκχυλίσματα προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο με την δοκιμή Folin-Ciocalteu. Τα στερεά υπολείμματα της διαδικασίας οινοποίησης, παρουσίασαν υψηλό φαινολικό περιεχόμενο αποδεικνύοντας ότι κατά τη διαδικασία της οινοποίησης μεγάλη ποσότητα πολυφαινολών παραμένει στα στέμφυλα.

Ακολούθησε μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας και η εκτίμηση της έγινε με τις δοκιμές ABTS και DPPH. Τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με το είδος εκχυλίσματος (ακατέργαστο, υδρολυμένο). Οι τιμές DPPH για την παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) κυμάνθηκαν από 16,8 % έως 53,2 % για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενώ οι τιμές για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 3,08 % έως 7,05 %. Αντίστοιχα η ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) κυμάνθηκε από 0,468 έως 1,474 ($\mu\text{mol DPPH/g}$ επί ξηρού βάρους) για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενώ οι τιμές για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 0,09 έως 0,208 ($\mu\text{mol DPPH/g}$ ξηρού βάρους). Οι τιμές ABTS της παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) κυμάνθηκαν από 43,3 % έως 98,04 % για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενώ οι τιμές για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 6,2 % έως 16,973 %.

Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, αναδείχθηκαν τα πλεονεκτήματα των προτεινόμενων πράσινων μεθόδων εκχύλισης που αφορούν την εκχύλιση φαινολικών συστατικών από στέμφυλα.

Λέξεις κλειδιά: Άμπελος • *Vitis vinifera L.* • Ποικιλίες Ιόνιων νήσων • Στέμφυλα • Αξιοποίηση αποβλήτων • Φαινολικές ενώσεις • Γλυκερόλη • Εκχύλιση • HPLC-DAD • Raman • LC-MS • FT-IR • Αντιοξειδωτικά •

ABSTRACT

The fruit of the vine *Vitis vinifera L.* is considered one of the most delicious and nutritionally excellent fruits due to its high content of bioactive substances. Grape berries are the raw material of wine during the vinification process in which the grapes are pressed, resulting in the outflow of the juice of the flesh and its contact with the solid parts of the grapes.

According to data from the Ministry of Rural Development and Food, the Ionian Islands produced 1.179,25 tons of grapes for wine making in the Ionian Islands in 2017, 175,12 tons of marc. Mars form the solid residue (bark and seed).

In Greece, most wineries are small-scale enterprises that do not have the ability to properly manage waste resulting from winemaking. Waste includes, among others, grape stems, grape marc, grape seed and oil, lees, yeast, tartaric acid, carbon dioxide and sewage. Typically, they are deposited in fields where they are converted into fertilizer, through aerobic breakdown procedures, and are a constant focus of contamination. The particularly high organic waste load is not readily biodegradable, and high concentrations of phenolic compounds lead to the occurrence of biotoxic effects that degrade the natural environment.

In this section of the postgraduate study, the development and optimization of a fast, economic and environmentally friendly process for the integrated management of the marc was carried out. Extracts were recovered which are intended for use in the food industry or alternatively in cosmetic products.

In the first step, the marc was extracted using a water-glycerol solvent. The extract contained mainly polyphenols. The process was based on the literature study and laboratory tests, in order to optimize the method.

In the second stage, the separation, isolation and identification of the components were performed by instrumental analysis techniques. Chromatographs and spectroscopic techniques were used, namely UV-Vis, HPLC-DAD, LC-MS, FT-IR, RAMAN. The main phenolic compounds isolated from the marrow are catechins (catechin and epicatechin) and their polymers, procyanidins.

In the third step in the extracts the total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu test. The solid residues of the vinification process showed high phenolic content, proving that during the winemaking process a large amount of polyphenols remained in the marc.

A study of antioxidant capacity was followed and its assessment was performed with the ABTS and DPPH tests. The results varied according to the type of extract (crude, hydrolyzed). DPPH values for inhibition of free radical (I %) ranged from 16.8 % to 53.2 % for crude extracts while values for hydrolyzed extracts ranged from 3.08 % to 7.05 %. Accordingly, the AAR ranged from 0.468 to 1.474 ($\mu\text{mol DPPH} / \text{g dry weight}$) for the crude extracts, whereas the values for the hydrolyzed extracts varied from 0.09 to 0.208 $\mu\text{mol DPPH} / \text{g dry weight}$. The ABTS values of free radical inhibition (% I) ranged from 43.3 % to 98.04 % for crude extracts while values for hydrolyzed extracts ranged from 6.2 % to 16.973 %.

The study has shown the advantages of the proposed green extraction methods for the extraction of phenolic components from marc.

Key words: Vine • *Vitis vinifera L.* • Ionian islands varieties • Grape pomace • Waste recovery • Phenolic compounds • Glycerol • Extraction • HPLC-DAD • LC-MS • FT-IR • Raman • Antioxidants •

Πινάκας Περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	iv
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xvi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ	xvii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α	1
A.1 Φυσικά προϊόντα	1
A.2 Οικογένεια <i>Vitaceae</i>	1
A.2.1 Το γένος <i>Vitis</i> του είδους <i>vinifera</i>	2
A.2.2 Ταξινόμηση κυριότερων Ελληνικών ποικιλιών αμπέλου	3
A.3 Η ιστορία της αμπέλου	10
A.4 Βοτανική Περιγραφή	11
A.4.1 Μορφολογία και σύνθεση της ράγας	12
A.5 Διαδικασίες οινοποίησης και παραπροϊόντα	13
A.6 Στατιστικά στοιχεία αμπέλου-οινοποίησης και παραπροϊόντων	14
A.6.1. Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας παραγωγής	14
A.6.2 Στατιστικά στοιχεία Ελληνικής παραγωγής	15
A.7 Ανάλυση των παραπροϊόντων της παραγωγής οίνου	17
A.7.1 Είδη στεμφύλων	19
A.7.2 Κατηγορίες στεμφύλων	19
A.7.3 Νομοθεσία στέμφυλων	21
A.7.4 Υφιστάμενη κατάσταση στέμφυλων στο εξωτερικό	22
A.7.5 Υφιστάμενη κατάσταση στέμφυλων στην Ελλάδα	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β	24
B.1 Χημική προσέγγιση των στέμφυλων	24
B.1.1 Πρωτεΐνες	24
B.1.2 Πηκτίνες	24
B.1.3 Διαιτητικές ίνες	25
B.1.4 Λιπαρές ύλες	25
B.2 Φαινολικές ενώσεις	26
B.3 Κατάταξη φαινολικών ενώσεων	27
B.3.1 Μη φλαβανοειδείς φαινόλες	28

B.3.2 Φλαβανοειδείς φαινόλες.....	29
B.3.2.1 Φλαβανόνες.....	30
B.3.2.2 Φλαβονόλες.....	30
B.3.2.3 Τανίνες.....	32
B.3.2.4 Ανθοκυάνες.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ.....	34
Γ.1 Βιολογική Δράση Δευτερογενών Μεταβολιτών.....	34
Γ.2 Αντιοξειδωτική δράση.....	34
Γ.2.1 Δύναμη των αντιοξειδωτικών.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ.....	37
Δ.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC.....	37
Δ.1.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με Χρωματογραφία HPLC.....	37
Δ.1.1.1 Ποιοτικός προσδιορισμός.....	37
Δ.1.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός.....	38
Δ.2 Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών.....	38
Δ.3 Φασματομετρία υπεριώδους-ορατού.....	40
Δ.4 Γενικά στοιχεία φασματοσκοπίας υπερύθρου IR.....	41
Δ.4.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας υπερύθρου.....	41
Δ.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier.....	42
Δ.5.1 Τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform spectroscopy, DRIFT).....	43
Δ.6 Φασματοσκοπία Raman.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε.....	47
Ε.1 Σκοπός και αντικείμενο της Μελέτης.....	47
Ε.1.1 Επιλογή ποικιλιών.....	50
Ε.1.2 Αναλυτικές πληροφορίες δειγμάτων.....	50
Ε.1.3 Φύλαξη και συντήρηση δείγματος.....	50
Ε.1.4 Προκαταρκτική κατεργασία δείγματος.....	52
Ε.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από παραπροϊόντα οινοποίησης.....	55
Ε.2.1 Παραλαβή φαινολικών συστατικών από στέμφυλα.....	55
Ε.2.2 Υδρόλυση φαινολικών συστατικών.....	56
Ε.2.3 Επεξεργασία δειγμάτων πριν της ανάλυσης.....	60
Ε.3 Ανάλυση δειγμάτων με UV-Vis.....	60
Ε.4 Ανάλυση δειγμάτων με την τεχνική HPLC-DAD.....	64
Ε.5 Ανάλυση δειγμάτων με την τεχνική LC-MS.....	68

E.6 Φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων των στεμφύλων με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR και της τεχνικής DRIFTS	77
E.6.1 Ανάλυση κονιοροποιημένων δειγμάτων με την τεχνική DRIFTS	77
E.7 Φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων των στεμφύλων με χρήση της φασματοσκοπίας Raman.....	82
E.8 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu (TF)	85
E.9 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας	92
Γ.9.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή DPPH (A _{AR}).....	92
E.9.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή ABTS	99
E.10 Συμπεράσματα	105
E.11 Προοπτικές Μελλοντικής Έρευνας	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	121
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	131
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ	145
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ	150
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ε	170
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ζ	175

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ταξινόμηση του γένους <i>Vitis</i>	3
Εικόνα 2: Ποικιλία Ρομπόλα.	5
Εικόνα 3: Ποικιλία Μαυροδάφνη.	5
Εικόνα 4: Ποικιλία Βοστυλίδι – Γουστολίδι.	6
Εικόνα 5: Ποικιλία Αυγουσιτιάτης.	7
Εικόνα 6: Ποικιλία Παύλος.	7
Εικόνα 7: Ποικιλία Κατσακούλιας.	8
Εικόνα 8: Ποικιλία Σκιαδόπουλο.	8
Εικόνα 9: Ποικιλία Κακοτρύγης.	9
Εικόνα 10: Ποικιλία Cabernet.	9
Εικόνα 11: Μορφολογία <i>Vitis Vinifera</i> (κληματίδα – φύλλα – έλικες – άνθη – σταφύλι – γίγαρτα).	11
Εικόνα 12: Μορφολογία και σύνθεση της ράγας.	13
Εικόνα 13: Έκταση (%) με αμπέλια στην Ευρώπη.	14
Εικόνα 14: Σχηματική παρουσίαση της παγκόσμιας οινοκαλλιέργειας.	15
Εικόνα 15: Αμπελοοινικές περιοχές της Ελλάδας το 2014. (1 εκτάριο ισούται με 10 στρέμματα).	17
Εικόνα 16: Παραπροϊόντα της παραγωγής οίνου (αμπελόφυλλα, ξύλα, στέμφυλα, οινολάσπη).	18
Εικόνα 17: Διάγραμμα αζύμων, ζυμώνων και ημιζυμώνων στεμφύλων.	20
Εικόνα 18: Κατηγοριοποίηση των πολυφαινόλων στα σημαντικότερα παράγωγα τους.	27
Εικόνα 19: Δομή (<i>cis</i> -) και (<i>trans</i> -) ρεσβερατρόλης.	28
Εικόνα 20: Δομή (+) κατεχίνης (δεξιά), (-) επικατεχίνης (αριστερά).	31
Εικόνα 21: Αλυσιδωτή αντίδραση αντιοξειδωτικών.	34
Εικόνα 22: Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που απαιτούνται για την αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών.	36
Εικόνα 23: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).	37
Εικόνα 24: Μοτίβο κατάτμησης λουτεολίνης.	39
Εικόνα 25: Ακτινοβολία διερχόμενη μέσα από κυψελίδα η οποία περιέχει κάποιο διάλυμα χημικής ουσίας.	41
Εικόνα 26: Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων.	42
Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση φασματοφωτόμετρο FT-IR με συμβολόμετρο.	43
Εικόνα 28: Διάγραμμα ενεργειακού επιπέδου που δείχνει τις καταστάσεις που εμπλέκονται στα φάσματα Raman.	46
Εικόνα 29: Σακούλες τροφίμων με αεροστεγές σύστημα.	51
Εικόνα 30: Ξήρανση δειγμάτων με έκθεση στον αέρα.	52
Εικόνα 31: Blender, και δείγμα μετά την κονιορτοποίηση.	53
Εικόνα 32: Εκχύλιση στεμφύλων σε μαγνητικό αναδευτήρα.	56
Εικόνα 33: Διαλύτης γλυκερόλη.	59
Εικόνα 34: Εκχυλίσματα διαφορετικών ποικιλιών στεμφύλων.	59
Εικόνα 35: Καθαρισμός εκχυλισμάτων πριν την ανάλυση με φιλτράκια Chromafil Xtra CA-45/25.	60
Εικόνα 36: Φασματοφωτόμετρο UV-Vis.	61
Εικόνα 37: Φάσμα ακατέργαστου εκχυλίσματος δείγματος 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	62
Εικόνα 38: Φάσμα υδρολυμένου εκχυλίσματος δείγματος 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	62

Εικόνα 39: Δείγματα που αναλύθηκαν με υγρό χρωματογράφο.....	65
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα του δείγματος 03 της ποικιλίας Ρομπόλα της περιοχής Κεφαλονιάς στα 280 nm.....	66
Εικόνα 41: Χρωματογραφικό προφίλ πρότυπων ενώσεων.....	69
Εικόνα 42: Χρωματογραφικό προφίλ (LC-MS) του ακατέργαστου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm.....	73
Εικόνα 43: Το φασματοφωτόμετρο FT-IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.....	78
Εικόνα 44: Υποδοχέας δείγματος που φέρει καψίδιο.....	78
Εικόνα 45: Φάσμα FT-IR στεμφύλων ποικιλίας Ρομπόλα Κεφαλονιάς καταγεγραμμένο με την τεχνική DRIFT.....	79
Εικόνα 46: Το φασματοφωτόμετρο Raman που χρησιμοποιήθηκε.....	82
Εικόνα 47: Φάσμα Raman προερχόμενου από στέμφυλα ποικιλίας Ρομπόλα Κεφαλονιάς.....	83
Εικόνα 48: Φασματόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V-550.....	86
Εικόνα 49: Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός των δειγμάτων έπειτα από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu).....	86
Εικόνα 50: Καμπύλη βαθμονόμησης καφεϊκού οξέος για χρήση στη δοκιμή Folin-Ciocalteu....	87
Εικόνα 51: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα εκχυλίσματα.....	89
Εικόνα 52: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα υδρολυμένα εκχυλίσματα.....	89
Εικόνα 53: Σύγκριση των περιεκτικότητων των φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα και υδρολυμένα εκχυλίσματα.....	90
Εικόνα 54: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα εκχυλίσματα.....	90
Εικόνα 55: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα υδρολυμένα εκχυλίσματα.....	91
Εικόνα 56: Η μεταφορά ενός φαινολικού ατόμου υδρογόνου στο DPPH.....	93
Εικόνα 57: Αντιδραστήριο DPPH.....	94
Εικόνα 58: Πρότυπη Καμπύλη Trolox.....	94
Εικόνα 59: Παρεμπόδιση (I %) ακατέργαστων εκχυλισμάτων.....	97
Εικόνα 60: Ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) ακατέργαστων εκχυλισμάτων.....	97
Εικόνα 61: Παρεμπόδιση (I %) υδρολυμένων εκχυλισμάτων.....	98
Εικόνα 62: Ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) υδρολυμένων εκχυλισμάτων.....	98
Εικόνα 63: Η δοκιμή ABTS σε μια αντίδραση αποχρωματισμού για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	100
Εικόνα 64: Παρεμπόδιση (I %) ακατέργαστων εκχυλισμάτων.....	103
Εικόνα 65: Παρεμπόδιση (I %) υδρολυμένων εκχυλισμάτων.....	103
Εικόνα 66: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	121
Εικόνα 67: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	121
Εικόνα 68: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	121
Εικόνα 69: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	122
Εικόνα 70: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	122
Εικόνα 71: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι-Κεφαλονιάς.....	122
Εικόνα 72: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	123
Εικόνα 73: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.....	123
Εικόνα 74: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουσιτιάτης-Κεφαλονιάς.....	123
Εικόνα 75: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.....	124
Εικόνα 76: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.....	124
Εικόνα 77: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας-Ζάκυνθος.....	124

Εικόνα 78: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.....	125
Εικόνα 79: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.	125
Εικόνα 80: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	126
Εικόνα 81: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	126
Εικόνα 82: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	126
Εικόνα 83: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	127
Εικόνα 84: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	127
Εικόνα 85: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 11- Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι-Κεφαλονιάς.	127
Εικόνα 86: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	128
Εικόνα 87: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιάς.	128
Εικόνα 88: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 14- Αυγουστιάτης-Κεφαλονιάς.	128
Εικόνα 89: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.	129
Εικόνα 90: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 16- Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.....	129
Εικόνα 91: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Ζάκυνθος.	129
Εικόνα 92: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 03-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.....	130
Εικόνα 93: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 19- Cabernet-Κέρκυρα.	130
Εικόνα 94: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 03 στα 280 nm.	131
Εικόνα 95: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 06 στα 280 nm.	132
Εικόνα 96: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 07 στα 280 nm.	133
Εικόνα 97: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 09 στα 280 nm.	134
Εικόνα 98: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 10 στα 280 nm.	135
Εικόνα 99: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 03 στα 280 nm.	136
Εικόνα 100: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 12 στα 280 nm.	137
Εικόνα 101: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 13 στα 280 nm.	138
Εικόνα 102: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 14 στα 280 nm.	139
Εικόνα 103: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 15 στα 280 nm.	140
Εικόνα 104: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 16 στα 280 nm.	141
Εικόνα 105: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 17 στα 280 nm.	142
Εικόνα 106: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 18 στα 280 nm.	143
Εικόνα 107: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 19 στα 280 nm.	144
Εικόνα 108: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	170
Εικόνα 109: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	170
Εικόνα 110: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	170
Εικόνα 111: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	171
Εικόνα 112: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	171
Εικόνα 113: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι -Κεφαλονιά.	171
Εικόνα 114: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	172
Εικόνα 115: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.....	172
Εικόνα 116: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουστιάτης-Κεφαλονιά.	172
Εικόνα 117: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.....	173
Εικόνα 118: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Σκιαδόπουλο - Ζάκυνθος.....	173
Εικόνα 119: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας-Ζάκυνθος.	173

Εικόνα 120: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.	174
Εικόνα 121: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.	174
Εικόνα 122: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	175
Εικόνα 123: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	175
Εικόνα 124: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	175
Εικόνα 125: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	176
Εικόνα 126: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	176
Εικόνα 127: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι -Κεφαλονιά.	176
Εικόνα 128: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	177
Εικόνα 129: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	177
Εικόνα 130: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουστιάτης-Κεφαλονιά.	177
Εικόνα 131: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.	178
Εικόνα 132: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.....	178
Εικόνα 133: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Ζάκυνθος.	178
Εικόνα 134: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.	179
Εικόνα 135: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.....	179
Εικόνα 136: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	180
Εικόνα 137: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	180
Εικόνα 138: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	180
Εικόνα 139: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	181
Εικόνα 140: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	181
Εικόνα 141: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι-Κεφαλονιά.	181
Εικόνα 142: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	182
Εικόνα 143: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.	182
Εικόνα 144: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουστιάτης-Κεφαλονιά.	182
Εικόνα 145: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.	183
Εικόνα 146: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.....	183
Εικόνα 147: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας- Ζάκυνθος.	183
Εικόνα 148: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.	184
Εικόνα 149: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.....	184

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βοτανική κατάταξη αμπέλου.....	2
Πίνακας 2: Κυριότερες Ελληνικές ποικιλίες αμπέλων.....	4
Πίνακας 3: Στατιστικά οινοπαραγωγής και αμπελοοινικής περιόδου 2015-2016.	16
Πίνακας 4: Γενική εικόνα των καλλιεργούμενων εκτάσεων με αμπέλια και της παραγωγής κρασιού στην Ελλάδα το έτος 2013 σύμφωνα με το ΥΠΑΑΤ.....	16
Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ελληνικής ποικιλίας αγωγργίτικο	24
Πίνακας 6: Σύσταση ελαίου γιγάρτων.	26
Πίνακας 7: Κύρια φαινολικά οξέα.	29
Πίνακας 8: Κύριες φλαβονόνες.....	30
Πίνακας 9: Κύριες φλαβονόλες.....	30
Πίνακας 10: Κύριες ανθοκυάνες.	33
Πίνακας 11: Πληροφορίες δειγμάτων.....	50
Πίνακας 12: Κωδικοποίηση δειγμάτων.....	51
Πίνακας 13: Φυσικοχημικές ιδιότητες γνωστών διαλυτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και πίεση 1 atm	59
Πίνακας 14: Απορρόφηση ακατέργαστων δειγμάτων μετά από αραιώση 1:10.....	63
Πίνακας 15: Απορρόφηση υδρολυμένων δειγμάτων.	63
Πίνακας 16: Χρόνοι ελκούςης του χρωματογραφήματος (HPLC-DAD) του ακατέργαστου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά σε όλα τα μήκη κύματος.....	66
Πίνακας 17: Πληροφορίες του χρωματογραφήματος (LC-MS) του προτύπου εκχυλίσματος στο μήκος κύματος 280 nm.....	70
Πίνακας 18: Πληροφορίες του χρωματογραφήματος (LC-MS) του ακατέργαστου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm	71
Πίνακας 19: Πληροφορίες του χρωματογραφήματος (LC-MS) του υδρολυμένου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm.	72
Πίνακας 20: Αποτελέσματα σύγκρισης εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά με τις πρότυπες ενώσεις και την βιβλιογραφία, με βάση τις χρωματογραφικές αναλύσεις.....	73
Πίνακας 21: Οι βασικές κορυφές του φάσματος FT-IR κονιορτοποιημένων στεμφύλων.....	80
Πίνακας 22: Οι βασικές κορυφές του φάσματος Raman κονιορτοποιημένων στεμφύλων.....	84
Πίνακας 23: Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών στα ακατέργαστα δείγματα.	88
Πίνακας 24: Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών στα υδρολυμένα δείγματα.	88
Πίνακας 25: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των ακατέργαστων δειγμάτων με τη δοκιμή DPPH.....	96
Πίνακας 26: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των υδρολυμένων δειγμάτων με τη δοκιμή DPPH.....	96
Πίνακας 27: Αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των ακατέργαστων δειγμάτων με τη δοκιμή ABTS.....	101
Πίνακας 28: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των υδρολυμένων δειγμάτων με τη δοκιμή ABTS.....	102
Πίνακας 29: Συνήθης τρόποι εκχύλισης παραπροϊόντων οινοποιίας που συναντάμε στην βιβλιογραφία.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Αγγλική ονομασία	Ελληνική ονομασία
Γ.Π.Α	Agricultural University of Athens	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Ε.Ε.	European Union	Ευρωπαϊκή Ένωση
Ε.Κ.	Government Gazette	Εφημερίδα Κυβερνήσεως
Κ.Ν.Φ.Ο	Code of the Alcohol Taxes Laws	Κωδικός περί Φορολογίας του Οινοπνεύματος
Π.Ο.Υ.	World Health Organisation	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
A_{AR}	DPPH freeze binding capability	Ικανότητα Δέσμευσης Ελεύθερης Ρίζας DPPH
ATD	Atmospheric Drying	Ατμοσφαιρική Ξήρανση
ATR	Attenuated Total Reflection	Εξασθενημένη Ολική Ανάκλαση
COX-1	Cyclooxygenase -1	Κυκλοξυγονάση -1
COX-2	Cyclooxygenase -2	Κυκλοξυγονάση -2
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής Διάταξης Διοδών
DM	Dry Matter	Ξηράς ουσίας
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DRIFT	Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier και την Τεχνική της Διάχυτης Ανάκλασης
EI	Electron Ionization	Ιονισμός Ηλεκτρονίων
ESI	Electrospray Ionization	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό
FAB	Fast Atom Bombardment	Γρήγορος Βομβαρδισμός Ατόμων
FAO	Food and Agriculture Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database	Οργανισμός Εταιρικής Βάσης Δεδομένων Τροφίμων και Γεωργίας
FD	Freeze Drying	Λυοφιλίωση
FIR	Far InfraRed	Άπω Υπέρυθρο
GRAS	Generally Recognized as Safe	Γενικά Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή
GSH	Glutathione Peroxidase	Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης
HAD	Hot air Drying	Ξήρανση με αέρα
HAT	Hydrogen Atom Transfer	Μεταφορά ατόμου υδρογόνου
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
HRP	Horseradish Peroxidase	Ένζυμο Περοξειδάση
IR	Infra Red Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου
LC	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
LDL	Low Density Lipoprotein	Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
LOX	Lipoxygenase	Λιποξυγονάσες

MD	Microwave Drying	Ξήρανση Μικροκυμάτων
MIR	Mid InfraRed	Μέσο Υπέρυθρο
MS	Mass Spectroscopy Detector	Φασματομετρία Μάζας
MVD	Microwave Vacuum Drying	Ξήρανση υπό κενό σε Μικροκύματα
NCI	Negative Chemical Ionization	Αρνητικός Χημικός Ιονισμός
NIR	Near InfraRed	Εγγύς Υπέρυθρο
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Detector	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NOS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές Μορφές Οξυγόνου
PCA	Principal Component Analysis	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών
PCI	Positive Chemical Ionization	Θετικός Χημικός Ιονισμός
PLS	Partial Least Square	Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
RNS	Reactive Nitrogen Species	Αντιδραστικά Είδη Αζώτου
ROS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές Ενώσεις Οξυγόνου
SET	Single Electron Transfer	Μονή Μεταφορά Ηλεκτρονίων
TP	Total Polyphenols	Ολικές Πολυφαινόλες
SOD	Superoxide Dismutase	Υπεροξειδική Δισμουτάση
TSR	Total Specular Reflection Spectroscopy	Ολική Φασματοσκοπία Ανάκλασης
UV/Vis	Ultra Violet-Visible	Ορατού-Υπεριώδους
VD	Vacuum Drying	Ξήρανση Κενού
V.Q.P.R.D.	Vins de Qualite Produits dans une Region Determine	Προϊόντα Οίνου Ποιότητας σε Καθορισμένη Περιοχή

A.1 Φυσικά προϊόντα

Από την αρχαιότητα η ανθρωπότητα έχει αναγνωρίσει την αξία των φυτών. Τα αρχαία κείμενα επιβεβαιώνουν τη γνώση που μεταδίδεται από γενιά σε γενιά για τα ευεργετικά αποτελέσματα των φυτών (Raymond C., 2014).

Με τον όρο φυσικά προϊόντα περιγράφονται τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τόσο των φυτικών όσο και των ζωικών οργανισμών καθώς και αυτά που παράγονται από θαλάσσιους οργανισμούς και μικροοργανισμούς (Π. Ταραντίλης, Πανεπιστημιακές σημειώσεις, ενόργανη χημική ανάλυση, 2017).

Ως προσιτή πηγή φυτοχημικών ενώσεων με αποδεδειγμένη ευεργετική επίδραση στην υγεία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα φυσικά συστατικά που εμπεριέχονται στα υποπροϊόντα διαφόρων γεωργικών διεργασιών (π.χ. ελαιόφυλλα, ελαιοπυρήνες) ή βιομηχανιών (π.χ. στέμφυλα οινοποιίας και τοματοποιίας κ.ά.), τα οποία χρησιμοποιούνται στη διατροφή των μηρυκαστικών ζώων (βοοειδή-αιγοπρόβατα) εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Τα εν λόγω υποπροϊόντα είναι γνωστό ότι εμπεριέχουν μεγάλες ποσότητες από φυσικά αντιοξειδωτικά με γνωστή και αποδεδειγμένη βιολογική αξία, όπως η ελαιοευρωπαϊνή, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη (ελαιουργία), η ρεσβερατρόλη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η ρουτίνη και η κερκετίνη (οινοποιία) και το λυκοπένιο (τοματοβιομηχανία) (Yinrong Lu *et al.*, 2000, Irini F. Strati *et al.*, 2011, Irini F. Strati *et al.*, 2015).

A.2 Οικογένεια *Vitaceae*

Η οικογένεια των αμπελιδών (*Ampelidae, Ampelidaceae, Vitaceae*) υπάγεται στο φύλο των Terebinthales-Rubiales και στην τάξη των Rhamnales (Πίνακας 1). Η συστηματική διάκριση των Αμπελιδών σε γένη παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα. Κατά τον Planchon (1887) περιλαμβάνει δέκα γένη, ο Suessenguth (1953) αναγνωρίζει 12 γένη ενώ ο Galet (1967) 18 γένη (Ποτσώλη Θ., 2016). Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την οικογένεια των Αμπελιδών παρουσιάζει το γένος *Vitis* το οποίο χωρίζεται σε δύο υπογένη, το *Euvitis* (*Vitis subg. Euvitis*) και το *Muscadinia* (*Vitis subg. Muscadinia*) (Weiguang yi *et al.*, 2005). Ο αριθμός των ειδών του υπογένους *Euvitis* δεν έχει ακριβώς προσδιορισθεί. Ο Galet (1957, 1988) αναγνωρίζει 62 είδη τα οποία κατατάσσονται σε 11 σειρές. Τα είδη του υπογένους *Euvitis* καλλιεργούνται ανά τον κόσμο είτε για την

παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων (*Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*) είτε μετέχουν σε προγράμματα βελτίωσης με σκοπό την παραγωγή υποκειμένων ανθεκτικών στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας, όπως τα *V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. champini* κ.ά.

Στο υπογένος *Muscadinia* περιλαμβάνονται μόνο τρία είδη, *V. rotundifolia*, *V. munsoniana* και *V. rotundifolia*. Από αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το *V. Rotundifolia* (Ποτσώλη Θ., 2016).

Πίνακας 1: Βοτανική κατάταξη αμπέλου.

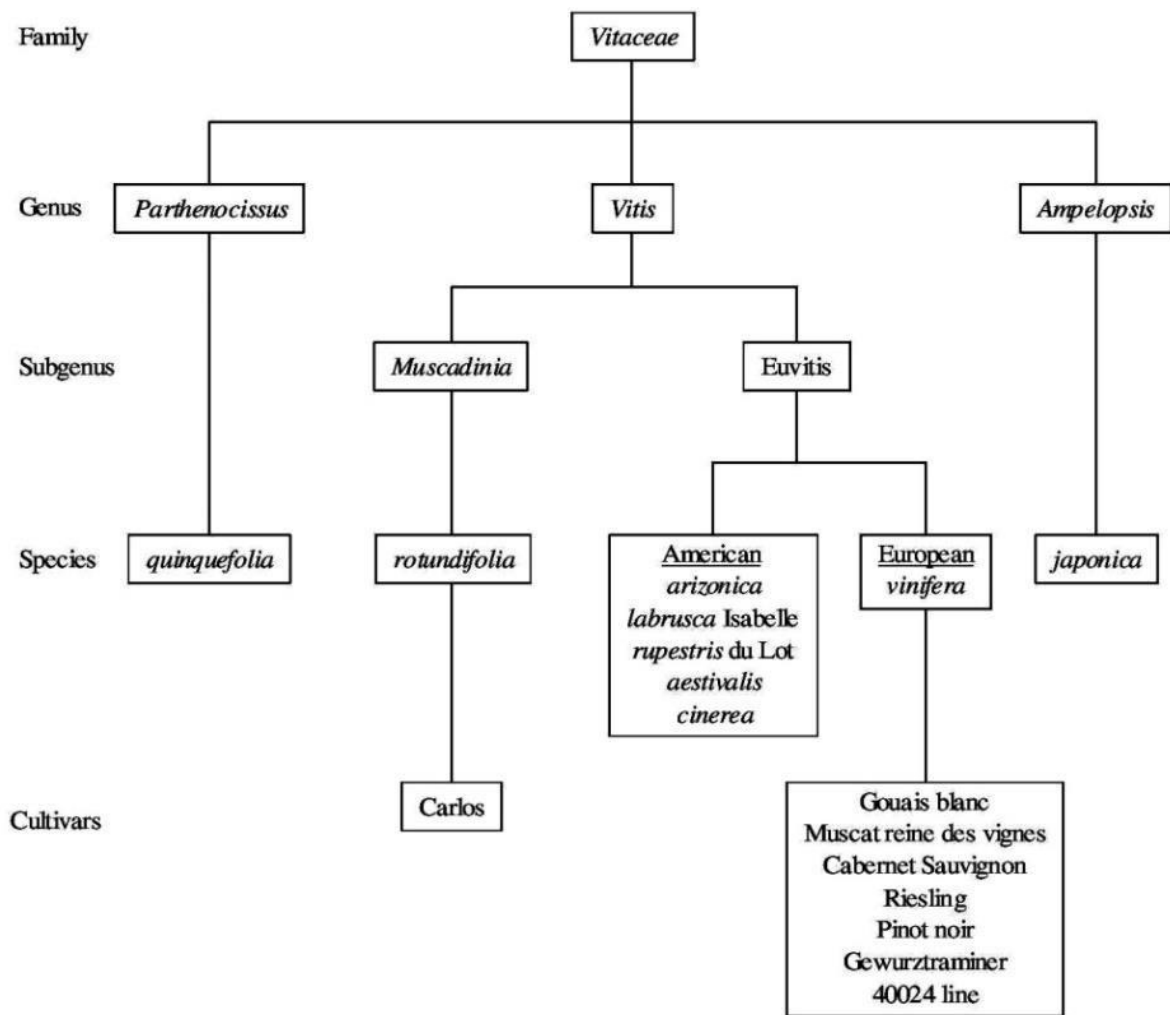
Βοτανική κατάταξη	
Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Διαίρεση	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Κλάση	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Τάξη	Ραμνώδη (Rhamnales)
Οικογένεια	Αμπελοειδή (<i>Vitaceae</i>)
Γένος	<i>Vitis</i> L. (grape)
Είδος	<i>Vitis vinifera</i> L. (wine grape)

A.2.1 Το γένος *Vitis* του είδους *vinifera*

Από τις λέξεις άμπελος και γράφω προήλθε η ονομασία του ειδικού κλάδου της αμπελουργίας, η αμπελογραφία (Ampelography, Ampelographie), που έχει ως αντικείμενο την περιγραφή, διάκριση, ταξινόμηση και αξιολόγηση των ποικιλιών της αμπέλου. Το έργο της αμπελογραφίας είναι ιδιαίτερα δυσχερές λόγω του μεγάλου αριθμού ποικιλιών του είδους *Vitis vinifera* L.

Το σημαντικότερο είδος των Αμπελιδών αποτελεί η άμπελος η οινοφόρος, καθώς σε αυτό ανήκουν όλες σχεδόν οι ποικιλίες αμπέλου που καλλιεργούνται ανά τον κόσμο για την παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων. Κατά τον Negrul (1957) οι ποικιλίες της οινοφόρου αμπέλου κατατάσσονται σε φυλές και υποομάδες, κυριότερες των οποίων είναι η Ανατολική (*Proles orientalis*), η Ποντία (*Proles pontica*) και η Δυτική (*Proles occidentalis*). Η Πόντια φυλή χωρίζεται σε δυο υποομάδες, την *georgica* και την *balcanica*. Στην *balcanica* μεταξύ άλλων ανήκουν και οι ελληνικές ποικιλίες.

Νεότερη έρευνα αναφέρει ότι ο αριθμός ποικιλιών κυμαίνεται στις 5.000- 7.000. Ο μεγάλος αυτός αριθμός ποικιλιών αμπέλου οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως είναι η μακράιωνη καλλιέργεια της αμπέλου, οι φυσικές και τεχνητές διασταυρώσεις, ο έντονος πολυμορφισμός, οι μεταλλάξεις καθώς και η μεγάλη γεωγραφική διασπορά του είδους όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1 (Ποτσώλη Θ., 2016).



Εικόνα 1: Ταξινόμηση του γένους *Vitis*.

A.2.2 Ταξινόμηση κυριότερων Ελληνικών ποικιλιών αμπέλου

Η αμπελομετρική ταξινόμηση βασίζεται στη μέτρηση των διαστάσεων ραγών, φύλλων και γωνιών που σχηματίζουν οι νευρώσεις κ.ά. Η φαινολογική ή φυσιολογική ταξινόμηση των ποικιλιών βασίζεται στα διάφορα φαινολογικά στάδια της αμπέλου, όπως η έκπτυξη των λανθανόντων οφθαλμών, η άνθηση, η ωρίμανση και η φυλλόπτωση.

Η γεωγραφική ταξινόμηση ξεκινά στα τέλη της δεκαετίας του 1920 και συνεχίστηκε στη δεκαετία του 1940 με πιο αξιόλογη την προσπάθεια του Negrul, ο οποίος βάσισε την ταξινόμηση στα μορφολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των ποικιλιών, οι οποίες βρέθηκαν σε διαφορετικά οικολογικά συστήματα.

Η φαινοτυπική ταξινόμηση βασίζεται στο χνοασμό της αυξανόμενης κορυφής της νεαρής βλάστησης, του ποώδους βλαστού και των ανεπτυγμένων φύλλων, καθώς και στις μετρήσεις των χαρακτήρων του φύλλου για τον προσδιορισμό του φυλλικού τύπου. Αναφορές σε ελληνικές ποικιλίες περιέχονται στις αμπελογραφικές μελέτες των Molon

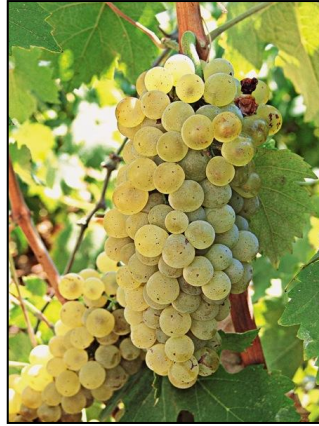
(1906), Guillon (1895), Pulliat (1897), Viala and Vermorel (1902-1910) κ.ά. (Ποτσώλη Θ., 2016). Οι ποικιλίες κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες τις επιτραπέζιες, οινοποιϊας, σταφιδοποιϊας, χυμοποίησης, κονσερβοποίησης (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Κυριότερες Ελληνικές ποικιλίες αμπέλων.

Λευκές ποικιλίες		Έγχρωμες ποικιλίες		
Αηδάνι	Μπατίκι	Αγιοργίτικο	Μαυροδάφνη	Ροδίτης
Αθήρι	Ντεμπίνα	Βερτζαμί	Μαύρο Αράχωβης	Σκοπελίτικο
Ασύρτικο	Ξυνιστέρι	Καλαμπόκι	Μαύρο Μεσενικόλα	Σκυλοπνίχτης
Βηλάνα	Ρομπόλα	Καλλινιατικό	Μαύρο Νεμέας	Φιλέρι
Γουστολίδι	Σαββατιανό	Κοτσιφάλι	Μαύρο Νάουσας	Φοκιανό μαύρο
Ζουμιάτικο	Βιδιανό	Λημνίο	Μαύρο Κύπρου	Cabernet sauvignon
Κακοτρύγης	Κακοτρύγης	Λιάτικο	Μαύρο Ρομείο	Θειακό
Μαλαγουζιά	Μπατίκι	Μανδηλαριά	Μαυρούδι Θράκης	
Μοσχάτο Αλεξανδρείας	Μοσχάτο Σάμου	Μασχοφίλερο	Ξινόμαυρο	

Η επιλογή ποικιλιών που απασχόλησαν την μεταπτυχιακή εργασία αποτελούν ποικιλίες των Ιονίων νήσων και συγκεκριμένα.

Ρομπόλα: Συνώνυμα της ποικιλίας αυτής είναι Ρομπόλα κέρινη, Ρομπόλα άσπρη, Ασπρορομπόλα (Εικόνα 2). Προέρχεται από την περιοχή της Βενετίας απ' όπου εισήχθη κατά τον Μεσαίωνα. Καλλιεργείται κυρίως στην Κεφαλονιά και σποραδικά στη Ζάκυνθο, Λευκάδα, Πρέβεζα και Αρκαδία. Αμπελογραφικά έχει φύλλα μέτριου έως μεγάλου μεγέθους, τρίλοβο, σχεδόν κυκλικό. Άνω επιφάνεια φύλλου πράσινη, λεία η κάτω καλυμμένη με λεπτά τριχίδια. Μισχικός κόλπος σχήματος V. Σταφύλι μέτριο έως μεγάλο, κυλινδρικό μέσης πυκνότητας. Ράγα μέτριου μεγέθους, σφαιρική. Φλοιός παχύς κιτρινόλευκος-χρυσός, πλούσιος σε ταννοειδείς ύλες. Επιδερμίδα διαφανής. Σάρκα μαλακή, χυμώδης, αρωματική με ιδιαίζουσα γεύση. Λευκή ποικιλία, ζωηρή, μέσης πρωιμότητας (τέλη Αυγούστου η πλήρης ωρίμανση), παραγωγική. Μορφώνεται σε κυπελλοειδές σχήμα και δέχεται κλάδεμα βραχύ. Πολύτιμη ποικιλία αμπέλου, μπορεί να αξιοποιησει εδάφη φτωχά, και ξηρά και να δώσει προϊόντα ανώτερης ποιότητας («ρομπόλα Κεφαλληνίας» είναι οίνος ονομασίας προέλευσης ανώτερης ποιότητας).



Εικόνα 2: Ποικιλία Ρομπόλα.

Μαυροδάφνη: Πρόκειται για μια ερυθρή ποικιλία η οποία καλλιεργείται στους νομούς Αχαΐας, Ηλείας, Κεφαλληνίας, Λευκάδας και σποραδικά στους νομούς Κέρκυρας, Αρκαδίας, Χαλκιδικής και Μαγνησίας, καταλαμβάνοντας συνολικά μία έκταση κοντά στα 6.500 στρέμματα (Εικόνα 3). Μέτριας ζωηρότητας φυτό και ευρωστίας, γόνιμο, παραγωγικό, ευαίσθητο στην ξηρασία και τον περονόσπορο, μέτρια ανθεκτικό στο ωίδιο. Πολλές φορές εμφανίζει ανθορροια, ιδιαίτερα όταν βρέχει την περίοδο ανθοφορίας. Για την καλλιέργεια του πρέπει να αποφεύγονται εδάφη βάρια, γόνιμα που οδηγούν σε αυξημένες αποδόσεις, υποβιβάζοντας την ποιότητα. Ξεκίνα την βλάστηση του στα τέλη του Μάρτη και ωριμάζει αρχές με μέσα Σεπτέμβρη. Κάθε καρποφόρα κληματίδα φέρνει 1-3 σταφύλια περίπου 250 g. Ράγες με παχύ φλοιό, ερυθρό- μελανού χρώματος, με σάρκα άχρωμη, μαλακή, γλυκιά, ελαφρά στυφή. Όταν καλλιεργείται σωστά, στο κατάλληλο εδαφολογικό περιβάλλον, δίνει κρασιά ξηρά, υψηλόβαθμα, μέτριας οξύτητας, με κάλο χρώμα, όπως και θαυμάσια γλυκά κρασιά.



Εικόνα 3: Ποικιλία Μαυροδάφνη.

Βοστυλίδι ή Γουστολίδι: Γενικά καλλιεργείται στη Ζάκυνθο, Κεφαλληνία και Β.Δ. Πελοπόννησο. Αναφέρεται και ως Αυγουστολίδι, Βουστολίδι, Βοστυλίδι, Γουστολίδι κ.ά. (Εικόνα 4). Αμπελογραφικά έχει φύλλο μεγάλο, τρίλοβο με μισχικό κόλπο σχήματος V. Άνω λεία, κάτω βαμβακώδης. Σταφύλι μέτριου μεγέθους, απλό ή διχαλωτό, πυκνό, κυλινδρικό. Ράγα μικρή σφαιρική, με φλοιό κίτρινο χρυσαφί, διαφανή. Επιδερμίδα λεπτή ελαστική. Σάρκα μαλακή, γλυκιά αρωματική. Λευκή ποικιλία αμπελιού πρώιμη (πλήρης ωρίμανση από 10 Αυγούστου), παραγωγική (κάθε παραγωγική μονάδα φέρει 1-3 σταφύλια, από τον τρίτο κόμβο και άνω). Τα πρέμνα μορφώνονται σε κύπελλο και δέχονται κλάδεμα βραχύ (1/3). Παρουσιάζει ευαισθησία στον περονόσπορο. Το γλεύκος είναι πλούσιο σε σάκχαρα (άνω των 26%) και ο παραγόμενος από αυτό οίνος είναι πολύ καλής ποιότητας (αλκοολικό βαθμό 14-15°) με χαρακτηριστικά το άρωμα και το ανοιχτό κίτρινο (αχυρένιο) χρώμα του.



Εικόνα 4: Ποικιλία Βοστυλίδι – Γουστολίδι.

Αυγουστιάτης: Προέρχεται από μια σπάνια ελληνική ποικιλία σταφυλιού που καλλιεργείται στην Ελλάδα τουλάχιστον από τον 14^ο αιώνα (Εικόνα 5). Σήμερα, ο Αυγουστιάτης είναι στενά συνδεδεμένος με το νησί της Ζακύνθου, αποτελώντας σημαντικό μέρος της αμπελοκαλλιέργειας στο κόκκινο σταφύλι (πάνω από 1800 στρέμματα). Είναι ανθεκτικός στην ξηρασία, με μετρίου μεγέθους ράγες, ενώ η καλλιέργειά του έχει μικρές αποδόσεις, επικεντρώνοντας στην ποιότητα και την αυθεντικότητα του κρασιού. Αρκετοί οινοποιοί παράγουν κρασιά συνδυάζοντας τον Αυγουστιάτη με άλλες, ελληνικές ή ξένες ποικιλίες.



Εικόνα 5: Ποικιλία Αυγουστιάτης.

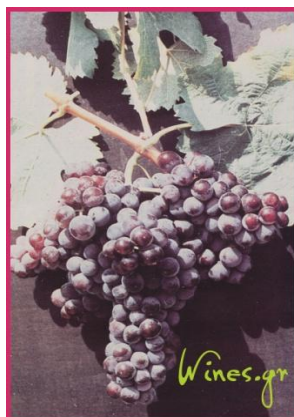
Παύλος: Σπάνια λευκή ποικιλία, η Παύλος, που συναντάται στα νησιά του Ιονίου πελάγους (Εικόνα 6). Συμμετέχει μαζί με άλλες ποικιλίες σε χαρμάνια, γνωστότερο των οποίων είναι το κρασί Βερντέα.



Εικόνα 6: Ποικιλία Παύλος.

Κατσακούλιας: Το σταφύλι της ποικιλίας αυτής είναι πολύ μεγάλου έως μεγάλου μήκους, μικρού βάρους, μέτριας πυκνότητας έως πυκνόραγο σταφύλι, κυλινδρικού σχήματος (Εικόνα 7). Σε κάθε βλαστό φέρονται δυο σταφυλές κατά μέσον όρο, που εμφανίζονται από τον τρίτο και τέταρτο κόμβο. Ο ποδίσκος είναι μικρού μήκους και έντονα ξυλοποιημένος. Η ράγα είναι μικρού μεγέθους, σφαιρικού σχήματος. Ο φλοιός είναι πρασινοκίτρινου χρώματος, υπάρχει ομοιομορφία χρώματος μεταξύ των ραγών με εμφανές το υπόλειμμα του στύλου. Η σάρκα δεν είναι χρωματισμένη, είναι ιδιαίτερα μαλακή, μετρίως εύχυμη με απόδοση σε χυμό 57,5 ml/ 100 g ραγών. Έχει υπόξινη γεύση χωρίς ιδιαίτερο άρωμα. Εμφανίζονται τρία γίγαρτα ανά ράγα που είναι μέτριου έως μεγάλου μεγέθους και μέτριου βάρους. Ο ποδίσκος είναι μικρού μήκους με εύκολη την αποκόλληση της ράγας από τον ποδίσκο. Ο λευκός κακοτρύγης είναι μια από τις πλέον

διαδεδομένες ποικιλίες, στα νησιά του Ιονίου πελάγους.



Εικόνα 7: Ποικιλία Κατσακούλιας.

Σκιαδόπουλο: Ιδιαίτερα παραγωγικό σταφύλι, το λευκό σκιαδόπουλο κατέχει ποσοτικά σημαντική θέση στον αμπελώνα των Ιόνιων νησιών (Εικόνα 8). Συνήθως συμμετέχει σε φρέσκα λευκά χαρμάνια.



Εικόνα 8: Ποικιλία Σκιαδόπουλο.

Κακοτρύγης: Το σταφύλι της ποικιλίας αυτής είναι πολύ μεγάλου έως μεγάλου μήκους, μικρού βάρους, μέτριας πυκνότητας έως πυκνόραγο σταφύλι, κυλινδρικού σχήματος (Εικόνα 9). Σε κάθε βλαστό φέρονται δυο σταφυλές κατά μέσον όρο, που εμφανίζονται από τον τρίτο και τέταρτο κόμβο. Ο ποδίσκος είναι μικρού μήκους και έντονα ξυλοποιημένος. Η ράγα είναι μικρού μεγέθους, σφαιρικού σχήματος. Ο φλοιός είναι πρασινοκίτρινου χρώματος, υπάρχει ομοιομορφία χρώματος μεταξύ των ραγών με εμφανές το υπόλειμμα του στύλου. Έχει υπόξινη γεύση χωρίς ιδιαίτερο άρωμα. Εμφανίζονται τρία γίγαρτα ανά ράγα που είναι μέτριου έως μεγάλου μεγέθους και

μέτριου βάρους. Ο ποδίσκος είναι μικρού μήκους με εύκολη την αποκόλληση της ράγας από τον ποδίσκο. Ο λευκός κακοτρύγης είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες ποικιλίες, στα νησιά του Ιονίου πελάγους.



Εικόνα 9: Ποικιλία Κακοτρύγης.

Cabernet: Έγχρωμη γαλλική ποικιλία, καλλιεργούμενη στην περιοχή Bordeaux και Medoc (Εικόνα 10). Στη χώρα μας μετά από τα πρώτα αποτελέσματα πειραματισμού, συνιστάται για τις περιοχές των νομών Χαλκιδικής, Κοζάνης, Γρεβενών, Ιωαννίνων, Αχαΐας και Μεσσηνίας. Είναι γνωστή και ως Petit Cabernet και Carbonet. Φύλλο μέτριο έως μικρό, κυκλικό, πεντάκολλο, βαθύκολλο. Μισχικός κόλπος σχήματος λύρας. Έλασμα λείο στην άνω επιφάνεια, με αραχνοϋφή χνοασμό στην κάτω. Σταφύλι μικρό, κυλινδροκωνικό, πυκνό. Ράγα μέτρια έως μικρή, σφαιρική με βαθύ κυανό χρώμα, καλυμμένη με επίσης κυανού χρώματος άχνη. Ποικιλία μέσης πρωιμότητας, ζωηρή, μέτρια παραγωγική.



Εικόνα 10: Ποικιλία Cabernet.

A.3 Η ιστορία της αμπέλου

Το αμπέλι, από το οποίο προέρχεται το κρασί έχει σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Η καλλιέργεια του αμπελιού φαίνεται ότι ξεκίνησε από τη νότια περιοχή του Καυκάσου, ωστόσο η καλλιέργειά του και η παραγωγή οίνου αποτελούν χαρακτηριστικές δραστηριότητες του ελληνικού λαού από την αρχαιότητα. Η ανάπτυξη της αμπελοκαλλιέργειας και της οινοποίησης στην χώρα μας θεωρούνται αποτέλεσμα της μετανάστευσης ανατολικών λαών στον ελλαδικό χώρο και τοποθετούνται χρονολογικά γύρω στην 3^η χιλιετία π.Χ.

Η λέξη κρασί προέρχεται από τη λέξη κράσις που σημαίνει ανάμειξη. Η λέξη κράσις προέρχεται από το ρήμα κεράννυμι, δηλαδή αναμειγνύω και η λέξη κρατήρ σημαίνει το σκεύος στο οποίο γινόταν η ανάμειξη του κρασιού με το νερό. Οι Αρχαίοι Έλληνες έπιναν το κρασί αναμειγνύοντάς το με νερό, σε αναλογία συνήθως 1:3. Η λέξη "κρασί" υποδηλώνει ακριβώς τον αναμειγμένο με νερό και οίνο, ενώ "άκρατος" λεγόταν ο ανόθευτος οίνος. Διέθεταν ειδικά σκεύη τόσο για την ανάμειξη όσο και για τη ψύξη του. Η πόση κρασιού που δεν είχε αναμειχθεί με νερό ("άκρατος οίνος") θεωρείτο βαρβαρότητα και συνηθιζόταν μόνο από αρρώστους ή κατά τη διάρκεια ταξιδιών ως τονωτικό. Διαδεδομένη ήταν ακόμα η κατανάλωση κρασιού με μέλι καθώς και η χρήση μυρωδικών. Η προσθήκη αφίνθου στο κρασί ήταν επίσης γνωστή μέθοδος (αποδίδεται στον Ιπποκράτη και αναφέρεται ως "Ιπποκράτειος Οίνος") όπως και η προσθήκη ρητίνης.

Το ενδιαφέρον για τον οίνο αναζωπυρώθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Επιδημιολογικές παρατηρήσεις συνέδεσαν την ημερήσια κατανάλωση ερυθρού οίνου στη Γαλλία με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων στη χώρα αυτή. Η υπόθεση αυτή προτάθηκε ως μια πιθανή εξήγηση για τη σχετικά χαμηλή θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα που παρατηρούνται εκεί, παρά τους υψηλούς δείκτες επικινδυνότητας όπως το κάπνισμα, η υψηλή αρτηριακή πίεση, η διατροφή πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά, και η παχυσαρκία που επίσης καταγράφονται. Το επιδημιολογικό αυτό εύρημα ονομάστηκε Γαλλικό Παράδοξο (French Paradox) (Renaud S. *et al.*, 1992).

Στις μέρες μας το κρασί θεωρείται αναπόσπαστο κομμάτι της ελληνικής παράδοσης και της Μεσογειακής διατροφής γενικότερα. Η κατανάλωση του από την ελληνική οικογένεια γίνεται σε καθημερινή βάση και σε αυτή αποδίδονται πιθανές ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία, όπως η προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα.

Α.4 Βοτανική Περιγραφή

Το αμπέλι δεν είναι ούτε θάμνος ούτε δέντρο. Στην φυσική του άγρια κατάσταση, το συναντάμε μόνο σαν αναρριχώμενο φυτό, δηλαδή κρεμασμένο πάνω σε άλλα δέντρα ή φυσικά υποστηρίγματα. Το αμπέλι είναι πολυετές φυτό και αναπτύσσεται γρήγορα. Ο κορμός του έχει πολλαπλές διακλαδώσεις και αρκετούς βραχίονες και βλαστάρια (Karvela E. *et al.*, 2011).

Τα φύλλα του αμπελιού είναι μεγάλα, παλαμοειδή και φύονται από το βλαστό με ένα μίσχο. Το σχήμα τους είναι χαρακτηριστικό και παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με την ποικιλία και το είδος, όπως διαφορές παρουσιάζει το χρώμα, το χνούδι στην κάτω επιφάνεια και το μέγεθος όπως φαίνεται στην Εικόνα 11.

Το μέγεθος, το χρώμα αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού εξαρτώνται από την ποικιλία. Το σταφύλι αποτελείται από τον βόστρυχο και τις ρώγες. Όλες μαζί οι ρώγες είναι κολλημένες στο βόστρυχο (τσάμπουρο). Στο βόστρυχο διακρίνουμε τη ράχη και τις διακλαδώσεις (τσαμπάκια) που διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα ανάλογα την ποικιλία, ενώ κάθε ρώγα είναι κολλημένη με μικρό μίσχο, τον ποδίσκο που μπαίνει στο εσωτερικό της σάρκας της με ένα μικρό θύσανο (πινέλο). Το μέγεθός του οφείλεται στον βόστρυχο, είναι πολύ μεταβλητό και επηρεάζεται από το κλίμα (σε ξηρό και θερμό κλίμα τα σταφύλια είναι μικρότερα), το έδαφος, την ηλικία της αμπέλου, το εφαρμοζόμενο σύστημα κλαδέματος και τη θέση επί του καρποφόρου βλαστού (τα σταφύλια είναι συνήθως μεγαλύτερα, όσο πιο κοντά βρίσκονται στη βάση). Το σταφύλι αποτελείται από ρώγες σε ποσοστό περίπου (95 % w/w) ή (75 % w/v) και από τα τσάμπουρα ή βόστρυχες σε ποσοστό περίπου πέντε (5 % w/w) ή (25 % w/v) (Κουράκου και Δραγωνά Σ., 1998).



Εικόνα 11: Μορφολογία *Vitis Vinifera* (κληματίδα – φύλλα – έλικες – άνθη – σταφύλι – γίγαρτα).

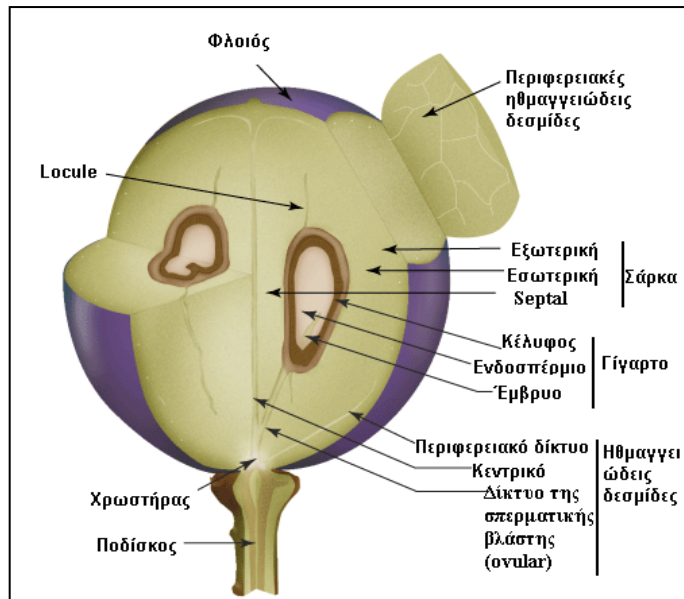
A.4.1 Μορφολογία και σύνθεση της ράγας

Το σταφύλι αποτελείται από τον βόστρυχο και τις ράγες (Εικόνα 12). Η ράγα είναι ο κύριος καρπός της αμπέλου και η βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή του κρασιού. Τα επιμέρους τμήματά της είναι ο φλοιός (10– 20 %), η σάρκα (74– 87 %) και τα γίγαρτα από τρία έως τέσσερα (3– 4 %) που σε ορισμένες ποικιλίες μπορεί να απουσιάζουν.

Ο φλοιός αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και την υποδερμίδα που απαρτίζουν το μεμβρανώδες και ελαστικό περικάρπιο της ράγας (Κουράκου και Δραγωνά Σ., 1998). Αντιπροσωπεύει μικρό ποσοστό επί του μέρους της ράγας (15 % του συνολικού βάρους), και συνίσταται από τις οργανικές ουσίες εκείνες που χαρακτηρίζουν τις διάφορες ποικιλίες αμπέλου και διαμορφώνουν τους οργανοληπτικούς χαρακτήρες των οίνων. Στον φλοιό συναντώνται επίσης ανθοκυάνες, αδιάλυτες πηκτίνες, μικρές ποσότητες σακχάρων και οξέων καθώς και ανόργανα συστατικά. Ο φλοιός αποτελείται σε ποσοστό (75– 80 %) κατά βάρος από νερό ενώ περιέχει και τα ακόλουθα συστατικά τανίνες: ένα με δυο (1– 2 %) w/w, όξινες ενώσεις: ένα με ενάμισι (1– 1,5 %) w/w, ανόργανες ενώσεις: ενάμισι με δυο (1,5–2 %) w/w, αζωτούχες ενώσεις: ενάμισι με δυο (1,5–2 %) w/w, λοιπές ουσίες: (10–15 %) w/w.

Η σάρκα αποτελείται από το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο και περικλείει τα γίγαρτα. Περιέχει νερό: (65– 80 %) w/w, σάκχαρα: (10–30 %) w/w, άλλες ουσίες: πέντε με έξι (5– 6 %) w/w, μεταξύ των οποίων οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά, αζωτούχες ουσίες, πηκτίνες, αρωματικές ουσίες, χρωστικές και τανίνες (Κουράκου και Δραγωνά Σ., 1998). Τα κυριότερα συστατικά της σάρκας είναι τα ζυμώσιμα σάκχαρα και τα οργανικά οξέα που εξασφαλίζουν στον οίνο την υδραλκοολική δομή του και τη γευστική ισορροπία.

Το γίγαρτο κοινώς κουκούτσια, είναι ο σπόρος της αμπέλου. Κάθε ράγα μπορεί να περιέχει από ένα έως τέσσερα (1– 4) γίγαρτα (εκτός τις αγίγαρτες ποικιλίες). Αποτελείται από τη σάρκα ή λευκωματώδη ιστό, το έμβρυο και εξωτερικά από το κέλυφος και είναι πλούσιο σε ελαιώδεις ουσίες και φαινολικά παράγωγα. Από άποψη χημικής σύστασης, η εκατοστιαία κατά βάρος σύσταση των γιγάρτων έχει ως εξής: νερό (25– 45 %), σάκχαρα και πολυσακχαρίτες (34– 36 %), ελαιούχες ουσίες και λιπαρά οξέα (13– 20 %), φαινολικά παράγωγα τέσσερα με έξι (4– 6 %), αζωτούχες ουσίες τέσσερα με εξίμισι (4– 6,5 %), ανόργανα συστατικά δυο με τέσσερα (2– 4 %) (Κουράκου και Δραγωνά Σ., 1998.; Karvela E. *et al.*, 2011). Επιπρόσθετα, τα γίγαρτα, αποτελούν μια ιδιαίτερη περίπτωση υποπροϊόντων οινοποίησης, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία φλαβονολών και στην υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, που μπορεί να φθάσει μέχρι το (13,8 %) w/w επί ξηρού βάρους (Karvela E. *et al.*, 2011).



Εικόνα 12: Μορφολογία και σύνθεση της ράγας.

Ο βόστρυχος, κοινώς κοτσάνι, απαρτίζεται από τον κεντρικό άξονα της ταξιανθίας, που καλείται ράχη και διακλαδίζεται σε δευτερεύοντες και τριτεύοντες άξονες. Από τις τελευταίες διακλαδώσεις εκφύονται δύο έως πέντε (2– 5) ποδίσκοι στην άκρη των οποίων προσφύεται ο πραγματικός καρπός που είναι οι ράγες. Το τμήμα της ράχης από το σημείο που εκφύεται από το βλαστό μέχρι την πρώτη διακλάδωση καλείται μίσχος. Ο βόστρυχος αποκτά τις οριστικές του διαστάσεις κατά τον περκασμό. Το τελικό μέγεθος της σταφυλής εξαρτάται ουσιαστικά από το μέγεθος που αποκτά σ’ αυτή τη φάση ο βόστρυχος και συγκεκριμένα ο κεντρικός άξονας της ταξιανθίας (Κουράκου και Δραγωνά Σ., 1998).

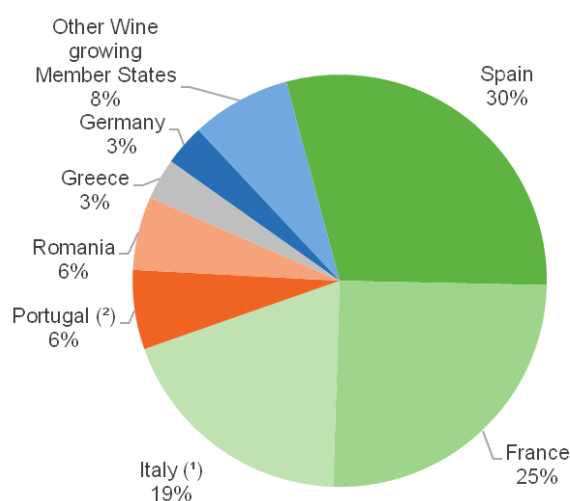
A.5 Διαδικασίες οινοποίησης και παραπροϊόντα

Ο οίνος προέρχεται ουσιαστικά από τα χυμοτόπια της σάρκας των ραγών, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 85 % της μάζας του σταφυλιού. Στα χυμοτόπια συγκεντρώνονται τα σάκχαρα όταν τα σταφύλια είναι ώριμα και τα οξέα που δίνουν τη γεύση στο κρασί που παράγεται από την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων. Η ζύμωση πραγματοποιείται με την βοήθεια ζυμομυκήτων, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, οι οποίοι μετατρέπουν απλά σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Το αλκοολικό μέσο που προκύπτει από τη ζύμωση περιέχει (12– 15 %) v/v αιθανόλη, ένα ποσοστό πάνω από το οποίο η ζύμη δεν μπορεί να επιβιώσει. (Jackson *et al.*, 1994; 2014). Οι δυο διαδικασίες οινοποίησης, η λευκή και η ερυθρά, από τις οποίες

προκύπτουν παραπροϊόντα. Ένα από αυτά είναι τα στέμφυλα που θα μας απασχολήσουν στην συνέχεια της ερευνητικής μελέτης (Κουράκου και Δραγώνα Σ. 1998; Karvela E. *et al.*, 2011).

A.6 Στατιστικά στοιχεία αμπέλου-οινοποίησης και παραπροϊόντων

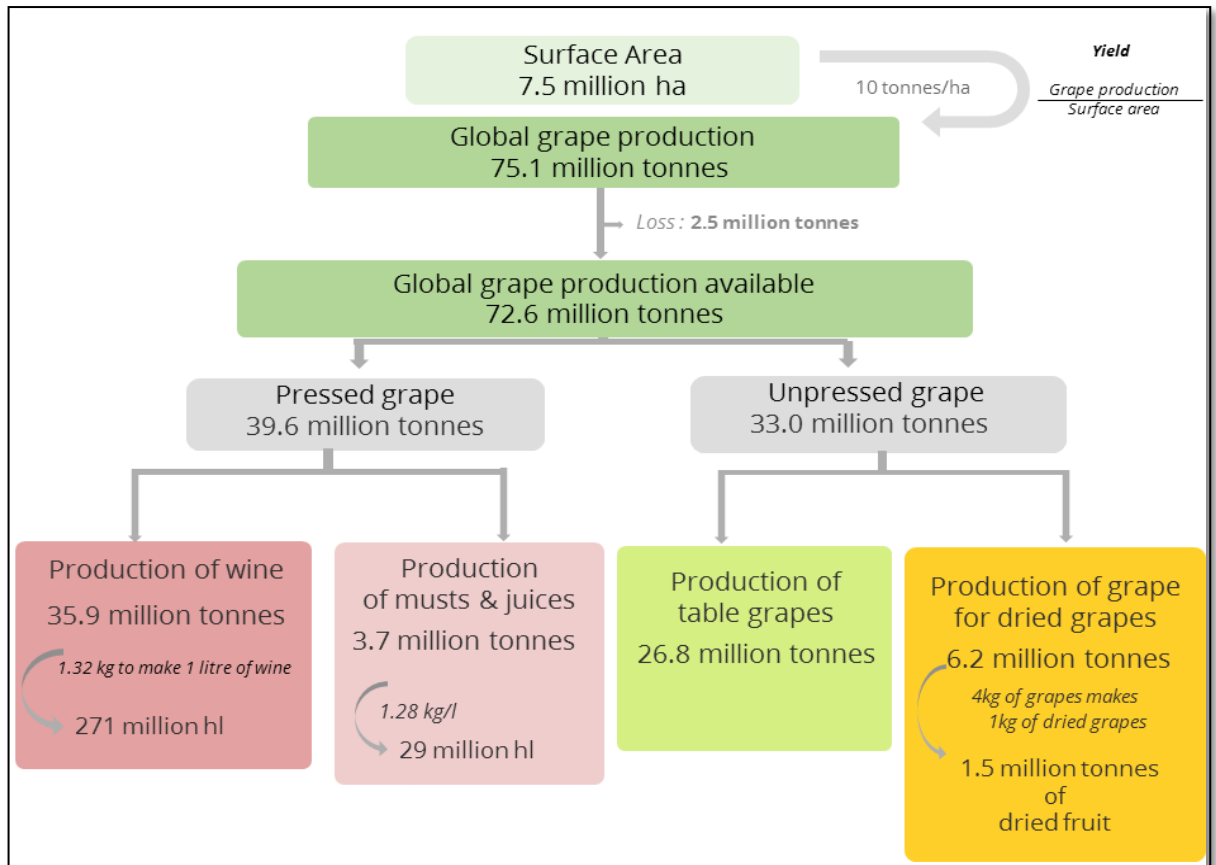
Σήμερα το αμπέλι καλλιεργείται σε όλο σχεδόν τον κόσμο, στο Βόρειο και στο Νότιο ημισφαίριο και σε γεωγραφικά πλάτη με εύκρατο κλίμα. Εντούτοις, είναι χαρακτηριστικό ότι στις χώρες που βρίσκονται γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου (Εικόνα 13, Στοιχεία της Euro-stat για την χρονική περίοδο 2015) είναι συγκεντρωμένο περίπου το 90 % της παγκόσμιας καλλιεργούμενης έκτασης (Amico V. *et al.*, 2004).



Εικόνα 13: Έκταση (%) με αμπέλια στην Ευρώπη.

A.6.1. Στατιστικά στοιχεία παγκόσμιας παραγωγής

Η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών το 2014 εκτιμήθηκε σε 75 εκατομμύρια τόνους εκ των οποίων το 41 % παράχθηκε στην Ευρώπη, το 29 % στην Ασία και το 21 % στην Αμερική (Food and Agriculture Organization- FAO, 2017). Περίπου 35,9 εκατομμύρια τόνοι χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή οίνου ενώ τα υπόλοιπα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μούστου και χυμού, ως επιτραπέζια και αποξηραμένα σταφύλια (International Organisation of Vine and Wine- OIV, 2016) (Εικόνα 14). Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την οινοποίηση είναι οι βόστρυχοι, τα στέμφυλα, τα γίγαρτα και η οινολάσπη. Στην Ευρώπη, ετησίως συλλέγονται 14,5 εκατομμύρια τόνοι αποβλήτων από οινοποιεία (Teixeira *et al.*, 2014; Pinelo *et al.*, 2006).



Εικόνα 14: Σχηματική παρουσίαση της παγκόσμιας οиноκαλλιέργειας.

A.6.2 Στατιστικά στοιχεία Ελληνικής παραγωγής

Η καλλιέργεια της αμπέλου αποτελεί μια από τις βασικότερες καλλιέργειες της χώρας μας και η παραγωγή, επεξεργασία, μεταποίηση και εμπορία των αμπελουργικών προϊόντων είναι από τις σημαντικότερες δραστηριότητες της αγροτικής παραγωγής. Το αμπέλι, για παραγωγή κρασιού, καλλιεργούνται όπου το κλίμα το επέτρεπε πλάι σε άλλες καλλιέργειες συμπληρώνοντας την οικιακή οικονομία, ενώ υπήρξαν και περιοχές όπου αποτελούσε το κύριο εισόδημα (Καραγιαννοπούλου, 2016).

Σύμφωνα δεδομένα της Στατιστικής Υπηρεσίας, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις με αμπέλια στην Ελλάδα παρουσιάζουν μια συνεχή μείωση από το 2009 μέχρι το 2013. Σε στοιχεία του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου η Ελλάδα κατατάχθηκε, το 2013, στην 12^η θέση παγκοσμίως στην παραγόμενη ποσότητα οίνου. Από τα εξαγώγιμα σταφύλια, το 90 % αποτελούν οι λευκές ποικιλίες. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενη ζήτηση ερυθρών ποικιλιών από τις αγορές του εξωτερικού.

Πίνακας 3: Στατιστικά οινοπαραγωγής και αμπελοοινικής περιόδου 2015-2016.

Κατηγορία Προϊόντων	Συνολικός Όγκος Οίνων (hl)	Οίνοι Ερυθροί (hl)	Λευκοί Οίνοι (hl)
Οίνοι	2.458.241	745.809	17.120.432
ΠΟΠ	234.350	120.250	114.100
ΠΓΕ	427.113	170.515	256.598
Ποικιλιακοί	110.950	41.250	69.700
Χωρίς ΠΟΠ/ΠΓΕ	1.513.737,50	413.789,50	1.099.948,00
Γλεύκη	42.859	1.721	41.138
Γενικό Σύνολο	2.501.100	747.530	1.753.570

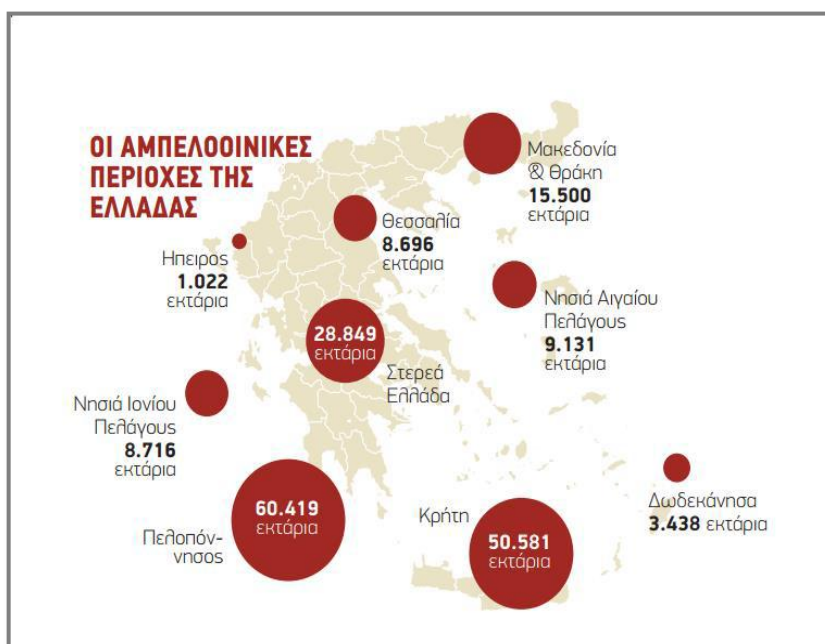
Πίνακας 4: Γενική εικόνα των καλλιεργούμενων εκτάσεων με αμπέλια και της παραγωγής κρασιού στην Ελλάδα το έτος 2013 σύμφωνα με το ΥΠΑΑΤ.

	Έκταση (ha)	Παραγωγή οίνου (hl)
Πελοπόννησος	60.419	1.525.590
Κρήτη	50.581	959.480
Στερεά Ελλάδα και Εύβοια	28.849	1.988.790
Μακεδονία και Θράκη	15.500	514.760
Θεσσαλία	8.696	423.910
Νησιά Ιονίου Πελάγους	8.716	215.840
Νησιά Αιγαίου Πελάγους	9.131	151.300
Δωδεκάνησα	3.438	128.850
Ήπειρος	1.022	30.620

Η παραγωγή σταφυλιών προς οινοποίηση στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας για τη χρονική περίοδο 2003-2006, ήταν κατά μέσο όρο 550.000 τόνοι. Η μέση ετήσια παραγωγή οίνου στην ίδια περίοδο ήταν 401.500 τόνοι (\approx 73 % του βάρους των σταφυλιών). Από την παραπάνω ποσότητα οίνου οι 140.000 τόνοι προέρχονται από την χωρική οινοποίηση, ενώ οι 261.500 τόνοι από οργανωμένα οινοποιεία. Το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ, 2018) όπως φαίνεται στους πίνακες 4, 5 δίνει κάποια στατιστικά στοιχεία της οινοπαραγωγής και αμπελοοινικής περιόδου 2015-2016. Στην Εικόνα 15 φαίνονται οι κυρίες αμπελοοινικές περιοχές της Ελλάδας το 2014. Με βάση τις αμπελουργικές εκτάσεις ανά περιφέρεια, του αμπελουργικού μητρώου του ΥΠΑΑΤ, στα Ιόνια νησιά την περίοδο 2015 καλλιεργήθηκαν 7.043 ha, ενώ συνολικά στην Ελλάδα για την ίδια περίοδο καλλιεργήθηκαν 64.013 ha.

Αν λάβουμε υπόψη ότι από 100 kg σταφύλια προς οινοποίηση, τα νωπά στέμφυλα αποτελούν περίπου το 27 %, στην Ελλάδα, μετά από μελέτες που έγιναν στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος Dionysos (2003- 2006), υπολογίζεται ότι παράγονται ανά έτος περίπου 148.500 τόνοι στεμφύλων. Υπολογίζεται πως από 100 kg νωπά στέμφυλα

παραλαμβάνονται 30 kg νωπής πούλπας, 25 kg νωπά γίγαρτα και 20 kg βόστρυχες. Τα υπόλοιπα αντιπροσωπεύουν απώλειες κυρίως σε υγρή μορφή. Συνεπώς από τους 148.500 τόνους νωπών στέμφυλων έχουμε για αξιοποίηση περίπου 44.550 τόνους νωπή πούλπα, 37.125 τόνους γίγαρτα και 29.700 τόνους βόστρυχες. Αυτά τα υποπροϊόντα δεν αξιοποιούνται βιομηχανικά, παρά μόνο σε πολύ μικρό ποσοστό για ζωοτροφές και την παραγωγή τσίπουρου (Karvela E. *et al.*, 2009).



Εικόνα 15: Αμπελοοινικές περιοχές της Ελλάδας το 2014. (1 εκτάριο ισούται με 10 στρέμματα).

A.7 Ανάλυση των παραπροϊόντων της παραγωγής οίνου

Τα παραπροϊόντα που προκύπτουν από την παραγωγή του οίνου περιλαμβάνουν μεταξύ των άλλων κλαδέματα αμπέλου, μίσχους σταφυλιών, στέμφυλα, γίγαρτα σταφυλιού και ελαίου αυτών, οινολάσπη, μαγιά, τρυγικό οξύ, διοξείδιο του άνθρακα και λυμάτων (Εικόνα 16).

Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει πως τα υποπροϊόντα οινοποιείου (λάσπες και στέμφυλα) μπορεί να επιδράσουν αρνητικά παρουσιάζοντας φυτοτοξικότητα σε καλλιέργειες (Moldes *et al.*, 2007; 2008) και σε υδροβιότοπους (Arienzo *et al.*, 2009). Ο Grismer και οι συνεργάτες του (2003), εστίασαν το ενδιαφέρον τους στα υδατικά απόβλητα των οινοποιείων, τα οποία κρίθηκαν υπεύθυνα για την επιμόλυνση των υπόγειων υδάτινων πόρων (Karvela E. *et al.*, 2011).



Εικόνα 16: Παραπροϊόντα της παραγωγής οίνου (αμπελόφυλλα, ξύλα, στέμφυλα, οινολάσπη).

Η χημική ανάλυση των υποπροϊόντων έδειξε ότι πρόκειται για απορρίμματα με διαφορετική σύσταση ανάλογα με την προέλευσή τους (λευκές/ κόκκινες ποικιλίες, γίγαρτα, βόστρυχες, φλοιοί, οινολάσπες, υποπροϊόντα απόσταξης) τα οποία είναι πλούσια σε μακροσυστατικά, κυρίως κάλιο (K) (11,9- 72,8 g/ kg), και φαινολικά συστατικά (1,2- 19,0 g/ kg) και χαμηλό ποσοστό μικροσυστατικών και βαρέων μετάλλων (Bustamante *et al.*, 2008; Karvela E. *et al.*, 2011).

Το εύρος της χρήσης των παραπροϊόντων αυτών είναι μεγάλο και με την σωστή αξιοποίηση του από την επιχείρηση του οινοποιείου, μπορεί και ενδυναμώνει επιχειρήσεις των κλάδων της ιατρικής, της κοσμετολογίας, της μαγειρικής, των ζωοτροφών και πολλών άλλων. Η μέχρι τώρα κατεργασία των υποπροϊόντων έχει δώσει ως αποτελέσματα την παραγωγή διαφόρων χρήσιμων ουσιών όχι μόνο για την φαρμακοβιομηχανία αλλά τόσο για την γεωργία όσο και για την βιομηχανία τροφίμων. Με την χρήση διαφορετικών διεργασιών κάθε φορά, παραλαμβάνονται ή παράγονται διαφορετικά προϊόντα. Με την διαδικασία της κομποστοποίησης από τα στέμφυλα έχει παραχθεί υπόστρωμα για τα φυτά (Paradelo *et al.*, 2010; Manios *et al.*, 2007; Pardo *et al.*, 2009; Garcia-Martinez *et al.*, 2009), ειδικό υπόστρωμα για την καλλιέργεια των μανιταριών (Pardo *et al.*, 2007) καθώς επίσης αποχρωστικές ουσίες (Paradelo *et al.*,

2009).

Με την βοήθεια ζύμωσης με την χρήση διαφορετικών μικροοργανισμών αλλά και διαφορετικής κατεργασίας (υδρόλυσης ή μη) έχει μέχρι τώρα παραχθεί γαλακτικό οξύ (Portilla *et al.*, 2008, 2009), γαλακτωματοποιητές (Portilla *et al.*, 2010), υδρολυτικά ένζυμα (Diaz *et al.*, 2009, 2010), αιθανόλη (Rodriguez *et al.*, 2010), ενώ με την διαδικασία της εκχύλισης έχουν παραληφθεί τανίνες (Jiang *et al.*, 2011), πολυφαινόλες (Vatai *et al.*, 2009; Conde *et al.*, 2011; Ping *et al.*, 2011; Fiori *et al.*, 2010) και αντιαλλεργιογόνα (Tominaga *et al.*, 2010).

A.7.1 Είδη στεμφύλων

Τα στέμφυλα μπορεί να προέρχεται από ερυθρά ή λευκά σταφύλια. Στα κόκκινα σταφύλια, τα στέμφυλα είναι ποτισμένα με κρασί. Τα λευκά στέμφυλα περιέχουν σάκχαρα που πρέπει να ζυμωθούν πριν αποσταχτούν. Γι αυτό τα λευκά στέμφυλα μπαίνουν σε δεξαμενή με χλιαρό νερό και προσθήκη μαγιάς.

Μετά τον τρύγο τα στέμφυλα συντηρούνται κατά την διάρκεια πολλών εβδομάδων απουσία αέρα ώστε να αναπτυχθούν συστατικά που θα δώσουν το άρωμα. Η απουσία αέρα τα προστατεύει από διάφορες αλλοιώσεις. Για αυτό φυλάσσονται σε δεξαμενές σκεπασμένα με λάσπη αλλά και με οινολάσπη (Τσακίρης Α., 1988).

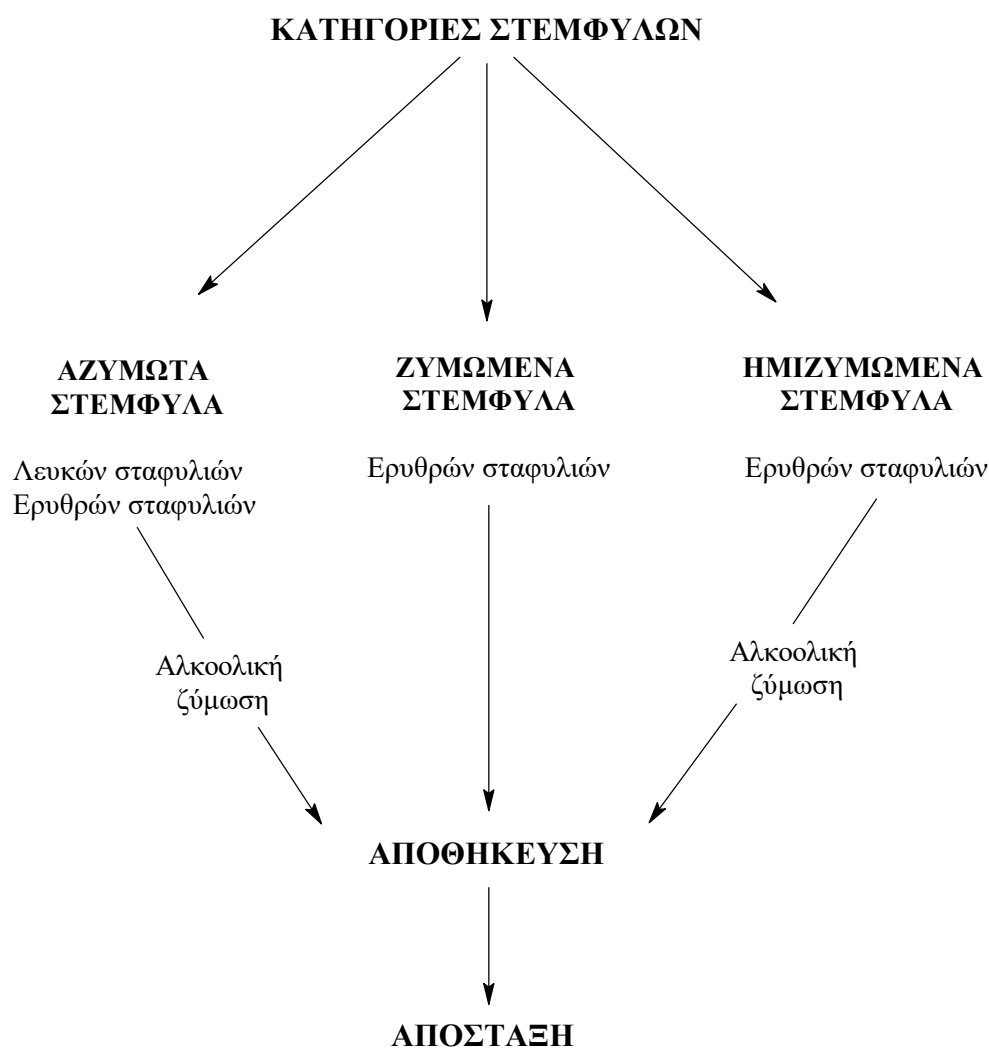
A.7.2 Κατηγορίες στεμφύλων

Τα αζύμωτα στέμφυλα λαμβάνονται από τα πιεστήρια μετά από την συμπίεση των λευκών κυρίως σταφυλιών και τον διαχωρισμό του γλεύκους. Μπορεί επίσης να προέρχονται από ερυθρά σταφύλια όταν έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ροζέ ή λευκού κρασιού με απευθείας συμπίεση. Τα λευκά σταφύλια μετά την συμπίεσή τους τοποθετούνται σε τσιμεντένια δεξαμενή που επιτρέπει την συνεχή παραλαβή του γλεύκους από το κάτω μέρος της και το στερεό υπόλειμμα συμπιέζεται στη συνέχεια μία ή δύο φορές. Η περιεκτικότητα αυτών των στεμφύλων σε σάκχαρα είναι υψηλή εάν δεν έχουν υποστεί αλκοολική ζύμωση, ενώ η περιεκτικότητα σε αιθανόλη χαμηλή. Τα αζύμωτα στέμφυλα οδηγούνται σε δεξαμενές όπου γίνεται η αλκοολική ζύμωση και πολλές φορές απαιτείται η προσθήκη νερού για την ομογενοποίησή τους καθώς και η προσθήκη οινολάσπης για την διευκόλυνση έναρξης της ζύμωσης.

Τα ζυμωμένα στέμφυλα προέρχονται από ερυθρή οينوποίηση. Η ποσότητα κρασιού που παραμένει στα στέμφυλα μετά την συμπίεση είναι αντίστροφα ανάλογη με το βαθμό συμπίεσης που έχουν υποστεί. Τα ερυθρά σταφύλια μετά τη συμπίεσή τους

τοποθετούνται σε ξύλινη δεξαμενή όπου παραμένουν μαζί με το γλεύκος για χρονικό διάστημα έως τρεις ημέρες. Κατά τη διάρκεια παραμονής τους με το γλεύκος λαμβάνει χώρα αυθόρμητα η αλκοολική ζύμωση. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του γλεύκους από το στερεό υπόλειμμα το οποίο στη συνέχεια συμπιέζεται. Τα ζυμωμένα στέμφυλα υπόκεινται απ' ευθείας σε απόσταξη εφόσον είναι πτωχά πλέον σε σάκχαρα και πλούσια σε αιθανόλη.

Τέλος, ημιζυμωμένα είναι τα στέμφυλα εκείνα στα οποία η απομάκρυνση των υγρών κατά την ερυθρή οινοποίηση γίνεται πριν το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και συνεπώς περιέχουν ταυτόχρονα αζύμωτα σάκχαρα και αλκοόλη. Τα στέμφυλα αυτά παραμένουν στην ίδια δεξαμενή ή μεταφέρονται σε άλλη για την ολοκλήρωση της ζύμωσής τους (Εικόνα 17) (Ακρίδα Κ., 2014).



Εικόνα 17: Διάγραμμα αζύμωτων, ζυμώμενων και ημιζυμώμενων στεμφύλων.

A.7.3 Νομοθεσία στέμφυλων

Βάσει του Κανονισμού (ΕΚ) 479/2008, ως στέμφυλα σταφυλιών ορίζονται τα υπολείμματα που προκύπτουν από την πίεση των νωπών σταφυλιών, είτε έχουν είτε δεν έχουν υποστεί ζύμωση. Τα στέμφυλα είναι η μάζα που απομένει μετά τη συμπίεση των σταφυλιών, τα οποία κατά την ερυθρή οινοποίηση παραμένουν με το γλεύκος για τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, με σκοπό την εκχύλιση των χρωστικών (ανθοκυανίνες). Η μάζα αυτή συνίσταται κυρίως από τους φλοιούς της ράγας του σταφυλιού, τα γίγαρτα και από τους βοστρύχους. Το ποσοστό των βοστρύχων που περιέχουν τα στέμφυλα εξαρτάται από το βαθμό αποβοστρύχωσης που έχει προηγηθεί.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) είναι πλεονασματική στην παραγωγή οίνου με αποτέλεσμα να έχουν θεσπιστεί παρεμβατικά μέτρα για τη στήριξη του προϊόντος αλλά και βελτίωση της ποιότητάς του. Σύμφωνα με το αυτό, κάθε οινοπαραγωγός υποχρεούται να παραδίδει σε οινοπνευματοποιεία το σύνολο των υποπροϊόντων που παράγει. Σύμφωνα με τους Κανονισμούς της Ε.Ε. 1493/99 και 1623/2000 και την Υπουργική Απόφαση 400761/22-11-200 καθορίζονται ελάχιστες τιμές αγοράς από τους οινοπνευματοποιούς των υποπροϊόντων οινοποίησης. Σήμερα, η κατώτερη τιμή καθορίζεται σε 0,995 € ανά αλκοολικό βαθμό και εκατόκιλο στεμφύλων ή οινολάσπης, τιμή την οποία υποχρεούται ο οινοπνευματοποιός να καταβάλει στον οινοπαραγωγό. Για να διατηρηθούν τα έξοδα απόσταξης σε λογικά επίπεδα, ορίζονται από το άρθρο 46 του Κανονισμού 1623/2000 της Ε.Ε. οι ελάχιστες περιεκτικότητες των υποπροϊόντων σε αιθυλική αλκοόλη και είναι (2– 2,8) L αιθυλικής αλκοόλης για κάθε 100 kg στεμφύλων και (3– 4) L αιθυλικής αλκοόλης για κάθε 100 kg οινολάσπης, ανάλογα με την αμπελουργική ζώνη.

Σε περίπτωση που στην περιοχή που εδρεύει το οινοποιείο δεν υπάρχουν εγκαταστάσεις για την παραλαβή και κατεργασία των υποπροϊόντων και όταν τα έξοδα μεταφοράς είναι δυσανάλογα, ο οινοποιός έχει το δικαίωμα της απόσυρσης αυτών από την αγορά, υπό την επίβλεψη και έλεγχο της τοπικής Διεύθυνσης Γεωργίας. Με την απόσυρση τα προϊόντα μπορούν να διατεθούν σαν ζωοτροφή ή για την παραγωγή λιπάσματος βελτιωτικό εδάφους.

Ο οινοπνευματοποιός που παραλαμβάνει και επεξεργάζεται υποπροϊόντα οινοποίησης ενισχύεται οικονομικά από την Ε.Ε. σύμφωνα με το άρθρο 48 του Κανονισμού 1623/2000 της Ε.Ε.

A.7.4 Υφιστάμενη κατάσταση στέμφυλων στο εξωτερικό

Σήμερα, οι μονάδες αξιοποίησης των στεμφύλων έχουν εκσυγχρονιστεί είτε έχουν δημιουργηθεί νέες, που παράγουν μια σειρά από προϊόντα με βάση το σταφύλι.

Τα στέμφυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως λίπασμα των καλλιεργειών λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων του αζώτου και καλίου. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος για να επιτευχθεί σταθεροποίηση των οργανικών αυτών αποβλήτων είναι η κομποστοποίηση. Η κομποστοποίηση των οργανικών υλών είναι ένας απλός και αποτελεσματικός τρόπος μετατροπής της αγροβιομηχανικών αποβλήτων σε προϊόντα κατάλληλα για χρήση ως εδαφοβελτιωτικών (Arvanitoyannis *et al.*, 2006).

Επιπλέον, τα απόβλητα αυτά φαίνεται να είναι ένα αποτελεσματικό προσροφητικό ρύπων, όπως τα βαρέα μέταλλα. Πολλά φυσικά και συνθετικά φίλτρα έχουν ερευνηθεί ως προσροφητικά των βαρέων μετάλλων, μεταξύ αυτών και τα απόβλητα των οινοποιείων, τα οποία αποδείχτηκε ότι έχουν χαμηλό κόστος και καλή απόδοση, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στην υποστήριξη της αειφόρου γεωργικής παραγωγής. Σημαντικό είναι επίσης, ότι τα εν λόγω απόβλητα μπορούν να ανακυκλωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενός υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντος, της πουλλουλάνης (Arvanitoyannis *et al.*, 2006).

Τα στέμφυλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως συστατικό ζωοτροφών. Τα στέμφυλα τα έχουν χρησιμοποιηθεί στη διατροφή των μηρυκαστικών, ιδίως προβάτων, ωστόσο τα υψηλά επίπεδα περιεκτικότητας σε λιγνίνες και τανίνες θέτουν σημαντικούς περιορισμούς στη χωρίς επεξεργασία χρήση αυτού του υποπροϊόντος ως ζωοτροφή μηρυκαστικών. Τα στέμφυλα τα προερχόμενα από λευκά σταφύλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής των μηρυκαστικών (Mirzaei *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2008).

Το εκχύλισμα των στεμφύλων μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα καλό υπόστρωμα για την παραγωγή της πουλλουλάνης, ένα σημαντικό βιομηχανικό πολυσακχαρίτη. Χρησιμοποιείται επίσης στη φαρμακευτική βιομηχανία ως διογκωτικό μέσο και ως παράγοντας πρόληψης της οξείδωσης των δισκίων (Arvanitoyannis *et al.*, 2006).

Οι ανθοκυάνες και τα φαινολικά συστατικά που περιέχονται στα σταφύλια θεωρούνται σήμερα οι πιο μελετημένες φυσικές ουσίες, για αυτό και επιτρέπεται η χρήση τους από τις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Επίσης οι ανθοκυάνες χρησιμοποιούνται ευρέως ως φυσική χρωστική με το κωδικό «E 163» για τρόφιμα και ποτά όπως μαρμελάδες, ζελέ, οίνους, λικέρ, ξύδια, ηδύποτα,

αναψυκτικά, σιρόπια, χυμούς φρούτων, παγωτά, γλυκίσματα, κομπόστες καθώς και σε καλλυντικά, οδοντόπαστες και άλλα (Τιτάκης και Καρτσωνάκης, 2007).

Τέλος τα στέμφυλα χρησιμοποιούνται και για την παρασκευή αποσταγμάτων. Η κατεργασία των στεμφύλων για την παραλαβή της αιθυλικής αλκοόλης γίνεται στα αποσταγματοποιεία Α' κατηγορίας, ετήσια ή διήμερα. Το προϊόν που παράγεται είναι απόσταγμα στεμφύλων, κοινώς τσίπουρο. Το τσίπουρο ή τσικουδιά ή ρακή είναι ένα παραδοσιακό προϊόν που προέρχεται από την απόσταξη ζυμωθέντων στεμφύλων. Σαν τύπος προϊόντος υπάρχει σε όλες τις οινοπαραγωγές χώρες, όπως marc ή eau-de-vie de marc de raisin στη Γαλλία, grappa στην Ιταλία, bagaceira στην Πορτογαλία, kommonica στη Γιουγκοσλαβία κ.τ.λ. (Τιτάκης και Καρτσωνάκης, 2006; Τζάμης Ι., 2010).

A.7.5 Υφιστάμενη κατάσταση στέμφυλων στην Ελλάδα

Τα οινοποιεία είναι στην πλειοψηφία τους επιχειρήσεις μικρής κλίμακας που δεν έχουν τη δυνατότητα να καλύψουν το κόστος εγκατάστασης συστημάτων επεξεργασίας των στερεών τους αποβλήτων, με αποτέλεσμα να τα διαχειρίζονται με μη αποδεκτές μεθόδους περιβαλλοντικά. Μετά το πέρας της οινοποίησης, σε μερικές περιπτώσεις, τα απόβλητα είτε τα στερεά ή και τα υγρά συνήθως κατευθύνονται προς κομποστοποίηση ή απορρίπτονται στο περιβάλλον. Το ιδιαίτερα υψηλό οργανικό φορτίο των αποβλήτων δεν βιοαποικοδομείται εύκολα, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων οδηγούν στην εμφάνιση και βιοτοξικών φαινομένων που υποβαθμίζουν το φυσικό περιβάλλον (Dionisos, 2006; Τιτάκης και Καρτσωνάκης, 2006).

Όσο ισχύουν τα παρεμβατικά μέτρα της Ε.Ε. οι προαιρετικές αποστάξεις οίνων, οι οινοποιοί δεν εκσυγχρονίζονται ώστε να μπορούν να επεξεργαστούν και τα στέμφυλα για την ανάκτηση της αιθυλικής αλκοόλης και του όξινου τρυγικού καλίου. Αυτό συμβαίνει διότι η επεξεργασία στεμφύλων είναι πολύπλοκότερη και οικονομικά ασύμφορη σε σχέση με τις οινολάσπες και τους οίνους. Διαπιστώνεται ότι η ελληνική βιομηχανία οίνου υστερεί καταρχήν στην τεχνολογία οινοποίησης και οι επενδύσεις που γίνονται προσανατολίζονται κατά κύριο λόγο στον εκσυγχρονισμό του παραγωγικού μηχανολογικού εξοπλισμού ώστε να αναβαθμίσει την ποιότητα και να συνταχθεί με τα διεθνή πρότυπα. Αντίθετα, οι ήδη τεχνολογικά προηγμένες χώρες, είχαν τα τελευταία χρόνια την ευκαιρία να μελετήσουν και να εφαρμόσουν περιβαλλοντικά φιλικές και βιώσιμες πρακτικές. Το μόνο από τα υποπροϊόντα που αξιοποιείται επαρκώς στην Ελλάδα είναι οι οινολάσπες (Τιτάκης και Καρτσωνάκης, 2006).

B.1 Χημική προσέγγιση των στέμφυλων

Τα σταφύλια φτάνουν σε ωριμότητα όταν ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων βρίσκεται σε ισορροπία. Η φαινολική ωριμότητα δεν αφορά μόνο την ολική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, αλλά και την δομή τους και την ικανότητά τους να εκχυλίζονται από τα σταφύλια (Valiente *et al.*, 1995).

Πίνακας 5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ελληνικής ποικιλίας αγιοργίτικο (Lafka *et al.*, 2007).

Παράμετροι	Τιμές
pH	3,6
Υγρασία (% w/w)	73,6
Ολικά στερεά (% w/w)	26,4
Τέφρα (% w/w)	4,6
Λίποι (% w/w)	6,3
Αναγωγικά σάκχαρα (% w/w)	1,5
Συνολικά φαινολικά (% w/w)	2,89

B.1.1 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι βασικό μέρος της διατροφής των ανθρώπων. Χρησιμοποιούνται ως γαλακτοματοποιητές, αφριστικά μέσα καθώς και για δημιουργία πηκτών (gel-ζελατίνη).

Στα στέμφυλα έχουν ανιχνευτεί πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα οι Valiente *et al.* (1995) ανέλυσαν τις πρωτεΐνες στεμφύλων της λευκής ποικιλίας Airen, οι οποίες αποτελούσαν το (10,72 % w/w) των ξηρών στεμφύλων. Η ποικιλία Muller Thurgau βρέθηκε να περιέχει (6,53 % w/w), η Morio Muscat (5,38 % w/w), η Cabernet Sauvignon (12,34 % w/w), η Merlot (11,26% w/w) και η Pinot Noir (12,13 % w/w) (Qian Deng *et al.*, 2011). Τέλος σε πρόσφατη βιβλιογραφία του 2014 που αφορά την ποικιλία Merlot αναφέρθηκε ποσοστό 13,23 % w/w (Ribeiro *et al.*, 2015).

B.1.2 Πηκτίνες

Οι πηκτίνες ανήκουν στους πολυσακχαρίτες, είναι υδρόφιλα κολλοειδή τα οποία έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού. Ως φυσικά συστατικά των φυτικών ιστών οι πηκτινικές ουσίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην υφή και τη συνεκτικότητα των φρούτων και λαχανικών. Οι μεταβολές των πηκτινικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα το μαλάκωμα της σάρκας φρούτων κατά την ωρίμανση, τις

μεταβολές στη θολερότητα των πολτών και των συμπυκνωμάτων φρούτων και την απώλεια της κολλοειδούς σταθερότητας στους χυμούς φρούτων. Αποτελούνται από μακριές ευθύγραμμες αλυσίδες πολυγαλακτουρονικού οξέος, με δεσμό (α -1 \rightarrow 4) και οι καρβοξυλικές ομάδες είναι εν μέρει εστεροποιημένες με μεθυλική αλκοόλη. Στα φυτικά κύτταρα εντοπίζονται σε μορφή πρωτοπηκτινών οι οποίες ενώνονται με την κυτταρίνη και είναι αδιάλυτες στο νερό (Brodeur *et al.*, 2011). Οι πηκτίνες χρησιμοποιούνται ως προσθετικά τροφίμων, ως διογκωτικοί και πηκτωματογόνοι παράγοντες εξαιτίας της ικανότητας τους να σχηματίζουν πηκτές και να μεταβάλλουν τη ρευστότητα των προϊόντων. Τα στέμφυλα από κόκκινες ποικιλίες περιείχαν (50,6– 56,4) mg/ g ξηρού βάρους ενώ οι άσπρες ποικιλίες (32,3– 41,2) mg/ g ξηρού βάρους (Valiente *et al.*, 1995).

B.1.3 Διαιτητικές ίνες

Οι φυτικές ή διαιτητικές ίνες αποτελούν το βρώσιμο τμήμα των φυτικών τροφίμων, οι οποίες δεν μπορούν να πεφθούν ή να απορροφηθούν στο λεπτό έντερο και περνούν ανέπαφες στο παχύ έντερο. Περιλαμβάνουν μη αμυλούχους πολυσακχαρίτες (π.χ. κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, κόμμεα, πηκτίνες), ολιγοσακχαρίτες (π.χ. ινσουλίνη), λιγνάνες και συναφή φυτικά συστατικά (π.χ. κηροί, σουβερίνη).

Οι διαιτητικές ίνες διακρίνονται σε διαλυτές και αδιάλυτες στο νερό. Στην κατηγορία διαλυτές στο νερό ανήκουν οι πηκτίνες, τα πολυμερή του γαλακτουρονικού οξέος, τα πολυμερή μονοσακχαριτών που σχηματίζουν πηκτές στο νερό και τα κόμμεα. Από την άλλη, στην κατηγορία των αδιάλυτων ινών στο νερό ανήκουν η κυτταρίνη, οι ημικυτταρίνες και η λιγνίνη. Τα στέμφυλα είναι πλούσια σε διαιτητικές ίνες, οι ποικιλίες Muller Thurgau, Morio Muscat, Cabernet Sauvignon, Merlot και Pinot Noir περιείχαν (28,01 % w/w), (17,28 % w/w), (53,21 % w/w), (51,09 % w/w) και (56,31 % w/w) αντίστοιχα (Valiente *et al.*, 1995). Τα αποτελέσματα συμφωνούν και με άλλες εργασίες στις όποια οι ποικιλίες Cabernet Sauvignon, και Merlot περιείχαν (26,42 % w/w), και (58,99 % w/w) αντίστοιχα (Qian Deng *et al.*, 2011).

B.1.4 Λιπαρές ύλες

Μεγάλο ποσοστό λιπαρών υλών εντοπίζεται στα γίγαρτα. Όπως αναφέρουν οι Da Porto *et al.* (2013), τα γίγαρτα των ερυθρών σταφυλιών είχαν περιεκτικότητα σε λίπος (13,1- 19,6 %) w/w, η σύσταση του οποίου απεικονίζεται στον παρακάτω Πίνακα 6.

Το γιγαρτέλαιο έχει υψηλή θρεπτική αξία λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε λινοελαϊκό οξύ, περίπου (72 % w/w). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο σε σάλτσες

καθώς επίσης και να προστεθεί σε καλλυντικά δεδομένου ότι έχει ενυδατικές ιδιότητες (Da Porto *et al.*, 2013).

Πίνακας 6: Σύσταση ελαίου γιγάρτων.

Λιπαρό οξύ (%) (w/w)	
Λινελαϊκό	72,35
Ελαϊκό	16,79
Παλμιτικό	7,22
Στεατικό	3,07
Λινολενικό	0,39
Παλμιτελαϊκό	0,16

B.2 Φαινολικές ενώσεις

Με τον όρο φαινολικές ενώσεις ή φαινολικά συστατικά εννοούμε μια κατηγορία χημικών ενώσεων των οποίων το μόριο περιλαμβάνει έναν τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο που φέρει ένα ή περισσότερα υδροξύλια. Φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τη φαινυλαλανίνη, μέσω της βιοσυνθετική οδού του σικιμικού οξέος, και του φαινυλοπροπανίων. Ο βασικός τους ρόλος είναι η προστασία των φυτών από το φωτοσυνθετικό και το περιβαλλοντικό stress όπως για παράδειγμα οι μολύνσεις από μικροοργανισμούς, η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας και ο τραυματισμός των ιστών (Κουράκου και Δραγώνα 1998; Naczki *et al.*, 2004).

Τα φαινολικά παράγωγα αποτελούν σημαντικό κεφάλαιο της οινολογίας, γιατί καθορίζουν το χρώμα και τις αποχρώσεις των εγχρώμων οίνων, αλλά και τους γευστικούς χαρακτήρες τους. Επίσης ευθύνονται για τις θετικές και αρνητικές της οινικής ποιότητας κατά την συντήρηση και παλαίωση (Κουράκου - Δραγώνα, 1998).

Τα σταφύλια περιέχουν φαινολικές ενώσεις που εντοπίζονται κυρίως στους φλοιούς και στα γιγάρτα. Τα φαινολικά παράγωγα που συναντάμε στους φλοιούς είναι κυρίως οι ανθοκυάνες, ουσίες χρωστικές που δίνουν το χρώμα στα σταφύλια, και σε μικρότερα ποσοστά φαινολικά οξέα, κατεχίνες, προκυανιδίνες. Αντίθετα, στα κουκούτσια των σταφυλιών συναντάμε κατεχίνες, προκυανιδίνες και καθόλου ανθοκυάνες. Κατά την οινοποίηση των ερυθρών σταφυλιών, ένα μέρος των παραπάνω φαινολικών ουσιών (περίπου 50 %) περνάει στον οίνο και το υπόλοιπο παραμένει στα στέμφυλα (Simpson *et al.*, 1998). Η βιοσύνθεση των φαινολικών μορίων πραγματοποιείται μέσω των παρακάτω

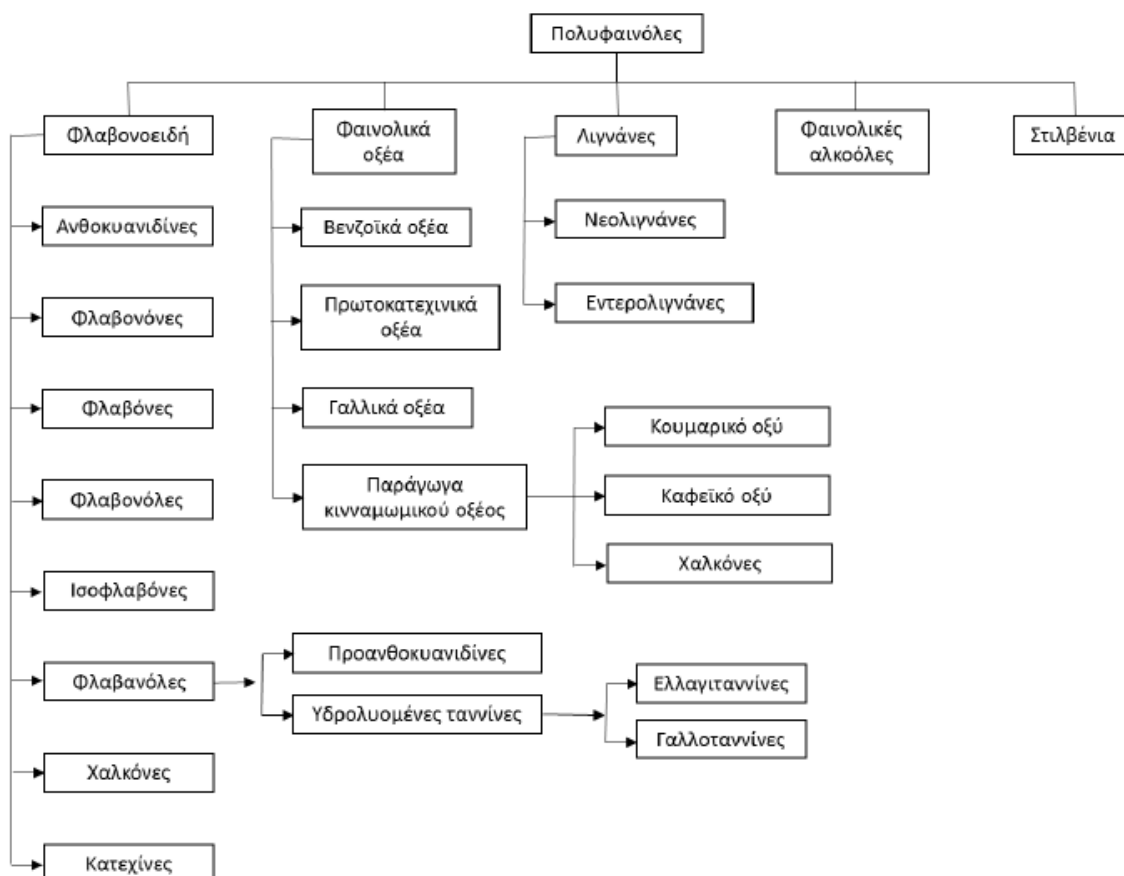
πέντε διαφορετικών βιοσυνθετικών οδών:

- της Γλυκόλυσης
- της Φωσφορικής Πεντόζης
- του Σικιμικού οξέος
- του Οξικού- Μαλονικού οξέος (ή οδού των πολυακετιδίων)
- του Οξικού- Μεβαλονικού οξέος

Οι τρεις τελευταίες βιοσυνθετικές οδοί μπορούν να ενσωματωθούν στο γενικότερο πλαίσιο του αρωματικού μεταβολισμού, ενώ οι οδοί του σικιμικού και του οξικού-μαλονικού οξέος θεωρούνται ως οι πλέον σημαντικές για τη βιοσύνθεση των φυτικών φαινολικών μορίων (Dey *et al.*, 1997).

B.3 Κατάταξη φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις διακρίνονται σε δυο ομάδες: Στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες και στις φλαβονοειδείς φαινόλες (Εικόνα 18).

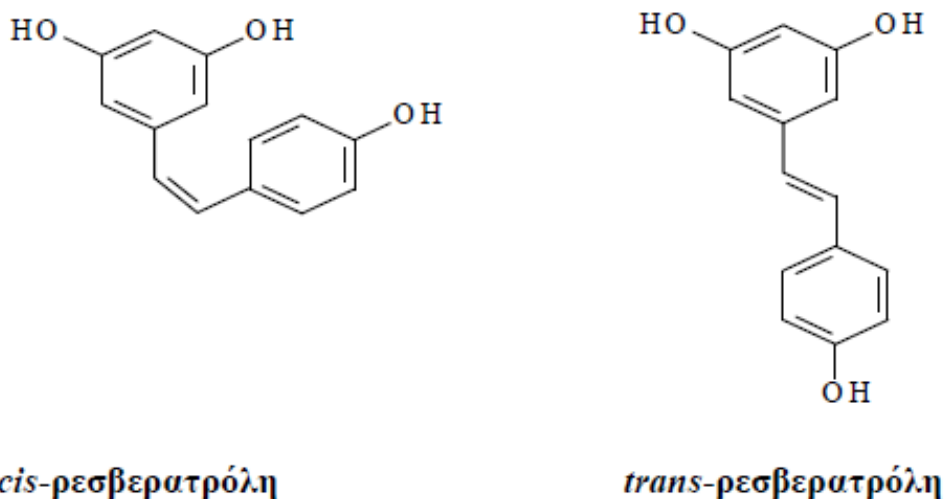


Εικόνα 18: Κατηγοριοποίηση των πολυφαινολών στα σημαντικότερα παράγωγα τους.

B.3.1 Μη φλαβονοειδείς φαινόλες

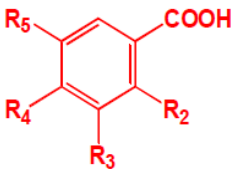
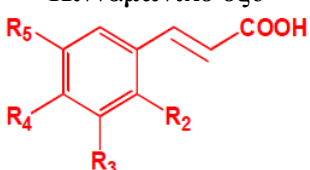
Μη φλαβονοειδείς φαινόλες είναι μονομοριακά φαινολικά παράγωγα. Απαντούν στους φυτικούς ιστούς και στα διάφορα φυτικά προϊόντα. Η σάρκα και οι φλοιοί των σταφυλιών περιέχουν παράγωγα του βενζοϊκού και κινναμωνικού οξέος υπό μορφή εστέρων ή ετεροζιτών αλλά και σε ελεύθερη μορφή λόγω υδρολύσεως. Τέτοια παράγωγα είναι τα σαλυκυλικό οξύ, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, πρότοκατεχικό οξύ, βανιλικό οξύ, συριγγικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, φερουλικό οξύ και *trans*-ρεσβερατρόλη (Πίνακας 7). Βρίσκονται στα σταφύλια και σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Έχουν αντιβακτηριδιακή δράση γι' αυτό δρουν σαν αντισηπτικά και συντηρητικά, επίσης έχουν αντιοξειδωτική δράση (κυρίως αυτά που έχουν δυο υδροξύλια (-OH) σε όρθο-θέση και οξειδώνονται σε ουσίες που έχουν δομή κινόνης χρώματος καστανόμαυρου) δράση (Κουράκου και Δραγώνα Σ., 1998).

Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται επίσης και τα στιλβένια. Το σπουδαιότερο από τα στιλβένια που απαντούν στο σταφύλι είναι η ρεσβερατρόλη καθώς και το παράγωγο της με τη γλυκόζη. Η ρεσβερατρόλη απαντά σε *cis*- και *trans*- μορφή (Εικόνα 19). Στα είδη των *Vitis Vinifera* και *Vitis Labrusca*, η ρεσβερατρόλη βρίσκεται αποκλειστικά στους φλοιούς απ' όπου εκχυλίζεται στους οίνους κατά την ερυθρά οινοποίηση ενώ δεν απαντάται στα γίγαρτα (Chung I.L. *et al.*, 2003).



Εικόνα 19: Δομή (*cis*-) και (*trans*-) ρεσβερατρόλης.

Πίνακας 7: Κύρια φαινολικά οξέα.

Φαινολικά οξέα, παράγωγα του βενζοϊκού οξέος				
 Βενζοϊκό οξύ	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
π-υδροξυβενζοϊκό	H	H	OH	H
Πρωτοκατεχικό οξύ	H	OH	OH	H
Βανιλλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
Γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH
Συριγγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Σαλικυλικό οξύ	OH	H	H	H
Φαινολικά οξέα, παράγωγα του κινναμωνικού οξέος				
 Κινναμωνικό οξύ	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
π-κουμαρικό οξύ	H	H	OH	H
Καφεϊκό οξύ	H	OH	OH	H
Φερουλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
Σιναπικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

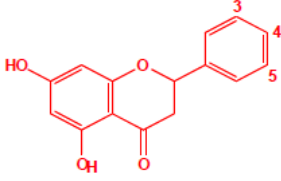
B.3.2 Φλαβονοειδείς φαινόλες

Οι φλαβονοειδείς φαινόλες είναι ενώσεις με βασικό τύπο C₆-C₃-C₆. Η βασική δομή των ενώσεων αυτών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται με μια αλειφατική αλυσίδα τριών άνθρακα, το οποίο έχει κανονικά συμπυκνωθεί για να σχηματίσει ένα πυράνιο ή, λιγότερο συχνά, ένα δακτύλιο φουρανίου. Διακρίνονται σε φλαβανόνες, φλαβονόλες, κατεχίνες – προκυανιδίνες, τανίνες και ανθοκυάνες. Περίπου το 90 % των φλαβονοειδών στα φυτά εμφανίζεται υπό μορφή γλυκοζιτών, όπου μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες του φλαβονοειδούς σχηματίζουν ημιακεταλικούς δεσμούς. Η γλυκοζυλίωση καθιστά τα φλαβονοειδή λιγότερο δραστικά και περισσότερο υδατοδιαλυτά. Το σάκχαρο που συναντάται πιο συχνά είναι η γλυκόζη, αλλά και η γαλακτόζη, ραμνόζη, ξυλόζη και αραβινόζη επίσης απαντώνται σε διάφορα φυτά, ενώ η φρουκτόζη, μαννόζη, και γλυκουρονικό οξύ πιο σπάνια (Κοτσεριδης, 2006).

B.3.2.1 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβανόνης. Απαντούν στη φύση ελεύθερα ή υπό μορφή ετεροζιτών όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8 (Κοτσεριδης, Γ. 2006).

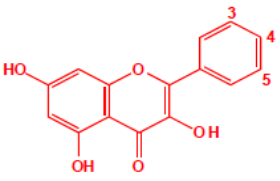
Πίνακας 8: Κύριες φλαβανόνες.

Φλαβανόνες του σταφυλιού		
Φλαβανόνες	3'	4'
		
Ναριγγενίνη	-	OH
Εσπεριτίνη	OH	OCH ₃

B.3.2.2 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβονόλης. Απαντούν στη φύση ελεύθερα ή υπό μορφή ετεροζιτών. Είναι οι πλέον διαδεδομένες στη φύση φλαβανοειδείς φαινόλες (καμπφερόλη, κερκετίνη, μυρικετίνη) (Πίνακας 9). Έχουν κίτρινο χρώμα και τις συναντάμε στους φλοιούς των λευκών και των ερυθρών σταφυλιών. Οι ερυθροί οίνοι που ζυμώνονται με τους φλοιούς περιέχουν μερικές δεκάδες (mg/ L) ενώ οι λευκοί περιέχουν μόνο ίχνη.

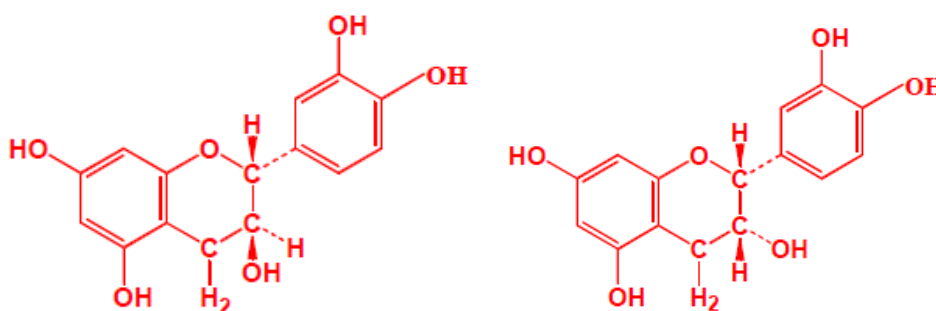
Πίνακας 9: Κύριες φλαβονόλες.

Φλαβονόλες του σταφυλιού			
Φλαβονόλες	3'	4'	5'
			
Καμπφερόλη	-	OH	-
Κερκετίνη	OH	OH	-
Μυρικετίνη	OH	OH	OH
Ισοραμνετόλη	OCH ₃	OH	-

Οι κατεχίνες είναι υδροξυλιωμένα παράγωγα της φλαβανόλη-3, εκ των οποίων η σπουδαιότερη είναι η κατεχίνη, το όνομα της οποίας επεκτάθηκε σε όλη την οικογένεια αυτών των φλαβονοειδών φαινολών. Επειδή η κατεχίνη έχει δυο ασύμμετρα άτομα C,

δίνει ως εκ τούτου τέσσερα ισομερή: την (+) κατεχίνη, (-) κατεχίνη, (+) επικατεχίνη και (-) επικατεχίνη (Εικόνα 20).

Η κατεχίνη είναι ουσία πολύ ευοξειδωτή, λόγω του ότι υπάρχουν δυο υδροξυλίον (-OH) σε ο-θέση στον πλευρικό δακτύλιο. Όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και δίδει τα γνωστά φλοιοβαφένια. Το χρώμα των διαλυμάτων αυτών είναι καταρχάς κίτρινο και ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού μπορεί να φτάσει μέχρι καστανόμαυρο γι' αυτό η παρουσία τέτοιων ουσιών στους οίνους είναι ανεπιθύμητες.



Εικόνα 20: Δομή (+) κατεχίνης (δεξιά), (-) επικατεχίνης (αριστερά).

Οι προκυανιδίνες είναι συμπυκνωμένα παράγωγα των κατεχινών και σχηματίζονται με αφυδρογονώσεις. Στα σταφύλια υπάρχουν μέχρι και τετραμερείς προκυανιδίνες, συνήθως όμως διμερείς και τριμερείς (Manach *et al.*, 2004).

Το μόριό τους αποτελείται συνήθως από (12- 16) φαινολικές ομάδες και πέντε με επτά (5- 7) αρωματικούς δακτυλίους ανά 1000 μονάδες μοριακού βάρους (MB). Αυτό, σε συνδυασμό με το μεγάλο MB, είναι που τις διαφοροποιεί από τα μονομερή φλαβονοειδή και τα χαμηλού MB φαινολικά οξέα στη δομή και τις ιδιότητές τους. Πρόκειται για πολυμερείς 3-φλαβανόλες, οι οποίες ενώνονται με δεσμούς C-C, ή περιστασιακά C-O-C. Οι 3-φλαβανόλες έχουν ως βασική δομή ένα C₆-C₃-C₆ σκελετό. Απ' όλα τα μέρη του σταφυλιού, τα γίγαρτα είναι αυτά που περιέχουν τις περισσότερες κατεχίνες και προκυανιδίνες (Κουράκου και Δραγώνα Σ., 1998). Απουσία οξυγόνου και σε όξινο περιβάλλον, οι προκυανιδίνες μπορούν να σχηματίσουν καρβοκατιόν, το οποίο εύκολα μπορεί να αντιδράσει με τα αρνητικά φορτία των έξι και του δακτυλίου A μιας άλλης προκυανιδίνης και να αυξήσει το βαθμό του πολυμερισμού της σχηματίζοντας πολυμερισμένες προκυανιδίνες. Αντίθετα, σε έντονο οξειδωτικό περιβάλλον, παράλληλα με τον πολυμερισμό των προκυανιδίων, σχηματίζονται και ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα, λόγω οξειδώσεων, την δημιουργία μοριακών συσσωμάτων μεγάλου όγκου, τα οποία καθιζάνουν.

B.3.2.3 Τανίνες

Οι τανίνες (προκυανιδίνες, συμπυκνωμένες και πολυμερισμένες τανίνες), απαντούν στους φλοιούς, τα γίγαρτα και τους βόστρυχους της σταφυλής και από χημική άποψη είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα. Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από τις πολυφαινολικές οξειδάσες παράγει κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται και σχηματίζουν τανίνες και θεωρούνται προστατευτικές ουσίες απέναντι στην προσβολή των φυτών από μικροοργανισμούς. Έχουν την ιδιότητα, να ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως οι πολυσακχαρίτες. Από την ιδιότητα αυτή απορρέει η στυφή τους γεύση, γιατί καθώς ενώνονται με τις πρωτεΐνες του εκκρίματος των σιαλογόνων αδένων, αυτό χάνει την ικανότητα να υγραίνει το στόμα. Επιπλέον, αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων του εκκρίματος λόγω δέσμευσης της πρωτεϊνικής ομάδος του, με συνέπεια να φράσσουν οι βλεννογόνοι και να παρεμποδίζεται η εκροή του σάλιου. Έτσι δημιουργείται μια αίσθηση ξηρότητας και τραχύτητας στη γλώσσα και σε όλη τη στοματική κοιλότητα, ένα είδος δέψης, όπως κατά την κατεργασία των δερμάτων στη βυρσοδεψία.

Ανάλογα με τη φύση της βασικής ομάδας οι τανίνες διακρίνονται σε υδρολυμένες και σε συμπυκνωμένες. Οι υδρολυμένες τανίνες αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζης, ή ένα μόριο πολυσακχαρίτη, του οποίου πολλά υδροξύλια είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα. Οι συμπυκνωμένες τανίνες σχηματίζονται από αντιδράσεις πολυμερισμού ενός στοιχειώδους μορίου πολύ δραστικού, της προκυανιδίνης. Η θέρμανση των τανινών σε όξινο περιβάλλον οδηγεί στο σχηματισμό κυρίως ερυθρής κυανιδίνης, αποδίδοντας τους τον όρο προκυανιδίνες (Κοτσερίδης, 2005). Όταν το μοριακό βάρος της σχηματιζόμενης τανίνης είναι μεταξύ 1.000 και 2.000, το χρώμα της είναι κίτρινο και η γεύση στυφή και ως εκ τούτου ελάχιστα συμβάλλει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Όταν το προϊόν πολυμερισμού (τανίνη) έχει μοριακό βάρος 2.000 έως 3.000, που αντιστοιχεί στο μέγιστο τανικό χαρακτήρα, το χρώμα του είναι πορτοκαλί. Τέτοια μόρια τανινών όταν ενωθούν με πεπτίδια ή πολυσακχαρίτες ο τανικός χαρακτήρας μειώνεται ή εξαφανίζεται και επομένως έχουμε γευστικό μαλάκωμα των οίνων και βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων του οίνου (Κουράκου και Δραγώνα Σ., 1998).

B.3.2.4 Ανθοκυάνες

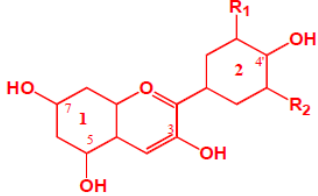
Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές των σταφυλιών και βρίσκονται στο φλοιό των ραγών και σε σπάνιες περιπτώσεις στη σάρκα (Πίνακας 10). Είναι επίσης παρούσες σε μεγάλες ποσότητες στα φύλλα, κυρίως κατά το τέλος της περιόδου ανάπτυξης (Κοτσερίδης Γ., 2006).

Οι ανθοκυάνες απαντούν στη φύση με τη μορφή ετεροζιτών οι οποίοι υδρολύονται εύκολα προς ένα άγλυκο μόριο και ένα ή περισσότερα μόρια σακχάρων. Τα άγλυκα τμήματα λέγονται ανθοκυανιδίνες κι έχουν γενικό τύπο $C_3-C_6-C_3$.

Το άγλυκο μέρος έχει τη βασική δομή του φλαβυλίου. Το μόριο τους αποτελείται από δύο βενζολικούς δακτυλίους που περιβάλλουν ένα δακτύλιο πυρυλίου. Στα σταφύλια και στους οίνους απαντούν, ανάλογα με την υποκατάσταση του πλευρικού δακτυλίου, πέντε είδη ανθοκυανών: η κυανιδίνη, η παιονιδίνη, η δελφινιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη (Κοτσερίδης, 2006).

Οι παιωνιδίνη και μαλβιδίνη είναι οι πιο σταθερές μορφές γι' αυτό όλες με την πάροδο του χρόνου μετατρέπονται σε αυτές και κυρίως στη μαλβιδίνη. Η σταθερότητα οφείλεται στο ότι δεν έχουν δυο υδροξύλια ($-OH$) σε ο-θέση στον Β βενζολικό δακτύλιο. Υδατικό εκχύλισμα πελαργονιδίνης και κυανιδίνης έχει χρώμα πορτοκαλοκόκκινο, παιονιδίνης κόκκινο φραμπουάζ, και των άλλων δυο κοκκινογαλαζωπό. Οι ανθοκυάνες σχεδόν πάντα απαντούνται με άλλες φλαβονοειδείς ενώσεις ασθενούς κίτρινου χρώματος, κατεχίνες, προκυανιδίνες, ελάχιστα όμως συμβάλλουν στο χρώμα των εκχυλισμάτων των ανθοκυανών.

Πίνακας 10: Κύριες ανθοκυάνες.

Ανθοκυάνες του σταφυλιού		
Φλαβύλιο	R_1	R_2
		
Κυανιδίνη	OH	H
Δελφινιδίνη	OH	OH
Παιονιδίνη	OCH ₃	H
Πετουνιδίνη	OCH ₃	OH
Μαλβιδίνη	OCH ₃	OCH ₃

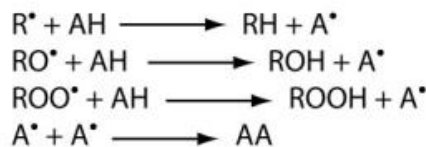
Γ.1 Βιολογική Δράση Δευτερογενών Μεταβολιτών

Η κατανόηση της πολυπλοκότητας και εξειδίκευσης των δευτερογενών μεταβολικών οδών στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς πολύ γρήγορα οδήγησε στην αντίληψη του πλούτου των αξιοποιήσιμων χημικών ουσιών που μπορεί να προέλθουν από τα δύο αυτά βασίλεια, τα οποία ο άνθρωπος χρησιμοποιεί εμπειρικά εδώ και εκατοντάδες χρόνια (Ameenah, 2006).

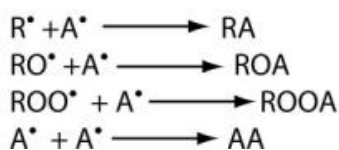
Γ.2 Αντιοξειδωτική δράση

Στις μέρες μας η έρευνα σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών έχει επικεντρωθεί, τόσο σε βιολογικό επίπεδο, όσο στον τομέα των τροφίμων. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες που έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν ή να αποτρέπουν την οξείδωση άλλων ουσιών. Ως οξείδωση ορίζεται η χημική αντίδραση κατά την οποία παρατηρείται μεταφορά ηλεκτρονίων από μια ουσία σε ένα οξειδωτικό σώμα. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να καταστρέψουν τα κύτταρα. Τα αντιοξειδωτικά σταματούν αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (Εικόνα 21) απομακρύνοντας τις ενδιάμεσες ελεύθερες ρίζες, και αναστέλλοντας άλλες αντιδράσεις οξείδωσης με το να οξειδώνονται αυτά (Karvela E. *et al.*, 2011). Τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές ομάδες, πρωτογενή (αυτά που σταματούν την αλυσιδωτή αντίδραση της οξείδωσης) και δευτερογενή (αυτά που την προλαμβάνουν).

Donation of hydrogen to free radicals by antioxidants



Complex formation between free radical and antioxidant radical



Εικόνα 21: Αλυσιδωτή αντίδραση αντιοξειδωτικών.

Γ.2.1 Δύναμη των αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά συστατικά μπορούν να ενεργούν ανεξάρτητα ή περισσότερο αποτελεσματικά σε συνδυασμό όταν υπάρχει δηλαδή συνέργεια αυτών (ο συνδυασμός τους έχει ισχυρότερη δράση) με μία ποικιλία μηχανισμών (Dai and Mumper, 2010). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες αποδίδονται στα φλαβονοειδή λόγω της παρουσίας των φαινολικών υδροξυλομάδων που συνδέονται με δομές δακτυλίου και μπορούν να δράσουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, δεσμευτές οξυγόνου ακόμη και να σχηματίσουν χηλικά σύμπλοκα. Μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν αντιοξειδωτικά ενζύμων και να αναστείλουν τις οξειδάσες. Η ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες χημικά έγκειται στο γεγονός ότι τα δυναμικά οξειδοαναγωγής των φλαβονοειδών ριζών που σχηματίζονται είναι αρκετά χαμηλά σε σχέση με αυτά των υπεροξειδικών και αλκοξυλοριζών.

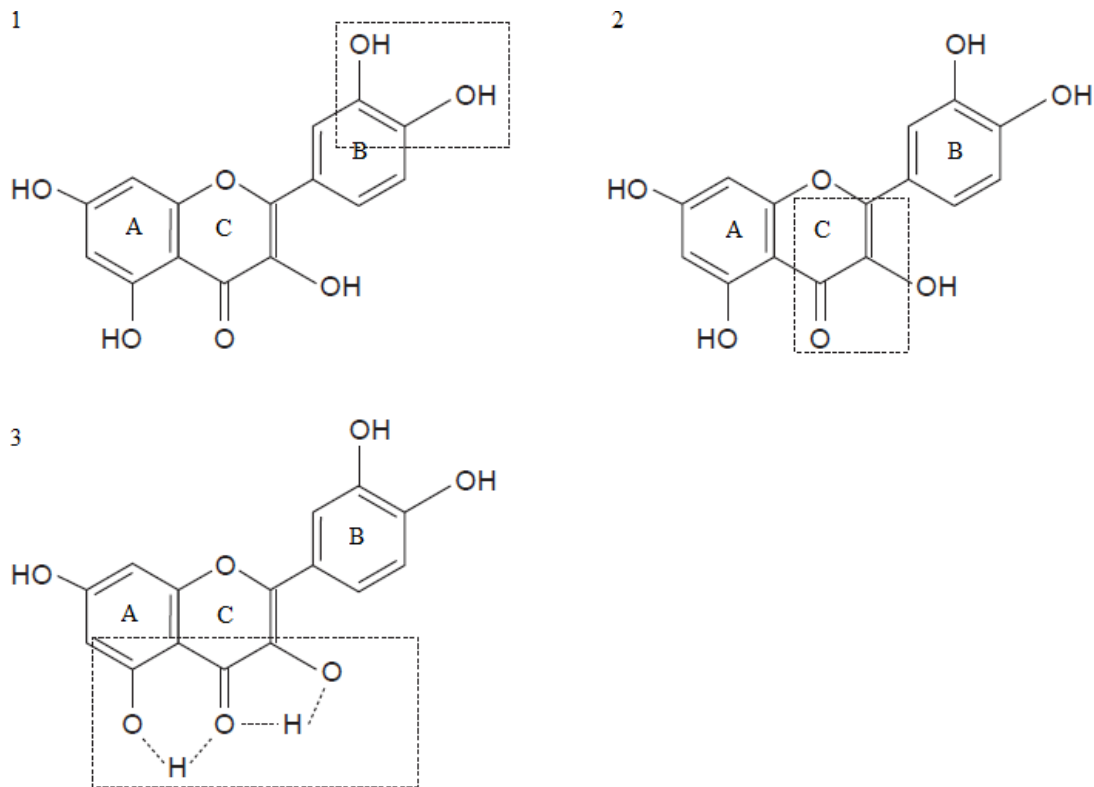
Αυτό σημαίνει ότι τα φλαβονοειδή απενεργοποιούν αυτές τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέπουν τις καταστροφικές συνέπειες των περαιτέρω αντιδράσεων (Rice-Evans *et al.*, 1996; Procházková *et al.*, 2011).

Τα φαινολικά οξέα δρουν ως χηλικές ενώσεις με σοβαρό αντίκτυπο στις υδρόξυ- και υπερόξυ- ρίζες (Terpinc *et al.*, 2011) ενώ τα καροτενοειδή δρουν ως δεσμευτές οξυγόνου και μπορούν με αποσύνθεσή τους να σχηματίσουν ενώσεις που λειτουργούν ως τερματιστές των ελεύθερων ριζών καθώς ενώνονται με αυτές (Paiva and Russell, 1999).

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών συστατικών εξαρτάται από το χημικό τύπο και από τον τρόπο με τον οποίο είναι κατανεμημένες οι λειτουργικές ομάδες (-OH) στο μόριο. Οι απλές φαινολικές ενώσεις έχουν μικρότερη δράση σε σχέση με τις πολυμερείς φαινόλες σε μεθόδους που μπλοκάρουν την παρουσία ριζών (Moure *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2001).

Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που απαιτούνται για την αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών συνοψίζονται παρακάτω όπως φαίνονται και στην Εικόνα 22.

- Όρθο-δι-υδρόξυ δομή του δακτυλίου B.
- Διπλός δεσμός στις θέσεις 2, 3 σε συζυγία με την 4-κετο-ομάδα.
- Δύο υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 5.



Εικόνα 22: Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που απαιτούνται για την αποτελεσματική δέσμευση ελεύθερων ριζών .

Η ακορεστότητα του ετεροκυκλικού δακτυλίου, ευθύνεται για τον απεντοπισμό των ηλεκτρονίων στον δακτύλιο Β ενώ η ταυτόχρονη παρουσία του ο-διφαινολικού τμήματος στον δακτύλιο Β έχει τον ρόλο του δότη υδρογόνου (H) για τη σταθεροποίηση των ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, ο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ των (-OH) στις θέσεις τρία (3) και πέντε (5) με τη κετονομάδα, αυξάνει την ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών (Rice-Evans *et al.*, 1996). Όσον αφορά τα φλαβονοειδή, η αντιοξειδωτική ικανότητα μειώνεται με την παρουσία γλυκοζιτών στο μόριο σε σχέση με το άγλυκο τμήμα (Rice-Evans *et al.*, 1996; Moure *et al.*, 2001).

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών οξέων εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των υδροξυλικών ομάδων σε σχέση με την δραστική καρβοξυλομάδα (Rice-Evans *et al.*, 1996). Μόνο-υδρόξυ υποκαταστημένα βενζοϊκά οξέα με την υδροξυλική ομάδα (-OH) σε όρθο- ή παρά- θέση σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα (-COOH) δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση ενώ συμβαίνει το αντίθετο όταν ο υποκατάστατης είναι σε μέτα- θέση. Παρατηρείται επίσης αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης με την αύξηση του βαθμού υδροξυλίωσης (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Δ.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – HPLC) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας (Εικόνα 23). Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Taylor *et al.*, 2011).



Εικόνα 23: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Δ.1.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με Χρωματογραφία HPLC

Δ.1.1.1 Ποιοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός προσδιορισμός έχει ως σκοπό να διερευνήσει και πιστοποιήσει την ταυτότητα μίας ουσίας που διαχωρίζεται με HPLC από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος.

Όταν είναι γνωστή η ταυτότητα του συστατικού του δείγματος που θέλουμε να διακρίνουμε, τότε η κορυφή του συστατικού που μας ενδιαφέρει πρέπει να ταυτοποιηθεί. Στην περίπτωση αυτή η ταυτοποίηση γίνεται με βάση τον συντελεστή

κατακράτησης που λαμβάνεται κατά την ανάλυση δείγματος και προτύπου της καθαρής ουσίας. Είναι απαραίτητο, προκειμένου η αντιστοίχιση να είναι έγκυρη, η ανάλυση δείγματος και προτύπου να διεξαχθεί υπό τις ακριβώς ίδιες πειραματικές συνθήκες. Εάν το χρωματογραφικό σύστημα έχει έναν επιλεκτικό ανιχνευτή, όπως ανιχνευτή συστοιχίας διόδων ή ανιχνευτή φθορισμού, το λαμβανόμενο φάσμα της κορυφής ενδιαφέροντος ή το μετρούμενο σήμα επιβεβαιώνουν την ταυτοποίηση, σε συνδυασμό με τον συντελεστή κατακράτησης. Τέλος, μια άλλη μεθοδολογία που εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση κορυφής, όταν είναι γνωστή η ταυτότητα του συστατικού που μας ενδιαφέρει, είναι ο εμβολιασμός του δείγματος με το γνωστό πρότυπο. Σ' αυτή τη μεθοδολογία η απουσία εμφάνισης νέας κορυφής, και παράλληλα η ενίσχυση της υπάρχουσας κορυφής του συστατικού με διατήρηση της συμμετρίας της, επιβεβαιώνει την ταυτότητα της κορυφής (Καρκαλούσος *et al.*, 2015).

Στην περίπτωση που δεν είναι γνωστή η ταυτότητα των συστατικών του δείγματος, η ταυτοποίηση μπορεί να γίνει σε συνδυασμό με ανιχνευτή NMR ή MS. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας θα πρέπει να γίνει με τουλάχιστον δύο ή συνήθως περισσότερες χημικές τεχνικές (Καρκαλούσος *et al.*, 2015).

Δ.1.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

Οι μετρήσεις σε μια οποιαδήποτε χρωματογραφική τεχνική ανάλυσης είναι σχετικές και απαιτούν τη βαθμονόμηση των χρωματογράφων με διαλύματα προτύπων παραπλήσιας συστάσεως με τα δείγματα. Είναι προφανές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, τόσο μεγαλύτερο θα είναι το εμβαδό της προκύπτουσας κορυφής (εφόσον περισσότερα μόρια της ουσίας θα ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή). Μάλιστα η σχέση αυτή είναι ανάλογη. Η ποσοτικοποίηση, λοιπόν, σε μια χρωματογραφική ανάλυση γίνεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας της κορυφής, το οποίο είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της ουσίας, μετά την κατασκευή κατάλληλης καμπύλης αναφοράς (Καρκαλούσος *et al.*, 2015).

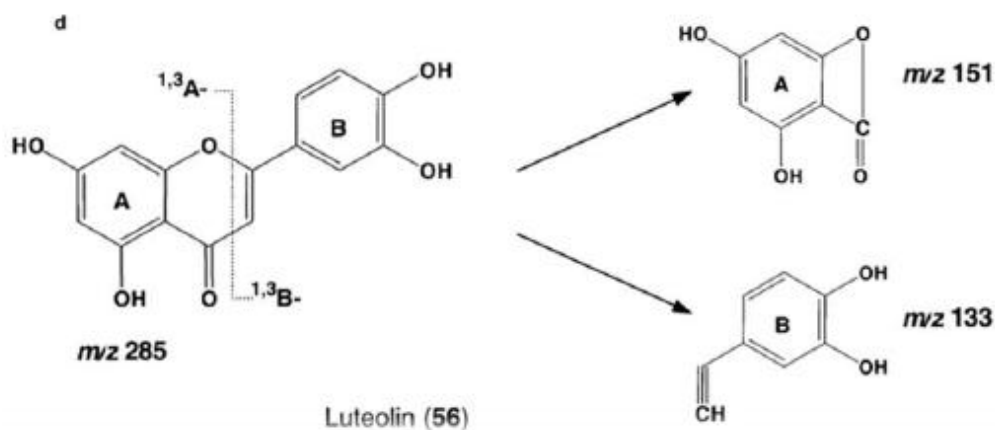
Δ.2 Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών

Η Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μαζών (Liquid Chromatography – Mass spectrometry – LC-MS) έχει σημαντική συνεισφορά στην ταυτοποίηση των φλαβονοειδών. Ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την ανάλυση, γεγονός πολύ κρίσιμο για τη μελέτη

ουσιών, όπως τα φαινολικά όπου η απομόνωση τους μπορεί να είναι αρκετά δύσκολη. Ωστόσο, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της φασματομετρίας μάζας είναι η συνδυασμένη τεχνική MS/MS με την οποία, εκτός από τα θραύσματα του μοριακού ιόντος, παραλαμβάνεται και δεύτερη σειρά θραυσμάτων που προκαλείται με την επιπλέον διάσπαση των αρχικών. Έτσι κάθε φαινολική ένωση παράγει ένα φάσμα μαζών το οποίο είναι μοναδικό και μπορεί να λειτουργήσει ως “δακτυλικό αποτύπωμα” για την ταυτοποίηση της δομής του.

Ο ιοντισμός των φαινολικών ομάδων στα συστήματα LC-MS γίνεται με βομβαρδισμό με ρεύμα e⁻ από θερμό νήμα (Electron Ionization/Impact, EI), χημικά (Atmospherical Pressure Chemical Ionization, APCI), με χρήση ηλεκτρικού πεδίου (Electrospray Ionization, ESI) και με βομβαρδισμό ατόμων αδρανών αερίων (Fast Atom Bombardment, FAB). Μία τεχνική μεγάλης σημασίας για την ανάλυση τέτοιων ομάδων είναι η HPLC-ESI-MS/MS, ενώ αξιόλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει τόσο με τη μέθοδο της πρωτονίωσης [M+H]⁺ (positive chemical ionization, PCI), όσο και με την αποπρωτονίωση [M-H]⁻ (negative chemical ionization, NCI) (Τσιμογιάννης *et al.*, 2008).

Η αρχή ταυτοποίησης κυρίως των φλαβονοειδών με MS αναφέρεται στη σχάση του C-δακτυλίου, παράγοντας τα λεγόμενα διαγνωστικά θραύσματα. Η σχάση οφείλεται σε ρετρό Diels-Alder διασπάσεις των δεσμών του C-δακτυλίου, οπότε στα φάσματα MS καταγράφονται τα χαρακτηριστικά θραύσματα του αρχικού μορίου, τα οποία περιέχουν ανέπαφους αντιστοιχώς τους δακτυλίους A και B (Εικόνα 24). Τα μέλη κάθε υποκατηγορίας έχουν γενικά την τάση να δίνουν τις ίδιες ρετρό Diels-Alder διασπάσεις και τύπους θραυσμάτων, όμως παρατηρούνται συχνά διαφοροποιήσεις, ανάλογα με την υποκατάσταση που φέρουν (Τσιμογιάννης *et al.*, 2008).



Εικόνα 24: Μοτίβο κατάτμησης λουτεολίνης.

Δ.3 Φασματομετρία υπεριώδους-ορατού

Η φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) είναι μία συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική στην ανάλυση φυτοχημικών ενώσεων (Thermo Spectronic, 2013). Περιλαμβάνει την μέτρηση της ποσότητας της υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας που απορροφάται από μια ουσία σε ένα διάλυμα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο UV-Vis (Pretsch *et al.*, 2009).

Ως εκ τούτου, όταν η δέσμη φωτός διέρχεται μέσω μιας διάφανης κυψελίδας, η οποία περιέχει ένα διάλυμα μιας απορροφητικής ουσίας, μπορεί να προκύψει μείωση της έντασης του φωτός (Εικόνα 25).

Από μαθηματική άποψη, ο νόμος των Beer - Lambert εκφράζεται ως

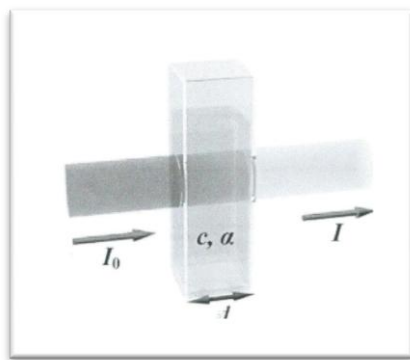
$$A = a \times b \times c$$

Όπου,

- A = η απορρόφηση ή η οπτική πυκνότητα
- a = η απορροφητικότητα ή ο συντελεστής απόσβεσης
- b = το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας μέσω του δείγματος (cm)
- c = συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο διάλυμα.

Τόσο το b όσο και το a είναι σταθερές, οπότε η απορρόφηση A είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση c .

Η ποσοτικοποίηση φυτοχημικών ουσιών σε ολικά φυτικά εκχυλίσματα δεν είναι τόσο εύκολη όσο οι μετρήσεις γνωστών διαλυμάτων μιας συγκεκριμένης ουσίας που απορροφά σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αντίθετα λόγω της φύσης του εκχυλίσματος η επιλογή ενός μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης (λ_{\max}) δεν είναι δυνατή, ως εκ τούτου, έχουν προταθεί πολλές χρωματομετρικές αντιδράσεις κατά τις οποίες η συγκέντρωση ενός χημικού στοιχείου ή μιας χημικής ένωσης σε ένα διάλυμα καθορίζεται με τη βοήθεια ενός χρωμοφόρου αντιδραστηρίου (Richardson *et al.*, 1990). Τέτοιες μέθοδοι αποτελούν τις πλέον κατάλληλες για συνήθεις εργαστηριακές εφαρμογές, δεδομένου ότι είναι εύκολες στην εκτέλεση, ταχείες και έχουν σχετικά χαμηλό κόστος. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται τέτοιες χρωματομετρικές δοκιμασίες, τα συστατικά του δείγματος προς μελέτη υπολογίζονται από την μετρούμενη απορρόφηση, χρησιμοποιώντας φάσματα ενώσεων ταυτοποιημένης απορρόφησης, καμπύλες βαθμονόμησης, ή και ακόμα και μονά ή διπλά σημεία ταυτοποίησης. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται ανάλογα με τον τύπο της ουσίας ή των ουσιών προς προσδιορισμό και το σύστημα στο οποίο βρίσκονται (Schmid *et al.*, 2001).



Εικόνα 25: Ακτινοβολία διερχόμενη μέσα από κυψελίδα η οποία περιέχει κάποιο διάλυμα χημικής ουσίας.

Δ.4 Γενικά στοιχεία φασματοσκοπίας υπερέυθρου IR

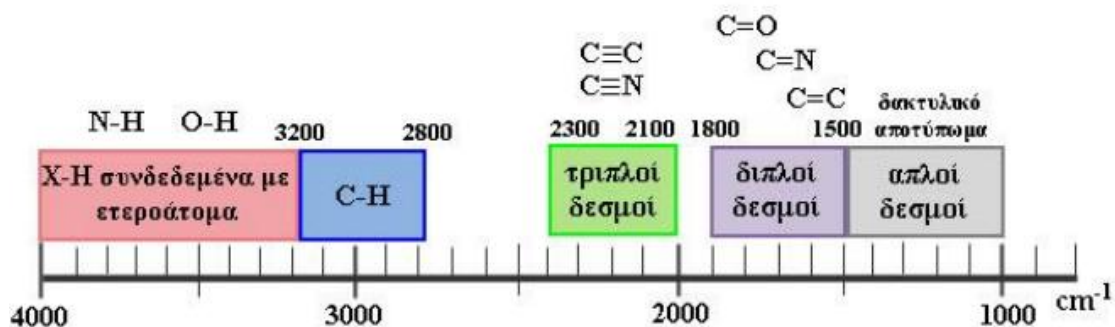
Δ.4.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας υπερέυθρου

Η φασματοσκοπία υπερέυθρου (Infra Red spectroscopy - IR) είναι μια τεχνική που βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από το μέσο που εξετάζεται. Όταν το εξεταζόμενο μέσο εκτίθεται σε υπέρυθη ακτινοβολία, μέρος της ενέργειας IR μπορεί να απορροφηθεί και το υπόλοιπο θα μεταδοθεί. Εάν τοποθετήσουμε έναν ανιχνευτή, που είναι ευαίσθητος στην υπέρυθη ακτινοβολία, στη διαδρομή της εκπεμπόμενης ακτίνας μπορούμε να ανιχνεύσουμε την ενέργεια που δεν απορροφάται και συνεπώς να προσδιορίσουμε το ποσό της ενέργειας που απορροφάται (Κουβουτσάκης, 2013). Οι τρεις υπέρυθρες περιοχές ενδιαφέροντος στην IR φασματοσκοπία:

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm) και διακρίνεται σε τρεις βασικές υποπεριοχές (Παππάς, 2000):

- Το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 0,8 μm έως 2,5 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς (14.000-4.000 cm^{-1}).
- Το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 2,5 μm έως 25 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς (4.000-400 cm^{-1}).
- Το άπω υπέρυθρο (FIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 25 μm έως 300 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς (400-10 cm^{-1}).

* Οι παραπάνω περιοχές είναι ενδεικτικές. Η ερμηνεία των φασμάτων IR γίνεται με τη χρήση πινάκων IR που υπάρχουν στην επιστημονική βιβλιογραφία, και οι οποίοι υποδεικνύουν τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις μίας μεγάλης ποικιλίας οργανικών ενώσεων.



Εικόνα 26: Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων.

Δ.5 Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier

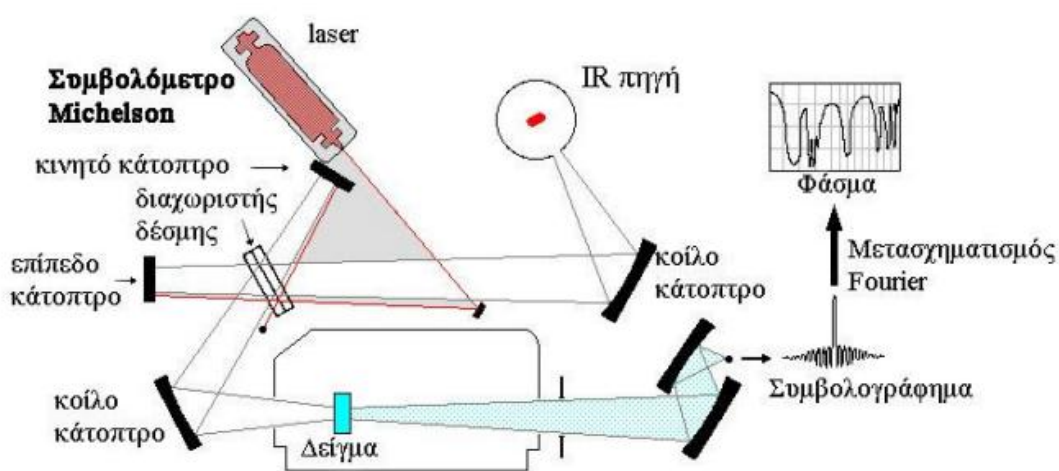
Την πραγματική επανάσταση στην υπέρυθρη φασματοσκοπία έφερε η ανάπτυξη των φασματοφωτόμετρων υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier, τα οποία και αντικατέστησαν τα κοινά φασματοφωτόμετρα διασποράς. Η χρήση των οργάνων αυτών αναπτύχθηκε βαθμιαία, και τις τελευταίες δεκαετίες έχει επεκταθεί σημαντικότητα σε πολύ μεγαλύτερο πλήθος εφαρμογών λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ταχύτητας που παρουσιάζουν. Οι πληροφορίες που παρέχουν οι δύο τύποι οργάνων είναι ίδιες, ωστόσο το βασικό πλεονέκτημα της FT-IR φασματοσκοπίας έγκειται στη χρήση συμβολόμετρου αντί μονοχρωμάτορα, το οποίο επιτρέπει να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα και όχι διαδοχικά, μόνο μία τη φορά, υπερνικώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις αδυναμίες και τους περιορισμούς των συμβατικών φασματοφωτόμετρων διασποράς. Το σχηματικό διάγραμμα ενός τυπικού φασματοφωτομέτρου FT-IR με συμβολόμετρο Michelson (Michelson interferometer) παρουσιάζεται στην Εικόνα 27, όπου διακρίνονται τα εξής τρία βασικά μέρη: η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο και ο ανιχνευτής υπέρυθρου. Η πηγή laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, τη μέτρηση των κυματαριθμών και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών.

Στην περίπτωση που εξετάζεται η άπω υπέρυθρη περιοχή (FIR), τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί λάμπα υδραργύρου υψηλής πίεσης, ενώ για κοντινό υπέρυθρο (NIR) φάσμα χρησιμοποιούνται συνήθως λάμπες βολφραμίου-αλογόνου.

Το συμβολόμετρο αποτελεί την καρδιά του FT-IR. Ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα συμβολόμετρα είναι το συμβολόμετρο Michelson το οποίο αποτελείται από δύο κάτοπτρα M_1 και M_2 , εκ των οποίων το ένα παραμένει σταθερό (fixed mirror), ενώ το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα είτε σταματά περιοδικά και

για μικρά χρονικά διαστήματα (moving mirror). Τα επίπεδα των δύο κάτοπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους, ενώ ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/ 50 (beam splitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθρη περιοχή, με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50 % αντίστοιχα. Η επιλογή του υλικού για τον διαχωριστή δέσμης γίνεται με βάση την περιοχή του φάσματος που εξετάζεται. Οι διαχωριστές δέσμης που χρησιμοποιούνται στη NIR και FIR περιοχή αποτελούνται συνήθως από υποστρώματα βρομιούχου καλίου ή ιωδιούχου καισίου επικαλυμμένων με υλικά όπως γερμάνιο ή οξείδιο του σιδήρου, ενώ η χρήση λεπτών οργανικών φιλμ (όπως πολυαιθυλενίου) συναντάται στο άπω υπέρυθρο φάσμα (Κουή *et al.*, 2015).

* Η υπέρυθρη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται στον διαχωριστή δέσμης όπου διαχωρίζεται σε δύο δέσμες, εκ των οποίων η μία προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο ενώ η άλλη στο κινητό και στη συνέχεια, αφού αντανακλαστούν, επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά τη συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον θάλαμο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρόλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές.



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση φωματοφωτόμερου FT-IR με συμβολόμετρο.

Δ.5.1 Τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Infra Red Fourier Transform spectroscopy, DRIFT)

Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια του υλικού ένα τμήμα της ανακλάται (ή διαχέεται), ένα τμήμα διαθλάται και ένα τμήμα περιθλάται. Ουσιαστικά η ανάκλαση είναι το φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η τεχνική DRIFTS.

Το DRIFT είναι ιδανικό για τραχείς, ανώμαλες επιφάνειες που τείνουν να ανακλάσουν το φως προς όλες τις κατευθύνσεις (Skoog *et al.*, 2002). Μια συσκευή DRIFTS

λειτουργεί κατευθύνοντας δέσμη ακτινοβολίας IR μέσα σε έναν υποδοχέα γεμάτο με ένα μίγμα του δείγματος και μίας μήτρας, η οποία δεν απορροφά ακτινοβολία IR (π.χ. KBr ή KCl σε αναλογία συνήθως 1:100). Όταν εξετάζονται μίγματα ως δείγματα, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην ομογενοποίησή τους.

Η IR ακτινοβολία αλληλεπιδρά με τα σωματίδια και στη συνέχεια ανακλάται από τις επιφάνειές τους, προκαλώντας διάχυση ή διασκόρπισμα του φωτός, καθώς κινείται μέσα σε όλο το δείγμα (Thermo scientific, 2013). Καθώς συμβαίνει αυτό η υπέρυθη ακτινοβολία αναπηδά από σωματίδιο σε σωματίδιο, αποθηκεύει την απορρόφηση του δείγματος που έπειτα οδηγείται σε κάτοπτρο CPC (καθρέπτης στην έξοδο). Αυτός συλλέγει τις πολλαπλές σκεδαζόμενες ακτίνες και τις οδηγεί στον ανιχνευτή του φασματοφωτομέτρου. Ο ανιχνευτής καταγράφει την υπέρυθη ακτινοβολία ως σήμα ιντερφερογραφήματος, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργήσει ένα φάσμα. Φάσμα υποβάθρου (background) συλλέγεται με τον υποδοχέα γεμάτο με KBr (Thermo scientific, 2013). Επομένως, η διάχυτη ανάκλαση προέρχεται από ανάκλαση της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε όλες τις κατευθύνσεις σε τραχιές επιφάνειες και συλλέγεται με τη χρήση ενός ελλειψοειδούς ή παραβολοειδούς κατόπτρου. Τα φάσματα απεικονίζονται σε μονάδες log αντίστροφης ανάκλασης ($\log_{1/R}$) έναντι κυματαριθμού ή ως συνάρτηση απορρόφησης- κυματαριθμού.

Κύρια πλεονεκτήματα της τεχνικής DRIFTS είναι ότι αποτελεί μία ταχεία μέθοδο και επιπλέον, η οπτική διαδρομή είναι μεγάλη και με τις διαδοχικές ανακλάσεις της απορροφητικά ανακλώμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας, οι πληροφορίες προέρχονται από μεγάλο τμήμα του δείγματος. Μειονεκτήματα θεωρούνται ότι οι κορυφές είναι σχετικά πλατειές και, επειδή στο δείγμα προσπίπτει μέρος της υπέρυθρης ακτινοβολίας, η ένταση των κορυφών είναι σχετικά μικρή. Γενικότερα, πλεονέκτημα των σύγχρονων τεχνικών ανάκλασης είναι ότι η οπτική διαδρομή είναι μεγάλη και με τις διαδοχικές ανακλάσεις της απορροφητικά ανακλώμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας, οι πληροφορίες προέρχονται από μεγάλο τμήμα του δείγματος. Επίσης, η διαδικασία λήψης του φάσματος είναι πολύ σύντομη (Παππάς, 2000).

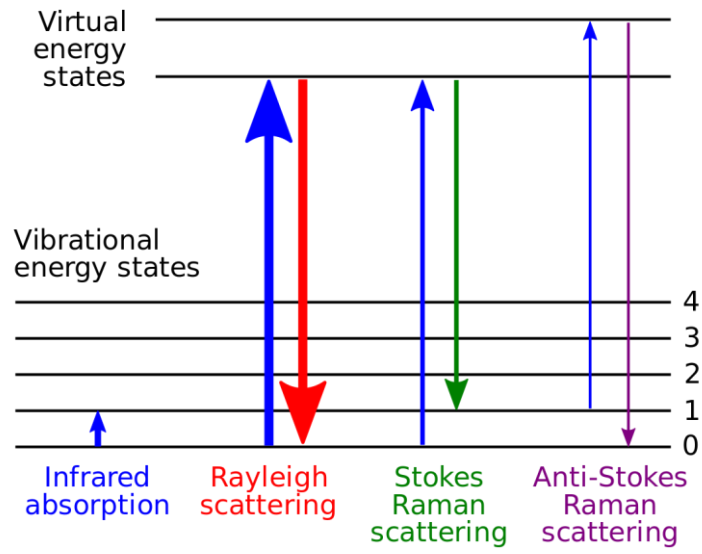
Δ.6 Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης της δέσμης του φωτός καθώς αυτό αλληλεπιδρά με την ύλη διεγείροντας τις δονήσεις χαρακτηριστικών ομάδων. Τα φάσματα Raman λαμβάνονται με ακτινοβολία του δείγματος με μια ισχυρή

πηγή λέιζερ ορατής ή εγγύς υπερύθρου μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης το φάσμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λαμβάνεται υπό κάποια γωνία (συνήθως 90°) με ένα κατάλληλο φασματοφωτόμετρο. Οι εντάσεις των γραμμών Raman αντιστοιχούν περίπου στο (0,001 %) της έντασης της πηγής. Κατά συνέπεια η ανίχνευση και η μέτρησή τους είναι κάπως πιο δύσκολες σε σχέση με τα φάσματα υπερύθρου.

Οι διαφορές μεταξύ ενός φάσματος Raman και ενός φάσματος IR δε μας εκπλήττουν εάν λάβουμε υπ' όψιν ότι, παρόλο που εξαρτώνται από τους ίδιους τρόπους δόνησης, προέρχονται από διαδικασίες με διαφορετικό μηχανισμό. Στην απορρόφηση IR απαιτεί οι τρόποι δόνησης ενός μορίου να προκαλούν μεταβολή στη διπολική ροπή ή στην κατανομή φορτίου. Μόνο τότε μπορεί η ακτινοβολία της ίδιας συχνότητας να αλληλεπιδράσει με το μόριο και να το προωθήσει σε μια διεγερμένη δονητική κατάσταση. Αντίθετα, η σκέδαση περιλαμβάνει μια στιγμιαία παραμόρφωση της κατανομής ηλεκτρονίων γύρω από ένα δεσμό του μορίου, που ακολουθείται από επανεκπομπή της ακτινοβολίας καθώς ο δεσμός επιστρέφει στην κανονική του κατάσταση (Εικόνα 28). Εξαιτίας αυτής της θεμελιώδους διαφοράς στο μηχανισμό, η ενεργότητα Raman ενός δεδομένου τρόπου δόνησης μπορεί να διαφέρει σημαντικά από την ενεργότητα στο IR. Δονήσεις που έχουν μια συμμετρική αλλαγή πόλωσης δεν εμφανίζονται στο Raman. Δηλαδή, δονήσεις κάμψης δεν είναι ισχυρές στο Raman και συμμετρικά τμήματα τείνουν να είναι ισχυρά στο Raman. Για τα μόρια με ένα κέντρο συμμετρίας, οι δονήσεις που επιτρέπονται στο Raman απαγορεύονται στο IR και το αντίστροφο. Επιπλέον, η φασματοσκοπία Raman δίνει πληροφορίες για το σκελετό του μορίου (δομικές πληροφορίες), ενώ η φασματοσκοπία IR για τις χαρακτηριστικές ομάδες.

Η ένταση ή η ισχύς μιας κανονικής κορυφής Raman εξαρτάται κατά πολύπλοκο τρόπο από την πολωσιμότητα του μορίου, την ένταση της πηγής, τη συγκέντρωση της δραστικής ομάδας, καθώς και από άλλους παράγοντες. Εκτός από πληροφορίες για την ένταση και τη συχνότητα, οι μετρήσεις Raman παρέχουν μια επιπλέον μεταβλητή, η οποία είναι μερικές φορές χρήσιμη για το χαρακτηρισμό της δομής μορίων και ονομάζεται «λόγος αποπόλωσης». Ο λόγος αποπόλωσης εξαρτάται από τη συμμετρία των δονήσεων που ευθύνονται για τη σκέδαση. Η θεωρία της σκέδασης αποδεικνύει ότι η μέγιστη τιμή του λόγου αποπόλωσης στις μη συμμετρικές δονήσεις είναι έξι προς επτά, ενώ στις συμμετρικές δονήσεις είναι πάντοτε μικρότερος από τον αριθμό αυτό. Δηλαδή ο λόγος αποπόλωσης είναι χρήσιμος για τη συσχέτιση των γραμμών Raman με τον τύπο δόνησης (Skoog *et al.*, 2002).



Εικόνα 28: Διάγραμμα ενεργειακού επιπέδου που δείχνει τις καταστάσεις που εμπλέκονται στα φάσματα Raman.

E.1 Σκοπός και αντικείμενο της Μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο προσδιορισμός του χημικού «προφίλ» φαινολικών συστατικών που απομονώθηκαν από στέμφυλα ποικιλιών των νησιών του Ιονίου με χρήση σύγχρονων ενόργανων τεχνικών όπως υγρή χρωματογραφία, φασματοσκοπία FT-IR και Raman, αλλά και ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

Οι στόχοι της είναι:

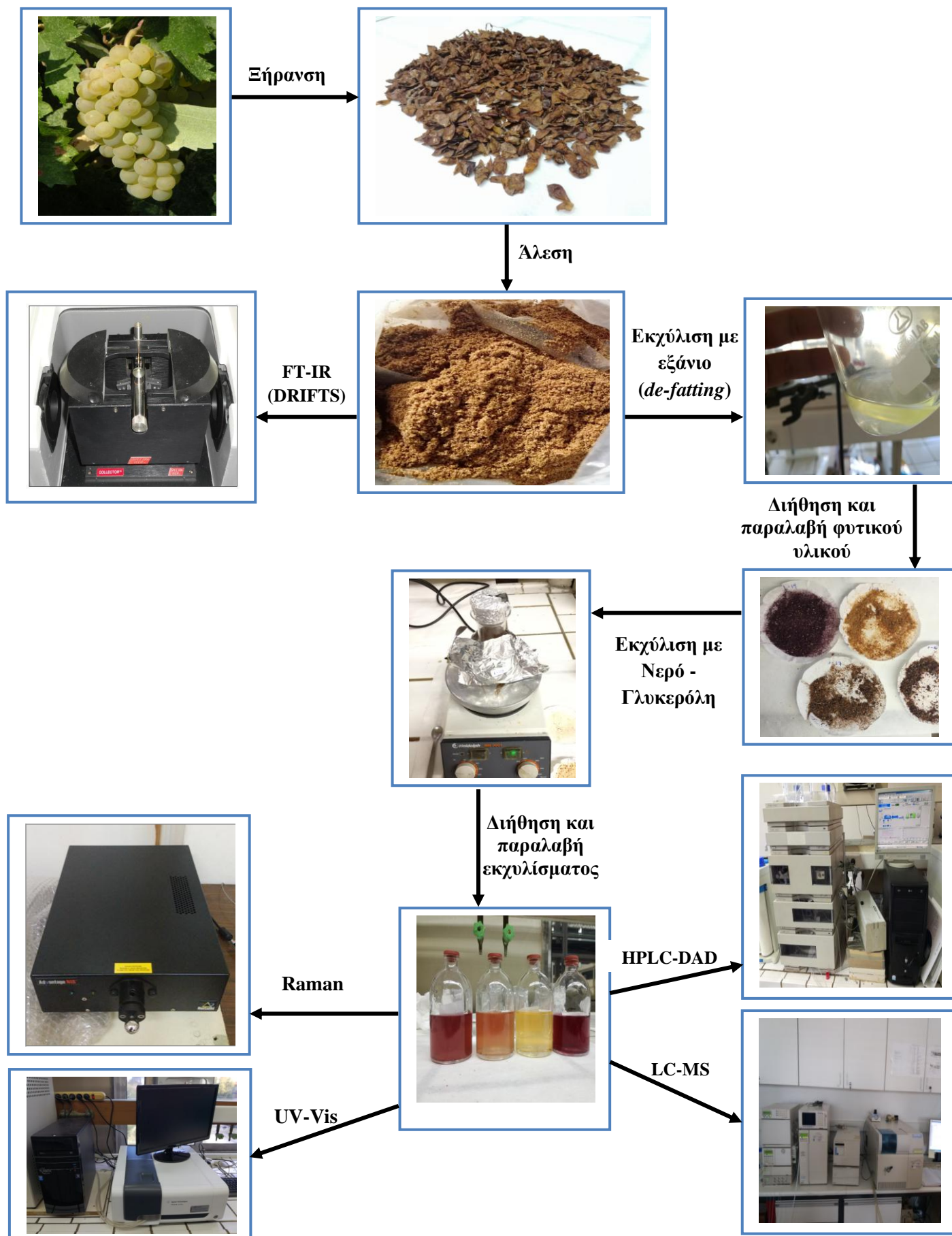
1. Η χρήση νέων διαλυτών, φιλικών προς το περιβάλλον, για την εκχύλιση παραπροϊόντων οινοποίησης, έτσι ώστε να ληφθούν εκχυλίσματα (ακατέργαστα και υδρολυμένα) με υψηλό φαινολικό δυναμικό, κατάλληλα για χρήση από τον άνθρωπο. Η αξιολόγηση των εκχυλισμάτων και ο προσδιορισμός ολικών φαινολών, έγινε με την χρήση της μεθόδου Folin– Ciocalteau.
2. Τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν ποιοτικά με χρήση χρωματογραφικών τεχνικών HPLC-DAD και LC-MS.
3. Στην συνέχεια τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν με χρήση της φασματοφωτομετρίας UV-Vis, FT-IR με την τεχνική DRIFTS και Raman. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συνδυάστηκαν με τα χρωματογραφικά δεδομένα.
4. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με δύο διαφορετικές δοκιμές DPPH και ABTS.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΡΩΤΟΤΥΠΙΑΣ

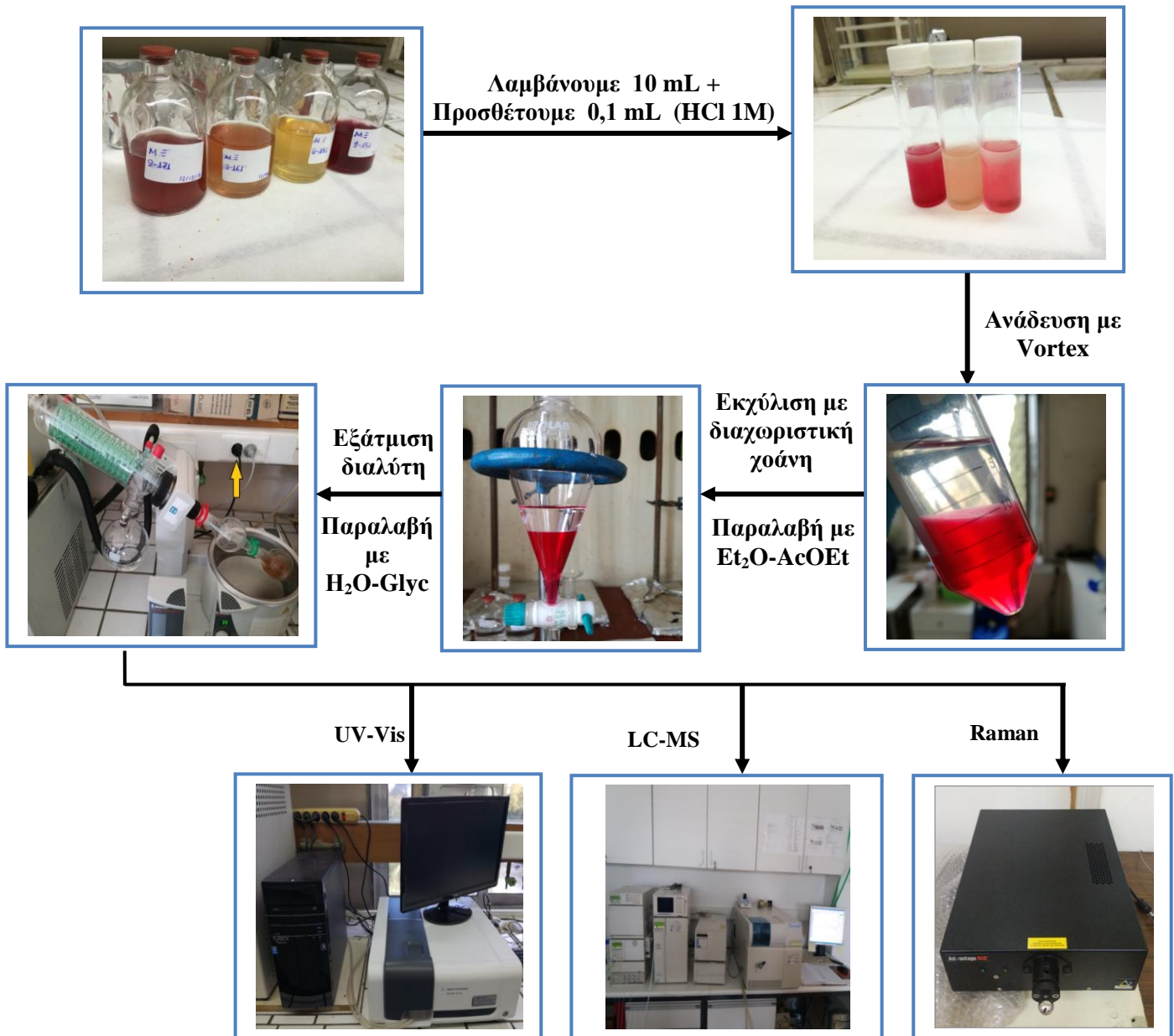
Δεν έχει μελετηθεί επαρκώς το φαινολικό δυναμικό των στεμφύλων ποικιλιών που προέρχονται από τα Ιόνια νησιά. Η μελέτη θα συμβάλει στην αξιοποίηση των παραπροϊόντων των οινοποιείων των ιονίων νήσων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Διάγραμμα ροής επεξεργασίας και εκχύλισης στεμφύλων



Διάγραμμα ροής υδρόλυσης



E.1.1 Επιλογή ποικιλιών

Οι ποικιλίες σταφυλιών, των οποίων τα στέμφυλα χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, αποτελούν χαρακτηριστικές ποικιλίες της ελληνικής αμπελουργίας και επελέγησαν βάσει της συχνότητας που συναντώνται στις αμπελουργικές περιοχές των Ιονίων νησιών της χώρας μας. Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκαν να εξετασθούν: οι ποικιλίες Ρομπόλα, Μαυροδάφνη, Γουστολίδι, Αυγουσιτιάτης, Παύλος, Κατσακούλιας, Σκιαδόπουλο, Κακοτρύγης και Cabernet.

E.1.2 Αναλυτικές πληροφορίες δειγμάτων

Σε κάθε δείγμα υπάρχουν αναλυτικές πληροφορίες για τον κωδικό, την περιοχή από την οποία συλλέχτηκαν, το οινοποιείο, τον παραγωγό, την ποικιλία, την ημερομηνία παραλαβής αλλά και για το βάρος τους. Αναλυτικά οι πληροφορίες συγκεντρώνονται στον παρακάτω Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Πληροφορίες δειγμάτων.

α/α Κωδικός δείγματος	Περιοχή	Οινοποιείο/Παραγωγός	Ποικιλία	Ημ. Παραλαβής	Αρχική υγρασία δειγμάτων %
1	Κεφαλονιά	Gentilini/ Φαγιάς	Ρομπόλα	19.08.17	60,71
2	Κεφαλονιά	Gentilini/ Κοκκινοπίλια	Ρομπόλα	27.08.17	57,18
3	Κεφαλονιά	Gentilini/ Αγ. Νικόλαος	Ρομπόλα	2.09.15	55,12
4	Κεφαλονιά	Gentilini/ Βαλσαμάτα	Ρομπόλα	14.09.17	63,80
5	Κεφαλονιά	Συνεταιρισμός	Ρομπόλα	15.09.17	53,97
6	Κεφαλονιά	Ταυλιανάτος	Μαυροδάφνη-Γουστολίδι	15.09.17	67,15
7	Κεφαλονιά	Gentilini/ Lianos	Ρομπόλα	16.09.17	50,16
8	Κεφαλονιά	Συνεταιρισμός	Ρομπόλα	17.09.17	58,88
9	Ζάκυνθος	Γράμψας	Αυγουσιτιάτης	17.09.17	65,46
10	Ζάκυνθος	Γράμψας	Παύλος	17.09.17	62,96
11	Ζάκυνθος	Καλλίνικος	Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο	17.09.17	63,83
12	Ζάκυνθος	Καλλίνικος	Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας	17.09.17	65,43
13	Ζάκυνθος	Θεοτόκης	Κακοτρύγης	14.09.17	68,02
14	Κέρκυρα	Gentilini/ Βαλσαμάτα	Cabernet	15.09.17	75,21

E.1.3 Φύλαξη και συντήρηση δείγματος

Η συλλογή της πρώτης ύλης έγινε από οινοποιεία και παραγωγούς που βρίσκονται στις περιοχές της Κεφαλονιάς, της Ζακύνθου και της Κέρκυρας τα οποία ανήκουν

διοικητικά στην περιφέρεια των Ιόνιων νησιών στην δυτική Ελλάδα. Από τα οινοποιεία συλλέχθηκαν στέμφυλα (γίγαρτα – φλοιοί) αμέσως μετά τον διαχωρισμό τους από το γλεύκος για τις λευκές ποικιλίες ενώ για την ερυθρές η παραλαβή έγινε μετά την ολοκλήρωση της οινοποίησης. Πριν τη ξήρανση το κάθε δείγμα ονομάστηκε με κωδικό όπως φαίνεται στον Πίνακα 12. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σακούλες τροφίμων με αεροστεγές σύστημα Slide & Lock και αποθηκευτήκαν στους (-20 °C) (Εικόνα 29).

Επιπλέον δημιουργήθηκε ένα φύλλο excel για κάθε ξεχωριστή ποικιλία που μελετήθηκε. Σε αυτό συμπληρώθηκαν δεδομένα και παρατηρήσεις για κάθε βήμα της πειραματικής πορείας και επεξεργασίας που ακολούθησε.

Πίνακας 12: Κωδικοποίηση δειγμάτων.

α/α κωδικός δείγματος	Κωδικός δείγματος	Αναλυτική περιγραφή δείγματος
1	03	03-Ρομπόλα-Κεφ.
2	06	06-Ρομπόλα-Κεφ.
3	07	07-Ρομπόλα-Κεφ.
4	09	09-Ρομπόλα-Κεφ.
5	10	10-Ρομπόλα-Κεφ.
6	11	11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.
7	12	12-Ρομπόλα-Κεφ.
8	13	13-Ρομπόλα-Κεφ.
9	14	14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.
10	15	15-Παύλος-Ζάκθ.
11	16	16-Αυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.
12	17	17-Αυγ-Κατσ-Ζάκθ.
13	18	18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.
14	19	19-Cabernet-Κέρκ.



Εικόνα 29: Σακούλες τροφίμων με αεροστεγές σύστημα.

E.1.4 Προκαταρκτική κατεργασία δείγματος

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000 g)
- Ποτήρι ζέσεως
- Οικιακό κουτάλι
- Blender οικιακής χρήσης
- Σακούλες τροφίμων με αεροστεγές σύστημα Slide & Lock

Αναλυτική πορεία

Η μέθοδος της ξήρανσης των ποικιλιών έγινε με έκθεση στον αέρα για 48 h όπως αυτή φαίνεται στην Εικόνα 30. Ακολούθησε ζύγιση του δείγματος σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000 g) και χωρίστηκε σε δυο κλάσματα. Το ένα κλάσμα αποξηραμένου φυτικού υλικού αποθηκεύτηκε ξανά σε σακούλες τροφίμων με αεροστεγές σύστημα Slide & Lock στους (-20 °C) ενώ το δεύτερο κλάσμα χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω κατεργασία.

Το δεύτερο κλάσμα αλέστηκε με blender οικιακής χρήσης για δυο 2 min. Κατά τη διάρκεια της άλεσης υπήρχαν διαστήματα 15 s ανάπαυσης για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση των δειγμάτων. Ακολούθησε η αποθήκευση του στους (-20 °C) σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές σύστημα Slide & Lock μέχρι να αναλυθούν για την αποφυγή χημικών αντιδράσεων (Εικόνα 31).



Εικόνα 30: Ξήρανση δειγμάτων με έκθεση στον αέρα.



Εικόνα 31: Blender, και δείγμα μετά την κονιορτοποίηση.

Συζήτηση

Η προεπεξεργασία φυτικών δειγμάτων πριν την εκχύλιση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων. Παρόλο που τα δείγματα προς εκχύλιση μπορεί να είναι φρέσκα, κατεψυγμένα ή ανεπεξεργαστα, συχνά προτιμώτερο είναι να υφίστανται προεπεξεργασία ξήρανσης. Η ξήρανση όχι μόνο μειώνει την περιεκτικότητα τους σε νερό, αλλά μπορεί να αυξήσει τη σταθερότητα του υλικού, μειώνοντας την ενζυματική δραστικότητα και την μικροβιολογική ανάπτυξη, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής του φυτικού υλικού. Ωστόσο, η διεργασία αυτή μπορεί να επηρεάσει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του, την θρεπτική αξία και τις δομικές ιδιότητες του. Η καταστροφή και η δυσλειτουργία του κυτταρικού ιστού μπορεί να οδηγήσει, πέρα από την συρρίκνωση, στην κατάρρευση του κυτταρικού τοιχώματος (Suarez and Viollaz, 1991).

Από την βιβλιογραφία βρεθήκαν πληροφορίες για πιο διαδεδομένες τεχνικές ξήρανσης που εφαρμόζονται στις βιομηχανίες. Αυτές συμπεριλαμβάνουν τη ξήρανση με χρήση θερμού αέρα (hot air drying - HAD), υπό κενό (vacuum drying - VD), υπό κατάψυξη (freeze drying - FD), υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες (Atmospheric drying - ATD), η ξήρανση με μικροκύματα (microwave drying - MD), ή με μικροκύματα και κενό (microwave vacuum drying - MVD) (Sablani *et al.*, 2006; Sagar *et al.*, 2010; Wojdyło *et al.*, 2009). Ακόμα, νέες τεχνολογίες ξήρανσης όπως με ακτινοβολία και μικροκύματα σε κενό έχουν διερευνηθεί και παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα με την ξήρανση μέσω κατάψυξης (Khanal *et al.* 2010; Leusink *et al.*, 2010). Τέτοιου τύπου τεχνικές θεωρούνται ανεπαρκείς και μη βιώσιμες για την επεξεργασία υλικών με υψηλή παραγωγικότητα (μεγάλους όγκους προς επεξεργασία) και για αγρό-βιομηχανικά υπολείμματα, τα οποία αυτή τη στιγμή έχουν μηδενική αξία. Στην επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ξήρανσης

σημαντικό ρόλο παίζει πέρα από την επιθυμητή ποιότητα του τελικού προϊόντος, το κόστος επεξεργασίας και η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε βιομηχανική κλίμακα. Για αυτό τον λόγο η καταλληλότερη ξήρανση στα πλαίσια του πειράματος κρίθηκε η ξήρανση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Ωστόσο, η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προετοιμασία του δείγματος, καθώς επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης. Η σημασία της προεργασίας έγκειται στη φύση των βιοδραστικών μορίων. Τα μόρια αυτά, ουσίες ευαίσθητες, δύναται να υποστούν αλλοίωση μέχρι να αναλυθούν. Η διάρρηξη του ιστού πριν την προσθήκη διαλύτη θα πρέπει να είναι ελεγχόμενη, καθώς κατά την διάσπαση των κυττάρων, ενδογενή ένζυμα όπως οξειδία πολυφαινόλων ή γλυκοσιδάσες έρχονται σε επαφή με τις φαινολικές ενώσεις που απελευθερώνονται από τα κενοτόπια, συμβάλλοντας έτσι στην υποβάθμιση ή αλλοίωση των φυσικών δομών τους (Renard *et al.*, 2011).

Έχει παρατηρηθεί ότι υλικά με μικρή κοκκομετρία παρουσιάζουν αποδοτικότερη εκχύλιση αντιοξειδωτικών λόγω της μείωσης της απόστασης στην οποία οι ενώσεις έχουν να διανύσουν για να φτάσουν στην επιφάνεια του υλικού και να ανακτηθούν από το διαλύτη (Landbo and Meyer, 2001). Επιπλέον, η δομή του υλικού διαταράσσεται και έτσι γίνεται αποδέσμευση των ουσιών στόχων ευκολότερα από την μάζα του υλικού (Perez-Jimenez *et al.*, 2008). Προσοχή ωστόσο πρέπει να δοθεί στην θέρμανση του δείγματος και στο χρόνο έκθεσης του στο οξυγόνο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας άλεσης, γιατί μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια αντιοξειδωτικών φυτοχημικών (Garzón and Wrolstad, 2009; White *et al.*, 2012). Παρότι λόγω της άλεσης, ο διαλύτης διαχέεται σε μεγάλες επιφάνειες και σε σύντομες διαδρομές διάχυσης, ένα υπερβολικά μικρό μέγεθος κόκκου μπορεί να προκαλέσει συσσωμάτωση και να δημιουργήσει μεγαλύτερη δυσκολία στον διαλύτη να διεισδύσει στο υλικό. Επίσης ευνοείται η διαπερατότητα ακόμα και μεγαλύτερων μορίων, που δεν είναι πάντοτε επιθυμητά (Aguilera *et al.*, 2003).

Όσον αφορά τις συνθήκες παρασκευής πρέπει να αποφεύγεται η οξείδωση, η υπερβολική έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, η ανάπτυξη ενζυμικών αντιδράσεων και άλλων χημικών μεταβολών στις ενώσεις-στόχους. Για να επιτευχθεί αυτό, η συγκομιδή των επιλεγμένων αγροτοβιομηχανικών απόβλητων πρέπει να είναι σύντομη και πρόσφατη. Σε κάθε περίπτωση, αν η διαδικασία εκχύλισης δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα, συνιστάται η αποθήκευση των δειγμάτων υπό ψύξη ή σε θερμοκρασίες κατάψυξης και με απουσία φωτός (White *et al.*, 2012).

E.2 Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από παραπροϊόντα οινοποιίας

E.2.1 Παραλαβή φαινολικών συστατικών από στέμφυλα

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Κωνική φιάλη
- Διηθητικό χαρτί
- Buchner υπό κενό
- Μαγνητικός αναδευτήρας Heidolph MR 3001
- Πιπέτα pasteur
- Αλουμινόχαρτο
- Σκούρο μπουκάλι αποθήκευσης
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000 g)
- Ποτήρι ζέσεως
- Φίλτρο καθαρισμού πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE)
- Νερό_(HPLC)
- Γλυκερόλη
- Εξάνιο (n-hexane)

Αρχή μεθόδου

Στην ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος εκχύλισης η εκχύλιση στερεού-υγρού. Αυτή είναι μια διαδικασία διαχωρισμού, η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά των διαλυμένων ουσιών από μια στερεά ύλη σε έναν εκχυλιστή- διαλύτη.

Η μέθοδος στηρίζεται στη διαφορετική εκχυλισιμότητα των ουσιών σε υδραλκοολικά διαλύματα, διαφορετικής συγκέντρωσης, σε συνάρτηση με το χρόνο εκχύλισης και την πολικότητα των διαλυτών (Lafka *et al.*, 2007, Apostolakis *et al.*, 2014, Makris *et al.*, 2013, Makris *et al.*, 2015, Anastasiadi *et al.*, 2012, Katiana P., *et al.*, 2016).

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα αποψύχθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους (25 °C). Ζυγίστηκε ένα (1 g) αλεσμένων - αποξηραμένων στέμφυλων σε κωνική φιάλη με πάμα και έγινε εκχύλιση με 10 mL εξάνιο (10:1 v/w) για 30 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα δυο (2) φορές. Ακολούθησε διήθηση Buchner υπό κενό. Το στερεό φυτικό υλικό αφέθηκε

σε διηθητικό χαρτί ώστε να εξατμιστεί το εξάνιο και ακολούθησε ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000 g).

Το απολιπασμένο φυτικό υλικό τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη με 20 mL διαλύτη νερό_(HPLC) – γλυκερόλη (80:20 v/v) και εκχυλίστηκε με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα στις 600 rpm για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου στους 25 °C (Εικόνα 32). Μετά την εκχύλιση το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10.000 g για 10 min, στους τέσσερις 4 °C και διηθήθηκε. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε με πιπέτα pasteur ενώ το ίζημα επανεκχυλίστηκε στις ίδιες συνθήκες ακόμα δυο (2) φορές. Τα υπερκείμενα και από τις τρεις (3) εκχυλίσεις αποθηκεύτηκαν σε σκούρο μπουκάλι με αλουμινόχαρτο στην κατάψυξη στους (-20 °C) με όνομα και κωδικό.



Εικόνα 32: Εκχύλιση στεμφύλων σε μαγνητικό αναδευτήρα.

Ε.2.2 Υδρόλυση φαινολικών συστατικών

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Περιστροφικός συμπυκνωτής της εταιρίας Heidolph
- Κωνική φιάλη
- Διαχωριστική χοάνη
- Vortex της εταιρίας BOECO
- Πιπέτα pasteur
- Αλουμινόχαρτο
- Σκούρο μπουκάλι αποθήκευση
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000 g)

- Ποτήρι ζέσεως
- Φίλτρο για καθαρισμό PTFE
- Νερό_(HPLC)
- Γλυκερόλη
- Υδροχλωρίο (HCl) 1M
- Διαιθυλαιθέρας (Et₂O)
- Οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση διαλύματος υδροχλωρίου 1M για την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στα σάκχαρα και τις φαινολικές ενώσεις, και την παραλαβή τους με κατάλληλης πολικότητας διαλυτές διαιθυλαιθέρα: οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) (Anastasiadi *et al.*, 2012, Αλαβάνος, 2014, Trikas *et al.*, 2016, Chiou *et al.*, 2014).

Αναλυτική πορεία

Τα εκχυλίσματα στέμφυλων αποψύχθηκαν και ελήφθησαν 10 mL. Σε αυτή την ποσότητα προστέθηκε 0,1 mL υδροχλωρίου 1M μέχρι pH= 1,5. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν σε συσκευή Vortex για 2 min. Τα απελευθερωμένα από σάκχαρα φαινολικά οξέα συλλέχθηκαν με 10 mL διαλύματος διαιθυλαιθέρα: οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) με την βοήθεια διαχωριστικής χοάνης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα δυο φορές. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό συμπυκνωτή υπό κενό μέχρι ξηρού. Το παραληφθέν στερεό διαλυτοποιήθηκε σε 10 mL νερό_(HPLC) – γλυκερόλη (80:20 v/v). Ακολούθησε καθαρισμός με φίλτρο PTFE και αποθηκεύτηκε σε σκούρο μπουκάλι με αλουμινόχαρτο στην κατάψυξη (-20 °C) με όνομα και κωδικό για περαιτέρω αναλύσεις.

Συζήτηση Εκχυλίσεων

Η εκχύλιση αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, καθώς και την απομόνωση τους από διάφορα υποστρώματα είτε αυτά είναι φυτικές ύλες ή υπολείμματα αγροτικών και βιομηχανικών δραστηριοτήτων.

Κατά την εκχύλιση οι χημικές ενώσεις που ανακτώνται είναι ασαφείς, και το διάλυμα αναφέρεται ως εκχύλισμα (Εικόνα 34). Σε πολυσύνθετα υλικά, οι διαφορετικές χημικές ενώσεις απομακρύνονται από το βασικό υλικό προς το εκχύλισμα με διαφορετικούς

ρυθμούς. Συνεπώς, ο συνολικός ρυθμός της διαδικασίας εκχύλισης καθορίζεται από το βήμα που έχει τον αργότερο ρυθμό (στάδιο ελέγχου ταχύτητας).

Ο χρόνος που απαιτείται από το διαλύτη για να επιδράσει με το στερεό υλικό είναι σημαντικός για την ανάκτηση των βιοδραστικών συστατικών και εξαρτάται από τη θερμοκρασία της εκχύλισης, την επιφάνεια του στερεού υλικού, το ιξώδες του διαλύτη και την ροή του (Ballard *et al.*, 2008; Meireles, 2009). Επιπλέον η ικανότητα ανάκτησης των ενώσεων στόχων εξαρτάται από την διαλυτότητα των ενώσεων στον επιλεγμένο διαλύτη. Ως εκ τούτου, η επιλογή του διαλύτη και τα δομικά χαρακτηριστικά του φυτικού ιστού που υπόκειται εκχύλιση είναι μείζονος σημασίας (Abrantes de Oliveira Seabra, 2010). Η κατανόηση των διαφόρων δράσεων που αλληλεπιδρούν σε τέτοια πολυανταγωνιστικά συστήματα δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, ωστόσο, η επιλογή του διαλύτη βασίζεται σε κάποιους εμπειρικούς κανόνες και επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες (Aguilera *et al.*, 2003).

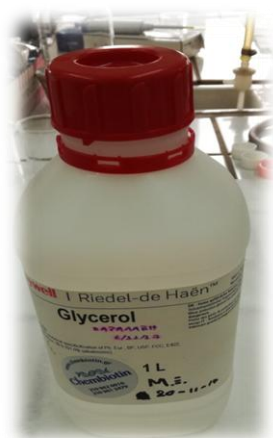
Την δυνατότητα απομάκρυνσης του διαλύτη, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων αυτού στο τελικό εκχύλισμα.

1. Την επιφανειακή τάση και το ιξώδες του διαλύτη, διότι ο διαλύτης πρέπει να είναι ικανός να διαπερνά την μήτρα του υλικού και το ιξώδες του θα πρέπει να είναι χαμηλό ώστε να ρέει εύκολα.
2. Τη διαβροχή του διαλύτη, η οποία είναι επίσης σημαντική καθώς και αυτή επηρεάζει την διείσδυση του διαλύτη μέσα στους πόρους της μήτρας.
3. Τις υπόλοιπες ιδιότητες του διαλύτη, καθώς ο διαλύτης πρέπει να είναι μη τοξικός, σταθερός (χημικά και θερμικά), να μην αντιδρά με τις προς εκχύλιση ουσίες, μη διαβρωτικός, μη εύφλεκτος, ασφαλής προς το περιβάλλον και οικονομικά προσιτός.
4. Την δυνατότητα ανακύκλωσης ή ανάκτησης του διαλύτη, ώστε να μειωθούν οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για οικονομικούς λόγους.

Με βάση τον παρακάτω Πίνακα 13 καταλήξαμε ότι ο ιδανικότερος διαλύτης στην παρούσα μελέτη ήταν ο συνδυασμός νερού και γλυκερόλης (Εικόνα 33).

Πίνακας 13: Φυσικοχημικές ιδιότητες γνωστών διαλυτών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και πίεση 1 atm.

Διαλύτης	Σημείο Βρασμού (°C)	Ποκνότητα (g/cm ³)	Επιφανειακή τάση mN/m	Ιξώδες (mPa·s)	Διηλεκτρική σταθερά	Σχετική πολικότητα
Νερό	100	0,997	72,6	0,8905	80,1	1,000
Μεθανόλη	64,6	0,792	22,6	0,5445	32,7	0,762
Αιθανόλη	78,5	0,789	22,3	1,078	24,5	0,654
1-Προπανόλη	97	0,803	21,4	2,073	20	0,617
Οξικός Αιθυλεστέρας	77	0,894	23,9	0,426	6,02	0,228
Εξάνιο	69	0,655	18,4	0,2923	1,88	0,009
Ακετόνη	56,2	0,791	23,7	0,304	20,7	0,355
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	189	1,092	43	1,996	46,7	0,444
1-Βουτανόλη	117,6	0,81	24,3	2,593	18	0,586
Οξικό οξύ	118	1,049	26,9	1,124	6,15	0,648
Ακετονιτρίλιο	81,6	0,786	28,45	0,3409	37,5	0,460
Γλυκερόλη	290	1,261	64,00	1,412	42,5	0,812



Εικόνα 33: Διαλύτης γλυκερόλη.



Εικόνα 34: Εκχλίσματα διαφορετικών ποικιλιών στεμφύλων.

Ε.2.3 Επεξεργασία δειγμάτων πριν της ανάλυσης

Τα δείγματα τα όποια πρόεκυψαν ήταν 14 ακατέργαστα και 14 υδρολυμένα εκχυλίσματα. Μετά την παραλαβή του εκχυλίσματος, το οποίο ήταν πια πλούσιο στις ενώσεις στόχους, πραγματοποιήθηκε μια μορφή καθαρισμού ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κομμάτια της στερεής μήτρας που είχαν παρασυρθεί από τον διαλύτη. Πριν από της αναλύσεις έγινε καθαρισμός των εκχυλισμάτων με ειδικά πολικά φίλτρα HPLC Chromafil Xtra CA-45/25 (aqueous or polar samples) (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Καθαρισμός εκχυλισμάτων πριν την ανάλυση με φιλτράκια Chromafil Xtra CA-45/25.

Ε.3 Ανάλυση δειγμάτων με UV-Vis

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis) της εταιρείας Agilent Technologies και μοντέλο Cary 60 UV-Vis με λογισμικό CaryWinUV 5.0
- Κυψελίδα χαλαζία (κρυσταλλικό πυρίτιο)
- Πιπέτα pasteur
- Ποτήρι ζέσεως για απόβλητα
- Νερό(HPLC)
- Γλυκερόλη

Αρχή της μεθόδου

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis στηρίζεται στο ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας που απορροφά την ακτινοβολία. Η καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης. Η ποσοτική σχέση δίνεται από το νόμο Beer-Lambert.

Αναλυτική πορεία

Τα ακατέργαστα δείγματα αραιώθηκαν με διαλύτη νερό-γλυκερόλη (1:10 v/v). Καταγράφηκαν τα φάσματα UV-Vis τόσο των ακατέργαστων δειγμάτων όσο και των υδρολυμένων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 36. Με την βοήθεια πιπέτας pasteur καθαρίστηκαν οι κυψελίδες με τον διαλύτη εκχύλισης. Έπειτα μηδενίστηκε το όργανο με την βοήθεια διαλύματος (Blank) που περιείχε τον διαλύτη εκχύλισης νερό - γλυκερόλη. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε το κάθε δείγμα σε κυψελίδα χαλαζία και στη συνέχεια αυτό στις ειδικές υποδοχές του οργάνου και φωτομετρήθηκε σε εύρος (600-200 nm). Καταγράφηκε το φάσμα κάθε δείγματος.



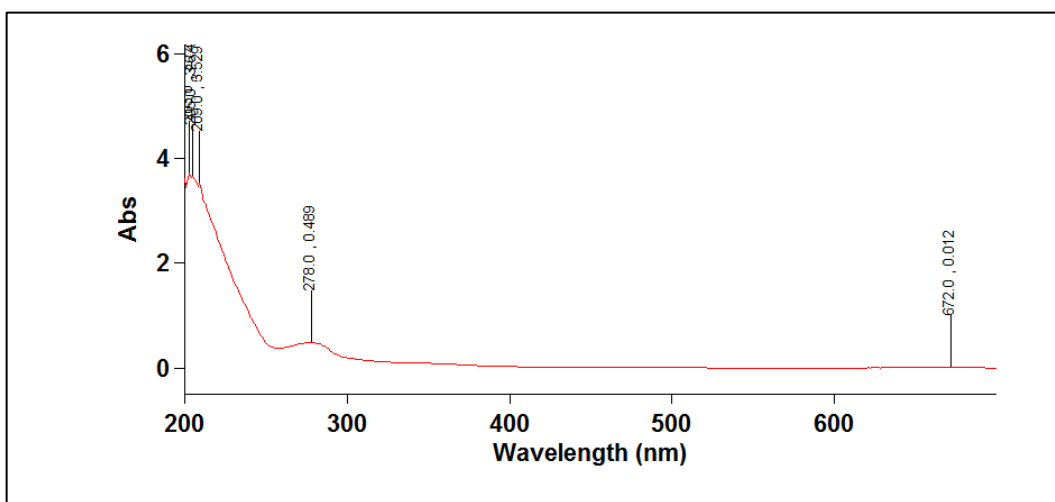
Εικόνα 36: Φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Συζήτηση - Αποτελέσματα

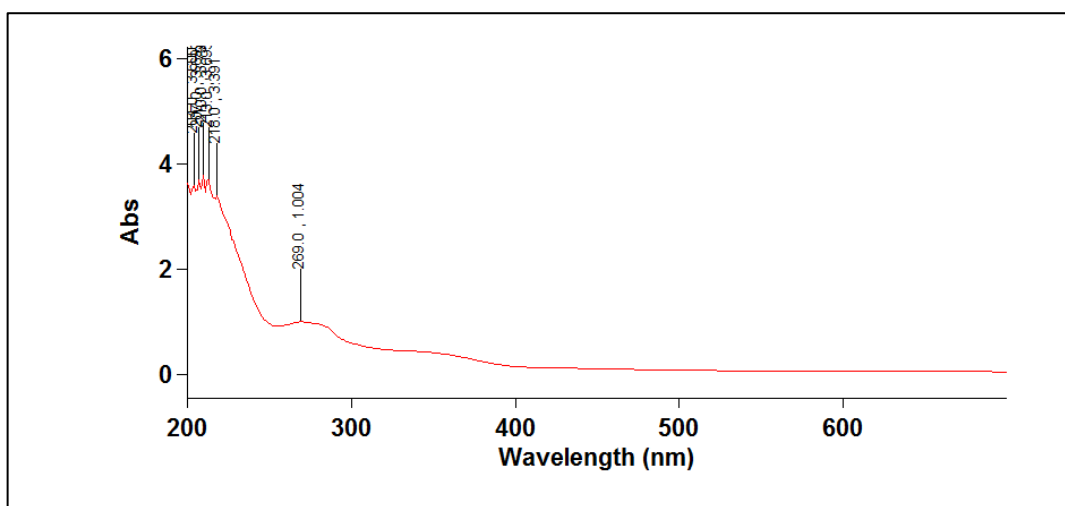
Τα φάσματα UV-Vis των διαφόρων φαινολικών ομάδων έχουν χαρακτηριστική δομή, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με την υποκατηγορία της ένωσης. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα UV-Vis των φλαβονοειδών εμφανίζουν τις δύο ζώνες απορρόφησης I και II. Η Ζώνη I βρίσκεται στην περιοχή απορρόφησης 300-370 nm και αντιστοιχεί στη δομή των δακτυλίων B και C ενώ η ζώνη II κυμαίνεται μεταξύ των 250-300 nm και οφείλεται στον A-δακτύλιο των φλαβονοειδών. Έτσι, η κάθε ομάδα ουσιών παρουσιάζει απορρόφηση σε συγκεκριμένη ζώνη.

Τα αποτελέσματα έδειξαν έντονες κορυφές με απορρόφηση (Abs) στις περιοχές 220 nm και 260-280 nm. Οι περιοχή 260-280 nm μας επιβεβαίωσε και με βάση την βιβλιογραφία την ύπαρξη πολικών φαινολικών ενώσεων και συγκεκριμένα φαινολικών οξέων (Cheng V. *et al.*, 2012). Τα δείγματα που προήλθαν από λευκές ποικιλίες είχαν ένα πλούσιο προφίλ από φαινολικά οξέα. Τα δείγματα που προήλθαν σε συνδυασμό με λευκές και ερυθρές ποικιλίες είχαν απορροφήσεις και στα 520 nm, περιοχή

χαρακτηριστική για τις ανθοκυάνες. Η γλυκερόλη και το νερό δεν παρουσίασε απορρόφηση στην περιοχή του ορατού (400-800 nm). Ενδεικτικά τα φάσματα των ακατέργαστων και υδρολυμένων εκχυλισμάτων του δείγματος Ρομπόλα από την Κεφαλονιά φαίνονται στις παρακάτω Εικόνες 37 και 38 ενώ τα αποτελέσματα στους παρακάτω Πίνακες 14 και 15. Περισσότερες αναλυτικές πληροφορίες για τα φάσματα υπάρχουν στο Παράρτημα Α.



Εικόνα 37: Φάσμα ακατέργαστου εκχυλίσματος δείγματος 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



Εικόνα 38: Φάσμα υδρολυμένου εκχυλίσματος δείγματος 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.

Πίνακας 14: Απορρόφηση ακατέργαστων δειγμάτων μετά από αραιώση 1:10.

Κωδικός Δείγματος	λ (max)	Abs
03-Ρομπόλα-Κεφ.	278	0,489
06-Ρομπόλα-Κεφ.	277	0,561
07-Ρομπόλα-Κεφ.	278	0,744
09-Ρομπόλα-Κεφ.	279	0,606
10-Ρομπόλα-Κεφ.	277	0,438
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	278	0,936
12-Ρομπόλα-Κεφ.	278	0,392
13-Ρομπόλα-Κεφ.	278	0,596
14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.	278	0,814
15-Πάυλος-Ζάκθ.	278	0,723
16-Άυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	278	0,927
17-Άυγ-Κατσ-Ζάκθ.	278	0,782
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	278	0,958
19-Cabernet-Κέρκ.	278	0,902

Πίνακας 15: Απορρόφηση υδρολυμένων δειγμάτων.

Κωδικός Δείγματος	λ (max)	Abs
03-Ρομπόλα-Κεφ.	269	1,004
06-Ρομπόλα-Κεφ.	265	1,105
07-Ρομπόλα-Κεφ.	270	1,312
09-Ρομπόλα-Κεφ.	275	0,976
10-Ρομπόλα-Κεφ.	265	0,746
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	265	1,192
12-Ρομπόλα-Κεφ.	270	0,927
13-Ρομπόλα-Κεφ.	265	1,643
14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.	275	1,604
15-Πάυλος-Ζάκθ.	275	0,867
16-Άυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	270	0,871
17-Άυγ-Κατσ-Ζάκθ.	265	1,046
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	270	1,052
19-Cabernet-Κέρκ.	270	1,330

E.4 Ανάλυση δειγμάτων με την τεχνική HPLC-DAD

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Χρωματογράφος 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis (Diode Array Detector - DAD).
- Σύστημα συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation
- Χρωματογραφική στήλη Supelco Discovery HS C₁₈, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4 mm.
- Νερό ειδικό για HPLC-DAD
- Μεθανόλη ειδική για HPLC-DAD
- Νερό οξιμισμένο με μυρμηγκικό οξύ (pH= 2,2)
- Μεθανόλη οξιμισμένη με μυρμηγκικό οξύ (pH= 2,2)
- Απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν τα υδατικά ακατέργαστα εκχυλίσματα και υδρολυμένα αυτών (Εικόνα 39). Η ανάλυση HPLC-DAD πραγματοποιήθηκε με βάση την βιβλιογραφία του (Cheng V. *et al.*, 2012). Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 1100 Agilent HPLC εφοδιασμένο με ανιχνευτή μεταβαλλόμενου μήκους κύματος UV-Vis-DAD. Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό HP Chemstation για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανεστραμμένης φάσης (Reverse Face - RF) όπου συνδυάστηκαν δύο διαλύτες. Ο διαλύτης A ήταν διασπεσταγμένο και φιλτραρισμένο νερό για HPLC ρυθμισμένο σε pH= 2,2 οξιμισμένο με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος και ο διαλύτης B ήταν μεθανόλη υψηλής καθαρότητας, για HPLC ρυθμισμένη σε pH= 2,2 με προσθήκη μυρμηγκικού οξέος.

Η ροή της κινητής φάσης ήταν ένα (1 mL/ min) και η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Supelco Discovery HS C₁₈, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4 mm.

Η τεχνική έκλουσης των διαλυτών που εφαρμόστηκε ήταν βαθμιδωτή. Ο σκοπός της βαθμιδωτής έκλουσης ήταν ο καλύτερος και πιο ακριβής διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν από 0–1 min., 5% ο διαλύτης (B), 1–5 min., 10% ο διαλύτης (B), 6–15 min., 33% ο διαλύτης (B), 16–25 min., 41% ο

διαλύτης (B), 26–35 min., 62% ο διαλύτης (B), 36–42 min., 66% ο διαλύτης (B), 43–55 min., 100% ο διαλύτης (B), 56–65 min., 5% ο διαλύτης (B). Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε τέσσερα μήκη κύματος στα 280, 320, 360 και 520 nm.



Εικόνα 39: Δείγματα που αναλύθηκαν με υγρό χρωματογράφο.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολών εκτιμήθηκε με βάση τον χρόνο ελκούσης (Retention Time – Rt) και το φάσμα απορρόφησης των προτύπων μορίων.

Οι φαινόλες ανάλογα με τη δομή τους παρουσίασαν χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο UV-Vis. Η ανάλυση τους έγινε σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος. Συγκεκριμένα, τα υδρόξυβενζοϊκά οξέα, οι φλαβονόλες και οι προκυανιδίνες ανιχνεύθηκαν στα 280 nm, τα στιλβένια, τα υδρόξυκιναμωμικά οξέα και οι εστέρες τους στα 320 nm, ενώ οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους στα 360 nm.

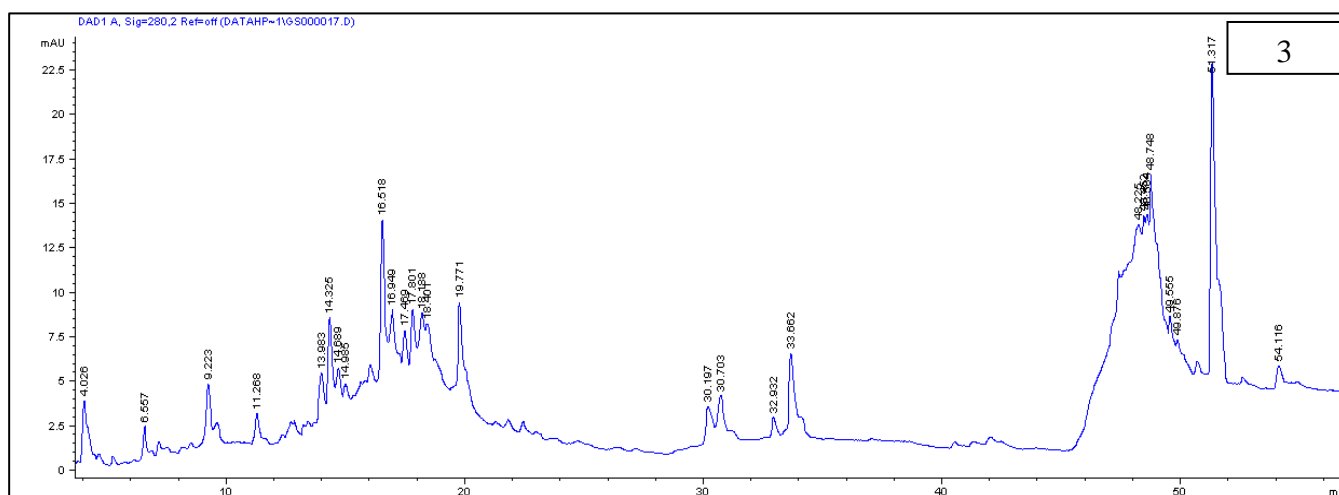
Συγκρίνοντας τις ποικιλίες Ρομπόλα από Κεφαλονιά με κωδικό δείγματος 03, 06, 07, 09, 10, 12, 13 παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξαν αξιοσημείωτες διαφορές. Στα 280 nm παρατηρήθηκε σχεδόν ίδιο προφίλ με μικροδιαφορές στο εμβαδόν των κορυφών. Συγκεκριμένα τα δείγματα με κωδικό 03, 07, 09, 10 παρουσίασαν μεγαλύτερο εμβαδόν σε αντίθεση με τις ποικιλίες με κωδικό 06, 12, 13 στο $R_t = 4,02$ min. Επιπλέον στο δείγμα 07 υπήρξαν δυο κορυφές με $R_t = 12,8$ min και $R_t = 13,20$ min που στα υπόλοιπα δείγματα Ρομπόλα είχαν πολύ μικρό εμβαδόν. Στα 320 nm τα χρωματογραφήματα δεν παρουσίασαν διαφορές με εξαίρεση το δείγμα με κωδικό 12 όπου έδωσε μικρές κορυφές. Στα 360 nm παρατηρήθηκαν ίδιες κορυφές με ίδια αφθονία ενώ στα 520 nm δεν παρατηρήθηκαν κορυφές. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι η ποικιλία Ρομπόλα είναι λεύκη και δεν έχει ανθοκυάνες.

Συγκρίνοντας τις ποικιλίες με κωδικό 14, 16, 17 και κοινό χαρακτηριστικό ότι αποτελούνταν από την ποικίλα Αυγουστιάτη παρατηρήθηκαν οι παρακάτω διαφορές. Στα 280 nm η ποικιλία με κωδικό 14 εμφάνισε τρεις μεγάλες κορυφές στο $R_t = 4,53$ min,

Rt=7,06 min και Rt=7,34 min σε αντίθεση με τις άλλες δυο ποικιλίες που δεν εμφάνισαν τις ίδιες κορυφές παρόλο που εμπεριείχαν την ποικιλία Αυγουστιάτη. Στα 320 nm και 360 nm παρατηρήθηκε η ποικιλία με κωδικό 14 να εμφανίζει οξείες κορυφές στα Rt=4,53 min έως και τα Rt=20,37 min σε αντίθεση με τις άλλες ποικιλίες. Στα 520 nm παρατηρήθηκαν κορυφές και στα τρία δείγματα με κωδικό 14, 16, 17. Μάλιστα στο δείγμα με κωδικό 14, 17 ήταν πιο έντονες. Αυτό συνέβη γιατί τα δείγματα με κωδικό 14, 16, 17 αποτελούνταν τουλάχιστον από μια ερυθρή ποικιλία στις οποίες υπάρχουν ανθοκυάνες.

Συγκρίνοντας τις ποικιλίες με κωδικό 11, 14, 17, 19 και κοινό χαρακτηριστικό ότι αποτελούνταν από ερυθρές ποικιλίες, στα 280 nm είχαμε ομοιότητες. Ενδιαφέρον υπήρξε ανάμεσα στις ποικιλίες με κωδικό 11 και 14 που εμφάνισαν κορυφές στα Rt=7,10 min και Rt=7,40 min. Στα 520 nm το δείγμα 19 εμφάνισε δυο κορυφές στα Rt=28,30 min και Rt=29,30 min που δεν είχαν οι άλλες ποικιλίες.

Συγκρίνοντας ποικιλίες από διαφορετικές περιοχές δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Διαφορές υπήρξαν μόνο ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες. Επίσης σε όλες τις κορυφές υπήρξε απορρόφηση στο UV. Αρά τα δείγματα είχαν ουσίες με χρωμοφόρες ομάδες. Τα περισσότερα φάσματα UV ήταν παρόμοια, αν όχι ίδια, και αυτό σημαίνει ότι είχαν χρωμοφόρες ομάδες και απορροφούν στα 280nm με παρόμοιο τρόπο άρα αυτό που τις διαφοροποιεί ήταν ο χρόνος ελκούσης.



Εικόνα 40: Χρωματογράφημα του δείγματος 03 της ποικιλίας Ρομπόλα της περιοχής Κεφαλονιάς στα 280 nm.

Αφού λοιπόν έγινε μια αρχική παρατήρηση των προφίλ των χρωματογραφημάτων, επιλέχθηκαν μερικά από τα δείγματα για να αναλυθούν στο με LC-MS. Ενδεικτικά

παρουσιάζεται στην Εικόνα 40 και στον Πινάκα 16 ένα χρωματογράφημα στα 280 nm και τα αποτελέσματα της ποικιλίας Ρομπόλα. Στο Παράρτημα Β υπάρχουν αναλυτικές πληροφορίες για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν.

Πίνακας 16: Χρόνοι ελκούσης του χρωματογραφήματος (HPLC-DAD) του ακατέργαστου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά σε όλα τα μήκη κύματος.

#	280nm		320nm		360nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,02	265	14,70	280- 320	14,70	280- 320
2	6,55	265	30,19	280- 355	30,19	280- 355
3	9,22	273	30,70	255- 360	30,70	255- 360
4	11,26	280	32,93	260- 355	32,93	260- 355
5	13,98	275	33,66	265- 355	33,66	265- 355
6	14,32	280				
7	14,68	280, 325				
8	14,98	280				
9	16,51	280				
10	16,94	275				
11	17,46	275				
12	17,80	275				
13	18,18	275				
14	18,40	275				
15	19,77	275				
16	30,19	270- 360				
17	30,70	270- 360				
18	32,93	280- 355				
19	33,66	265- 350				
20	48,22	275				
21	48,45	275				
22	48,58	275				
23	48,74	270- 285				
24	49,55	275				
25	49,87	275				
26	51,31	270- 280				
27	54,11	275				

E.5 Ανάλυση δειγμάτων με την τεχνική LC-MS

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Χρωματογράφος Shimatzu LC/MS-2010A εξοπλισμένος με εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (MS-ESI, ElectroSpray Ionization, negative mode).
- Χρωματογραφική στήλη Supelco Discovery HS C18, μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4 mm.
- Σύστημα συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό Lab Solutions της εταιρείας Shimatzu version 3.40.307
- Νερό ειδικό για LC-MS
- Μεθανόλη ειδική για LC-MS
- Νερό οξινισμένο με μυρμηγκικό οξύ (pH= 2,2)
- Μεθανόλη οξινισμένη με μυρμηγκικό οξύ (pH= 2,2)
- Απιονισμένο νερό

Αναλυτική πορεία

Για κάθε πρότυπη ένωση παρασκευάστηκε αρχικά ένα αποθεματικό διάλυμα συγκέντρωσης 1 mg/ mL σε μεθανόλη καθαρότητας HPLC, που διατηρήθηκε στην κατάψυξη στους (-20 °C). Για την παρασκευή του ζυγίστηκε ένα 1 mg ουσίας σε ζυγό ακριβείας, τοποθετήθηκε σε πλαστικό σωλήνα Eppendorf και συμπληρώθηκε με ένα 1 mL μεθανόλης. Τα διαλύματα φυλάχθηκαν στους (-20 °C) απουσία φωτός.

Από τις πρότυπες έγιναν κατάλληλες αραιώσεις 1/10 και 1/100. Με το LC-MS αναλύθηκαν οι αραιώσεις 1/100. Εν συνεχεία, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 µg/ mL και αναλύθηκε στις ίδιες συνθήκες. Οι πρότυπες ουσίες επιλέχτηκαν με βάση την βιβλιογραφία πάνω στα στέμφυλα και αυτές που υπήρχαν στο εργαστήριο.

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με την ίδια διαδικασία όπως στο HPLC-DAD (Cheng V. *et al.*, 2012). Με το LC-MS έγινε ο διαχωρισμός, αλλά και η ταυτοποίηση των συστατικών η οποία δεν είχε γίνει στο HPLC.

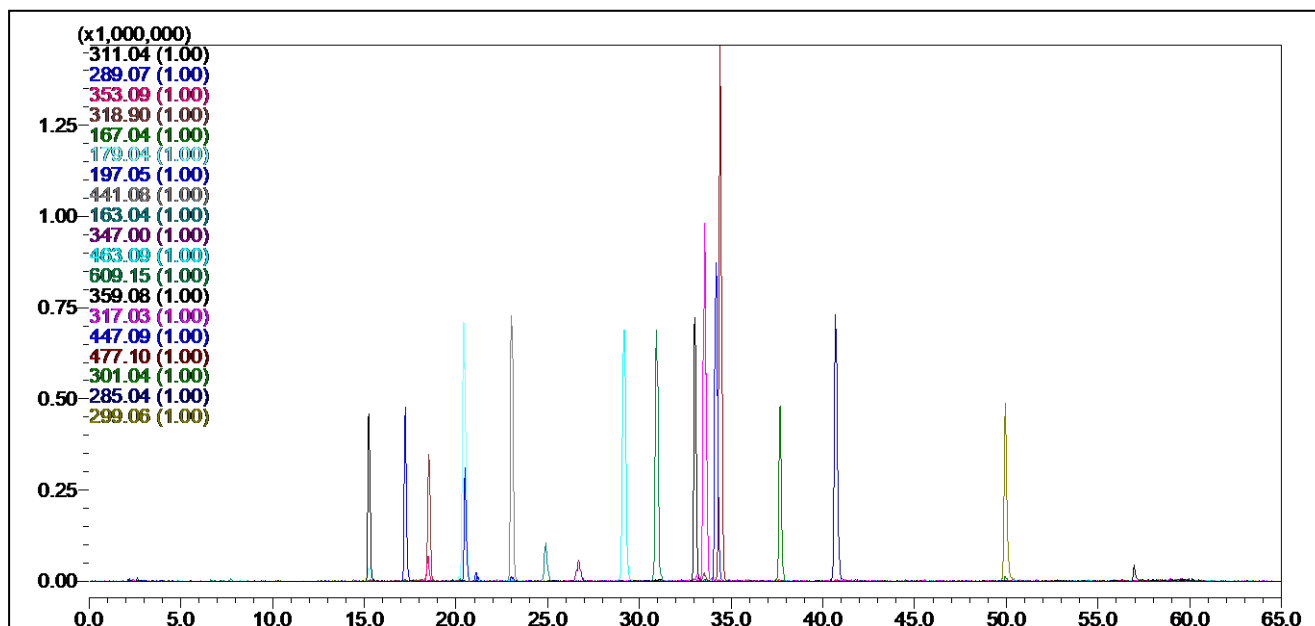
Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Shimatzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δυαδική αντλία LC-10ADnr, απαερωτή DGU-14A, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20 µL, ανιχνευτή σειράς φωτοδιοδών

(PDA) SPD-M10Avr και εκλεκτικό τετραπολικό ανιχνευτή μαζών (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ElectroSpray Ionization, negative mode - MS-ESI). Το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή και ειδικό λογισμικό Lab Solutions της εταιρείας Shimatzu version 3.40.307 για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Η στήλη και το πρόγραμμα έκλουσης ήταν όμοια με αυτά της ανάλυσης HPLC-DAD της παραγράφου. Οι συνθήκες του ανιχνευτή ρυθμίστηκαν στη λειτουργία αρνητικού ιόντος ώστε να ευνοηθεί ο σχηματισμός $[M-H]^-$ και ήταν οι εξής: θερμοκρασία πηγής ιοντισμού (Curved Dissolvation Line - CDL) (250 °C) , ροή αερίου εκνέφωσης (N_2) (1,5 L/ min⁻¹), πίεση αερίου ξήρανσης (N_2) 0,1 MPa (ροή 10 L/ min), θερμοκρασία heat block (300 °C), δυναμικό περιοχής εκνέφωσης (interface) (-3,5 kV), τάση (CDL -20 V) και τάση ανιχνευτή (-1,55 kV).

Αποτελέσματα – Συζήτηση

Οι πρότυπες ενώσεις αναλύθηκαν όπως φαίνεται στην Εικόνα 41 και καταγράφηκαν οι χρόνοι R_t , τα λ_{max} στο UV-Vis και το κύριο θραύσμα μάζας (m/z) σε ESI όπως αυτές φαίνονται στον Πινάκα 17.



Εικόνα 41: Χρωματογραφικό προφίλ πρότυπων ενώσεων.

Πίνακας 17: Πληροφορίες του χρωματογραφήματος (LC-MS) του προτύπου εκχυλίσματος στο μήκος κύματος 280 nm.

Πρότυπες ενώσεις (10 µg/ mL)	Rt (min)	UV-Vis (nm)	[M-H]⁻
Καφταρικό οξύ	15,44	217- 328	311,04
Κατεχίνη	17,19	279	289,07
Χλωρογενικό οξύ	18,38	217- 326	353,08
Δελφινιδίνη	18,42	320	337,01
Βαλλινικό οξύ	20,09	219- 260- 291	167,03
Καφεϊκό οξύ	20,29	218- 323	179,03
Επικατεχίνη	20,35	278	289,07
Κιναμωνικό οξύ	20,40	218- 323	179,03
Συριγγικό οξύ	21,02	218- 274	197,04
Γαλλική Επικατεχίνη	22,87	276	441,08
π-κουμαρικό οξύ	24,77	220- 309	163,04
Μαλβιδίνη	26,57	322	365,04
Μυρικιτρίνη	29,01	351	463,08
Ρουτίνη	30,79	254- 356	609,10
Ροσμαρινικό οξύ	32,95	217- 329	359,07
Μυρικετίνη	33,46	372	317,03
Γλυκοζίτη της καμπερόλης	34,07	215- 265- 348	447,09
3-O-γλυκοζίτης της ισορχαμνετίνης	34,30	253- 354	477,10
Κερκετίνη	37,58	371	301,03
Καμπερόλη	40,63	218- 265- 366	285,04
4-μεθυλαιθέρας της καμπεφερόλης	49,90	218- 365	299,05

Στους Πίνακες 18 και 19 δίνονται πληροφορίες των αποτελεσμάτων του χρωματογραφήματος LC-MS του ακατέργαστου και υδρολυμένου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm. Αναλυτικότερα, δίνονται οι χρόνοι Rt, τα λ_{\max} στο UV-Vis και το κύριο θραύσμα μάζας (m/z) σε ESI. Επίσης υπολογίζεται από το εμβαδόν και η επί της εκατό απόδοση 81,31 %. Πληροφορίες για όλα τα δείγματα υπάρχουν στα Παραρτήματα Γ, Δ.

Πίνακας 18: Πληροφορίες του χρωματογραφήματος (LC-MS) του ακατέργαστου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm.

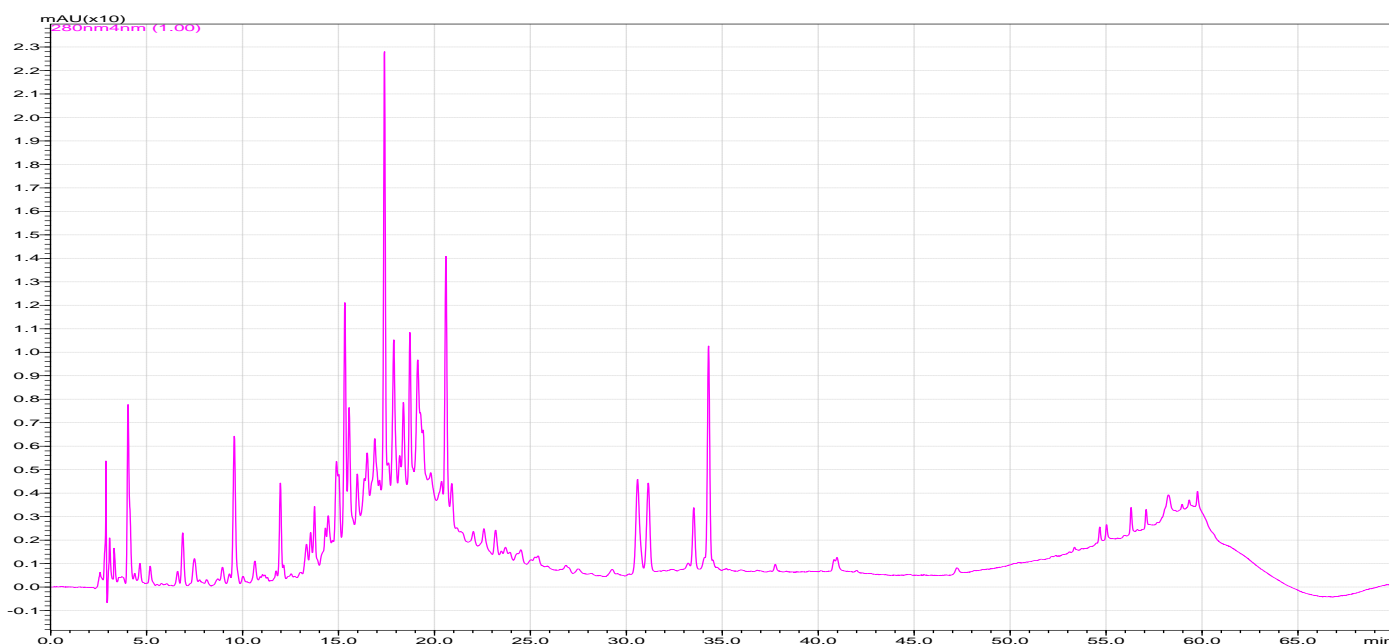
Κωδικός Δείγματος: 3-Ρομπολα-Κεφαλονια-Φαγίας				
#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (nm)	[M-H]⁺
1	3,061	1,168	338	368,9
2	4,026	3,682	266	723,4
3	6,875	1,412	261	288,9
4	7,483	0,968	274	146,7
5	9,561	4,296	215 - 270	168,3
6	11,965	2,253	220- 283	544,5
7	13,325	0,919	218- 264	575,5
8	13,541	0,957	217	330,9
9	13,744	1,421	220- 274	242,7
10	14,889	2,129	218- 278	576,7
11	15,008	1,170	217- 277	576,9
12	15,324	5,555	278	577,0
13	15,546	3,066	221- 286- 328	310,8
14	15,972	1,094	218- 277	865,7
15	16,486	1,254	220- 279	576,6
16	16,885	1,753	220- 277	-
17	17,387	9,150	278	288,8
18	17,873	4,019	278- 375	576,9
19	18,374	2,005	223- 271	443,1
20	18,716	3,117	220- 277	729,0
21	19,120	3,577	219- 278	865,0
22	19,255	1,200	222- 278	896,9
23	19,396	0,963	222- 278	577,0
24	20,364	0,926	224- 278	829,5
25	20,590	6,422	278	289,0
26	20,896	1,079	224- 278	488,9
27	30,576	4,236	225- 354	476,9
28	31,136	3,426	226- 355	463,1
29	33,508	1,835	226- 264- 348	446,5
30	34,277	6,253	226- 265- 349	446,9

Πίνακας 19: Πληροφορίες του χρωματογραφήματος (LC-MS) του υδρολυμένου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm.

Κωδικός Δείγματος: 3-Ρομπολα-Κεφαλονια-Φαγιας				
#	R.Time (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (nm)	[M-H]⁺
1	9,343	6,260	215- 271	797,5
2	11,745	10,288	217- 283	305,1
3	14,281	1,406	218	-
4	15,222	0,971	218	-
5	15,436	3,217	221- 286- 328	310,8
6	17,301	17,582	278	288,8
7	17,480	1,247	218- 278	576,7
8	17,804	1,282	219- 277	727,1
9	18,045	1,165	219- 277	-
10	18,650	1,810	219	-
11	19,150	0,891	219	-
12	20,277	1,643	221	-
13	20,515	9,387	278	289,0
14	23,062	2,065	220- 277	440,9
15	30,452	5,860	225- 354	476,9
16	31,012	4,563	226- 355	463,0
17	34,158	12,680	226- 265- 349	446,9

Η ταυτοποίηση κάθε συστατικού στην ανάλυση LC-MS, βασίστηκε σε συνδυασμό του R_t και φασματικής αντιστοίχισης, καθώς οι πολυφαινόλες απορροφούν στην UV περιοχή. Έτσι, τα συστατικά ταυτοποιήθηκαν με τη σύγκριση του φάσματος μάζας αλλά και του φάσματος UV (με βάση το μοριακό βάρος κάθε συστατικού, που αντιστοιχούσε στο μεγαλύτερο θραύσμα μάζας m/z) με αντίστοιχες πρότυπες ενώσεις αλλά και βιβλιογραφικά. Η ταυτοποίηση έγινε μόνο στα κυριότερα συστατικά των δειγμάτων.

Ο διαχωρισμός του εκχυλίσματος στέμφυλων με LC όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα στην Εικόνα 42 έχει ευρείες κορυφές, οι οποίες εκκλόνονται για περισσότερο από 21 min. Οι κορυφές αντιστοιχούν σε μονομερείς 3-φλαβανόλες, καθώς και μονομερείς, διμερείς και τριμερείς προανθοκυανιδίνες. Αυτό το ευρύ χρωματογραφικό προφίλ ίσως οφείλεται στην πολυπλοκότητα των προανθοκυανιδινών που έχουν μεγάλο μοριακό βάρος.



Εικόνα 42: Χρωματογραφικό προφίλ (LC-MS) του ακατέργαστου εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά στο μήκος κύματος 280 nm.

Πίνακας 20: Αποτελέσματα σύγκρισης εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα από την Κεφαλονιά με τις πρότυπες ενώσεις και την βιβλιογραφία, με βάση τις χρωματογραφικές αναλύσεις.

Κωδικός Δείγματος: 3-Ρομπολα-Κεφαλονια-Φαγιας

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁻ (Π)	[M-H] ⁻ (Θ)	Ένωση
1	3,061	1,168	338	-	368,9	-	Άγνωστη
2	4,026	3,682	266	-	723,4	-	Άγνωστη
3	6,875	1,412	261	-	288,9	-	Άγνωστη
4	7,483	0,968	274	273	146,7	148	Κινναμικό οξύ
5	9,561	4,296	215- 270	217- 270	168,3	170	Γαλλικό οξύ
6	11,965	2,253	220- 283	-	544,5	-	Άγνωστη
7	13,325	0,919	218- 264	-	575,5	-	Άγνωστη
8	13,541	0,957	217	-	330,9	332,2	Μονογαλοϋλογλυκόζη
9	13,744	1,421	220- 274	-	242,7	-	Άγνωστη
10	14,889	2,129	218- 278	220- 280	576,7	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
11	15,008	1,170	217- 277	220- 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
12	15,324	5,555	278	280	577,0	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
13	15,546	3,066	286- 328	217- 328	310,8	312,2	Καρφαρικό οξύ
14	15,972	1,094	218- 277	220- 280	865,7	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
15	16,486	1,254	220- 279	220- 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης

16	16,885	1,753	220- 277	220- 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
17	17,387	9,150	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
18	17,873	4,019	278- 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
19	18,374	2,005	223- 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
20	18,716	3,117	220- 277	-	729,0	730,0	Διμερές γαλλικής προανθοκυανιδίνης
21	19,120	3,577	219- 278	220- 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
22	19,255	1,200	222- 278	-	896,9	898,0	Τριμερές γαλλοκατεχίνη- γαλλοκατεχίνη-κατεχίνη
23	19,396	0,963	222- 278	280	577,0	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
24	20,364	0,926	224- 278	-	829,5	-	Άγνωστη
25	20,590	6,422	278	278	289,0	289,0	Επικατεχίνη
26	20,896	1,072	224- 278	-	488,9	-	Άγνωστη
27	23,181	0,720	226- 275	276	441,0	441,0	Επικατεχίνη γαλλικού οξέος
28	25,003	0,190	226	220- 309	163,0	164,0	π-κουμαρικό οξύ
29	30,576	4,239	225- 354	254- 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
30	31,136	3,425	226- 355	254- 356	609,1	610,5	Ρουτίνη
31	33,508	1,835	264- 348	265- 348	446,5	448,3	Γλυκοζίτης της καμφερόλης
32	34,277	6,253	265- 349	265- 348	446,9	448,3	Γλυκοζίτης της καμφερόλης
33	34,499	0,225	226- 350	253- 354	477,1	448,1	3-O- γλυκοζίδιο της ισορχαμεντίνης
34	37,755	0,187	373	371	301,0	302,2	Κερκετίνη

*Πειραματικό, *Θεωρητικό.

Αναλυτικότερα, το $[M-H]^- = 289$ m/z αποδόθηκε την (επι)-κατεχίνη, το $[M-H]^- = 441$ m/z στη μονομερή μορφή της (επι)-κατεχίνης του γαλλικού οξέως, το $[M-H]^- = 577$ m/z στο διμερές της (επι)-κατεχίνης, το $[M-H]^- = 729$ m/z στο διμερές της γαλλική προανθοκυανιδίνης και το $[M-H]^- = 865$ m/z σε τριμερές της προανθοκυανιδίνης (Wu *et al.*, 2003; Amico *et al.*, 2004; Pati *et al.*, 2006).

Με βάση τα χρωματογραφήματα LC-MS των πρότυπων ουσιών και της βιβλιογραφίας η κορυφή 13 με $R_t = 15,5$ min είχε $[M-H]^- = 310,8$ m/z και αποδόθηκε στο καφαρικό οξύ, λαμβάνοντας υπόψη και το μέγιστο απορρόφησης UV-Vis στα 217, 328 nm. Η ταυτοποίηση έγινε με πρότυπο διάλυμα καφαρικού οξέος αλλά και βιβλιογραφικά (Ellen Silva *et al.*, 2011).

Τα φάσματα των κορυφών 17 και 25 αποδόθηκαν στην κατεχίνη και την επικατεχίνη αντίστοιχα. Και οι δύο ενώσεις είχαν $[M-H]^- = 289$ m/z και UV-Vis στα 280 nm. Το $R_t = 17,3$ min αντιστοιχούσε σε κατεχίνη και το $R_t = 20,5$ min στην επικατεχίνη (Wu *et al.*, 2003; Amico *et al.*, 2004; Pati *et al.*, 2006). Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Shi *et al.*,

2003; Gomez-Alonso *et al.*, 2007) παρουσιάζουν τη σειρά έκλουσης για κατεχίνη και επικατεχίνη με τον ίδιο τρόπο που βρέθηκε σε αυτή τη μελέτη: η κατεχίνη εκλούστηκε πρώτη ακολουθούμενη από την επικατεχίνη.

Η κορυφή 27 με $R_t = 23,1$ min είχε $[M-H]^- = 441$ m/z και UV-Vis στα 226, 275 nm και αποδόθηκε στην επικατεχίνη του γαλλικού οξέως. Η κορυφή 28 με $R_t = 24,95$ min είχε $[M-H]^- = 163,04$ m/z και UV-Vis στα 220, 309 nm και αποδόθηκε στο π-κουμαρικό οξύ. Η κορυφή 30 με $R_t = 31,1$ min είχε $[M-H]^- = 609,1$ m/z και UV-Vis στα 226, 355 nm και αποδόθηκε στην ρουτίνη. Η κορυφή 32 με $R_t = 34,2$ min είχε $[M-H]^- = 446,9$ m/z και UV-Vis στα 226, 265, 349 nm και αποδόθηκε στον γλυκοζίτη της καμφερόλης. Η κορυφή 33 με $R_t = 34,4$ min είχε $[M-H]^- = 477,1$ m/z και UV-Vis στα 226, 350 nm και αποδόθηκε στην 3-O-γλυκοζίδιο της ισορχαμεντίνης. Τέλος η κορυφή 34 με $R_t = 37,7$ min είχε $[M-H]^- = 301,03$ m/z και UV-Vis στα 373 nm και αποδόθηκε στην κερκετίνη.

Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας υποδεικνύουν ότι η πρώτη κορυφή (1) με $R_t = 7,4$ min και $[M-H]^- = 147$ m/z, αποδόθηκε στο κινναμικό οξύ, λαμβάνοντας και το μέγιστο απορρόφησης UV-Vis στα 274 nm (Ribeiro *et al.*, 2015).

Η πέμπτη κορυφή (5) με $R_t = 9,5$ min είχε $[M-H]^- = 168,3$ m/z και UV-Vis στα 215, 270 nm και αποδόθηκε στο γαλλικό οξύ (Chedea *et al.*, 2010).

Η ογδόη κορυφή (8) με $R_t = 13,5$ min είχε $[M-H]^- = 330,9$ m/z και UV-Vis 217 nm και συσχετίστηκε με την υδρολύσιμη τανίνη μονογαλοϋλογλυκόζη (Soong *et al.*, 2005; Meyers *et al.*, 2006).

Οι κορυφές 11, 15, 16, και 23 με $R_t = 15$ min, $R_t = 16,4$ min, $R_t = 16,8$ min και $R_t = 19,3$ min αντίστοιχα είχαν $[M-H]^- = 557$ m/z και μπόρεσαν να συσχετιστούν με την παρουσία διμερούς προκυανιδίνη (Tomaz *et al.*, 2015). Στα εκχυλίσματα στεμφύλων, τα διμερή ονομάζονται προκυανιδίνες τύπου (B). Οι Sun και Miller (2003) ταξινόμησαν με την ακόλουθη σειρά: B₃, B₁, B₄ και B₂ τη σειρά έκλουσης τους. Επίσης ανέφεραν τα επόμενα R_t για τις προαναφερθείσες ενώσεις: (5,5, 6,1, 9,5 και 16,5) min. Οι προκυανιδίνες τύπου (B) συνδέονται κυρίως μέσω του δεσμού C₄ → C₈, αλλά υπάρχει και ο δεσμός C₄ → C₆, ενώ η διπλή σύνδεση με έναν επιπλέον αιθερικό δεσμό μεταξύ C₂ → O₇ δίνει τον τύπο (A). Οι προανθοκυανιδίνες που αποτελούνται αποκλειστικά από (επί)-κατεχίνη είναι προκυανιδίνες.

Η κορυφές 10, 12, 14, 18, 21 με $R_t = 14,8$ min, $R_t = 15,3$ min $R_t = 15,9$ min και $R_t = 17,8$ min $R_t = 19,1$ min αντίστοιχα είχαν $[M-H]^- = 865$ m/z και UV-Vis στα 218, 277 nm. Μπόρεσαν να συσχετιστούν με την παρουσία τριμερικών προανθοκυανιδινών στο εκχύλισμα. Ο κατακερματισμός αυτής της ένωσης, πιθανότατα λόγω ιονισμού, έδωσε

κορυφές επίσης ως διμερές προκυανιδίνης με $[M-H]^- = 557$ m/z και $[M-H]^- = 451$ m/z. Οι Sun και Miller (2003) ανέφεραν ότι το $[M-H]^- = 557$ m/z και $[M-H]^- = 451$ m/z είναι ένα συγκεκριμένο θραύσμα ιόν για φυσικά διμερή 3-φλαβονολών.

Η κορυφή 20 με $R_t = 18,7$ min, είχε $[M-H]^- = 729$ m/z και UV-Vis στα 220, 277 nm, συσχετίστηκε με την διμερή γαλλική προανθοκυανιδίνη (Chedea *et al.*, 2010).

Η κορυφή 22 με $R_t = 19,2$ min, είχε $[M-H]^- = 896,9$ m/z και UV-Vis στα 222, 278 nm, συσχετίστηκε με την γαλλοκατεχίνη-γαλλοκατεχίνη-κατεχίνη (Friedrich *et al.*, 2000).

Η κορυφή 29 με $R_t = 30,5$ min, είχε $[M-H]^- = 476,9$ m/z και UV-Vis στα 225, 254, 354 nm, συσχετίστηκε με το 3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης (Makris *et al.*, 2013; Ellen Silva *et al.*, 2011; Noelia Castillo *et al.*, 2009)

Η κορυφή 31 με $R_t = 33,5$ min, είχε $[M-H]^- = 446,5$ m/z και UV-Vis στα 226, 264, 348 nm, συσχετίστηκε με τον γλυκοζίτης της καμφερόλης (Ellen Silva *et al.*, 2011; Noelia Castillo *et al.*, 2009).

Τέλος υπήρξαν κορυφές οι οποίες δεν ταυτοποιήθηκαν και ορίστηκαν σαν άγνωστες.

E.6 Φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων των στεμφύλων με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR και της τεχνικής DRIFTS

E.6.1 Ανάλυση κονιορτοποιημένων δειγμάτων με την τεχνική DRIFTS

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο FT-IR (Thermo Nicolet 7600) της εταιρίας Thermo Scientific, συνδεδεμένο με Η/Υ μέσω του προγράμματος OMNIC 7.3
- Υποδοχέας DRIFTS
- KBr (βρωμιούχο καλίο)

Αρχή μεθόδου

Η υπέρυθη φασματοσκοπία βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Η προέλευση των απορροφήσεων στο IR φάσμα είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου (Παπιάς, 2000).

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, έγινε άλεση του φυτικού υλικού ώστε να είναι όσο το δυνατόν πιο ομογενές και ομοιόμορφο το δείγμα και να δώσει πιο αντιπροσωπευτικό φάσμα. Τα φάσματα FT-IR με την τεχνική DRIFTS ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο υπέρυθρου Thermo Nicolet 7600. Το όργανο ήταν συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή με ειδικό λογισμικό OMNIC 7.3 για την επεξεργασία τους.

Πριν από την ανάλυση κάθε δείγματος έγινε καταγραφή του υποβάθρου (background), το οποίο κατέγραψε τις συνθήκες του περιβάλλοντα χώρου, οι οποίες στη συνέχεια θα ληφθούν υπόψη κατά το μετασχηματισμό Fourier με τη χρήση του Η/Υ στο τελικό φάσμα IR κάθε δείγματος. Ως φάσμα υποβάθρου λαμβανόταν το φάσμα του βρωμιούχου καλίου, το οποίο δεν απορροφά την υπέρυθη ακτινοβολία. Ακολούθησε προσεκτική τοποθέτηση του κονιορτοποιημένου φυτικού υλικού στον υποδοχέα του εξαρτήματος, η τοποθέτηση του στο όργανο και η καταγραφή του φάσματος κάθε δείγματος. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν τρία φάσματα και ανά τρία φάσματα κάθε φορά, λαμβανόταν το υπόβαθρο (background) με βρωμιούχο κάλιο ως φάσμα αναφοράς (υποβάθρου). Ακόμη,

σε κάθε δείγμα γίνονταν 100 «σαρώσεις», η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου ήταν (4 cm^{-1}), ενώ η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου του συμβολόμετρου ήταν $0,3165\text{ mm/s}$.

Κατά τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε υποδοχέας δείγματος που φέρει καψίδιο. Στις Εικόνες 43 και 44 φαίνεται το φασματοφωτόμετρο IR και ο υποδοχέας δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Τα φάσματα FT-IR των κονιοποιημένων δειγμάτων στεμφύλων, ελήφθησαν με την τεχνική DRIFT (4000 έως 400 cm^{-1}), αποκόπηκε η κορυφή του διοξειδίου του άνθρακα, εξομαλύνθηκαν (λειτουργία αυτόματης εξομάλυνσης) και έγινε διόρθωση της βασικής τους γραμμής (λειτουργία αυτόματης διόρθωσης). Τέλος, υπολογίστηκε ο μέσος όρος τριών φασμάτων με χρήση της λειτουργίας Statistical spectra του λογισμικού του οργάνου και κανονικοποιήθηκε η κλίμακά τους. Όλες οι επεξεργασίες των φασμάτων πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού (OMNIC 7.3) που συνοδεύει το φασματοφωτόμετρο.



Εικόνα 43: Το φασματοφωτόμετρο FT-IR που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις.

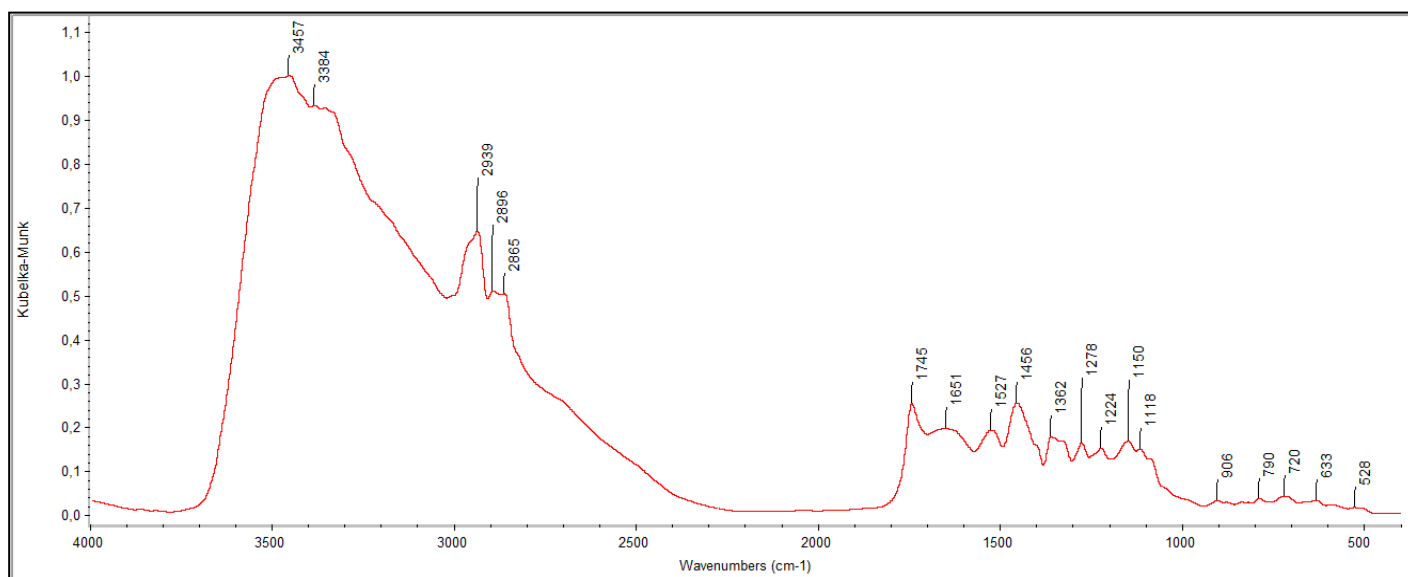


Εικόνα 44: Υποδοχέας δείγματος που φέρει καψίδιο.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στην εικόνα 45 φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό μέσο FT-IR φάσμα στεμφύλων, ποικιλία Ρομόλα προερχόμενο από την Κεφαλονιά. Στο Παράρτημα (Ε) απεικονίζονται τα μέσα FT-IR φάσματα και των υπόλοιπων δειγμάτων.

Στον Πίνακα 21 φαίνονται οι αποδόσεις των κορυφών του παραπάνω αντιπροσωπευτικού φάσματος.



Εικόνα 45: Φάσμα FT-IR στεμφύλων ποικιλίας Ρομόλα Κεφαλονιάς καταγεγραμμένο με την τεχνική DRIFT.

Από τα φάσματα και τον Πίνακα 21, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους με κορυφές σε όλες τις κύριες φασματικές περιοχές. Τα δείγματα αποτελούνται από νερό, πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις και φλαβονοειδή.

Το νερό είναι ένας σημαντικός παράγοντας απορρόφησης στην φασματική περιοχή MIR και μπορεί να παρεμβαίνει στον προσδιορισμό άλλων συστατικών που υπάρχουν στα συστήματα τροφίμων.

Οι πρωτεΐνες εμφανίζονται ως ομάδες αμιδίου I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) και αμιδίου II ($1565-1520\text{ cm}^{-1}$). Στην παρούσα μελέτη οι κορυφές που σχετίζονται με την πρωτεΐνη είναι στα 1651 cm^{-1} και 1745 cm^{-1} για το αμίδιο I (Karoui *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα οι κορυφές αντιπροσωπεύουν τη δόνηση τάσης (stretching) του καρβονυλίου (αμίδιο I) που έχουν να κάνουν σχέση με τον πεπτιδικό δεσμό, τους εστέρες, πολυεστέρες και τις πηκτίνες (Nogales-Bueno *et al.*, 2017). Επίσης η κορυφή στα 1527 cm^{-1} για το αμίδιο II

αντιπροσωπεύει την τάση του C-N συνδυασμένη με την κάμψη του (N-H) του πεπτιδικού δεσμού (αμίδιο II). Επιπρόσθετος η κορυφή στα 1456 cm^{-1} αντιστοιχεί στην τάση (C-N) του πεπτιδικού δεσμού (amide III). Τέλος μια άλλη κορυφή απορρόφησης που σχετίζεται με την πρωτεΐνη, συνήθως, παρατηρείται γύρω 3290 cm^{-1} ως ευρεία κορυφή (δόνηση τάσης του (C-N) (Karoui *et al.*, 2010).

Πίνακας 21: Οι βασικές κορυφές του φάσματος FT-IR κονιορτοποιημένων στεμφύλων.

Κοματαριθμοί (cm^{-1})	Λειτουργική Ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης	Ένταση
~ 3454	O-H	Σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, κουτίνη	Τάσης	Πολύ ισχυρή
~ 3290	C-N (amide)	Πρωτεΐνες	Τάσης	Πολύ ισχυρή
~ 2934	C-H (-CH ₂)	Λιπίδια	Συμμετρική δόνηση τάσης	Ισχυρή
~ 2860	C-H (-CH ₂)	Λιπίδια	Ασύμμετρη δόνηση τάσης	Ισχυρή
~ 1745	C=O -COOR	Εστεροποιημένες πηκτίνες, Δεσμοί εστέρα τριγλυκεριδίων, Πεπτιδικός δεσμός (amide I)	Δόνηση τάσης	Μέτρια
~ 1651	C=O, -COO ⁻	Μη εστεροποιημένες πηκτίνες, Δεσμοί εστέρα τριγλυκεριδίων, Πεπτιδικός δεσμός (amide I)	Δόνηση τάσης, Ασύμμετρη τάση	Πολύ Μέτρια
~ 1527	C-N, N-H	Πεπτιδικός δεσμός (amide II)	Δόνηση τάσης, Κάμψη	Μέτρια
~ 1456	C-N, -CH ₂	Πεπτιδικός δεσμός (amide III) Λιπίδια (Λιπαρά οξέα)	Δόνηση τάσης, Κάμψη	Μέτρια
~ 1362	-CH ₃	Λιπίδια (Λιπαρά οξέα)	Συμμετρική κάμψη	Μέτρια
~ 1278	C-O-C	Εστέρες	Ασύμμετρη τάση	Μέτρια
~ 1224	O-H		Παραμόρφωση	Μέτρια
~ 1150	C-O, C-O-C	Σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, (κυτταρίνη, πηκτίνες)	Αντισυμμετρική δόνηση τάσης, Συμμετρική τάση	Μέτρια
~ 1118	C-O-C	Σάκχαρα, πηκτίνες	Δόνηση τάσης	Πολύ Μέτρια
~ 906	=CH ₂ (>C=CH-)		Εκτός επιπέδου παραμόρφωση	Αδύναμη
~ 790	C-C		Τάσης	Αδύναμη
~ 720	-CH ₂ -	Κήροι, κουτίνη	Αιώρηση	Αδύναμη
~ 633	C-H	Αρωματικού δακτυλίου έξω από το επίπεδο κάμψης	Κάμψη	Πολύ Αδύναμη

Οι κορυφές που σχετίζονται με τα λιπαρά συστατικά, τους κηρούς και τα πολυμερή τους, εμφανίζονται στα 1456 cm^{-1} και 1362 cm^{-1} και αντιπροσωπεύουν δονήσεις κάμψης του μεθυλενίου και συμμετρική δόνηση κάμψης των ομάδων μεθυλίου των λιπαρών οξέων αντίστοιχα (Nogales-Bueno *et al.*, 2017). Οι κορυφές που σχετίζονται με τους δεσμούς εστέρα τριγλυκεριδίων είναι η $1118 - 1150\text{ cm}^{-1}$ (C-O) και η 1745 cm^{-1} (C=O) (Karoui *et al.*, 2010). Τέλος οι κορυφές 2939 cm^{-1} και 2896 cm^{-1} σχετίζονται με τα

λιπαρά συστατικά (Nogales-Bueno *et al.*, 2017) και πιο συγκεκριμένα με τις δονήσεις τάσεις των αρωματικών και μη αρωματικών C-H (-CH₂) (Karoui *et al.*, 2010).

Οι ημικυτταρίνες απορροφούν στα 1732 cm⁻¹, 1240 cm⁻¹. Η κυτταρίνη στα 1170- 1150 cm⁻¹, 1050 cm⁻¹, 1030 cm⁻¹. Η λιγνίνη περίπου στα 1510 cm⁻¹. Οι πηκτίνες στα 1680-1600 cm⁻¹, 1260 cm⁻¹, 955 cm⁻¹ (Karoui *et al.*, 2010).

Τα σάκχαρα και πολυσακχαριδια απορροφούν στην ζώνη περίπου στα 3454 cm⁻¹ που αποδίδεται στη δόνηση τάσης υδροξυλικών ομάδων που αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου. Η ένταση αυτής της ζώνης εξαρτάται από το κλάσμα πολυσακχαριτών (Heredia-Guerrero *et al.*, 2014). Η κορυφή στα 1150 cm⁻¹ εμφανίζονται οι απορροφήσεις της αντισυμμετρικής δόνησης τάσης του (C-O) των πολυσακχαριτών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνη ή πηκτίνες) και σε ασύμμετρες δονήσεις τάσεις που οφείλονται σε εστέρες (C-O-C) και συνδέονται με τη κουτίνη (Guerrero *et al.*, 2014). Τέλος η κορυφή στα 1118 cm⁻¹ αποδίδεται δόνησης τάσης του σκελετού (C-O-C) των σακχάρων, πολυσακχαριτών (Nogales-Bueno *et al.*, 2017).

Οι ζώνες στα 720, 1456, 2860 και 2934 cm⁻¹ οφείλονται σε λίκνιση (rocking), ψαλιδισμό (scissoring) και συμμετρική, ασύμμετρη τάση του μεθυλενίου, αντίστοιχα. Αυτές οι ζώνες αποδίδονται στην κουτίνη (Guerrero *et al.*, 2014).

Στη συνέχεια, οι κορυφές στα 1745 cm⁻¹ (τάση της καρβοξυλικής ομάδας, (C=O)) και 1651 cm⁻¹ (ασύμμετρη τάση COO⁻) αποδίδονται αντίστοιχα σε εστεροποιημένες πηκτίνες και πηκτίνες με ιοντισμένο καρβοξύλιο (COO⁻). Ο βαθμός εστεροποίησης των πηκτινών επηρεάζει την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος (Hanlin *et al.*, 2010). Η υψηλή ένταση της ζώνης γύρω στα 1745 cm⁻¹ και η χαμηλή ένταση της ζώνης γύρω στα 1660 cm⁻¹ υποδηλώνουν υψηλό βαθμό εστεροποίησης των πηκτινών. Η κορυφή στα 633 cm⁻¹ αντιστοιχεί σε εκτός επιπέδου κάμψεις των C-H αρωματικών δακτυλίων (Bancuta *et al.*, 2015; Fernandez *et al.*, 2007).

E.7 Φασματοσκοπική μελέτη των δειγμάτων των στεμφύλων με χρήση της φασματοσκοπίας Raman

Όργανα

- Φασματοφωτομετρο Vis-Raman (768 nm) DeltaNu της εταιρίας Advantage NIR
- Σωλήνες τύπου NMR

Αρχή μεθόδου

Η φασματοσκοπία Raman βασίζεται στο φαινόμενο της σκέδασης δέσμης φωτός καθώς αυτή αλληλεπιδρά με την ύλη. Το Raman είναι συμπληρωματικό του FT-IR.

Αναλυτική πορεία

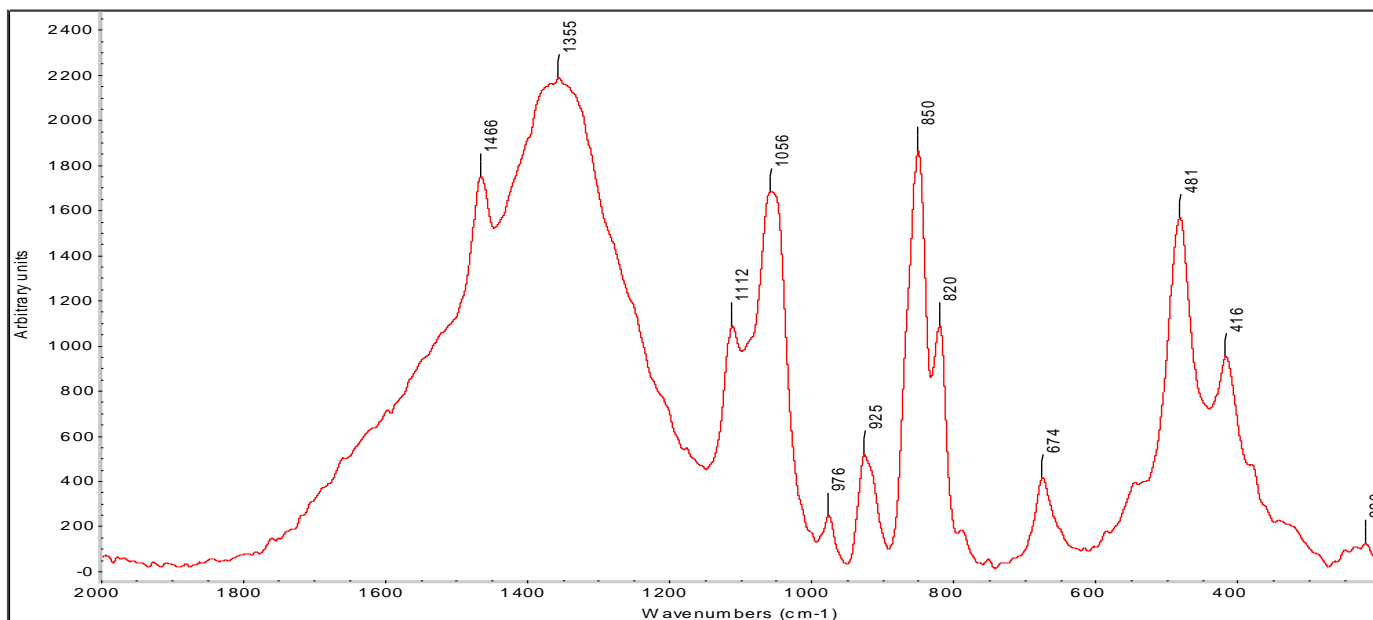
Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Vis-Raman (768 nm) (Εικόνα 46) το οποίο συνοδευόταν από το λογισμικό NuSpec. Τα εκχυλίσματα τοποθετούνταν σε σωλήνες τύπου NMR. Οι παράμετροι καταγραφής των φασμάτων ήταν: χρόνος ολοκλήρωσης καταγραφής του φάσματος 10 s και απαιτούμενος αριθμός φασμάτων 10, δηλαδή καταγράφονταν 10 φάσματα σε συνολικό χρόνο 10 s και το τελικό φάσμα προέκυπτε από τα 10 φάσματα. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν τρία φάσματα. Όλα τα φάσματα Raman που ελήφθησαν, εξομαλύνθηκαν και έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής. Οι επεξεργασίες αυτές έγιναν με τη βοήθεια των λειτουργιών «αυτόματης εξομάλυνσης» και της «αυτόματης διόρθωσης της βασικής γραμμής». Τέλος, με χρήση της λειτουργίας Statistical Spectra, λήφθηκε ο μέσος όρος τριών φασμάτων για κάθε δείγμα από τα τρία αρχικά φάσματα και το μέσο φάσμα κανονικοποιήθηκε. Οι επεξεργασίες των φασμάτων έγιναν με χρήση του λογισμικού (OMNIC 7.3).



Εικόνα 46: Το φασματοφωτόμετρο Raman που χρησιμοποιήθηκε.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στην Εικόνα 47 φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα Raman εκχυλίσματος της ποικιλίας Ρομπόλα προερχόμενο από την Κεφαλονιά ενώ στο Παράρτημα (Z) ακολουθούν τα φάσματα και των υπόλοιπων δειγμάτων.



Εικόνα 47: Φάσμα Raman προερχόμενου από στέμφυλα ποικιλίας Ρομπόλα Κεφαλονιάς.

Στον Πίνακα 22 φαίνονται αναλυτικά οι κυριότερες κορυφές, που παρατηρήθηκαν στα φάσματα Raman, καθώς και οι αποδόσεις τους. Κατ'αρχάς παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους με κορυφές σε όλες τις κύριες φασματικές περιοχές.

Τα δείγματα αποτελούνταν από φαινολικές ενώσεις που διακρίνονται στις μη φλαβονοειδείς φαινόλες και στις φλαβονοειδείς φαινόλες. Πιο συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα περιείχαν φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, φλαβανόνες, τανίνες, και ανθοκυάνες.

Η περιοχή περίπου στα 1850 cm^{-1} οφείλεται στην τάση του καρβονυλίου. Γενικά στην περιοχή ($1680\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) οι κορυφές οφείλονται στις ενυπάρχουσες φαινόλες. Η απορρόφηση στους ($1640\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$) πιθανόν να έχει σχέση με την δόνηση τάσης του αρωματικού C=C των ανθοκυανών. Η κορυφή στα 1466 cm^{-1} αντιπροσωπεύει την κάμψη των (C-H) των (-CH₂-) και (-CH₃) αλειφατικών ομάδων. Η κορυφή στα 1379 cm^{-1} έως 1359 cm^{-1} αποδίδεται στην κάμψη (C-H), (-CH₃) και (O-H). Οι ζώνες αυτές μπορούν να αποδοθούν σε φαινόλες.

Πίνακας 22: Οι βασικές κορυφές του φάσματος Raman κονιορτοποιημένων στεμφύλων.

Κυματριθμοί (cm^{-1})	Λειτουργική Ομάδα	Αποδόσεις	Τρόπος Δόνησης	Ένταση
~ 219	C-H	Αλκάνια	Στρέβλωση	Αδύναμη
~ 341	Βενζόλιο	Μονοάλκυλο ακετυλένια	Στρέβλωση	Πολύ Αδύναμη
~ 416	Βενζόλιο	Μονοϋποκατεστημένα βενζόλια	Δόνηση τάσης	Μέτρια
~ 483	Βενζόλιο	Τρισυποκατεστημένα βενζόλια	Δόνηση τάσης	Ισχυρή
~ 673	C=O	Μονοϋποκατεστημένα βενζόλια	Στρέβλωση	Αδύναμη
~ 786	C-C, -CH ₂	π – υποκατεστημένα βενζόλια	Δόνηση τάσης	Πολύ Αδύναμη
~ 819	-CH ₂	π – υποκατεστημένα βενζόλια	Δόνηση τάσης	Ισχυρή
~ 850	C-C	Αλκάνια	Δόνηση τάσης	Ισχυρή
~ 924	C-CH ₃	Αλκάνια εκτός επιπέδου κάμψης	Δόνηση τάσης	Πολύ Αδύναμη
~ 975	C-CH ₃	Αλκάνια	Δόνηση τάσης	Αδύναμη
~ 1058	Βενζόλιο	διϋποκατεστημένα παράγωγα βενζολίου	Δόνηση τάσης	Ισχυρή
~ 1112	C-C, C-O	Αλκάνια , Σάκχαρα	Δόνηση τάσης	Μέτρια
~ 1364	C-H, -CH ₃ , -OH,	Αλειφατική ομάδα αλκανίων, Φαινόλες	Κάμψη	Πολύ ισχυρή
~ 1466	C-H, -CH ₃ , C=C	Αλειφατική ομάδα αλκανίων, Φαινόλες	Κάμψη	Ισχυρή
~ 1628	C=C	Αλκένια, Αρωματικός δακτύλιος	Δόνηση τάσης	Αδύναμη
~ 1849	C=O	5-μελείς κυκλικοί ανυδρίτες	Δόνηση τάσης	Αδύναμη

Η κορυφή στα 1116 cm^{-1} έως 1112 cm^{-1} αντιστοιχεί στην δόνηση τάσης ανθρακικού σκελετού (C-C), δόνηση τάσης (C-O) (Fragoso *et al.*, 2011), και αρωματικά (C-H) επί του επιπέδου κάμψης (Ping *et al.*, 2012) και αποδίδεται σε σάκχαρα και κορεσμένους υδρογονάνθρακες. Η κορυφή στα 1058 cm^{-1} αποδίδεται στην κάμψη (C-C) πολυσακχαριτών (Kacurakova *et al.*, 2000), και στην δόνηση τάσης (C-O) (Ping *et al.*, 2012).

Η κορυφή στα 974 cm^{-1} αποδίδεται στο αρωματικό (C-H) και στους (1→3) γλυκοζιτικούς δεσμούς των πολυσακχαριτών (Kacurakova *et al.*, 2000; Boulet *et al.*, 2007). Η κορυφή στα 920 cm^{-1} αποδίδεται στο αρωματικό C-H εκτός επιπέδου κάμψης. Η κορυφή στα 870 έως 868 cm^{-1} αποδίδεται στον β -γλυκοζιτικό δεσμό (Kacurakova *et al.*, 2000). Η κορυφή στα 825 cm^{-1} αποδίδεται στον α -γλυκοζιτικό δεσμό (Kacurakova *et al.*, 2000), στην αρωματική τάση (C-H) (Fernandez *et al.*, 2007). Η απορρόφηση (777 – 774 cm^{-1}) αποδίδεται στη εκτός επιπέδου τάση των αρωματικών (C-H) (Foo, 1981; Fernandez *et al.*, 2007). Τέλος η κορυφή στα 650 cm^{-1} αντιστοιχεί στην εκτός επιπέδου κάμψη των αρωματικών C-H (Bancuta *et al.*, 2015, Fernandez *et al.*, 2007).

E.8 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu (TF)

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Φασματόμετρο UV-Vis μοντέλο Jasco V-550, ρυθμισμένου στα 725 nm
- Πιάτο με βοθρία (12-well plate)
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000 g)
- Αυτόματες πιπέτες (100-1000 μL) και (10-100 μL)
- Κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής (1cm)
- Tips
- Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL
- Καφεϊκό οξύ
- Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας
- Απιονισμένο νερό

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος Folin–Ciocalteu είναι μια φωτομετρική μέθοδος που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1998). Χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών ή μεγαλύτερων φαινολικών συστατικών. Το κύριο αντιδραστήριο της μεθόδου, το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu, είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων προς μίγμα οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαινίου, χαρακτηριστικού κυανού χρώματος. Πιστεύεται ότι το μολυβδαίνιο ανάγεται πιο εύκολα σε σύμπλοκο και ότι μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου λαμβάνει χώρα (Huang *et al.*, 2005).

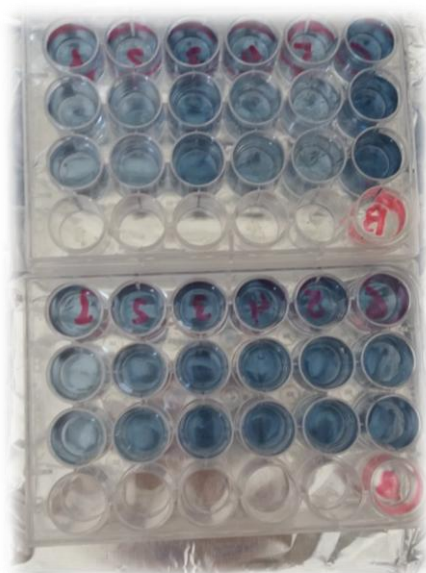
Το σχηματιζόμενο κυανό χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση περίπου στα 725 nm και είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων. Οι φαινολικές ουσίες εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

Αναλυτική πορεία

Σε πιάτο με βοθρία προστέθηκε 1,5 mL απιονισμένο νερό, 25 μL δείγματος και 125 μL από το αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu και αναδεύτηκαν καλά. Μετά το πέρας 3 min προστέθηκαν 375 μL διαλύματος ανθρακικού νατρίου, προκειμένου να δημιουργηθεί αλκαλικό περιβάλλον και να λάβει χώρα η αντίδραση. Προστέθηκαν 475 μL απιονισμένο νερό (Εικόνα 49). Μετά από επώαση 2 h στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C), μετρήθηκαν οι απορροφήσεις στα 725 nm με το φασματόμετρο (Εικόνα 48). Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με διάλυμα που παρασκευάζεται με την ίδια διαδικασία, μόνο που αντί για δείγμα προστέθηκε μεθανόλη. Οι φαινολικές ουσίες εκφράστηκαν σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος.



Εικόνα 48: Φασματόμετρο υπεριώδους- ορατού UV-Vis μοντέλο Jasco V-550.



Εικόνα 49: Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu (χαρακτηριστικός μεταχρωματισμός των δειγμάτων έπειτα από την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu).

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως παραπάνω (μέτρηση απορροφήσεων τους, καταγραφή αποτελεσμάτων κλπ). Στην παρακάτω Εικόνα 50 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη καφεϊκού οξέος. Με βάση αυτήν υπολογίστηκε η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών εκφρασμένα ως (mg/mL) καφεϊκού οξέος. Στην συνέχεια η περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες (Y_{TP}) προσδιορίστηκε σε mg καφεϊκού οξέος ανά g ξηρού βάρους (dw) με τη χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$Y_{TP} \left(\frac{mg \text{ καφεϊκού οξέος}}{g \text{ ξηρού βάρους}} \right) = C_{TP} \times \frac{V}{m}$$

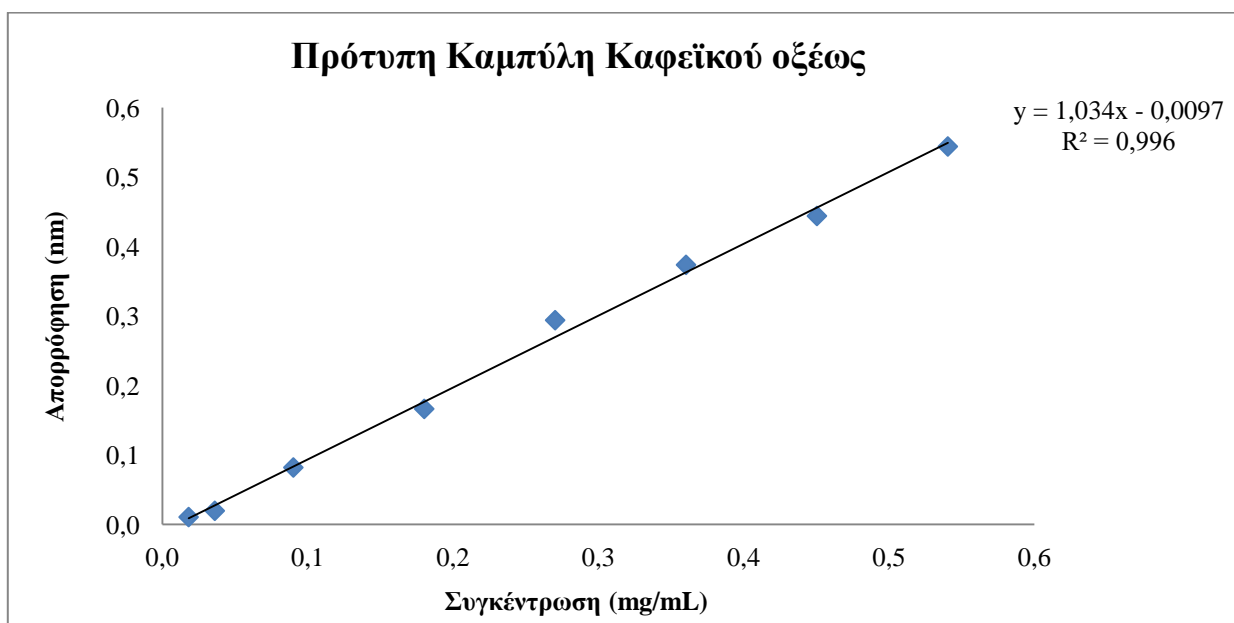
Όπου,

Y_{TP} : Περιεκτικότητα εκφρασμένη ως mg καφεϊκού οξέος ανά g ξηρού βάρους

C_{TP} : Περιεκτικότητα εκφρασμένη ως mg καφεϊκού οξέος ανά mL εκχυλίσματος

V: Ο όγκος του εκχυλίστη (νερό-γλυκερόλη) σε (mL) και

m: Το ξηρό βάρος του φυτικού υλικού σε (g) που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση.



Εικόνα 50: Καμπύλη βαθμονόμησης καφεϊκού οξέος για χρήση στη δοκιμή Folin-Ciocalteu.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Στον Πίνακα 23 και 24 παραθέτονται τα αποτελέσματα του μέσου ορού των τριών απορροφήσεων και της περιεκτικότητας και σε ολικά φαινολικά συστατικά, αναγόμενα

επί ξηρού βάρους, των ακατέργαστων και υδρολυμένων εκχυλισμάτων στεμφύλων από διάφορες ποικιλίες. Στα αποτελέσματα έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση (SD). Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης είναι εκφρασμένα ως mg/ mL καφεϊκού οξέως, ενώ της απόδοσης ως (mg) καφεϊκού οξέως ανά (g) φυτικού υλικού.

Πίνακας 23: Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών στα ακατέργαστα δείγματα.

Δείγμα	$A_{725} \pm SD$	$C_{TP} \text{ (mg/ mL)} \pm SD$	$Y_{TP} \text{ (mg/ g)} \pm SD$
03-Ρομπόλα-Κεφ.	0,200 ± 0,010	0,202 ± 0,019	12,15 ± 1,16
06-Ρομπόλα-Κεφ.	0,212 ± 0,008	0,214 ± 0,017	12,86 ± 1
07-Ρομπόλα-Κεφ.	0,359 ± 0,004	0,357 ± 0,013	21,39 ± 0,8
09-Ρομπόλα-Κεφ.	0,272 ± 0,003	0,272 ± 0,012	16,35 ± 0,73
10-Ρομπόλα-Κεφ.	0,209 ± 0,003	0,212 ± 0,012	12,69 ± 0,72
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	0,436 ± 0,010	0,452 ± 0,019	27,14 ± 1,14
12-Ρομπόλα-Κεφ.	0,182 ± 0,011	0,186 ± 0,020	11,14 ± 1,21
13-Ρομπόλα-Κεφ.	0,290 ± 0,013	0,290 ± 0,022	17,37 ± 1,33
14-Αγουστιάτης-Ζάκθ.	0,342 ± 0,004	0,340 ± 0,013	20,43 ± 0,78
15-Παύλος-Ζάκθ.	0,368 ± 0,005	0,365 ± 0,014	21,92 ± 0,85
16-Άγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	0,380 ± 0,011	0,377 ± 0,020	22,61 ± 1,22
17-Άγ-Κατσ-Ζάκθ.	0,338 ± 0,012	0,337 ± 0,021	20,20 ± 1,27
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	0,381 ± 0,005	0,325 ± 0,014	19,48 ± 0,85
19-Cabernet-Κέρκ.	0,571 ± 0,002	0,562 ± 0,011	33,70 ± 0,65

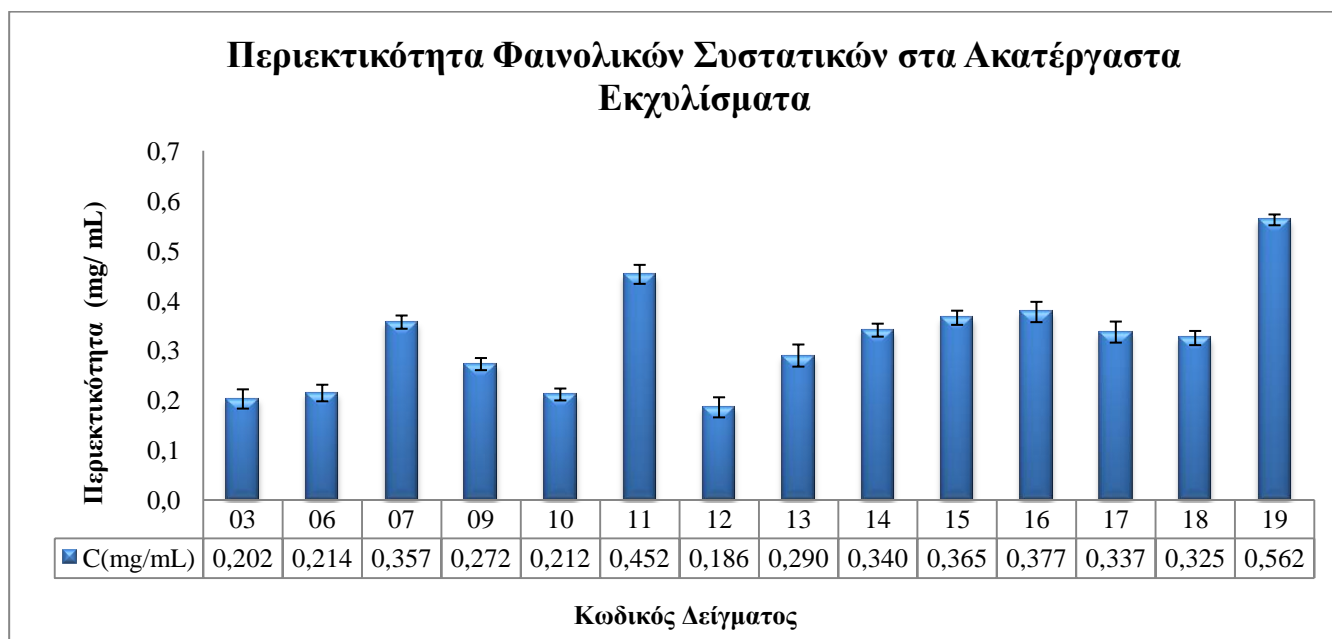
Πίνακας 24: Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των φαινολικών στα υδρολυμένα δείγματα.

Δείγμα	$A_{725} \pm SD$	$C_{TP} \text{ (mg/ mL)} \pm SD$	$Y_{TP} \text{ (mg/ g)} \pm SD$
03-Ρομπόλα-Κεφ.	0,025 ± 0,002	0,033 ± 0,011	1,99 ± 0,66
06-Ρομπόλα-Κεφ.	0,026 ± 0,000	0,034 ± 0,010	2,04 ± 0,59
07-Ρομπόλα-Κεφ.	0,049 ± 0,001	0,056 ± 0,010	3,38 ± 0,59
09-Ρομπόλα-Κεφ.	0,030 ± 0,002	0,038 ± 0,011	2,30 ± 0,65
10-Ρομπόλα-Κεφ.	0,019 ± 0,005	0,028 ± 0,014	1,68 ± 0,85
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	0,039 ± 0,001	0,047 ± 0,010	2,83 ± 0,62
12-Ρομπόλα-Κεφ.	0,012 ± 0,001	0,021 ± 0,010	1,28 ± 0,61
13-Ρομπόλα-Κεφ.	0,037 ± 0,000	0,045 ± 0,009	2,71 ± 0,56
14-Αγουστιάτης-Ζάκθ.	0,048 ± 0,001	0,056 ± 0,010	3,35 ± 0,62
15-Παύλος-Ζάκθ.	0,023 ± 0,004	0,031 ± 0,013	1,88 ± 0,80
16-Άγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	0,025 ± 0,003	0,033 ± 0,012	1,99 ± 0,72
17-Άγ-Κατσ-Ζάκθ.	0,039 ± 0,005	0,047 ± 0,014	2,81 ± 0,84
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	0,039 ± 0,002	0,047 ± 0,012	2,81 ± 0,70
19-Cabernet-Κέρκ.	0,051 ± 0,001	0,058 ± 0,010	3,50 ± 0,61

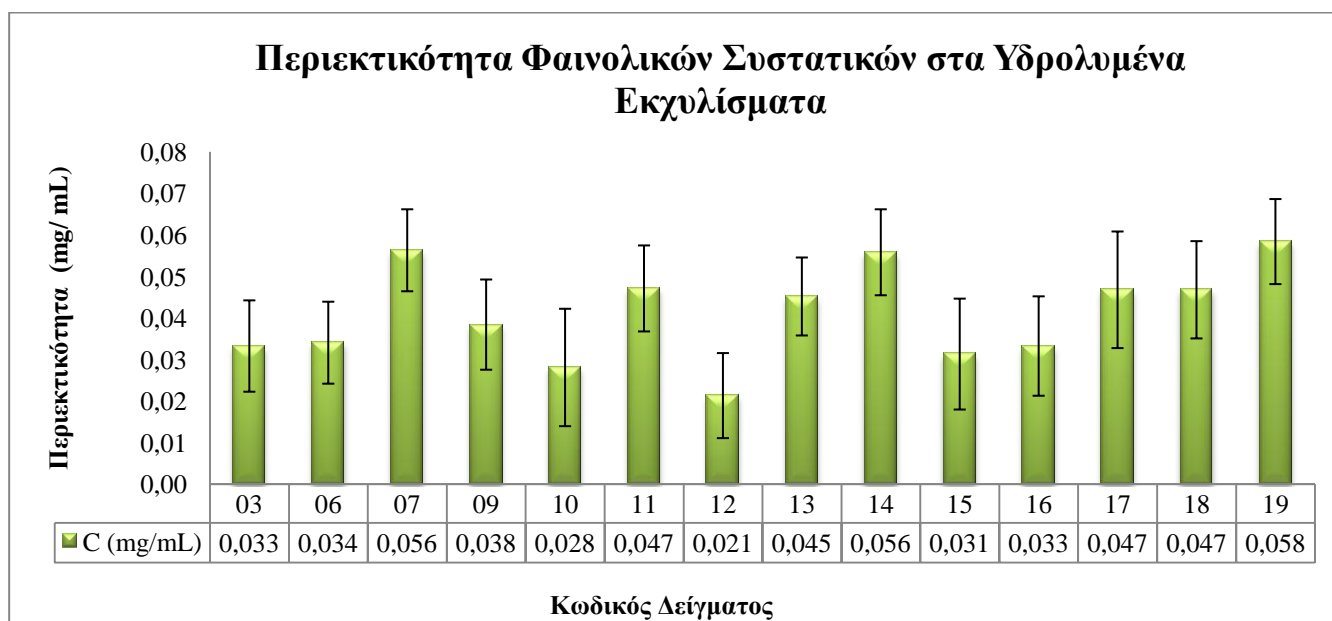
Στις παρακάτω Εικόνες 51, 52, 53, 54 και 55 παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές των ολικών φαινολικών συστατικών των ακατέργαστων και υδρολυμένων εκχυλισμάτων.

Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά συστατικά, σε σχέση με τα υπόλοιπα χημικά συστατικά των στεμφύλων, ποικίλει βάση του γένους, της ποικιλίας και των

καλλιεργητικών και εδαφολογικών συνθηκών που επικρατούν. Ακόμη περισσότερο, τα ολικά φαινολικά συστατικά των στεμφύλων έχουν άμεση σχέση με τα βοτανικά χαρακτηριστικά μέσα στο γένος, ιδιαίτερα με το χρώμα των σπερμάτων. Τα έγχρωμα σπέρματα περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα λευκά, καθώς οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή, ανθοκυάνες) είναι οι βασικές χρωστικές των σπερμάτων.



Εικόνα 51: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα εκχυλίσματα.



Εικόνα 52: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα υδρολυμένα εκχυλίσματα.

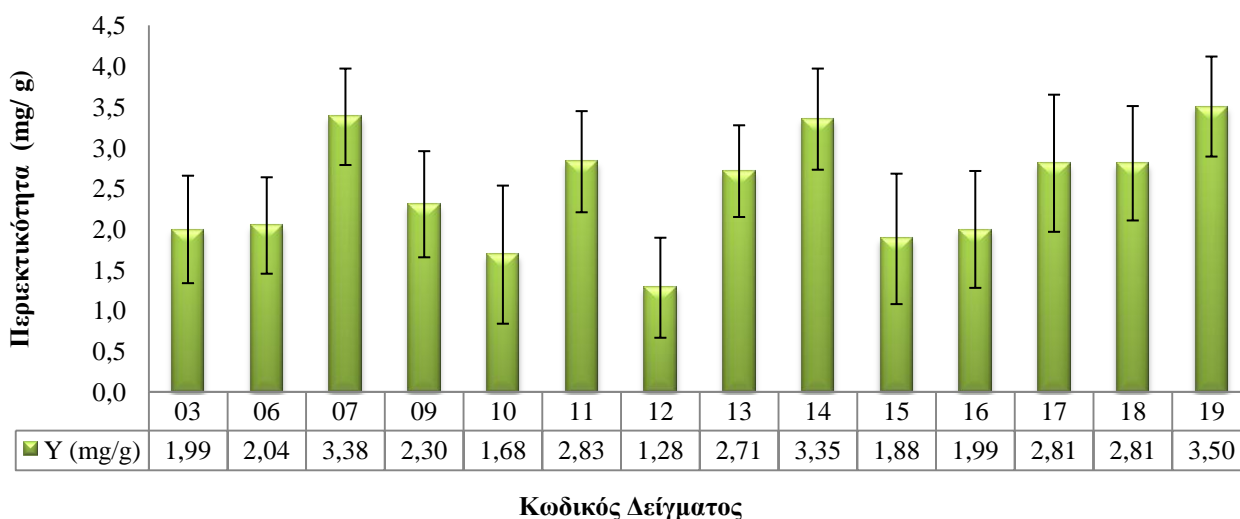


Εικόνα 53: Σύγκριση των περιεκτικότητων των φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα και υδρολυμένα εκχυλίσματα.



Εικόνα 54: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα εκχυλίσματα.

Περιεκτικότητα Φαινολικών Συστατικών στα Υδρολυμένα Εκχυλίσματα



Εικόνα 55: Περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών στα υδρολυμένα εκχυλίσματα.

Τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα το είδος εκχυλίσματος. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,186 mg/ mL έως 0,562 mg/ mL καφεϊκού οξέος για τις περιεκτικότητες των ολικών φαινολικών συστατικών στα ακατέργαστα εκχυλίσματα και από 0,021 mg/ mL έως 0,058 mg/ mL καφεϊκού οξέος για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα.

Αντίστοιχα η περιεκτικότητα των ολικών φαινολικών συστατικών κυμάνθηκαν από 11,14 mg/ g έως 33,7 mg/ g καφεϊκού οξέος για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενώ οι τιμές για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμανθήκαν από 1,28 mg/ g έως 3,50 mg/ g καφεϊκού οξέος.

Αναλυτικότερα τα δείγματα με κωδικούς 03, 06, 07, 09, 10, 12, 13 είναι εκχυλίσματα ποικιλιών Ρομπόλα από την περιοχή της Κεφαλονιάς. Από αυτά μόνο το δείγμα με κωδικό 07 έδωσε παραπάνω φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με τα υπόλοιπα που έδωσαν περίπου ίδιο (0,202- 0,290 mg/ mL). Αυτό συνέβη είτε λόγω διαφορετικών εδαφοκλιματικών συνθηκών ή λόγω κάποιας διαφορετικής επεξεργασίας της ποικιλίας μετά την συγκομιδή της από τον παραγωγό ή το οινοποιείο είτε λόγω συνδυασμού των παραπάνω παραγόντων.

Παρατηρήθηκε ότι το μέγιστο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, εμφανίστηκε στα εκχυλίσματα ερυθρών ποικιλιών με μέγιστη περιεκτικότητα να παρουσιάζεται στο εκχύλισμα της ποικιλίας Cabernet από τη Κέρκυρα (0,562 mg/ mL καφεϊκού οξέος). Αρκετά υψηλό φαινολικό σε σχέση με της λευκές ποικιλίες έδωσε και η ποικιλία Μαυροδάφνη (0,452 mg/ mL).

Τέλος οι υπόλοιπα δείγματα που ήταν ανάμικτες ποικιλίες έδωσαν ένα αρκετά ικανοποιητικό φαινολικό περιεχόμενο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα δείγματα των υδρολυμένων εκχυλισμάτων. Σαφώς το φαινολικό περιεχόμενο ήταν αρκετά μικρότερο σε σχέση με το ακατέργαστο εκχύλισμα.

E.9 Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Γ.9.1 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή DPPH (A_{AR})

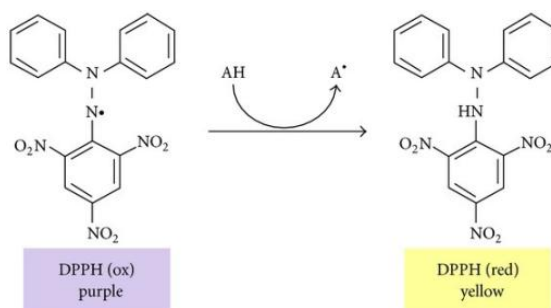
Όργανα - Αντιδραστήρια

- Φασματόμετρο UV-Vis μοντέλο Jasco V-550, ρυθμισμένου στα 725 nm.
- Περιέκτες Eppendorf (1,5 mL)
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,00000g)
- Λουτρό υπερήχων μοντέλο Grant Ultrasonic bath
- Αυτόματη πιπέτα (100-1000 µL)
- Αυτόματη πιπέτα (10-100 µL)
- Tips
- Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL
- 6-υδροξύ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαϊκό οξύ (Trolox)
- Διάλυμα 2,2-διφαινυλο-1-πικρυδραζυλίου (DPPH) (Sigma)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Αρχή δοκιμής

Η δοκιμή DPPH προσδιορίζει την αντιοξειδωτική δράση μιας ουσίας. Το DPPH είναι μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα της οποίας παρουσιάζει έντονο ιώδες (μωβ) χρώμα. Η δοκιμή βασίζεται στην ικανότητα των εκχυλισμάτων να αποχρωματίζουν το διάλυμα του DPPH. Η δοκιμασία δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, μετρά τη μείωση της DPPH από τη δράση των αντιοξειδωτικών, δηλαδή την εκατοστιαία % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας του διαλύματος-αντιδραστηρίου DPPH, η οποία καταγράφεται ως αλλαγή χρώματος (Singh *et al.*, 2002). Το DPPH, σύμφωνα με τους (Foti *et al.*, 2004), αντιδρά με τις φαινολικές ενώσεις (ArOH) με δύο διαφορετικούς τρόπους:

- Με απόσπαση ενός φαινολικού υδρογόνου από τη ρίζα του DPPH (HAT- αντίδραση) (Εικόνα 56).
- Με μεταφορά ηλεκτρονίου από τη φαινολική ένωση ή από το φαινολικό ανιόν προς την ελεύθερη ρίζα (ET- αντίδραση).



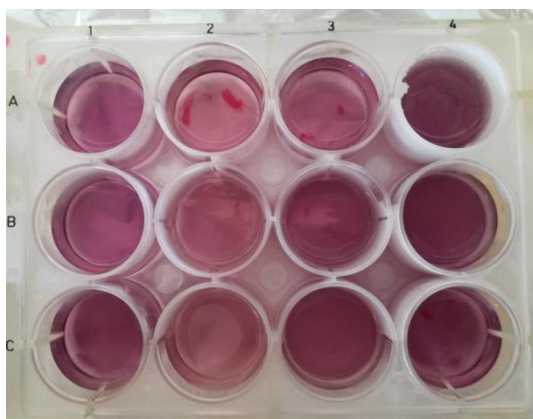
Εικόνα 56: Η μεταφορά ενός φαινολικού ατόμου υδρογόνου στο DPPH.

Αναλυτική πορεία

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Κακούρη *et al.* (2017).

Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν εκχυλίσματα από στέμφυλα. Για την παρασκευή του διαλύματος DPPH χρησιμοποιήθηκε διφαινυλοπικρυλυδραζύλιο (Sigma). Το διάλυμα του DPPH παρασκευάζεται καθημερινά, διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα σε μεθανόλη (καθαρότητας HPLC). Ζυγίστηκαν 4 mg DPPH σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, προστίθενται σε 50 mL μεθανόλης και το όλον τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων για να διαλυθεί. Έπειτα, προστέθηκε μεθανόλη μέχρι τα 90 mL και τοποθετήθηκε ξανά στο λουτρό υπερήχων. Ακολούθησε προσθήκη μεθανόλης έως τα 100 mL. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη με το διάλυμα DPPH αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι. Η απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517 nm ήταν στα $1,100 \pm 0,005$.

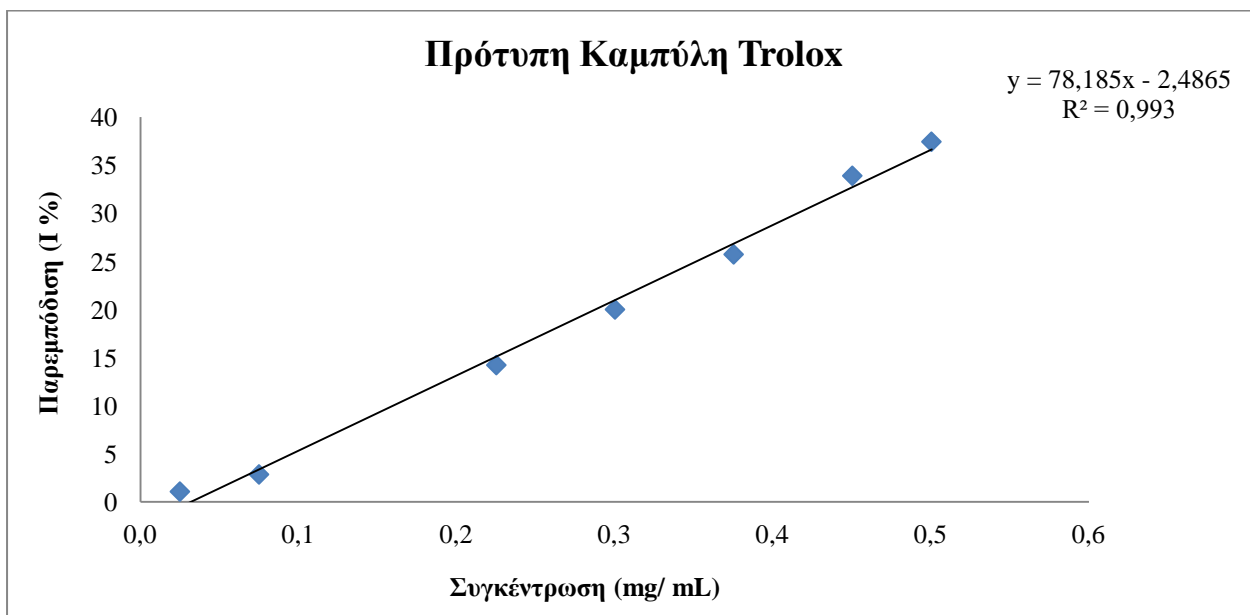
Σε περιέκτες Eppendorf προστέθηκαν 3 mL του διαλύματος DPPH και 30 μ L του προς εξέταση εκχυλίσματος. Ακολούθησε ανάδευση και το διάλυμα αφέθηκε στο σκοτάδι για 30 min. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 515 nm και προσδιορίστηκε το ποσοστό δέσμευσης της ρίζας. Ως τυφλό ή δείγμα έλεγχου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που παρασκευάστηκε με προσθήκη 30 μ L μεθανόλης σε 3 mL διαλύματος DPPH, ενώ για το μηδενισμό του οργάνου χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (Εικόνα 57).



Εικόνα 57: Αντιδραστήριο DPPH.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για τον υπολογισμό της αρχικής μοριακής συγκέντρωσης DPPH, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς όπως αυτή φαίνεται στην Εικόνα 58. Παρασκευάστηκαν διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων Trolox και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως στα δείγματα.



Εικόνα 58: Πρότυπη Καμπύλη Trolox.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν οι τιμές της εκατοστιαίας παρεμπόδισης (I %) της ελεύθερης ρίζας με βάση τις απορροφήσεις. Για τον υπολογισμό του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :

$$I \% = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \times 100$$

Όπου,

- I % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας
- A₀ = η απορρόφηση του τυφλού (απορρόφηση αναφοράς της ελεύθερης ρίζας)
- A = η απορρόφηση του δείγματος

Επίσης υπολογίστηκε και η ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}). Η χρήση του DPPH στον υπολογισμό της A_{AR} μπορεί να αξιολογήσει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να είναι δότες ατόμων υδρογόνου ανάλογα με τις συνθήκες (Magalhes *et al.*, 2008). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μmol DPPH/g ξηρού βάρους σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο (Kallithraka *et al.*, 2005; Makris *et al.*, 2013).

$$A_{AR} (\mu\text{mol DPPH} / \text{g dw}) = \frac{C_{DPPH}}{C_{TP}} \times \left(1 - \frac{A_{515(f)}}{A_{515(i)}} \right) \times Y_{TP}$$

- C_{DPPH}: Η αρχική μοριακή συγκέντρωση DPPH
- C_{TP}: Περιεκτικότητα εκφρασμένη ως mg καφεϊκού οξέος ανά mL εκχυλίσματος
- A_{515(f)}: Η απορρόφηση του δείγματος σε χρόνο 30 min.
- A_{515(i)}: Η απορρόφηση του τυφλού
- Y_{TP}: Περιεκτικότητα εκφρασμένη ως mg καφεϊκού οξέος ανά g ξηρού βάρους

Στον Πίνακα 25 και 26 παραθέτονται τα αποτελέσματα του μέσου ορού των απορροφήσεων, της παρεμπόδισης της ελεύθερης ρίζας (I %) και της ικανότητας απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) των ακατέργαστων και υδρολυμένων εκχυλισμάτων στεμφύλων από διάφορες ποικιλίες. Τα αποτελέσματα A_{AR} είναι εκφρασμένα ως (μmol DPPH/ g επί ξηρού βάρους). Στα αποτελέσματα έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση των μέσων (SD).

Πίνακας 25: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των ακατέργαστων δειγμάτων με τη δοκιμή DPPH.

Δείγμα	$A_{515} \pm SD$	$I \% \pm SD$	A_{AR}
03-Ρομπόλα-Κεφ.	0,832 ± 0,002	25,426 ± 0,135	0,704
06-Ρομπόλα-Κεφ.	0,853 ± 0,003	23,498 ± 0,269	0,651
07-Ρομπόλα-Κεφ.	0,690 ± 0,014	38,117 ± 1,288	1,056
09-Ρομπόλα-Κεφ.	0,766 ± 0,003	31,300 ± 0,269	0,867
10-Ρομπόλα-Κεφ.	0,899 ± 0,008	19,342 ± 0,695	0,536
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	0,631 ± 0,012	43,378 ± 1,079	1,202
12-Ρομπόλα-Κεφ.	0,927 ± 0,005	16,891 ± 0,470	0,468
13-Ρομπόλα-Κεφ.	0,796 ± 0,012	28,640 ± 1,051	0,793
14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.	0,759 ± 0,010	31,898 ± 0,930	0,884
15-Παύλος-Ζάκθ.	0,696 ± 0,033	37,549 ± 2,980	1,040
16-Αυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	0,537 ± 0,015	45,170 ± 1,302	1,435
17-Αυγ-Κατσ-Ζάκθ.	0,570 ± 0,015	41,803 ± 1,375	1,158
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	0,574 ± 0,021	41,429 ± 1,869	1,148
19-Cabernet-Κέρκ.	0,459 ± 0,017	53,197 ± 1,566	1,474

Πίνακας 26: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των υδρολυμένων δειγμάτων με τη δοκιμή DPPH.

Δείγμα	$A_{515} \pm SD$	$I \% \pm SD$	A_{AR}
03-Ρομπόλα-Κεφ.	0,913 ± 0,002	6,803 ± 0,216	0,188
06-Ρομπόλα-Κεφ.	0,929 ± 0,003	5,170 ± 0,233	0,143
07-Ρομπόλα-Κεφ.	0,907 ± 0,017	7,483 ± 1,509	0,207
09-Ρομπόλα-Κεφ.	0,942 ± 0,003	3,912 ± 0,285	0,108
10-Ρομπόλα-Κεφ.	0,941 ± 0,005	4,014 ± 0,419	0,111
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	0,925 ± 0,004	5,646 ± 0,375	0,156
12-Ρομπόλα-Κεφ.	1,224 ± 0,004	4,150 ± 0,323	0,121
13-Ρομπόλα-Κεφ.	1,204 ± 0,005	5,690 ± 0,415	0,166
14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.	1,238 ± 0,008	3,080 ± 0,688	0,090
15-Παύλος-Ζάκθ.	1,235 ± 0,005	3,263 ± 0,467	0,095
16-Αυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	1,210 ± 0,007	5,221 ± 0,600	0,152
17-Αυγ-Κατσ-Ζάκθ.	1,219 ± 0,004	4,542 ± 0,323	0,132
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	1,186 ± 0,014	7,152 ± 1,215	0,208
19-Cabernet-Κέρκ.	1,200 ± 0,005	6,030 ± 0,451	0,175

Τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα το είδος εκχυλίσματος όπως φαίνονται και στις Εικόνες 59, 60, 61, και 62. Οι τιμές για την παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) κυμάνθηκαν από 16,8 % έως 53,2 % για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενώ οι τιμές για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 3,08 % έως 7,05 %.

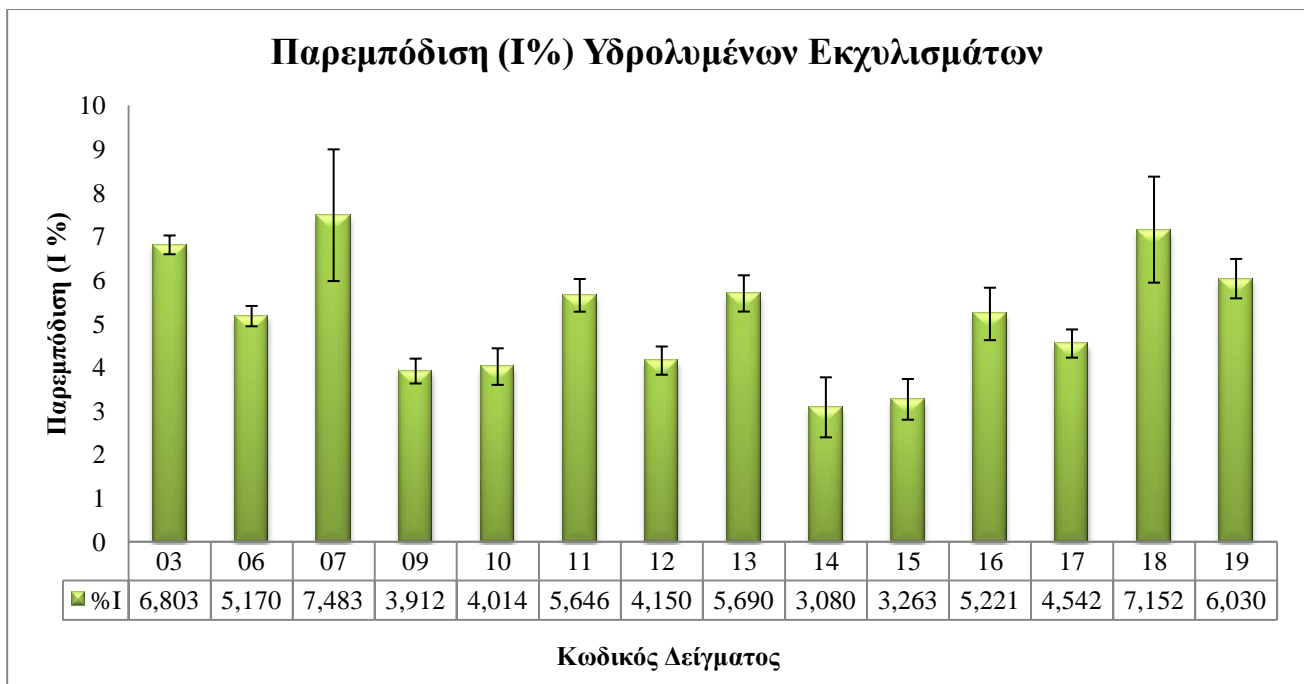
Αντίστοιχα η ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) κυμάνθηκε από 0,468 έως 1,474 ($\mu\text{mol DPPH/g}$ επί ξηρού βάρους) για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα ενώ οι τιμές για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 0,09 έως 0,208 ($\mu\text{mol DPPH/g}$ επί ξηρού βάρους).



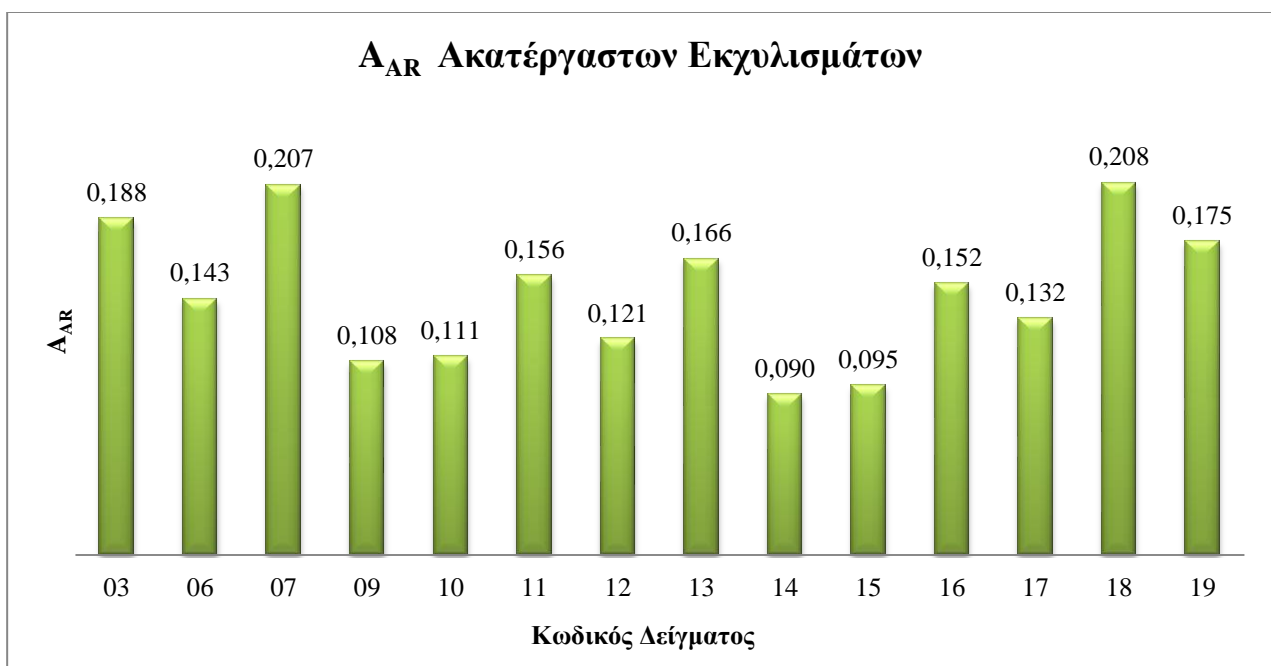
Εικόνα 59: Παρεμπόδιση (I %) ακατέργαστων εκχυλισμάτων.



Εικόνα 60: Ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) ακατέργαστων εκχυλισμάτων.



Εικόνα 61: Παρεμπόδιση (I %) υδρολυμένων εκχυλισμάτων.



Εικόνα 62: Ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) υδρολυμένων εκχυλισμάτων.

Αναλυτικότερα τα δείγματα με κωδικό 03, 06, 07, 09, 10, 12, 13 είναι εκχυλίσματα ποικιλιών Ρομπόλα από την περιοχή της Κεφαλονιάς. Από αυτά μόνο το δείγμα με κωδικό 07 παρουσίασε μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) σε σχέση με τα υπόλοιπα που παρουσίασαν περίπου ίδια από 25,4 % έως 31,3 %. Αυτό συνέβη είτε λόγω διαφορετικών εδαφοκλιματικών συνθηκών ή λόγω κάποιας διαφορετικής

επεξεργασίας της ποικιλίας μετά την συγκομιδή της από τον παραγωγό ή το οινοποιείο είτε σε συνδυασμό των παραπάνω παραγόντων.

Παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %), εμφανίστηκε στα εκχυλίσματα ερυθρών ποικιλιών και τη μεγαλύτερη τιμή παρουσίασε το εκχύλισμα της ποικιλίας Cabernet από τη Κέρκυρα (53,1 %). Αρκετά υψηλή παρεμπόδιση σε σχέση με της λευκές ποικιλίες παρουσίασε και η ποικιλία Μαυροδάφνη (43,3 %). Τέλος οι υπόλοιπα δείγματα που ήταν ανάμικτες ποικίλες παρουσίασαν αρκετά ικανοποιητική παρεμπόδιση.

Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα δείγματα των υδρολυμένων εκχυλισμάτων. Η παρεμπόδιση ήταν αρκετά μικρότερη σε σχέση με το ακατέργαστο εκχύλισμα.

Η ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}) στα ακατέργαστα εκχυλίσματα αλλά και στα υδρολυμένα ήταν αντίστοιχη με τα αποτελέσματα των παρεμποδίσεων της ελεύθερης ρίζας (I %). Όσο μεγαλύτερη είναι η παρεμπόδιση τόσο μεγαλύτερη ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών παρουσίασαν τα δείγματα και το αντίστροφο.

E.9.2 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας με την δοκιμή ABTS

Όργανα - Αντιδραστήρια

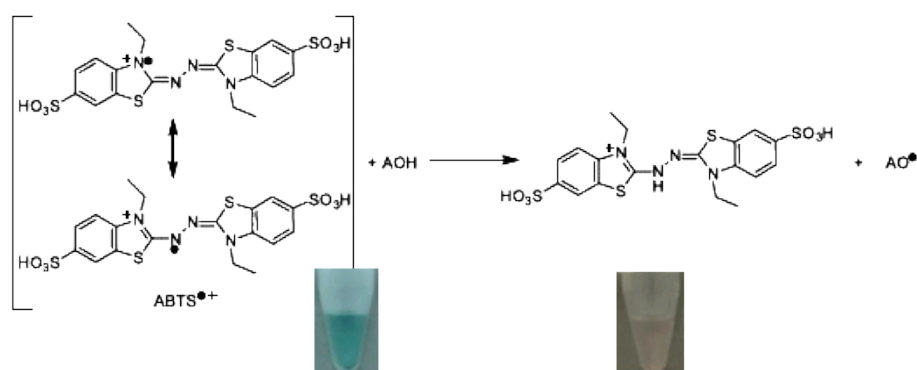
- Φασματοόμετρο UV-Vis μοντέλο Jasco V-550, ρυθμισμένου στα 725 nm.
- Περιέκτες σωλήνες 1,5 mL
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (0,0000 g)
- Αυτόματη πιπέτα (100-1000 μ L)
- Αυτόματη πιπέτα (10-100 μ L)
- Tips
- Ογκομετρικές φιάλες όγκου 100 mL
- 2,2'-αζινο – δις(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-θειικό οξύ (ABTS)
- υπερθειϊκό κάλιο ($K_2S_2O_8$)
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας

Αρχή δοκιμής

Η δοκιμή αναπτύχθηκε από τον Miller και βασίζεται σε μια αντίδραση αποχρωματισμού και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, αφού βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την

σταθερή ρίζα $ABTS^{\bullet+}$. Το $ABTS$ παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της δράσης του ένζυμου υπεροξειδάση (HRP), οξειδώνεται δημιουργώντας τη δραστική ρίζα, του κατιόντος $ABTS^{\bullet+}$ (Εικόνα 63).

Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός μορίου πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στη συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ένωσης. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ένωση με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα $ABTS^{\bullet+}$, ανάγεται είτε μέσω της προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (Single Electron Transfer, SET) είτε μέσω της προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνεπώς τη μείωση της απορρόφησης στα 730 nm.



Εικόνα 63: Η δοκιμή $ABTS$ σε μια αντίδραση αποχρωματισμού για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Αναλυτική πορεία

Για την παρασκευή διαλύματος $ABTS^{\bullet+}$ έγινε ανάμειξη 2,45 mM υπερθειικού καλίου και 7 mM $ABTS$ σε 10 mL νερό σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL. Πιο συγκεκριμένα προσθέτουμε 6,62 mg υπερθειικού καλίου και 38,41 mg $ABTS$ σε 10 mL νερό για την παρασκευή αποθεματικού διαλύματος.

Μετά την παρασκευή του διαλύματος πραγματοποιήθηκε επώαση του μίγματος για 16-18 h στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα $ABTS^{\bullet+}$ αραιώθηκε με νερό προκειμένου η απορρόφηση να αποκτήσει τιμή $0,7 \pm 0,02$ στα 734 nm.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 30 μ L δείγματος σε 3 mL αραιωμένου διαλύματος $ABTS^{\bullet+}$. Έπειτα από 6 min πραγματοποιήθηκε μέτρηση απορρόφησης του μίγματος στα 734 nm (τρεις τιμές απορρόφησης για το κάθε δείγμα). Ο μηδενισμός του

οργάνου έγινε με καθαρή μεθανόλη. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 30 μL μεθανόλη σε 3 mL αραιωμένου διαλύματος ABTS⁺.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν οι τιμές της εκατοστιαίας παρεμπόδισης (I %) της ελεύθερης ρίζας με βάση τις απορροφήσεις. Για τον υπολογισμό του ποσοστού της παρεμποδιστικής δράσης κάθε εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

$$I \% = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \times 100$$

Όπου,

- I % = η % παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας
- A₀ = η απορρόφηση του τυφλού (απορρόφηση αναφοράς της ελεύθερης ρίζας)
- A = η απορρόφηση του δείγματος

Στον Πίνακα 27 και 28 παραθέτονται τα αποτελέσματα του μέσου ορού των απορροφήσεων και της παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) των ακατέργαστων και υδρολυμένων εκχυλισμάτων στεμφύλων από διάφορες ποικιλίες. Στα αποτελέσματα έχει υπολογιστεί η τυπική απόκλιση (SD).

Πίνακας 27: Αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής δράσης των ακατέργαστων δειγμάτων με τη δοκιμή ABTS.

Δείγμα	A ₇₃₀ ± SD	I % ± SD
03-Ρομπόλα-Κεφ.	0,318 ± 0,006	55,524 ± 0,855
06-Ρομπόλα-Κεφ.	0,258 ± 0,002	63,869 ± 0,284
07-Ρομπόλα-Κεφ.	0,014 ± 0,001	98,042 ± 0,140
09-Ρομπόλα-Κεφ.	0,093 ± 0,002	86,946 ± 0,247
10-Ρομπόλα-Κεφ.	0,295 ± 0,008	58,741 ± 1,050
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	0,021 ± 0,010	97,063 ± 1,334
12-Ρομπόλα-Κεφ.	0,405 ± 0,028	43,357 ± 3,851
13-Ρομπόλα-Κεφ.	0,205 ± 0,016	71,375 ± 2,204
14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.	0,210 ± 0,005	70,676 ± 0,705
15-Παύλος-Ζάκθ.	0,105 ± 0,002	85,315 ± 0,242
16-Άυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	0,071 ± 0,015	90,070 ± 2,153
17-Άυγ-Κατσ-Ζάκθ.	0,094 ± 0,006	86,807 ± 0,900
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	0,175 ± 0,018	75,524 ± 2,456
19-Cabernet-Κέρκ.	0,064 ± 0,004	91,096 ± 0,627

Πίνακας 28: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των υδρολυμένων δειγμάτων με τη δοκιμή ABTS.

Δείγμα	A₇₃₀ ± SD	I % ± SD
03-Ρομπόλα-Κεφ.	0,590 ± 0,002	16,549 ± 1,410
06-Ρομπόλα-Κεφ.	0,626 ± 0,009	11,457 ± 2,418
07-Ρομπόλα-Κεφ.	0,587 ± 0,010	16,973 ± 2,534
09-Ρομπόλα-Κεφ.	0,616 ± 0,006	12,871 ± 1,938
10-Ρομπόλα-Κεφ.	0,663 ± 0,003	6,271 ± 1,517
11-Μαυροδ-Βοστιλίδι-Κεφ.	0,606 ± 0,004	14,239 ± 1,725
12-Ρομπόλα-Κεφ.	0,669 ± 0,000	5,328 ± 1,166
13-Ρομπόλα-Κεφ.	0,616 ± 0,002	12,824 ± 1,366
14-Αυγουστιάτης-Ζάκθ.	0,607 ± 0,002	14,191 ± 1,378
15-Παύλος-Ζάκθ.	0,636 ± 0,005	10,090 ± 1,882
16-Αυγ-Κατσ-Σκιαδ-Ζάκθ.	0,634 ± 0,006	10,372 ± 2,005
17-Αυγ-Κατσ-Ζάκθ.	0,630 ± 0,002	10,938 ± 1,402
18-Κακοτρύγης-Ζάκθ.	0,648 ± 0,006	8,345 ± 1,970
19-Cabernet-Κέρκ.	0,615 ± 0,000	13,060 ± 1,166

Τα αποτελέσματα διαφέρουν ανάλογα το είδος εκχυλίσματος. Οι τιμές της παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) κυμάνθηκαν από 43,3 % έως 98,04 % για τα ακατέργαστα εκχυλίσματα και από 6,2 % έως 16,97 % για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα.

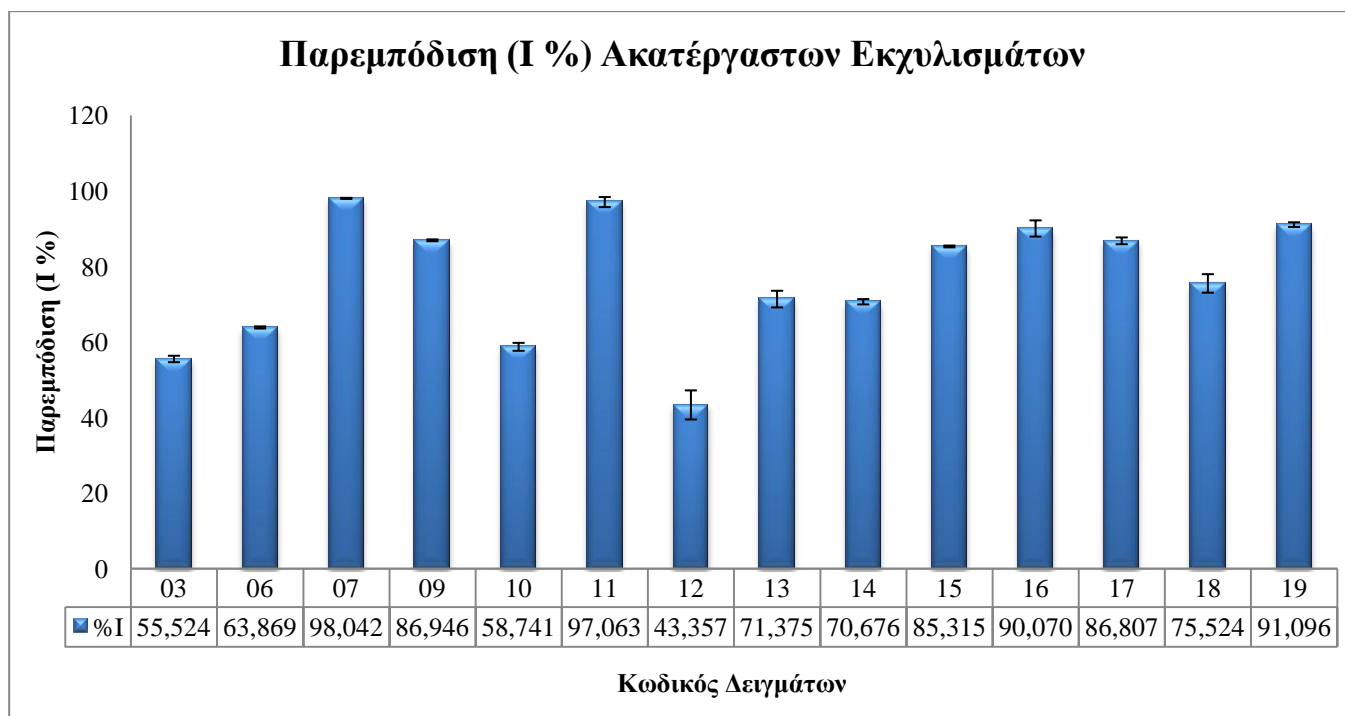
Αναλυτικότερα τα δείγματα με κωδικό 03, 06, 07, 09, 10, 12, 13 είναι εκχυλίσματα ποικιλιών Ρομπόλα από την περιοχή της Κεφαλονιάς. Από αυτά το δείγμα με κωδικό 7 παρουσίασε τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας. Αυτό συνέβη είτε λόγω των διαφορετικών εδαφοκλιματικών συνθηκών ή λόγω κάποιας διαφορετικής επεξεργασίας της ποικιλίας μετά την συγκομιδή της από τον παραγωγό ή το οινοποιείο είτε σε συνδυασμό των παραπάνω παραγόντων.

Παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας (I %) εμφανίστηκε στα εκχυλίσματα ερυθρών ποικιλιών και τη μεγαλύτερη τιμή παρουσίασαν τα εκχυλίσματα των δειγμάτων Μαυροδάφνης και Βοστιλίδι (97,06 %). Αρκετά υψηλή τιμή παρεμπόδισης, σε σχέση με της λευκές ποικιλίες, παρουσίασε και η ποικιλία Cabernet από την Κέρκυρα (91,09 %). Τέλος οι υπόλοιπα δείγματα που ήταν ανάμικτες ποικιλίες εμφάνισαν αρκετά ικανοποιητική παρεμπόδιση.

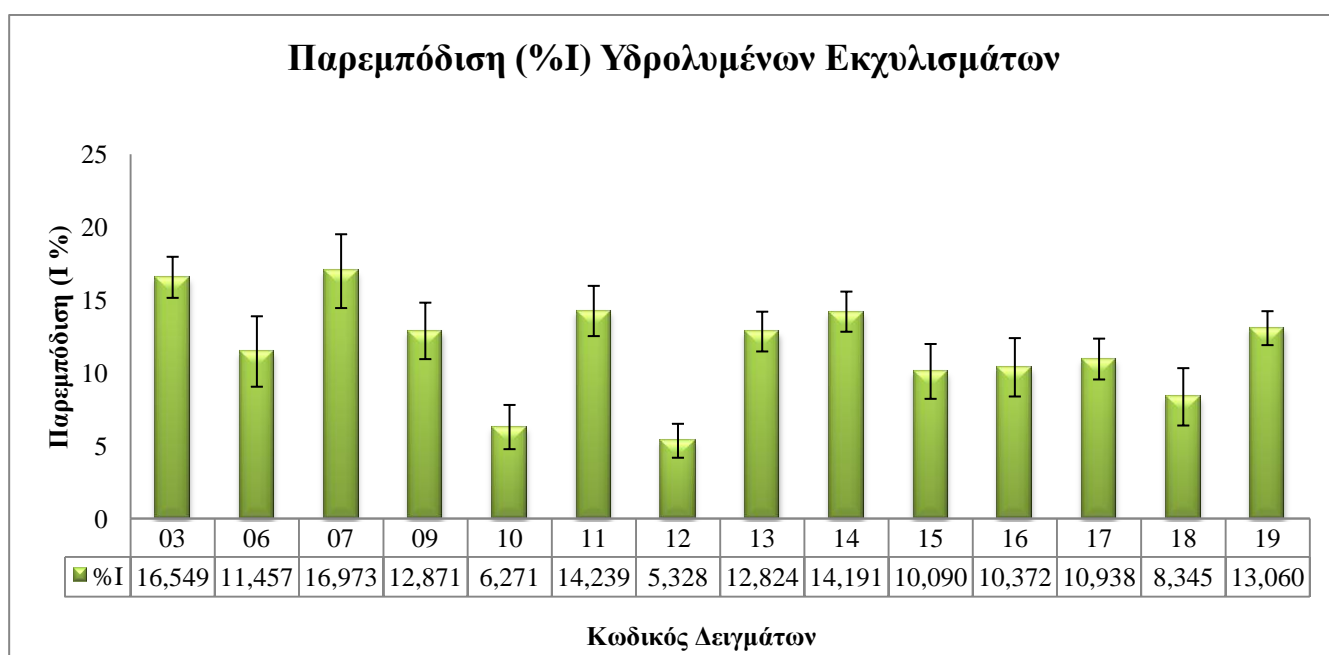
Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα δείγματα των υδρολυμένων εκχυλισμάτων. Οι τιμές παρεμπόδισης είναι αρκετά μικρότερες σε σχέση με αυτές των ακατεργάστων εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στις παρακάτω Εικόνες 64 και 65.

Γενικά όσον αφορά τα φλαβονοειδή, όσο μεγαλύτερος είναι βαθμός πολυμερισμού τους, τόσο μεγαλύτερη και η ικανότητα να εμποδίζουν την δράση των ελεύθερων ριζών.

Η θέση των υποκαταστατών στο χώρο θεωρείται ότι είναι ο πιο σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε σχέση με την κύρια δομή της φλαβόνης. Τέλος η παρουσία γλυκοζιτών στο μόριο μειώνει την αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το άγλυκο τμήμα (Rice-Evans *et al.*, 1996).



Εικόνα 64: Παρεμπόδιση (I %) ακατέργαστων εκχυλισμάτων.



Εικόνα 65: Παρεμπόδιση (I %) υδρολυμένων εκχυλισμάτων.

Η Revilla (1997) έδειξε ότι η περιεκτικότητα σε φαινόλες άρα κατ' επέκταση και στην αντιοξειδωτική δράση επηρεάζεται σαφώς από τέσσερις γεωργό-οικολογικούς παράγοντες: την ποικιλία, την κλιματική κατάσταση από έτος σε έτος, τον τόπο παραγωγής της γεωγραφικής προέλευσης των σταφυλιών, της χημείας του εδάφους και του βαθμού ωρίμανσης. Αυτοί οι παράγοντες, είναι σημαντικοί για τη μεταβλητότητα της ποσοτικής και ποιοτικής κατανομής των χημικών συστατικών στα σταφύλια και, σε κάποιο βαθμό, θα είναι σημαντικά για την περιεκτικότητα σε στέμφυλα (Amico *et al.*, 2004).

Πιο αναλυτικά, το κλίμα επηρεάζει σημαντικά στην συγκέντρωση των πολυφαινολών της σταφυλής διαμέσου της ωρίμανσης της ράγας. Τα κρασοστάφυλα μπορούν να καλλιεργηθούν σε ξηρά και φτωχά εδάφη γι' αυτό και επεκτάθηκε η καλλιέργειά τους σ' όλη την Ελλάδα. Θερμοκρασίες και ηλιοφάνεια πολύ χαμηλές ή αντίθετα πολύ υψηλές έχουν επιπτώσεις στην φυσιολογική ωρίμανση της ράγας και κατά συνέπεια δεν είναι ευνοϊκές στην σύνθεση των πολυφαινολών. Η διακύμανση της θερμοκρασίας μεταξύ ημέρας-νύκτας κατά την περίοδο ωρίμανσης των σταφυλιών είναι ευνοϊκή για την σύνθεση των φαινολικών. Το άθροισμα ανθοκυανών και τανινών σε φλοιούς και γίγαρτα είναι μεγαλύτερο στα ξηρά κλίματα (Amico *et al.*, 2004).

Στην συγκέντρωση των φλαβονοειδών επιδρούν φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους όπως η δομή, η σύστασή του αλλά και η ηλικία του. Η κύρια όμως επίδραση του τύπου του εδάφους είναι η ικανότητά του να συγκρατεί νερό επιτρέποντας παράλληλα την καλή στράγγιση της υγρασίας που περισσεύει. Ακόμα και χημικές ιδιότητες του εδάφους όπως pH και γονιμότητα παίζουν ρόλο στη συσσώρευση των ανθοκυανών (Downey *et al.*, 2006). Επίσης η κλίση του εδάφους επηρεάζει την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Μια μικρή έως μέτρια κλίση του αμπελώνα μπορεί να είναι ευεργετική γιατί ευνοεί τη στράγγιση του εδάφους και την απομάκρυνση των ψυχρών ρευμάτων αέρα. Γενικότερα, είναι σημαντικό το αμπέλι να έχει μια πλήρη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και μια καλή κυκλοφορία του αέρα μεταξύ των φυτών. Σε πληθώρα ερευνητικών εργασιών εξετάζεται η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Οι Cortell and Kennedy (2006) παρατήρησαν ότι στους βόστρυχες με σκίαση η συγκέντρωση των ανθοκυανών ήταν περίπου 30% λιγότερη απ' αυτή των μη σκιαζόμενων.

Με τη λίπανση εμπλουτίζουμε το έδαφος με θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη και παραγωγή των πρέμων. Η υπερβολική λίπανση με άζωτο N και κάλιο K θα οδηγήσει σε μειωμένη συγκέντρωση πολυφαινολών και ανθοκυανών, επειδή θα

αυξηθεί η ζωηρότητα του πρέμνου θα επηρεαστεί η ισορροπία βλάστησης προς καρποφορίας και έμμεσα το μικροκλίμα εξαιτίας των ζωηρών (μεγάλου μήκους) βλαστών (Jackson and Lombard, 1993).

Ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν ότι υδατικό έλλειμμα αυξάνει στις ράγες την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες (Downey *et al*, 2006). Κυρίως η επίδραση της έλλειψης νερού επιδρά στο μέγεθος των ραγών και έτσι αλλάζει η αναλογία βάρους φλοιού της ράγας προς ολικό βάρος ράγας με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα των ανθοκυανών και τανινών στις ράγες.

E.10 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χημική σύσταση και η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών συστατικών των στεμφύλων του είδους *Vitis vinifera*. Οι ποικιλίες προέρχονταν από τα Ιόνια νησιά. Αναλυτικότερα έγινε μελέτη στις ποικιλίες Ρομπόλα, Μαυροδάφνη, Βοστυλίδι ή Γουστολίδι, Αυγουσιιάτης, Παύλος, Κατσακούλιας, Σκιαδόπουλο, Κακοτρύγης και Cabernet. Τα δείγματα προς ανάλυση ήταν 14 και αποτελούνταν από αυτούσιες ή ανάμικτες ποικιλίες των παραπάνω.

Δεδομένου ότι τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί κατά πολύ το ποσοστό των αποβλήτων της βιομηχανίας παραγωγής οίνου, σκοπός ήταν ο προσδιορισμός του χημικού «προφίλ» όπου θα συμβάλει στην αξιοποίηση των παραπροϊόντων των οινοποιείων.

Σε πρώτο στάδιο έγινε η παραλαβή τους και ακλούθησε η προκαταρκτική κατεργασία των δειγμάτων, η οποία περιλάμβανε την ξήρανση την άλεση και την αποθήκευση τους. Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε εκχύλιση στερεού-υγρού με οργανικούς διαλύτες. Καταλληλότερος διαλύτης εκχύλισης κρίθηκε το νερό σε συνδυασμό με την γλυκερόλη σε αναλογία 80:20 (v/v). Η παραλαβή του εκχυλίσματος με αυτούς τους μη τοξικούς διαλύτες ήταν αποδοτικότερη ενώ παράλληλα ελαχιστοποιούσε τα συν-εκχυλιζόμενα ανεπιθύμητα συστατικά. Η μέθοδος δεν υποβάθμιζε ούτε οξειδωνε τις φαινολικές ενώσεις ενώ παράλληλα ήταν μια οικονομική και μη χρονοβόρα διαδικασία.

Σε τρίτο στάδιο πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία UV-Vis η οποία μας επιβεβαίωσε την ύπαρξη φαινολικών ενώσεων. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε στα μήκη κύματος 220, 280, 320, 360 και 520 nm. Τα αποτελέσματα έδειξαν απορρόφηση στις περιοχές 220 nm και 260-280 nm. Τα δείγματα που προήλθαν από λευκές ποικιλίες είχαν ένα πλούσιο προφίλ από φαινολικά οξέα. Τα δείγματα που προήλθαν σε συνδυασμό με

λευκές και ερυθρές ποικιλίες είχαν απορροφήσεις και στα 520 nm, περιοχή χαρακτηριστική για τις ανθοκυάνες.

Σε τέταρτο στάδιο έγιναν αναλύσεις HPLC-DAD και LC-MS. Τα χρωματογραφήματα λήφθηκαν στα αντίστοιχα μήκη κύματος με την φασματοσκοπία UV-Vis. Ποιοτικά διαφορές υπήρξαν μόνο ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες. Σε ίδιες ποικιλίες διαφορετικών περιοχών δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Αναλυτικότερα οι κορυφές αντιστοιχούσαν σε μονομερείς 3-φλαβονόλες, καθώς και μονομερείς, διμερείς και τριμερείς προανθοκυανιδίνες. Το ευρύ χρωματογραφικό προφίλ οφειλόταν στην πολυπλοκότητα των προανθοκυανιδινών και στο μεγάλο μοριακό τους βάρος. Τα πλέον άφθονα φαινολικά που απομονώθηκαν από τα στέμφυλα σταφυλιών ήταν οι κατεχίνες (κατεχίνη και επικατεχίνη) και τα πολυμερή τους, οι προκυανιδίνες.

Σε πέμπτο στάδιο πραγματοποιήθηκε μελέτη των δειγμάτων με φασματοσκοπία FT-IR (DRIFTS) και Raman όπου πιστοποίησαν τις δομές των στεμφύλων. Μέσω αυτών των τεχνικών πήραμε δοκιμές πληροφορίες για τον σκελετό των μορίων που υπάρχουν στα στέμφυλα αλλά και για την πιστοποίηση της καθαρότητας τους. Από την καταγραφή των φασμάτων και τη μελέτη των κύριων φασματικών περιοχών, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Η φασματοσκοπία FT-IR (DRIFTS) έδειξε ότι τα δείγματα αποτελούνται από νερό, πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις και φλαβονοειδή. Η φασματοσκοπία Raman έδειξε ότι τα εκχυλίσματα των δειγμάτων αποτελούνται φαινολικά οξέα, φλαβονόλες, φλαβανόνες, τανίνες, και ανθοκυάνες.

Στο έκτο στάδιο προσδιοριστικό το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Οι τιμές στα ακατέργαστα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 0,186 mg/ mL έως 0,562 mg/ mL καφεϊκού οξέος για τις περιεκτικότητες των ολικών φαινολικών συστατικών. Στα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκαν από 0,021 mg/ mL έως 0,058 mg/ mL καφεϊκού οξέος. Τα στέμφυλα παρουσίασαν υψηλό φαινολικό περιεχόμενο, αποδεικνύοντας ότι κατά την εκχύλιση του οίνου μεγάλη ποσότητα πολυφαινολών παραμένει στα στέμφυλα. Επίσης οι τιμές έχουν άμεση σχέση με τα βοτανικά χαρακτηριστικά μέσα στο γένος, ιδιαίτερα με το χρώμα των σπερμάτων. Τα έγχρωμα σπέρματα περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα λευκά.

Στο τελευταίο στάδιο εφαρμόστηκαν δοκιμές οι DPPH και ABTS. Η εκατοστιαία παρεμπόδιση στην δοκιμή DPPH στα ακατέργαστα εκχυλίσματα κυμάνθηκε από 16,8 % έως 53,2 % ενώ για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμάνθηκε από 3,08 % έως 7,05 %. Η

εκατοστιαία παρεμπόδιση στην δοκιμή ABTS στα ακατέργαστα εκχυλίσματα κυμάνθηκε από 43,3 % έως 98,04 % ενώ για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμανθήκε από 6,2 % έως 16,97 %. Επιπλέον υπολογίστηκε η ικανότητα απόσβεσης ελεύθερων ριζών (A_{AR}). Στα ακατέργαστα εκχυλίσματα οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,468 έως 1,474 ($\mu\text{mol DPPH/g}$ επί ξηρού βάρους) ενώ για τα υδρολυμένα εκχυλίσματα κυμανθήκε από 0,09 έως 0,208 ($\mu\text{mol DPPH/g}$ επί ξηρού βάρους).

Η δράση των εκχυλισμάτων απέναντι στις ρίζες DPPH^{*} και ABTS⁺⁺ υποδεικνύει την ύπαρξη ουσιών που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες δρώντας ως δότες ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται από τη δόκιμη προσδιορισμού, τον τρόπο εκχύλισης και τις χημικές ενώσεις που περιέχουν. Επειδή, τα εκχυλίσματα στεμφύλων περιέχουν τόσο λιπόφιλα όσο και υδρόφιλα συστατικά, η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί έχει αντίκτυπο στην αντιοξειδωτική ικανότητα. Άλλες δόκιμες έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε υδατικά εκχυλίσματα συστατικά όπως η δόκιμη του DPPH, ενώ άλλες μεγαλύτερη ευαισθησία σε λιπόφιλα εκχυλίσματα όπως η μέθοδος ABTS. Τέλος ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός ξεχωριστά συστατικού του εκχυλίσματος είναι σχεδόν αδύνατο να πραγματοποιηθεί λόγω της πολυπλοκότητας της σύστασης του, καθώς και της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των συστατικών. Για τον λόγο αυτό ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης με τουλάχιστον δύο μεθόδους της επιλογής, αποτελεί υποχρεωτικό βήμα έτσι ώστε να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα και να συνδέσουμε την περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, με την αντιοξειδωτική δράση.

E.11 Προοπτικές Μελλοντικής Έρευνας

Για μελλοντική επέκταση της παρούσας διατριβής προτείνεται να εξετασθούν τα ακόλουθα ερευνητικά αντικείμενα:

1. Εξέταση, ανάπτυξη και σύγκριση άλλων υψηλής απόδοσης πράσινων διεργασιών εκχύλισης, όπως η εκχύλιση με μικροκύματα και υπερήχους.
2. Ποσοτικοποίηση των φαινολικών συστατικών με την βοήθεια της χρωματογραφίας LC-MS.

3. Μελέτη της επίδρασης και διακύμανσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των παραπροϊόντων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης των φυτών σε σχέση με τις αποδόσεις σε φαινολικά συστατικά.
4. Μελέτη πολλαπλών δειγμάτων τα οποία θα έχουν συλλεχθεί από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και σε διαφορετικές περιόδους συγκομιδής με την χρήση φασματοσκοπίας (FTIR και Raman) σε συνδυασμό με στατιστικά μοντέλα.
5. Μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση των γραμμών εκχύλισης μελετώντας πολλαπλά σημεία σχεδιασμού όπως μέγεθος κόκκων υλικού, αναλογία στερεού - διαλύτη, θερμοκρασία, χρόνος επεξεργασίας, αναλογία συστήματος διαλυτών, ένταση μικροκυματικής ακτινοβολίας ή υπερήχων, κ.α., εφαρμόζοντας μαθηματικά μοντέλα.
6. Ανάπτυξη τελικών προϊόντων τροφίμων ή καλλυντικών στα όποια θα περιέχονται φυσικά εκχυλίσματα προερχόμενα από τις προτεινόμενες πράσινες μεθόδους εκχύλισης. Μελέτη της λειτουργικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας των εκχυλισμάτων σε διάφορα συστήματα προϊόντων.
7. Μελέτη της διάρκειας ζωής των εκχυλισμάτων τόσο μικροβιακά όσο και ως προς τη διατήρηση της βιοδραστικότητας τους σε σχέση με το χρόνο και τις συνθήκες συντήρησης.
8. Μελέτη της αξιοποίησης των υπολειμμάτων της εκχύλισης σε μονάδες κομποστοποίησης και βιοδιύλισης, ώστε να μειωθεί σημαντικά ο όγκος των υπολειμμάτων και να μην προκαλείται μεγαλύτερο πρόβλημα την απόθεση τους στο περιβάλλον.
9. Ακριβής σχεδιασμός μονάδων αξιοποίησης αγροτικών παραπροϊόντων με επιλογή κατάλληλων σημείων εγκατάστασης, στοχεύοντας επίσης στη βελτιστοποίηση της διακίνησης πρώτων υλών και προϊόντων και την αγορά στην οποία θα απευθύνονται.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγγλική Βιβλιογραφία

Abrantes de Oliveira Seabra, I.J., (2010). Extraction of valuable compounds from agro-residues of elder (*Sambucus nigra*), pine (*Pinus pinaster*) and tara (*Caesalpinia spinosa*). University of Coimbra, *FacuLy of Sciences and Technology*, Chemical Engineering Department.

Aguilera, J. M., ChiraL, A., & Fito, P., (2003). Food dehydration and product structure. *Trends in Food Science and Technology*. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00122-5](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00122-5).

Amico, V., Napoli, E.M., Renda A., Ruberto, G., Spatafora, C., Tringali, C., (2004). Constituents of grape pomace from the Sicilian cuLivar ‘Nerello Mascalese’, *Food Chemistry*, 88, 599–607.

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., SkaLsounis, A.L., Haroutounian, S. A., (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties, *LWT - Food Science and Technology*, 48, 316-322.

Apostolakis, A., Grigorakis, S., Makris, D.P., (2014). Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures, *Separation and Purification Technology*, 128, 89–95.

Arvanitoyannis, S., Ladas, D., Mavromatis, A., (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: a review *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 475–487.

Arienzo, M., Christen, E.W., Quayle W.C., (2009). Phytotoxicity testing of winery wastewater for constructed wetland treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 94–99.

Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., & Keefe, S.O., (2008). Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins.

Bancuta, O.R., Chilian, A., Bancuta I., Ion, R.M., Setnescu R., Setnescu, T., Gheboianu, A., Lungulescu M., (2015). FT-IR and UV-VIS Characterization of grape extracts used as antioxidants in polymers. *Revue Roumaine de Chimie*, 60(5-6), 571-577.

Boulet, J.C., Williams, P., Doco, T., (2007). A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides *Carbohydrate Polymers*, 69, 79–85.

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K., & Ramakrishnan, S., (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*.

Bustamante, M.A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles J., Pérez-Murcia, M.D., (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Manage.* 28(2), 372–380.

Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, j., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 2872-2888.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, S. K., Lim, K. K., Tan, S. P., Lianto, F. S., & Yong, M. Y. (2009). Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. *Food Chemistry*, 113(1), 166–172. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.090>.

Chen, C. & Kong A.N.T., (2005). Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26 (6), 318-325.

Chedea V., Echim, C., Braicu, C., Andjelkovic, M., Verhe, R., Socaciu, C., (2010). Composition in polyphenols and stability of the aqueous grape seed extract from the Romanian variety ‘‘ Merolot Recas’’. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 92–108.

Cheng, V. J. Bekhit, A. E. D. A. McConnell, M. Mros, S. Zhao, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, 134, 474–482.

Chung, L.Y., Cheung, T. C., Kong, S. K, Fung, K P., Choy, Y. M., Chan, Z. Y., Kwok, T. T. (2003). Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci.*, 68, 1207 -1214.

Chiou, A., Panagopoulou, E.A., Gatzali, F., De Marchi, S., Karathanos, V.T., (2014). Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera L., var. Apyrena*), *Food Chemistry* 146, 157–165.

Chun, S-S. (2005). Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, 809-816.

Conde, E., Moure, A., Domínguez H., Parajó, J.C. (2011). Production of antioxidants by non isothermal autohydrolysis of lignocellulosic wastes. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), 436–442.

Da Porto, Erica Porretto, Deborha Decorti, (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera L.*) seeds, *ULrasonics Sonochemistry*, 20, 1076–1080.

Dai, J., Mumper, R.J., (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 2010, 15, p. 7313-7352.

Díaz, A.B., Bolívar, J., De Ong, I., Caro I., Blandino, A. (2011). Applicability of enzymatic extracts obtained by solid state fermentation on grape marc and orange peels mixtures in must clarification. *LWT – Food Science and Technology*, 44(4), 840–846.

Díaz, A.B., De Ong, I., Caro, I., Blandino, A. (2009). Production of hydrolytic enzymes from grape pomace and orange peels mixed substrate fermentation by *Aspergillus awamori*. *Chemical Engineering Transactions*, 17, 1143–1148.

Downey M, Houlsworth R, Maringele L, Rollie A, Brehme M, Galicia S, Guillard S, Partington M, Zubko MK, Krogan NJ, Emili A, Greenblatt JF, Harrington L, Lydall D, Durocher D Show fewer. (2006) A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* 124(6):1155-68

Ellen Silva., Da-Silva R., Gomes E., Romero E., and Hermosvn-Gutiérrez I., (2011). Phenolic Composition of the Edible Parts (Flesh and Skin) of Bordo Grape (*Vitis labrusca*) Using HPLC–DAD–ESI-MS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 13136–13146.

Fernandez, K., and Agosin, E., (2007). Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7294-7300.

Fiori, L. (2010). Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: plant and process design, modeling, economic feasibility. *Journal of Chemical Engineering and Processing*, 49(8), 866–872.

Friedrich, W., Eberhardt, A., Galensa, R., (2000). Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 211: 56±64.

Foo, L. Y., (1981). Proanthocyanidins: Gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry*, 20(6), 1397–1402.

Foti, M. C., Daquino, C., & Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. *The Journal of organic chemistry*, 69(7), 2309-2314.

Fragoso, S., Acena, L., Guasch, J., Mestres, M., & Busto, O. (2011). Quantification of phenolic compounds during red winemaking using FT-MIR spectroscopy and PLS-regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 10795–10802.

Fusco, V., Besten, H. M. W., Logrieco, A. F., Rodriguez, F. P., Skandamis, P. N., Stessl, B., & Teixeira, P. (2015). Food safety aspects on ethnic foods: toxicological and microbial risks. *Current Opinion in Food Science*, 6, 24–32.

García-Martínez, S., Grau, A., Agulló, E., Bustamante, M.A., Paredes, C., Moral, R., Ruiz, J.J. (2009). Use of composts derived from winery wastes in tomato crop. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(1–6), 445–452.

Garzón, G. A., & Wrolstad, R. E. (2009). Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chemistry*, 114(1), 44–49. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.013>.

Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., and Hermosin-Guitierrez, I., (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetector by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.

Guarrera P.M., Salerno G., Caneva G., (2005). Folk phytotherapeutical plants from *Maratea area* (Basilicata, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 367-378.

Guarrera P.M. (2003). Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). *Fitoterapia*, 74, 515-544.

Guarrera P.M. (1999). Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 183-192.

Guerrero, M. S. Torres, J. S. Nuñez, M. J. (2008). Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: optimization and modelling. *Bioresource Technology*, 99, 1311–1318.

Guerrero, J.H., Benítez, J.J., Domínguez, E., Bayer, I.S., Cingolani, R., Athanassiou, A., and Heredia, A., (2014). Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review frontiers in plant science June, Volume 5, Article 305.

Hanlin, R.L., Hrmova, M., Harbertson, J.F., Downey, M.O. (2010). Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine *Article in Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1):173 – 188.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

Irini F. Strati, Oreopoulou, V., (2011) Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste, *Food Chemistry*, 129, 747–752.

Irini F. Strati, Gogou, E., Oreopoulou, V., (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and bioproducts processing*, 94, 668–674.

Jackson, R. S., (1994). *Wine Science. Principles and Applications*. United Kingdom: Academic Press, (p. 11-15, 222).

Jackson, R. S., (2014). *Wine Science. Principles and Applications*. Fourth edition, United Kingdom: Academic Press, (p. 354-355, 359-360, 432-434, 439).

Jiang Y., Simonsen J., Zhao, Y. (2011). Compression-molded biocomposite boards from red and white wine grape pomaces. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(5), 2834–2846.

Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A., (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43:195–203.

- Kallithraka, S.,** Mohdalya, A.A., Makris, D.P., Kefalas, P., (2005). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 375–386.
- Karoui, R.,** Downey, G., Blecker, C. (2010). Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure-Quality Relationships. *Chemical Reviews*, 110, 6144–6168.
- Karvela, E.,** Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos, (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stems polyphenols. *Talanta*, 79(5), 1311-1321.
- Karvela, E.,** Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos, Panagiotis Kefalas, (2009). Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. *European Food Research Technology*, 229(5), 731-743.
- Karvela, E.,** Dimitris P. Makris, Vaios T. Karathanos, (2009). Implementation of Response Surface Methodology to Assess the Antiradical Behaviour in Mixtures of Ascorbic Acid and α -Tocopherol with Grape (*Vitis vinifera*) Stem Extracts, *Food Chemistry*.
- Karvela, E.,** Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos, (2011). The Effect of pH on the Efficiency of Vinification By-Product Extracts to Inhibit Lipid Peroxidation in a Lecithin Liposome Model Matrix, *Journal of Food Quality*, 34, 299-305.
- Kaya-Celikera, H.,** Mallikarjunan, P. K., & Kaaya, A. (2015). Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control*, 52, 103-111.
- Khanal, R. C.,** Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, 43(5), 1464–1469. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.018>.
- Lafka, T.,** Sinanoglou, V., Evangelos S. Lazos, (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes, *Food Chemistry*, 104, 1206–1214.
- Landbo, A. K.,** & Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3169–3177. <http://doi.org/10.1021/jf001443p>.
- Leusink, G. J.,** Kitts, D. D., Yaghmaee, P., & Durance, T. (2010). Retention of antioxidant capacity of vacuum microwave dried cranberry. *Journal of Food Science*, 75(3). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01563.x>.
- Magalhaes, L.,** Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *613*, σσ. 1-19.
- Makris D.P.,** and Kefalas, P., (2013). Characterization of Polyphenolic Phytochemicals in Red Grape Pomace, *Int J Waste Resources*, 3:2.

Makris, D.P., Passalidi, V., Stamatina Kallithraka & Ioannis Mourtzinis (2015). Optimization of polyphenol extraction from red grape pomace using aqueous glycerol/tartaric acid mixtures and response surface methodology *Preparative Biochemistry and Biotechnology*.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Manios, T., Maniadakis, K., Boutzakis, P., Naziridis, Y., Lasaridi, K., Markakis, G., Stentiford, E.I. (2007). Methane and carbon dioxide emission in a two-phase olive oil mill sludge windrow pile during composting. *Waste Management*. 27(9), 1092–1098.

Meireles, M. A. A. (2009). Extracting bioactive compounds for food products : theory and applications. CRC Press.

Meyers, K.J., Swiechi T.J., Mitchell A.E., (2006). Understanding the native Californian diet: Identification of condensed and hydrolysable tannins in tanoak acorns (*Lithocarpus densiflorus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7686–7991.

Mirzaei-Aghsaghali1, Maheri-Sis, Mansouri, Ebrahim Razeghi, Abdolahad Shaddel telli, and Abolfazl Aghajanzadeh-Golshani, (2011). Estimation of the nutritive value of grape pomace for ruminant using gas production technique African. *Journal of Biotechnology* Vol. 10(33), pp. 6246-6250.

Molina-Alcaide, Moumen and Martín-García. (2008). By products from viticulture and the wine industry: potential as sources of nutrients for ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:597–604.

Moore, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145- 171.

Naczki, M., and Shahibi, F., (2004). Extraction and analysis of phenolics in food, *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

Noelia Castillo, Gomez-alonso S., Garcí E., Victoriz M., Velders H., and Errez I., (2009). Flavonol 3-O-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 209–219 209.

Nogales-Bueno, J., Berta B.B., Abigail R., José Miguel H.H., José Heredia, F., Byrne H.J., (2017). Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin *Talanta*, 167, 44–50.

Paiva, S.A.R., Russell, R.M., (1999). β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Journal of the American College of Nutrition*, 18, 426–433.

- Paradelo, R.,** Moldes, A.B., Barral, M.T. (2010). Utilization of a factorial design to study the composting of hydrolyzed grape marc and vinification lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3085–3089.
- Pardo, A.,** Perona, M.A., Pardo, J. (2007). Indoor composting of vine by-products to produce substrates for mushroom cultivation. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 5(3), 417–424.
- Pati, S.,** Losito, I., Gambacorta, G., Lanotte, E., Palmisano, and Zambonin, P.G., (2006). Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 41, 861–871.
- Perez-Jimenez, J.,** Arranz, S., Taberner, M., Diaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>.
- Philippi, K.,** Tsamandouras, N., Grigorakis, S., Makris, D.P., (2016). Ultrasound Assisted Green Extraction of Eggplant Peel (*Solanum melongena*) Polyphenols Using Aqueous Mixtures of Glycerol and Ethanol: Optimisation and Kinetics, *Springer International Publishing Switzerland*.
- Pinelo, M.,** Arnous, A., Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skin: significance of cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (11), 579-590.
- Ping, L.,** Brousse, N., Chrusciel, L., Navarrete, P., Pizzi, A. (2011). Extraction of condensed tannins from grape marc pomace for use as wood adhesives. *Industrial Crop and Products*, 33(1), 253–257.
- Ping, L.,** Pizzi, A., Ding Guoa, Z., Brosse, N., (2012). Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. *Industrial Crops and Products*, 40, 13– 20.
- Portilla, M.,** Torrado-Agrasar, A., Carballo, J., Domínguez J.M., Moldes, A.B. (2009). Development of a factorial design to study the effect of the major hemicellulosic sugars on the production of surface-active compounds by *L. pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9057–9062.
- Portilla, O.,** Torrado, A., Domínguez, J.M., Moldes, A.B. (2008). Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8074–8080.
- Portilla, O.,** Torrado, A.M., Domínguez J.M., Moldes, A.B. (2010). Stabilization of kerosene/water emulsions using bioemulsifiers obtained by fermentation of hemicellulosic sugars with *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10162–10168.
- Qian Deng,** Michael H. Penner, Yanyun Zhao (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44, 2712–2720.

Renard, C., J. M., Bauduin, R., Symoneaux, R., Le Bourvellec, C., & Baron, A. (2011). Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions. *Food Chemistry*, 124(1), 117–125. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.113>.

Renaud, S., De Lorgeril, M., (1992). Wine, alcohol platelets and the French paradox for coronary heart disease, *Research Library Core*, pg. 1523.

Ribeiro, Ribania, R.H., Franciscod, T.M.G., Soarese, A.A., Pontarolod, R., (2015). Haminiukca Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectralanalyses. *Journal of Chromatography B*, 1007, 72–80.

Rice-Evens, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

Richardson, P. M., & Harborne, J.B. (1990). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Second Edition. Brittonia, 42(2), 115. <http://doi.org/10.2307/2807624>.

Rodriguez, L., Toro, M., Vázquez, F., Correa-Daneri, M., Gouiric, S., Vallejo, M. (2010). Bioethanol production from grape marc and sugar beet pomaces by solid state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(11), 5914–5917.

Sablani, S. S. (2006). Drying of fruits and vegetables: retention of nutritional/functional quality. *Drying Technology*, 24(2), 123–135. <http://doi.org/10.1080/07373930600558904>.

Sagar, V. R., & Suresh Kumar, P. (2010). Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: A review. *Journal of Food Science and Technology*, <http://doi.org/10.1007/s13197-010-0010-8>.

Schmid, M. (2001). Current Protocols in Food Analytical Chemistry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 48(May), 87. [http://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00141-5](http://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00141-5).

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., and Kakuda, Y., (2003). Polyphenolics in grape seeds – biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6, 291–299.

Simpson, T. J., (1998). Application of Isotopic Methods to Secondary Metabolic Panthway. *Top. Cur. Chum*, 195, 1-48.

Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of agricuLural and food chemistry*, 50(1), 81-86.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1998). Section III. Polyphenols and Flavonoids-14-Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-CiocalaLeu Reagent. *Methods in Enzymology*, 1999(299), 152-177.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2002). *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*. Αθήνα: Κωσταράκης.

Smita, T., & Mishra, H. N. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*, 20, 840–846.

Soong, Y.Y., and Barlow P.J. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085, 270–277.

Suarez, C., & Viollaz, P. E. (1991). Shrinkage effect on drying behavior of potato slabs. *Journal of Food Engineering*, 13(2), 103–114. [http://doi.org/10.1016/0260-8774\(91\)90013-I](http://doi.org/10.1016/0260-8774(91)90013-I).

Sun, W., and Miller, J.M., (2003). Tandem mass-spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrocatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin. *J. Mass Spectrometry*. 38, 438–446.

Teixeira Nieves Baenas, Raul Dominguez-Perles, Ana Barros, Eduardo Rosa, Diego A. Moreno, and Cristina Garcia-Viguera, (2014). Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 15638-15678, doi:10.3390/ijms150915638.

Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N.P., Abramovic, H., (2011). Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*. 128, 62–68.

Thermo scientific. (2013). «Introduction to FT-IR: Sample Handling». (2013). https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD%20Documents/Catalogs%20%26%20Brochures/Molecular%20Spectroscopy/FTIR/FTIR%20Spectrometers/BR50557_E_IntroSampHand0613M_H_1.pdf.

Thermo Spectronic. (2013). Basic UV-Vis Theory , Concepts and Applications Basic. Retrieved from. http://www.plant.uoguelph.ca/research/homepages/raizada/Equipment/RaizadaWebEquipmentPDFs/5B_UV-VIS_theory_ThermoSpectric.pdf.

Tomaz, I., Maslov, L., Stupić, D., Preiner, D., Ašperger, D., and Kontić, J.K., (2015). Multi-response optimisation of ultrasound-assisted extraction for recovery of flavonoids from red grape skins using response surface methodology *Phytochemical Analysis*.

Trikas, E., Melidou, M., Papi, R.M., Zachariadis, G.A., Kyriakidis D.A., (2016). Extraction, separation and identification of anthocyanins from red wine by-product and their biological activities, *Journal of Functional Foods*, 25, 548–558.

Valiente, C., Arrigoni, E., Esteban, R. M., & Amado, R. (1995). Grape Pomace as a Potential Food Fiber. *Journal of Food Science*, 60(4), 818–820. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06237.x>.

Vatai, T. Skerget, M. Knez, Z. Kareth, S. Wehowski, M. Weidner, E. (2008). Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *The Journal of Supercritical Fluids*, 45, 32–36.

White, B., Rice, L., & Howard, L. R. (2012). The Procedure, Principle, and Instrumentation of Antioxidant Phytochemical Analysis. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, 25–68. <http://doi.org/10.1002/9781118229378.ch2>.

Winkel-Shirley, B., (2001). Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126, 485- 493.

Wojdyło, A., Figiel, A., & Oszmiański, J. (2009). Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1337–1343. <http://doi.org/10.1021/jf802507j>.

Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173–1183.

Wu, Q., Wang, M., and Simon, J.E., (2003). Determination of proanthocyanidins in grape products by liquid chromatography/mass spectrometric detection under low collision energy. *Analytical Chemistry*, 75, 2440–2444.

Yinrong, L., Yeap, F., (1999). The polyphenol constituents of grape pomace, *Food Chemistry*, 65.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Ακριδα, Κ., Δεμερτζής, Ρηγανάκος, Σαββαΐδης. (2014). «Προχωρημένα Μαθήματα Επεξεργασίας και Συντήρησης Τροφίμων. Αλκοολούχα αποστάγματα». Έκδοση: 1.0. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Αλαβάνος Λευτέρης, (2014). «Απομόνωση και μελέτη των φαινολικών συστατικών οσπρίων *Phaseolus Vulgaris* και *Phaseolus Coccineus*», Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθίνα.

Διονύσος, (DIONYSOS), (2003-2006). Ανάπτυξη οικονομικά βιώσιμης διαδικασίας για την ολοκληρωμένη διαχείριση, μέσω χρησιμοποίησης, των οινοποιητικών αποβλήτων: Παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και οργανικού λιπάσματος, LIFE 03 ENV/GR/000223.

Κουβουτσάκης, Π. Γ. (2013). Γεωγραφική ταξινόμηση οσπρίων φακής (*Lens culinaris* L.) με χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας συνδυασμένης με χημειομετρικές μεθόδους. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Καραγιαννοπούλου-Πετροπούλου, Σ. (2016). Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Σημειώσεις Αμπελουργίας, Γεωπόνος Καθηγήτρια ΤΕΙ Πελοποννήσου.

Καρβέλα Ευαγγελία, (2011). Πολυφαινολικά συστατικά υποπροϊόντων οινοποίησης: Ανάκτηση και αξιολόγησή τους ως πρόσθετα σε μοντέλα τροφίμων, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα.

Καρκαλούσος, Πέτρος Γεωργίου, Ζωή Κρούπης, Χρήστος Παπαϊωάννου, Άγγελος Πλαγιάς, Παναγιώτης Σπυρόπουλος, Βασίλειος Τσότσου, Γεωργία Ελένη Φούντζουλα, (2015). Χριστίνα Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. <http://hdl.handle.net/11419/5388>.

Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., Χειλάκου, Ε. (2015). Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., Χειλάκου, Ε. 2015. Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. εφ 7. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/6175>.

Παππάς, Χ. (2000). Φασματοσκοπική μελέτη συστατικών του φυτού κενάφ (*Hibiscus cannabinus* L.). Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Παππάς Χ., (2018). Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Καραγιαννοπούλου, Σ., (2016). Σημειώσεις Αμπελουργίας Καθηγήτρια ΤΕΙ Πελοποννήσου Καλαμάτα.

Ποτσώλη Θεοδώρα, (2016). Αμπελογραφική μελέτη και αξιολόγηση γηγενών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera* L.), μεταπτυχιακή μελέτη.

Ταραντίλης Πέτρος, (2018). Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τζάμης Ι., (2010). Μελέτη αποσταγμάτων στεμφύλων και σταφύλης, Διδακτορική διατριβή Αθήνα.

Τιτάκης-Καρτσωνάκης, (2006). Αξιοποίηση των στεμφύλων σε μονάδες παράγωγης σταφύλης πλούσιων σε πολυφαινόλες, μεταπτυχιακή μελέτη, Αθήνα.

Τσιμογιάννης, Δ., (2008). Αντιοξειδωτική Δράση Φλαβονοειδών Ενώσεων Και Εκχυλισμάτων Αρωματικών Φυτών: Αναγωγή Ελευθέρων Ριζών και Προστασία Φυτικών Ελαίων. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών.

Ξένα Βιβλία

Raymond, C., George, N. Sources, (2014). Natural Products Chemistry: Separations and Structures by Raymond Cooper. Paperback – 1718.

Taylor & Francis., (2011). Group International Handbook of HPLC Standard Book Number: 978-1-57444-554-1 (Hardback).

Ελληνικά Βιβλία

Αργύρης Τσακίρης, (1988). Οινολογία από το σταφύλι στο κρασί, Εκδότης ψύχαλος, ISBN13 9789607920058, σελ.(368).

Κουράκου-Δραγώνα Σ., (1998). Θέματα Οινολογίας, Αθήνα.

Νταβίδης Ο.Ξ., (1982). Ελληνική Αμπελολογία, (Γ), Αθήνα.

Διαδικτυακοί Σύνδεσμοι

Ευρωπαϊκό προγράμμα, Dionysos, (2003-2006). www.pharm.uoa.gr.

Κανονισμός 1493/99 της Ε.Ε., L179/17, 14 – 7 – 1999.

Κανονισμός 1623/2000 της Ε.Ε., L194/67, 31 – 7 – 2000.

Υπουργείου Γεωργίας, www.minagric.gr.

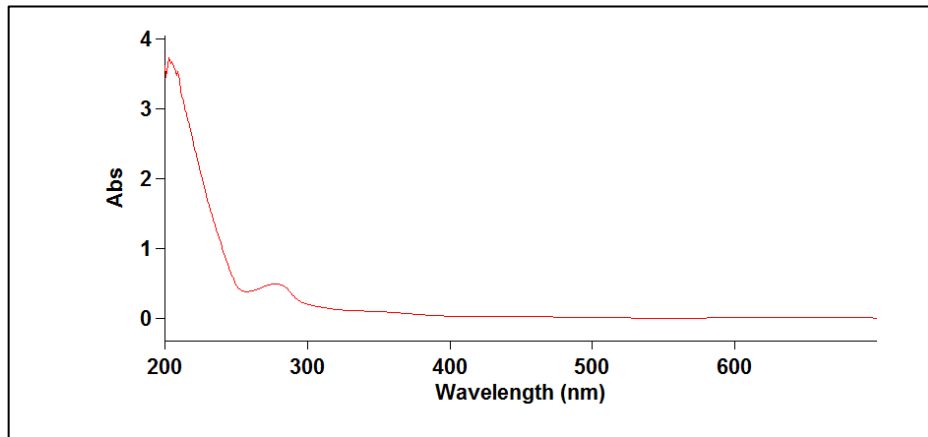
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων, ΥΠΑΑΤ, 2018.

Υπουργική Απόφαση 400761, Υπουργός Γεωργίας, 22 – 11 – 2000.

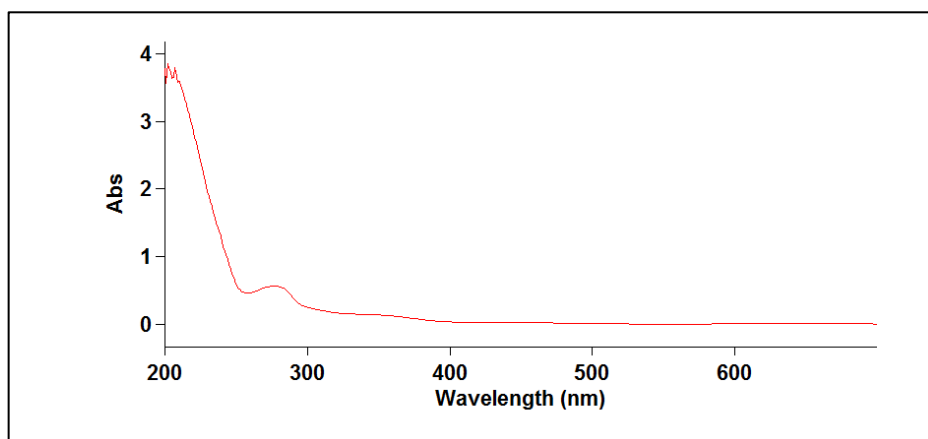
FAO, Food and Agriculture Organization, 2017.

OIV, International Organisation of Vine and Wine, 2016.

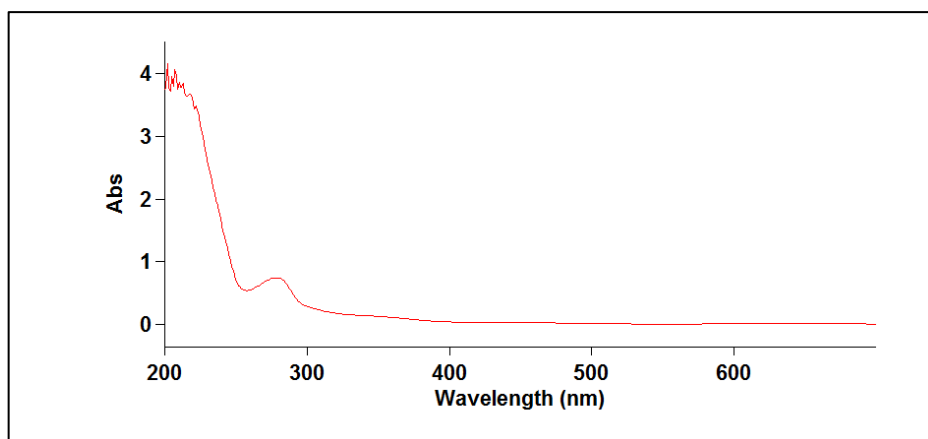
Φάσματα UV-Vis Ακατέργαστων δειγμάτων



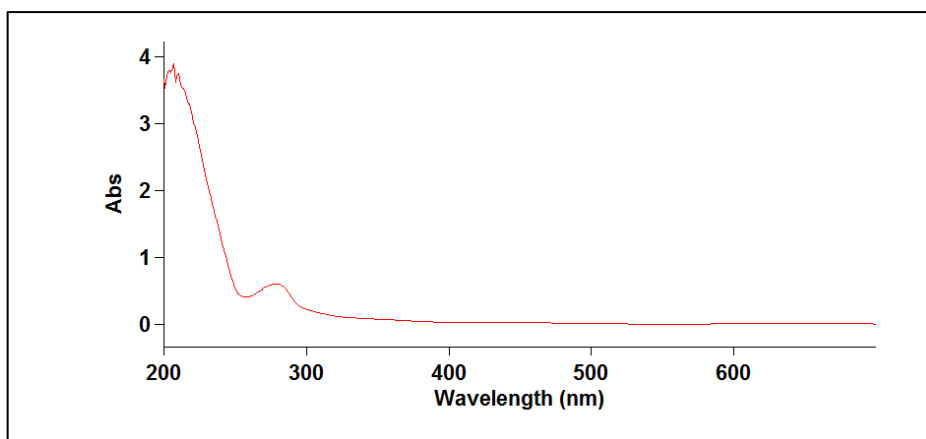
Εικόνα 66: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



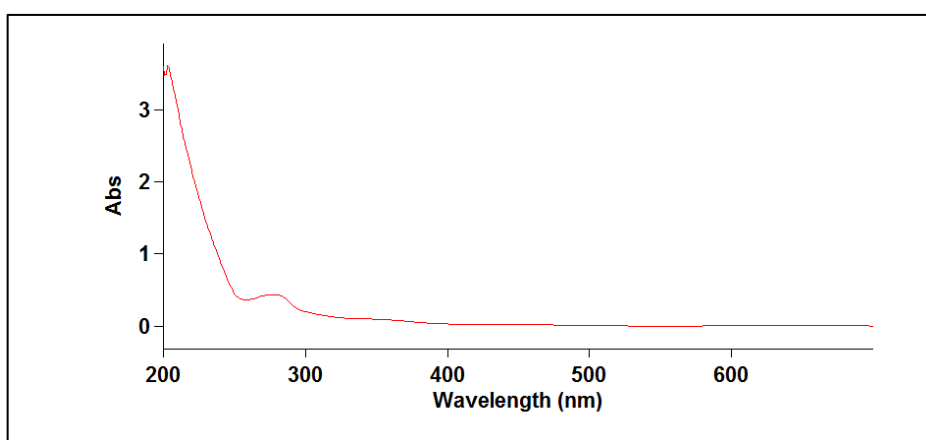
Εικόνα 67: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



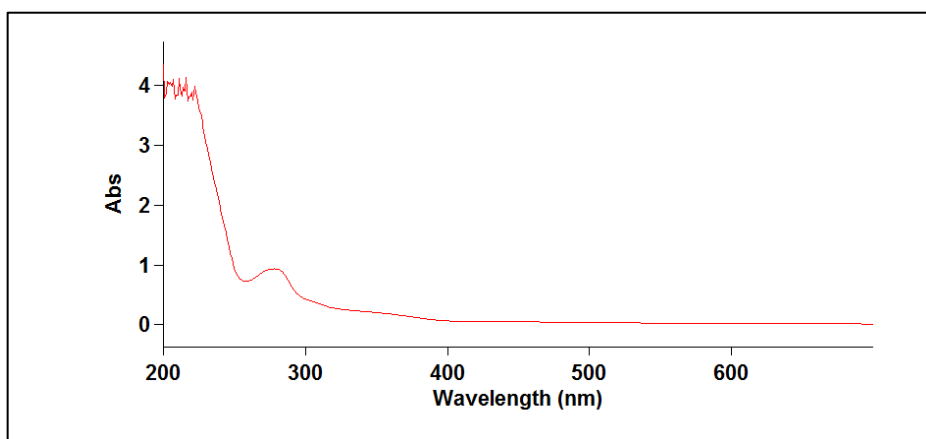
Εικόνα 68: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



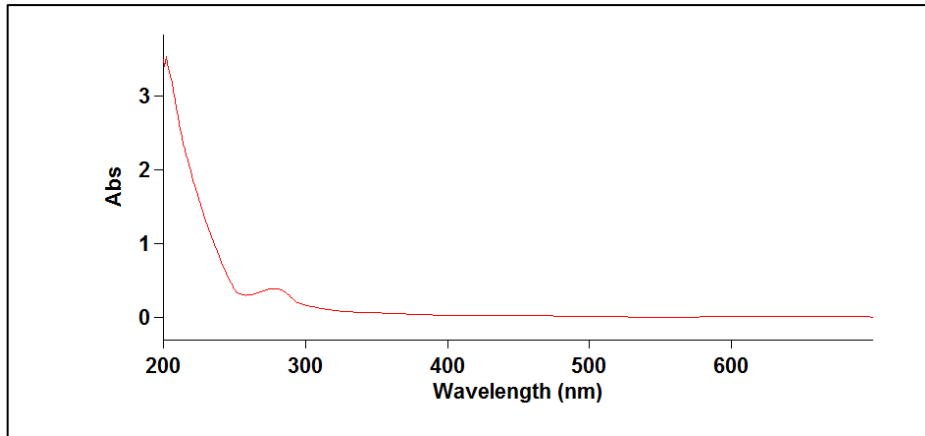
Εικόνα 69: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



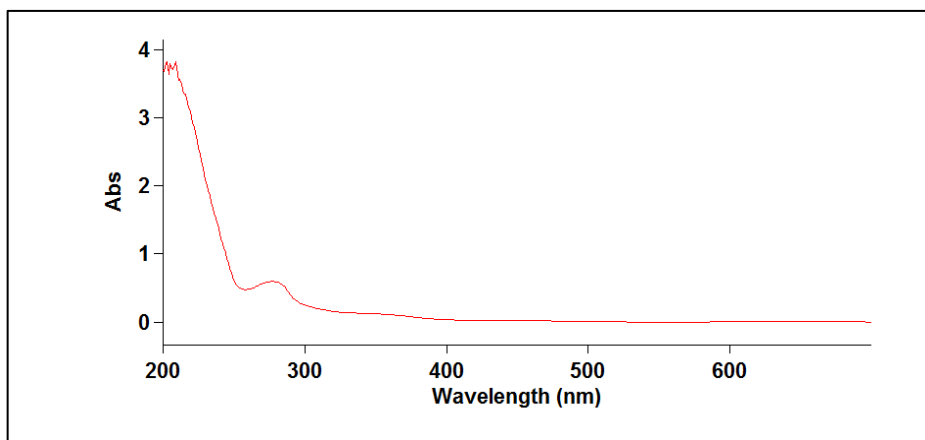
Εικόνα 70: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



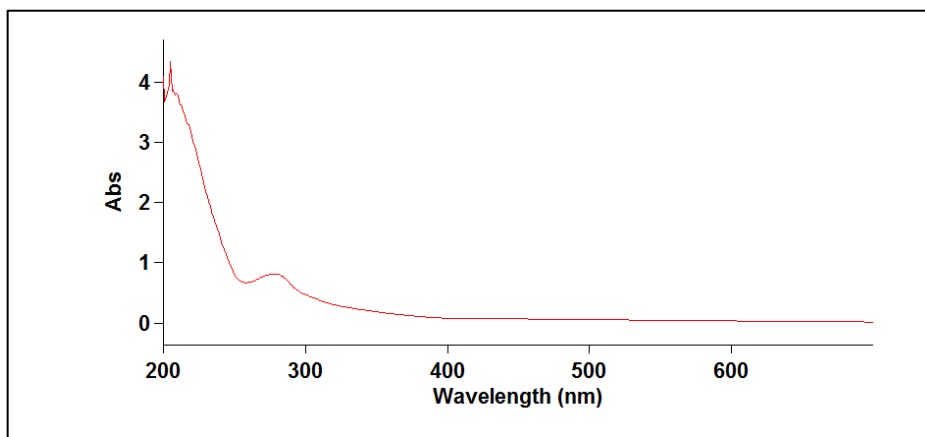
Εικόνα 71: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι-Κεφαλονιας.



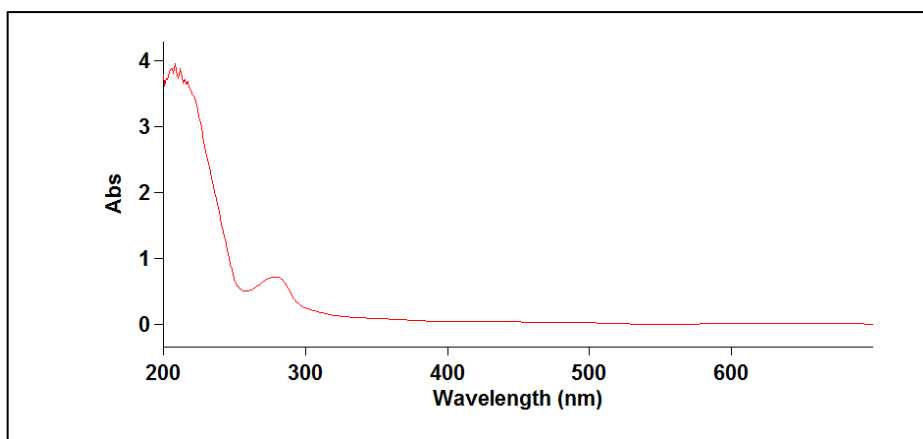
Εικόνα 72: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



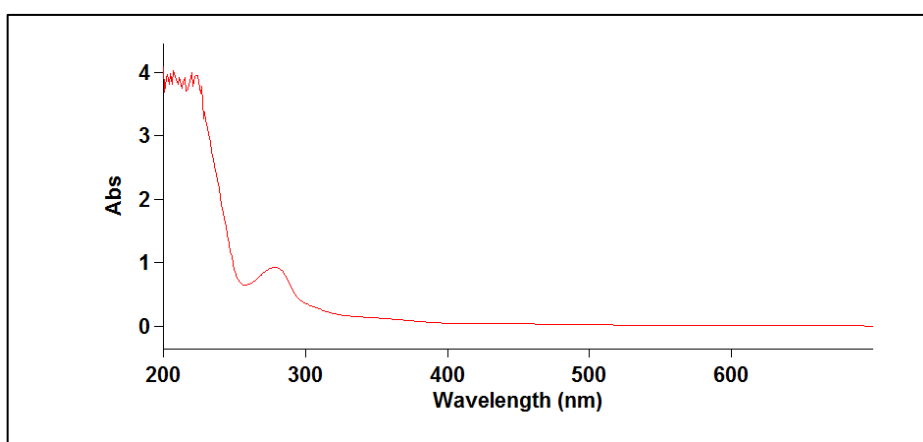
Εικόνα 73: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



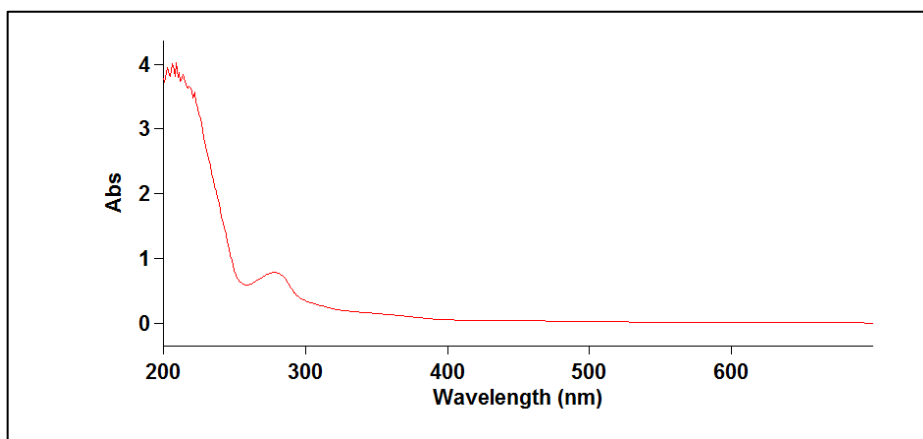
Εικόνα 74: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουσιάτης-Κεφαλονιας.



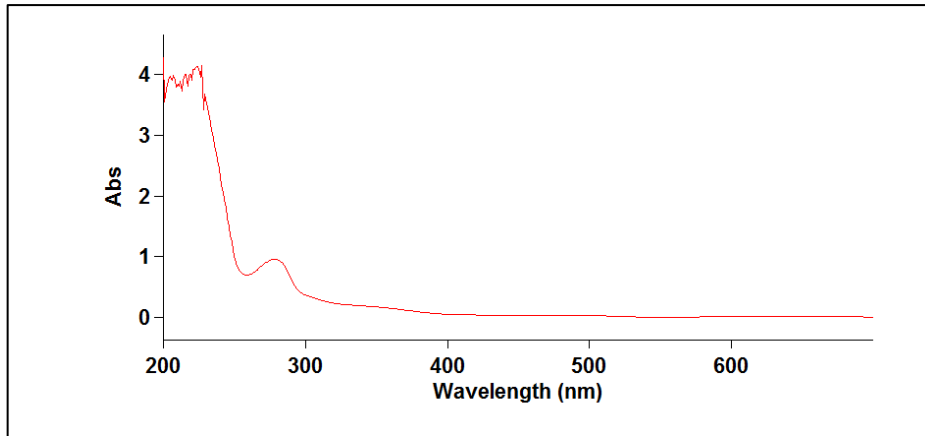
Εικόνα 75: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.



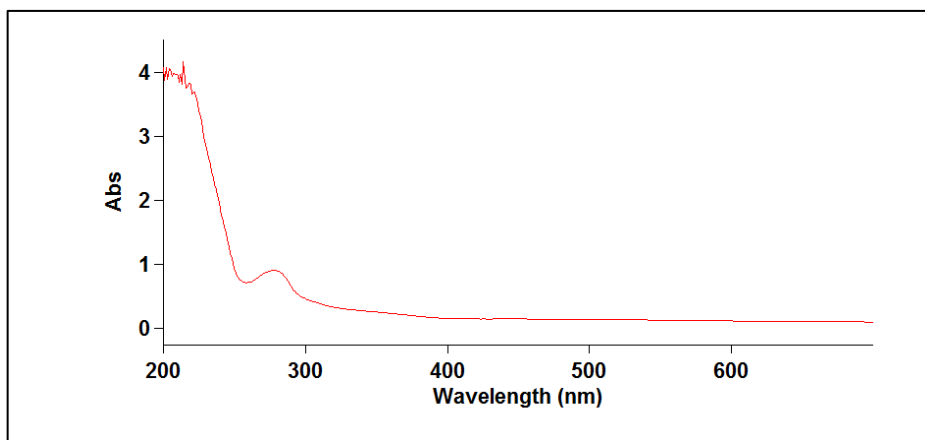
Εικόνα 76: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος



Εικόνα 77: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 17- Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας- Ζάκυνθος

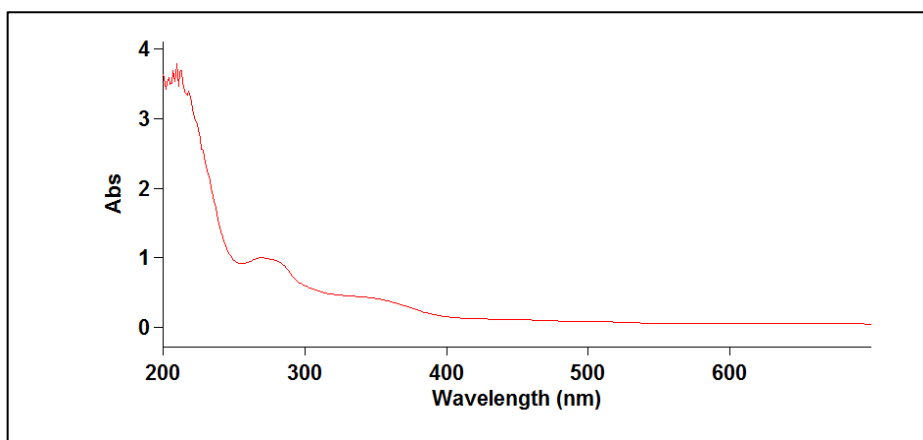


Εικόνα 78: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.

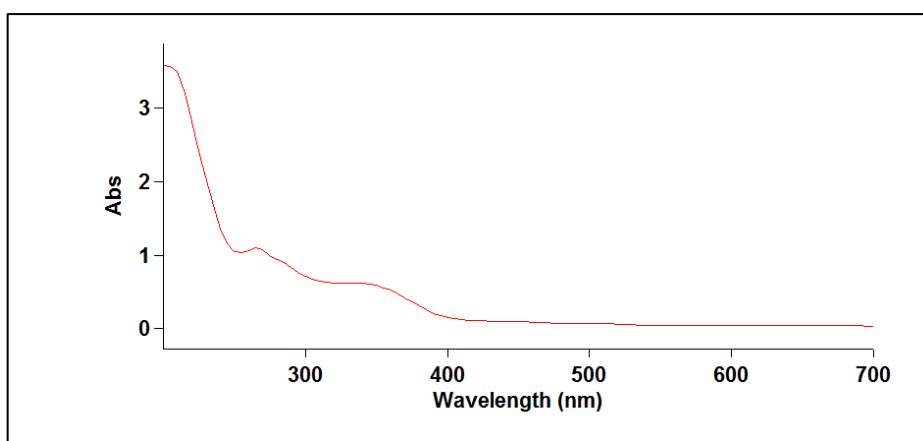


Εικόνα 79: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.

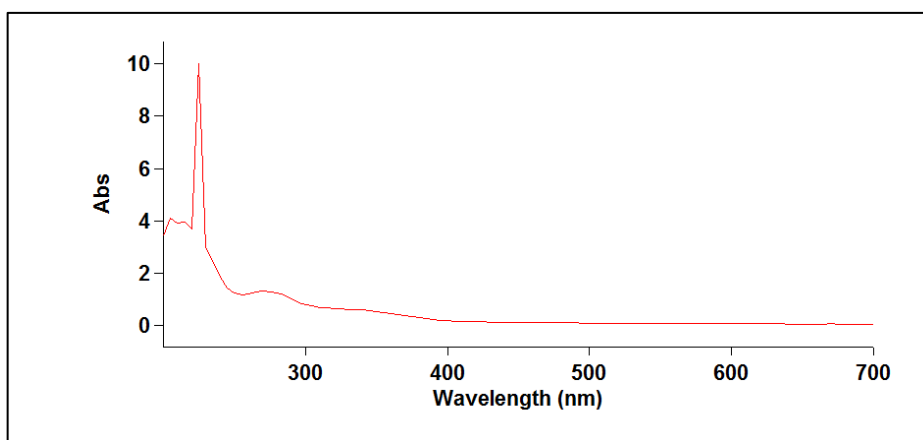
Φάσματα UV-Vis Υδρολυμένων δειγμάτων



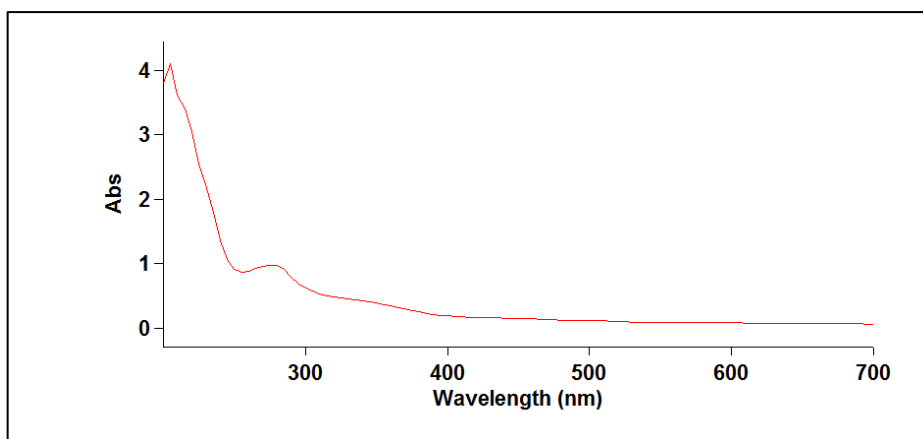
Εικόνα 80: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



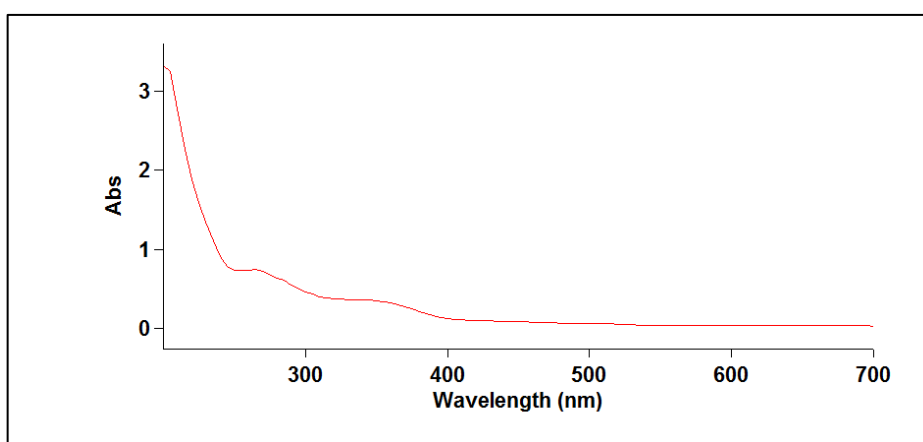
Εικόνα 81: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



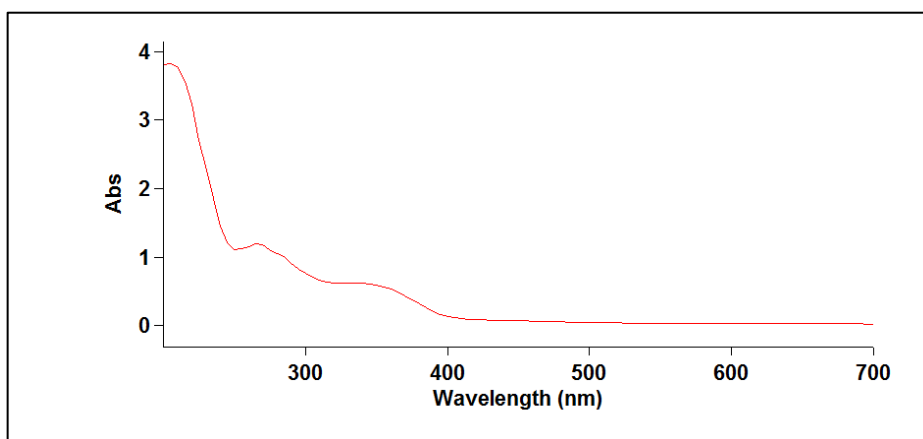
Εικόνα 82: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



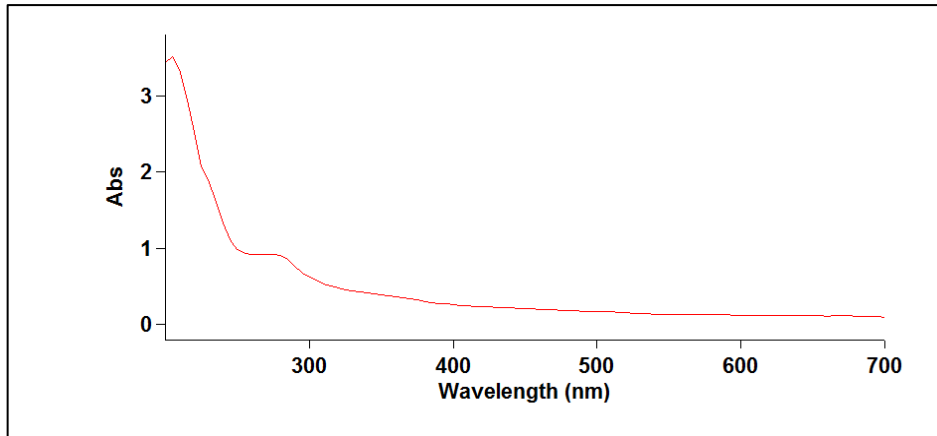
Εικόνα 83: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



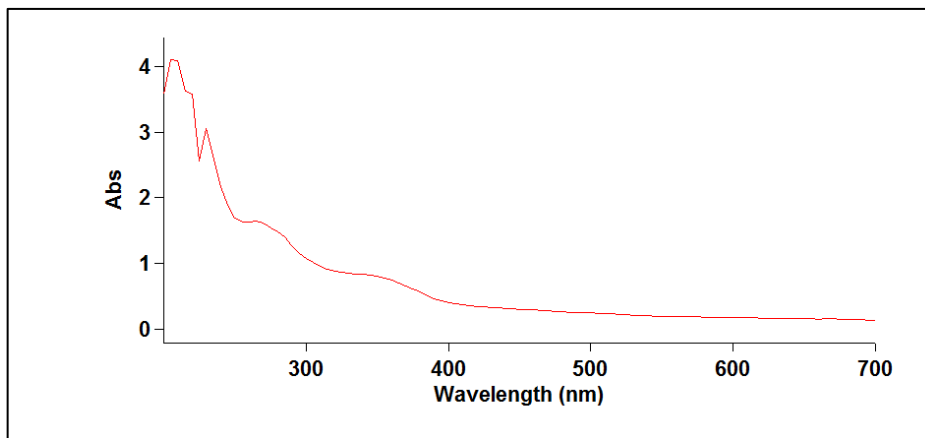
Εικόνα 84: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



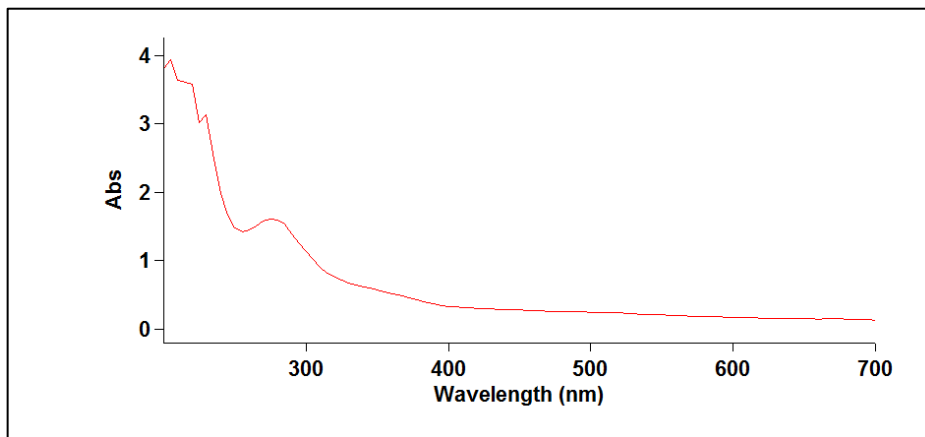
Εικόνα 85: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 11- Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι-Κεφαλονιας.



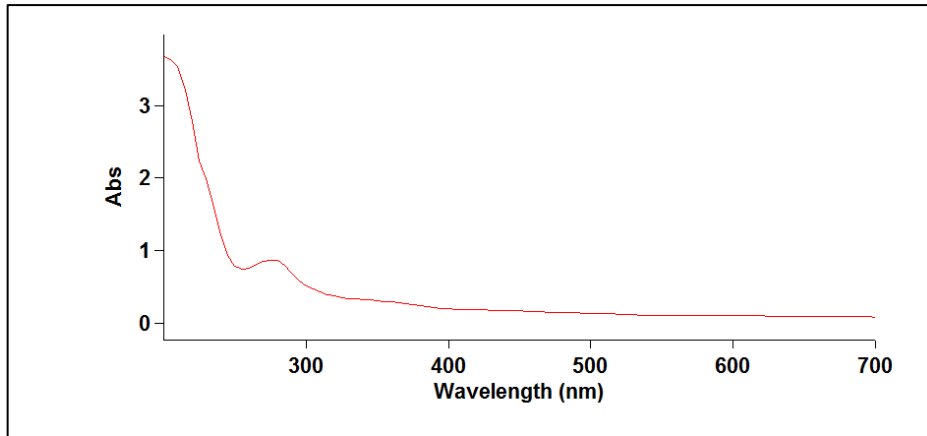
Εικόνα 86: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



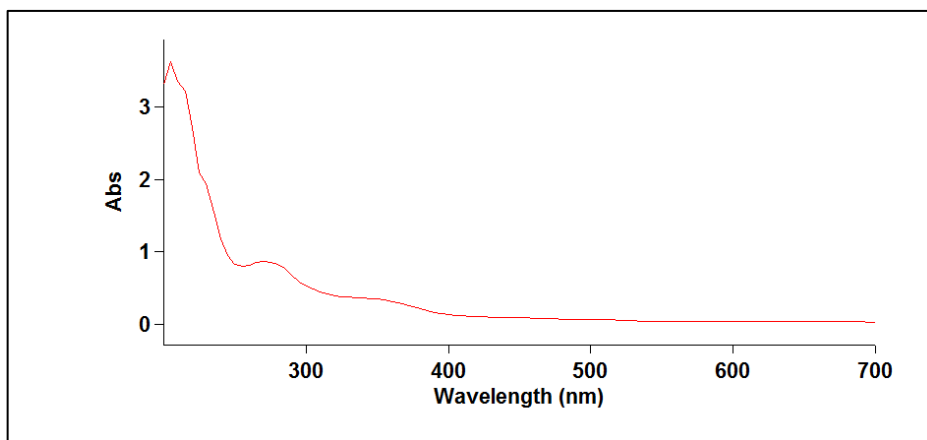
Εικόνα 87: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιας.



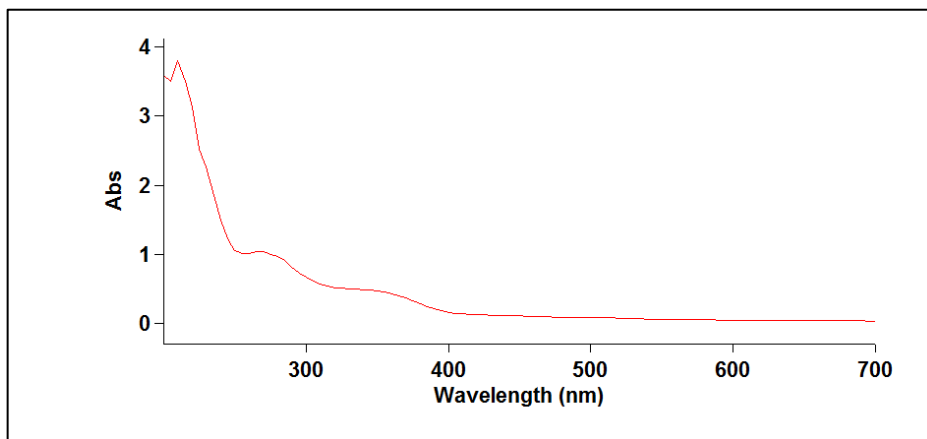
Εικόνα 88: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 14- Αυγουσιάτης-Κεφαλονιας.



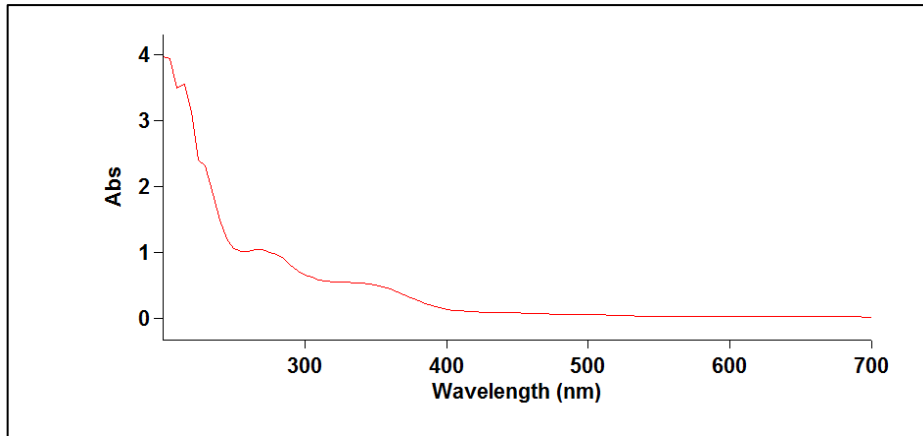
Εικόνα 89: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.



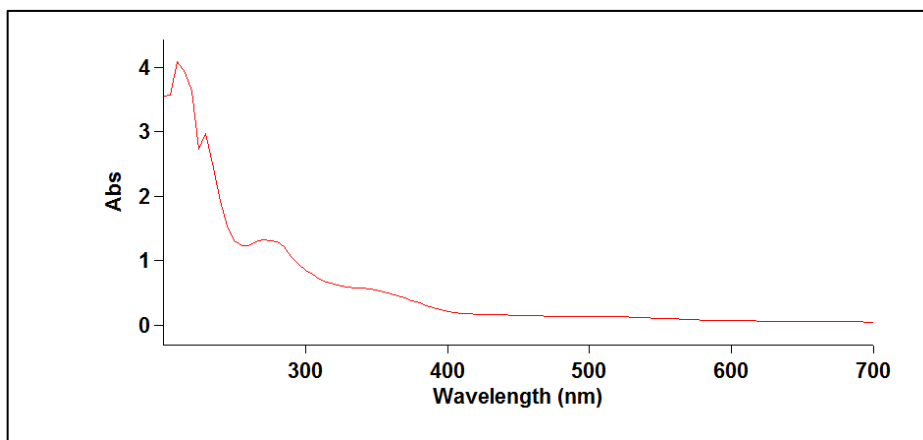
Εικόνα 90: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 16- Αυγουσιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.



Εικόνα 91: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουσιάτης-Κατσακούλιας-Ζάκυνθος.



Εικόνα 92: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 03-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.

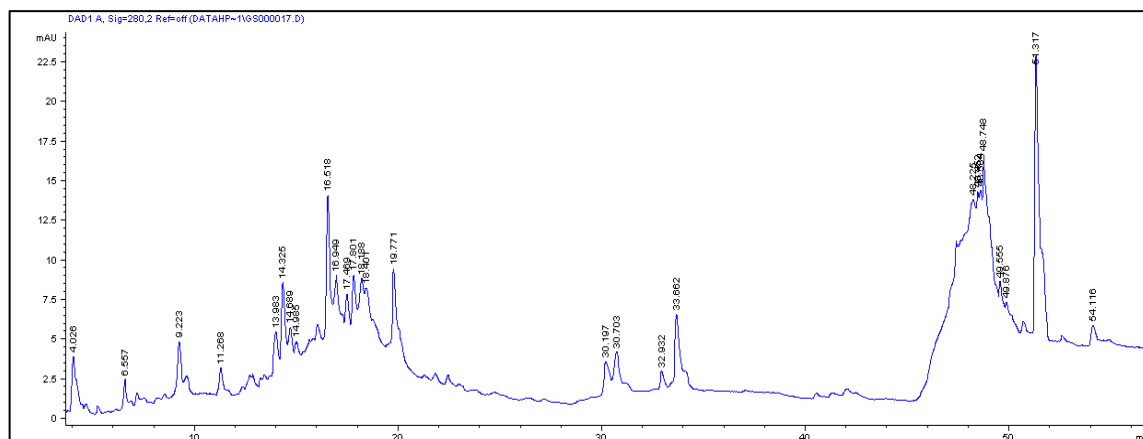


Εικόνα 93: Φάσμα UV-Vis του δείγματος με κωδικό 19- Cabernet-Κέρκυρα.

Χρωματογραφήματα HPLC-DAD Ακατέργαστων δειγμάτων

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Gentilini/ Φαγιάς

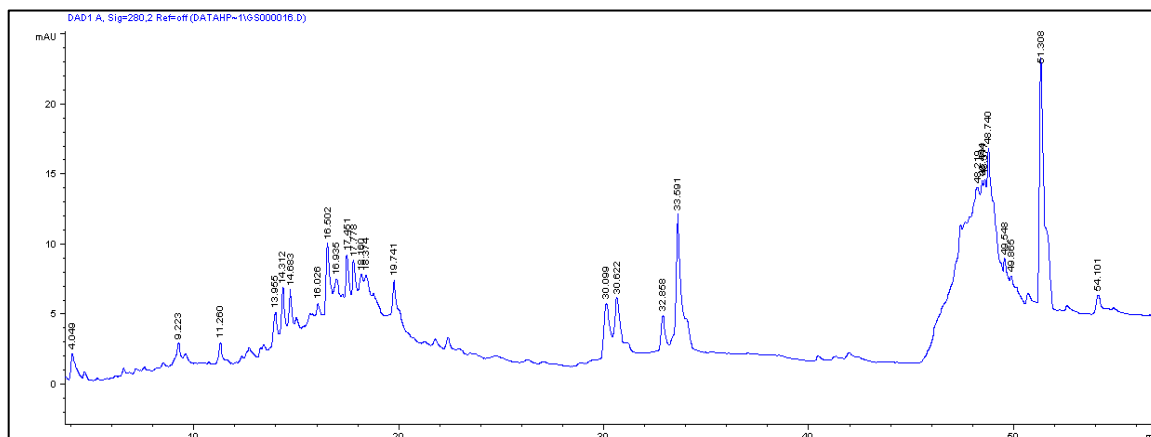


Εικόνα 94: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 03 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis (nm)	Rt (min)	UV-Vis (nm)	Rt (min)	UV-Vis (nm)
1	4,026	265	14,706	280– 320	14,708	280– 320
2	6,557	265	30,192	280– 355	30,192	280– 355
3	9,223	273	30,704	255– 360	30,701	255– 360
4	11,268	280	32,930	260– 355	32,930	260– 355
5	13,983	275	33,660	265– 355	33,660	265– 355
6	14,325	280				
7	14,689	280– 325				
8	14,985	280				
9	16,518	280				
10	16,949	275				
11	17,469	275				
12	17,801	275				
13	18,188	275				
14	18,401	275				
15	19,771	275				
16	30,197	270– 360				
17	30,703	270– 360				
18	32,932	265– 280– 355				
19	33,662	265– 350				

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Gentilini/ Κοκκινοπίλια

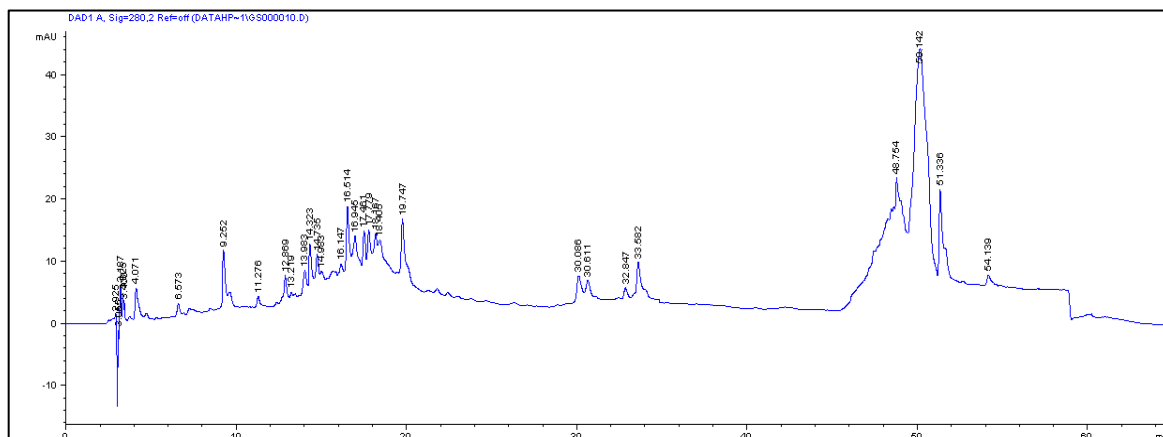


Εικόνα 95: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 06 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,049	265	14,690	280– 320	14,688	280– 320
2	9,223	273	30,095	280– 355	30,095	280– 355
3	11,260	280	30,620	255– 360	30,620	255– 360
4	13,955	275	32,857	260– 355	32,856	260– 355
5	14,312	280	33,590	265– 355	33,590	265– 355
6	14,683	280– 330				
7	16,026	280				
8	16,502	280				
9	16,935	275				
10	17,451	275				
11	17,778	275				
12	18,160	275				
13	18,374	275				
14	19,741	275				
15	30,099	270– 360				
16	30,622	270– 360				
17	32,858	265– 355				
18	33,591	265– 350				

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Gentilini/ Αγ. Νικόλαος

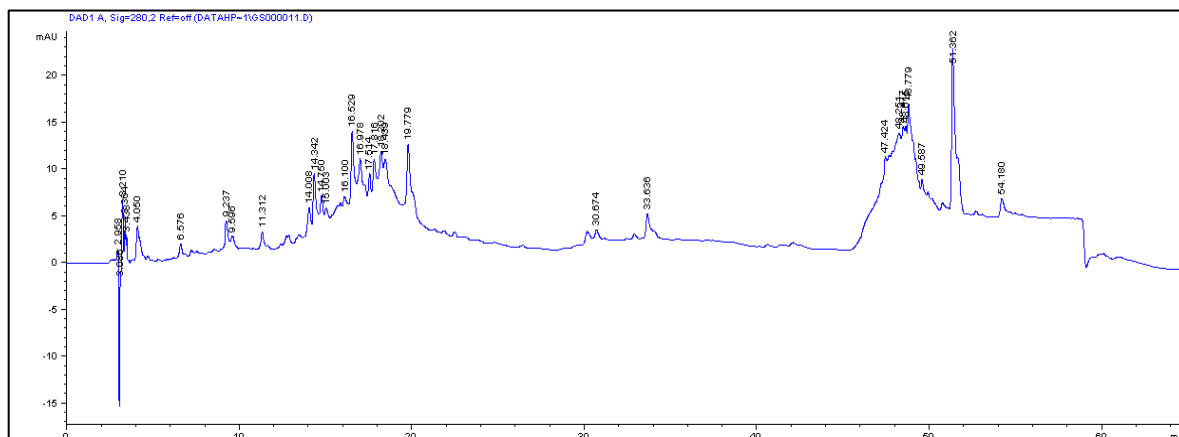


Εικόνα 96: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 07 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,071	265	14,739	280– 330	14,738	280– 340
2	6,573	273	17,465	280	30,086	280– 360
3	9,252	280	18,357	280	30,608	280– 360
4	11,276	275	30,086	255– 360	32,848	265– 280
5	12,869	280	30,61	260– 355	33,581	260– 355
6	13,219	280– 330	32,847	260		
7	13,983	280	33,581	265– 355		
8	14,323	280				
9	14,735	275– 320				
10	14,983	275				
11	16,147	275				
12	16,514	275				
13	16,945	275				
14	17,461	275				
15	17,779	270– 360				
16	18,167	270– 360				
17	18,405	280– 355				
18	19,747	265– 350				
19	30,086	275– 360				
20	30,611	275– 360				
21	32,847	275				
22	33,582	270– 285				

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Gentilini/ Βαλσαμάτα

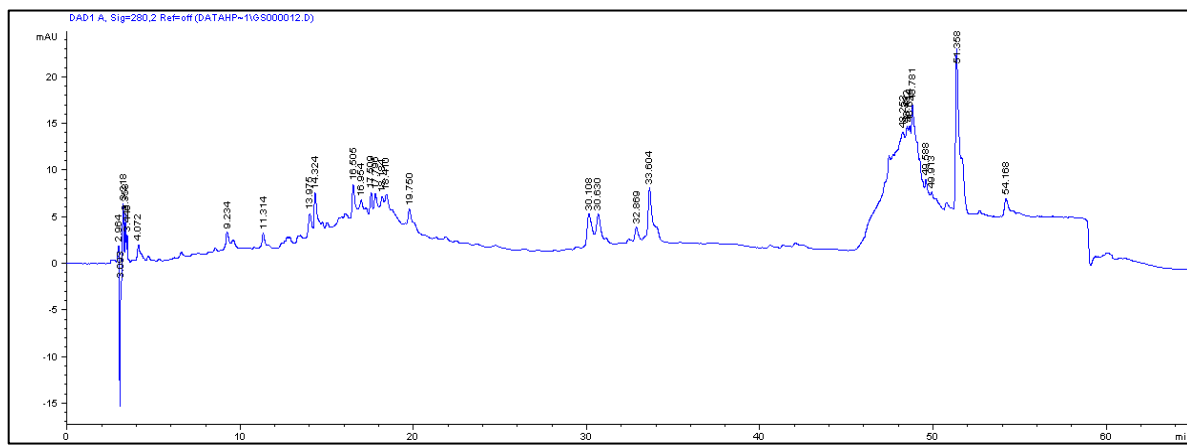


Εικόνα 97: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 09 στα 280 nm.

Μήκος Κόματος #	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,050	265	14,753	280– 330	14,738	280– 340
2	6,576	265	30,157	280	30,086	280– 355
3	9,237	273	30,677	280	30,608	255– 360
4	9,596	280	33,636	255– 360	32,848	260– 350
5	11,312	275				
6	14,008	280				
7	14,342	280				
8	14,750	280– 325				
9	15,003	280				
10	16,100	275				
11	16,529	275				
12	16,978	275				
13	17,514	275				
14	17,816	275				
15	18,202	275				
16	18,439	270– 360				
17	19,779	270– 360				
18	30,674	280– 355				
19	33,636	265– 350				

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Συνεταιρισμός

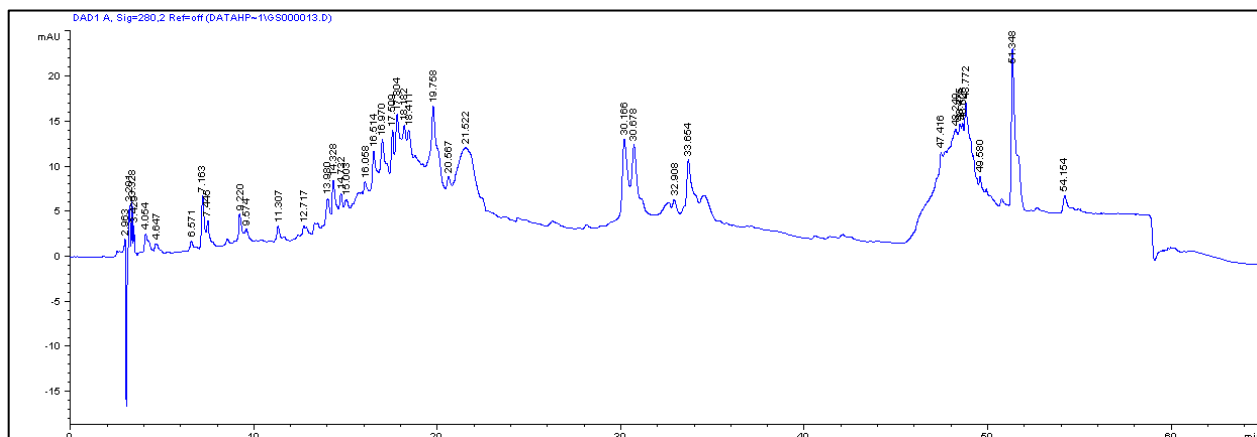


Εικόνα 98: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 10 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος	280 nm		320 nm		360 nm	
#	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,072	265	14,736	280– 320	30,109	280– 355
2	9,234	273	30,107	280– 355	30,630	255– 360
3	11,314	280	30,629	255– 360	32,867	260– 355
4	13,975	275	32,865	260– 355	33,608	265– 355
5	14,324	280	33,608	265– 355		
6	16,505	280– 325				
7	16,954	280				
8	17,509	280				
9	17,796	275				
10	18,184	275				
11	18,410	275				
12	19,750	275				
13	30,108	275– 360				
14	30,630	275– 360				
15	32,869	270– 360				
16	33,604	270– 360				

Πληροφορίες δείγματος: Μαυροδάφνη- Βοστυλίδι, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Ταυλιανός

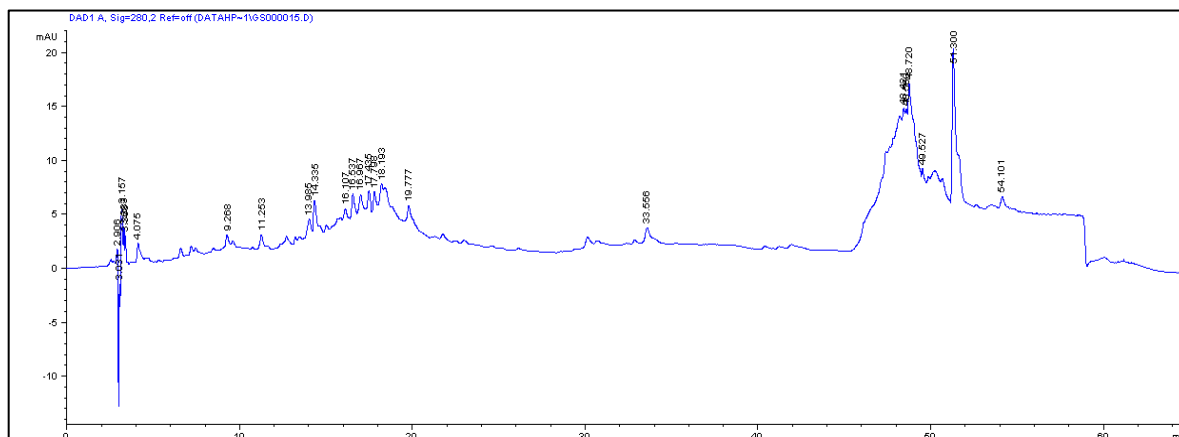


Εικόνα 99: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 03 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm		520 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,054	265	14,737	280– 320	14,733	280– 330	17,907	275– 520
2	4,647	265	17,478	280	24,379	280	19,717	275– 520
3	6,571	260	18,388	280	26,236	280	21,533	275– 520
4	7,163	290	24,373	280	30,164	275– 360	32,524	275
5	7,445	265	30,164	275– 360	30,677	275– 360	34,539	275
6	9,220	280	30,681	275– 360	32,914	275		
7	9,574	275	32,907	275	33,652	275– 360		
8	11,307	280	33,653	275– 355				
9	12,717	220						
10	13,980	280						
11	14,328	275						
12	14,732	275– 330						
13	15,003	280						
14	16,058	280						
15	16,514	280						
16	16,970	280						
17	17,509	280						
18	17,804	280						
19	18,182	280						
20	18,411	280						
21	19,758	280						
22	20,567	280						
23	21,522	270– 520						
24	32,908	275						
25	33,654	275– 360						

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Gentilini/ Lianos

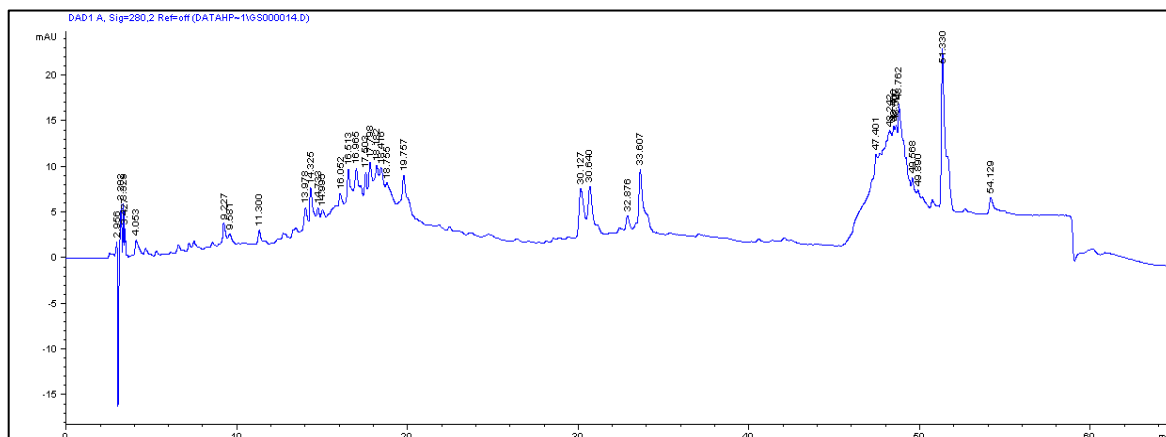


Εικόνα 100: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 12 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,075	265	10,698	280– 360	30,118	280
2	9,268	265– 280	11,159	280– 360	30,667	280– 360
3	11,253	280	12,634	280– 360	32,867	280– 360
4	13,985	275	13,979	280	33,592	280– 355
5	14,335	280	14,738	280		
6	16,107	280	15,644	280		
7	16,537	280	17,126	280		
8	16,967	280	18,342	280		
9	17,435	275	30,114	280		
10	17,798	275	30,666	280		
11	18,193	275	32,865	265– 280		
12	19,777	275				
13	33,556	275				

Πληροφορίες δείγματος: Ρομπόλα, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/Παραγωγός: Συνεταιρισμός

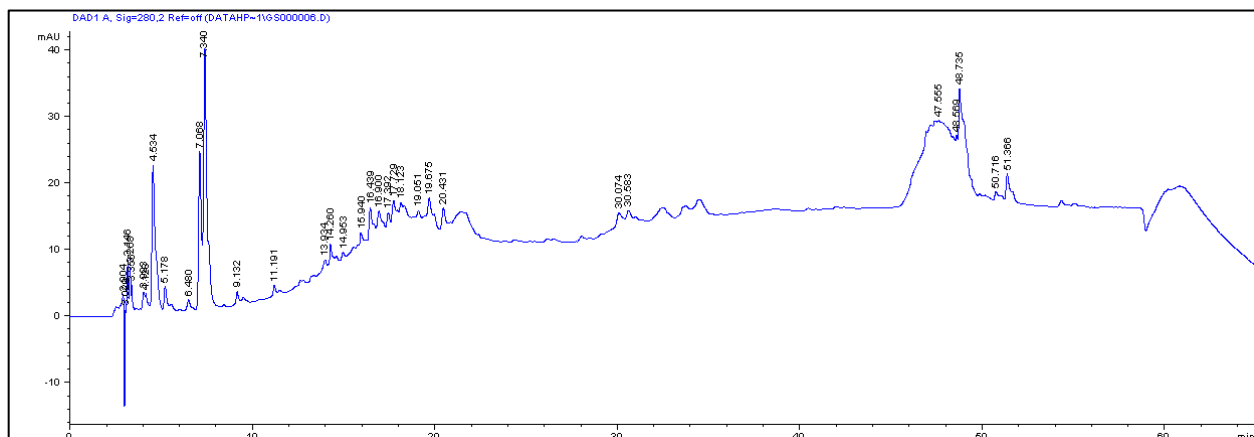


Εικόνα 101: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 13 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,053	265	14,741	280– 335	14,737	280– 320
2	9,227	265	30,126	280– 335	30,126	280– 355
3	9,581	273	30,640	255– 360	30,639	255– 360
4	11,300	280	32,874	260– 335	32,878	260– 355
5	13,978	275	33,613	265– 335	33,615	265– 355
6	14,325	280				
7	14,733	280– 330				
8	14,995	280– 325				
9	16,052	280– 325				
10	16,513	280				
11	16,965	280				
12	17,503	280				
13	17,798	280				
14	18,182	280				
15	18,416	280				
16	18,755	280				
17	19,757	280				
18	30,127	265– 360				
19	30,640	265– 360				
20	32,876	265– 360				
21	33,607	265– 355				

Πληροφορίες δείγματος: Αυγουστιάτης, Κεφαλονιά

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Γράμψας

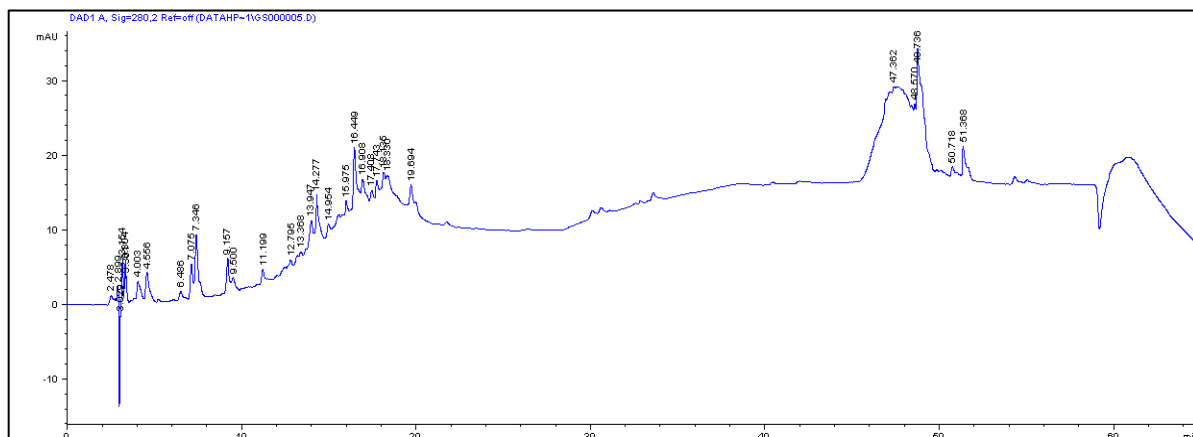


Εικόνα 102: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 14 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	3,355	265	4,538	245– 285	24,289	280– 320
2	3,993	265	7,071	260– 290	26,145	280– 320
3	4,128	280	14,604	270	30,060	280– 360
4	4,534	283	16,479	275	30,575	270– 355
5	5,178	275	17,673	275– 325	30,942	270– 355
6	6,480	265	19,053	280	33,742	275
7	7,068	260– 290	20,372	280		
8	7,340	270	30,057	275– 355		
9	9,132	270	30,587	280– 355		
10	11,191	275	49,155	280		
11	13,934	275				
12	14,260	275				
13	14,953	275				
14	15,940	275				
15	16,439	275				
16	16,900	275				
17	17,392	275				
18	17,729	275				
19	18,123	275				
20	19,051	275				
21	19,675	275				
22	20,431	275				
23	30,074	265– 355				
24	30,583	265– 355				

Πληροφορίες δείγματος: Παύλος, Ζάκυνθος

Οινοποιείο/Παραγωγός: Γράμψας

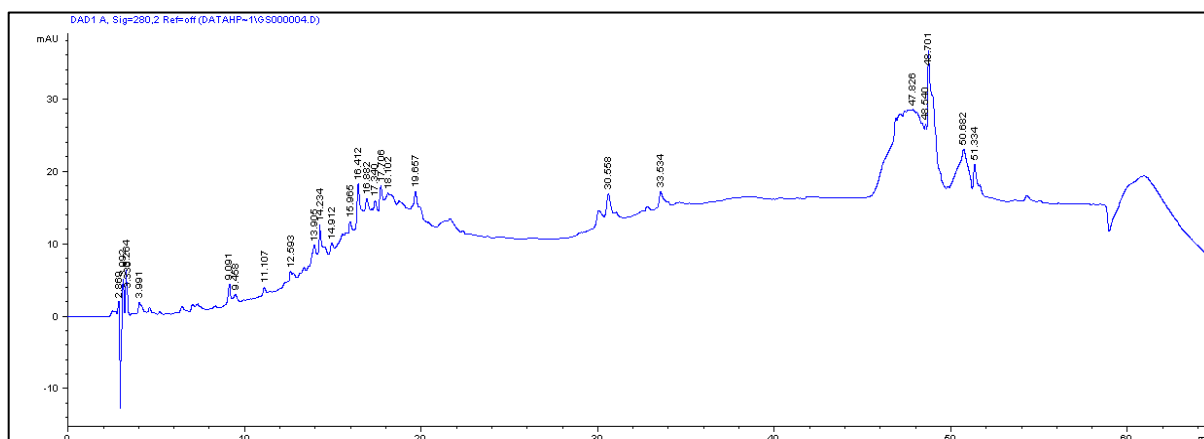


Εικόνα 103: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 15 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,003	265	30,568	270– 340	30,072	270– 340
2	4,556	250– 275	33,565	270– 340	30,571	270– 340
3	6,486	265	49,156	270– 340	33,565	270– 340
4	7,075	290				
5	7,346	270				
6	9,157	270				
7	9,500	270				
8	11,199	270				
9	12,795	270				
10	13,368	270				
11	13,947	270				
12	14,277	270				
13	14,954	270				
14	15,975	270				
15	16,449	270				
16	16,908	270				
17	17,408	270				
18	17,743	270				
19	18,135	270				
20	18,330	270				
21	19,694	270				

Πληροφορίες δείγματος: Αυγουστιάτης- Κατσακούλιας- Σκιαδόπουλο, Ζάκυνθος

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Καλλίνικος

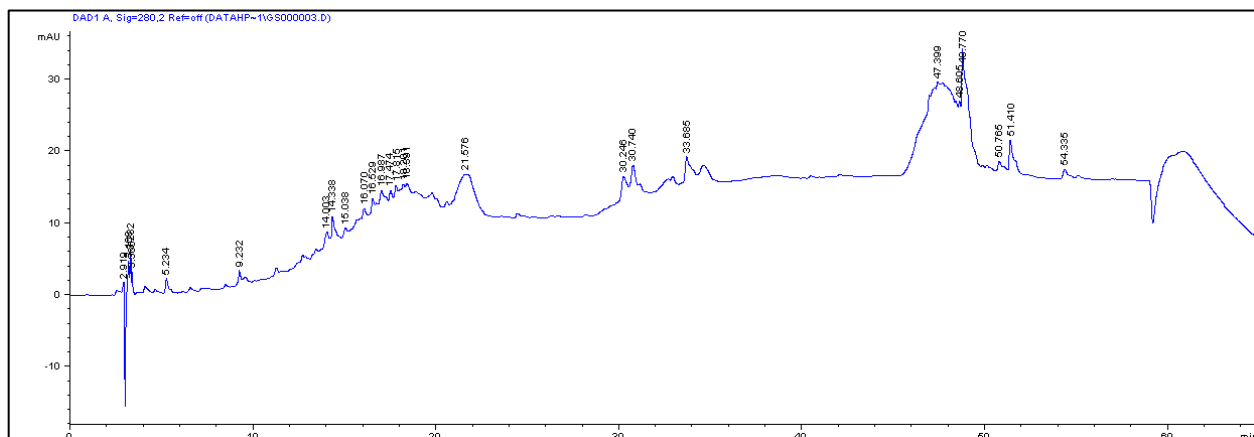


Εικόνα 104: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 16 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm		520 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	3,991	265	14,568	280– 320	30,030	280– 360	19,347	275– 515
2	9,091	275	30,027	280– 355	30,556	280– 360	21,502	275– 515
3	9,458	280	30,556	280– 360	33,534	280– 355		
4	11,107	290	33,533	280– 355				
5	12,593	260	49,124	280				
6	13,905	280						
7	14,234	280						
8	14,912	280						
9	15,965	280						
10	16,412	280						
11	16,882	280						
12	17,340	280						
13	17,706	280						
14	18,102	280						
15	19,657	280						
16	30,558	270– 350						
17	33,534	280– 330						

Πληροφορίες δείγματος: Αυγουστιάτης- Κατσακούλιας, Ζάκυνθος

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Καλλίνικος

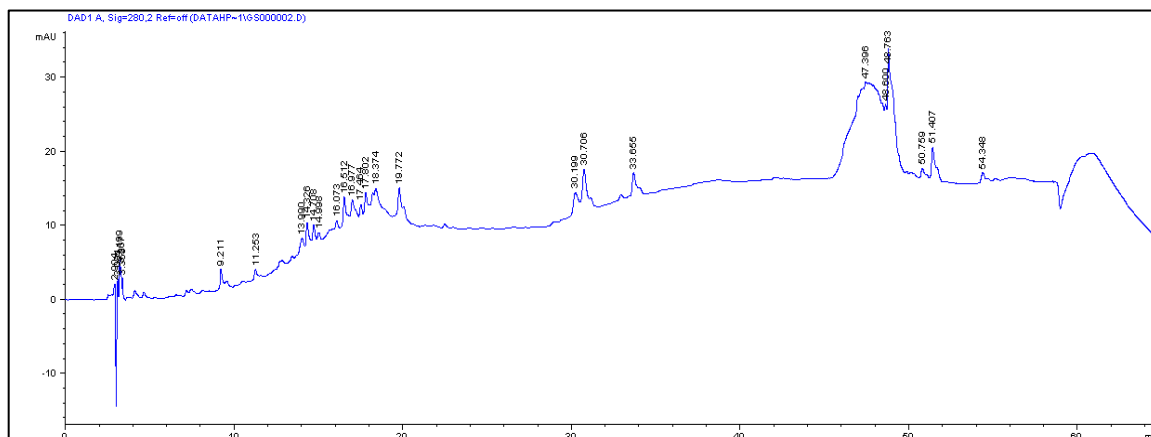


Εικόνα 105: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 17 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm		520 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	5,234	285	24,448	275	24,446	275	21,613	260– 525
2	9,232	275	30,236	265– 355	30,235	275– 360	32,661	260
3	14,003	275	30,742	275– 355	30,738	275– 360	34,625	260
4	14,338	275	32,946	275	32,948	275– 360		
5	15,038	275	33,685	275– 355	33,685	275– 355		
6	16,070	275	49,190	275				
7	16,529	275						
8	16,987	270						
9	17,474	270						
10	17,815	270						
11	18,201	270						
12	18,391	270						
13	21,576	270						
14	30,246	270– 360						
15	30,740	270– 360						
16	33,685	270– 350						

Πληροφορίες δείγματος: Κακοτρύγης, Κέρκυρα

Οινοποιείο/ Παραγωγός: Θεοτόκης

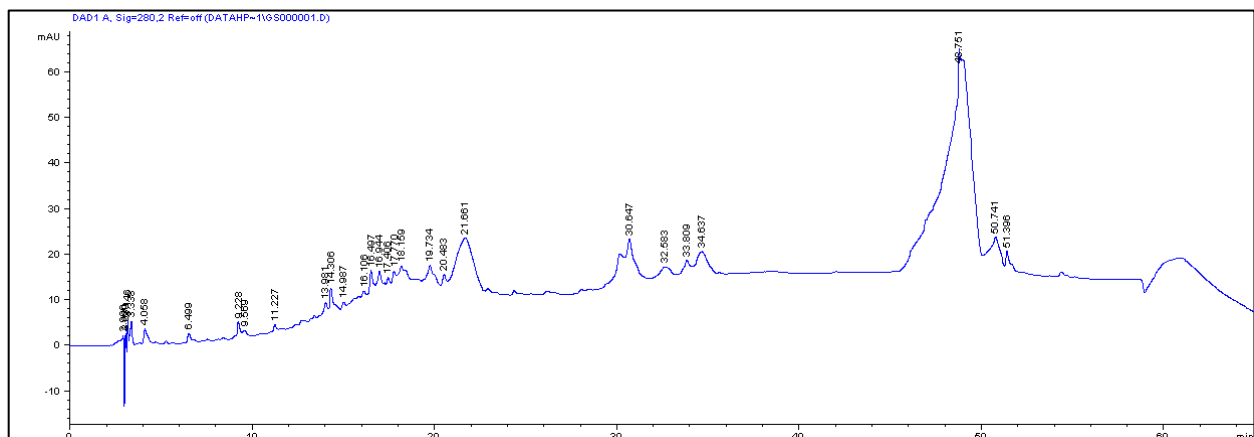


Εικόνα 106: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 18 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	9,211	270	14,711	270– 330	14,712	280– 335
2	11,253	275	18,351	270– 330	30,193	280– 360
3	13,990	275	30,195	270– 330	30,704	280– 360
4	14,326	275	30,705	270– 330	32,923	280– 350
5	14,708	275– 335	33,655	270– 330	33,654	280– 360
6	14,998	270	49,183	270– 330		
7	16,073	270				
8	16,512	270				
9	16,977	270				
10	17,464	270				
11	17,802	270				
12	18,374	270– 335				
13	19,772	270				
14	30,199	270– 360				
15	30,706	270– 360				
16	33,655	270– 360				

Πληροφορίες δείγματος: Cabernet, Κέρκυρα

Οινοποιείο/Παραγωγός: -



Εικόνα 107: Χρωματογράφημα του δείγματος με κωδικό 19 στα 280 nm.

Μήκος Κύματος #	280 nm		320 nm		360 nm		520 nm	
	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis	Rt (min)	UV-Vis
1	4,058	265	13,979	280	24,335	270	17,959	270– 520
2	6,499	265	14,700	280	26,163	270	19,826	270– 520
3	9,228	265	24,335	280	30,118	265– 360	21,647	270– 520
4	9,569	265	26,151	280	30,647	265– 360	28,356	270
5	11,227	280	30,122	355, 520	30,973	265– 360	29,369	270– 520
6	13,981	280	30,656	355– 520	33,800	265– 360	30,472	270– 520
7	14,306	270	33,802	280			32,613	270– 520
8	14,987	270	34,617	355– 520			34,638	270
9	16,106	270						
10	16,497	270						
11	16,944	270						
12	17,406	270						
13	17,770	270						
14	18,159	270						
15	19,734	270						
16	20,483	270						
17	21,661	270– 520						
18	30,647	355– 520						
19	32,583	280– 520						
20	33,809	270– 520						
21	34,637	270– 520						

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Αποτελέσματα LC-MS Ακατέργαστων δειγμάτων στα 280 nm

Κωδικός δείγματος: 7-Ρομπόλα – Κεφαλονιά – Αγ. Νικόλαος

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁻ (Δ)	[M-H] ⁻ (Π)	Ένωση
1	4,006	3,221	266	-	723,4	-	Άγνωστη
2	6,852	1,108	261	-	288,9	-	Άγνωστη
3	7,457	0,825	274	273	146,7	148,7	Κιναμικό οξύ
4	9,525	8,161	215– 270	217– 270	168,3	170,3	Γαλλικό οξύ
5	11,941	1,388	220– 283	-	544,5	-	Άγνωστη
6	13,325	0,919	218– 264	-	575,5	-	Άγνωστη
7	13,517	0,749	217	-	330,9	332,2	Μονογαλοϋλογλυκόζη
8	13,720	4,552	220– 274	-	242,7	-	Άγνωστη
9	14,867	1,906	218– 278	220– 280	576,7	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
10	14,997	1,021	217– 277	220– 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
11	15,305	4,849	278	280	577,0	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
12	15,516	5,087	221– 328	217– 328	310,8	312,2	Καρταρικό οξύ
13	15,954	1,096	218– 277	220– 280	865,7	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
14	16,464	1,464	220– 279	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
15	16,843	1,407	220– 277	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
16	17,361	6,816	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
17	17,847	4,115	278– 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
18	18,355	3,161	223– 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
19	18,694	2,438	220– 277	-	729,0	730,0	Διμερή γαλλική προανθοκυανιδίνη
20	19,097	4,960	219– 278	220– 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
21	20,561	7,154	278	278	289,0	289,0	Επικατεχίνη
22	30,527	5,460	225– 354	254– 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
23	31,092	2,299	226– 355	254– 356	609,1	610,5	Ρουτίνη
24	33,470	1,749	264– 348	265– 348	446,5	448,3	Γαλακτοζίτης -καμφερόλης
25	34,239	5,096	265– 349	265– 348	446,9	448,3	Γλυκοζίτη της καμφερόλης
26	34,459	0,196	226– 350	253– 354	477,1	448,1	3-O-γλυκοζίτης της ισοχαρμεντίνης
27	37,755	0,187	373	371	301,03	302,2	Κερκετίνη

*Πειραματικό, *Θεωρητικό.

Κωδικός δείγματος: 11-Μαυροδάφνη – Βοστυλίδι – Κεφαλονιά – Ταυλιανάτος

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁺ (Π)	[M-H] ⁺ (Θ)	Ένωση
1	7,385	3,848	274	273	146,7	148	Κιναμικό οξύ
2	9,478	2,327	215– 270	217– 270	168,3	170	Γαλλικό οξύ
3	11,917	1,273	220– 283	-	544,5	-	Άγνωστη
4	13,474	0,484	217	-	330,9	332,2	Μονογαλοϋλογλυκόζη
5	14,828	1,449	218– 278	220– 280	576,7	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
6	14,933	0,555	217– 277	220– 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
7	15,262	2,960	278	280	577,0	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
8	15,458	2,552	286– 328	217– 328	310,8	312,2	Καφταρικό οξύ
9	15,915	0,936	218– 277	220– 280	865,7	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
10	16,426	1,065	220– 279	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
11	16,786	1,329	220– 277	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
12	17,308	2,608	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
13	17,803	3,345	278– 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
14	18,328	2,168	223– 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
15	18,649	2,765	220– 277	-	729,0	730	Διμερή γαλλική προανθοκυανιδίνη
16	19,049	2,634	219– 278	220– 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
17	20,494	3,707	278	278	289,0	289,0	Επικατεχίνη
18	30,373	10,163	225– 354	254– 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
19	30,955	5,349	226– 355	254– 356	609,1	610,5	Ρουτίνη
20	33,351	0,982	264– 348	265– 348	446,5	448,3	Γαλακτοζίτης- καμφερόλης
21	34,135	4,929	265– 349	265– 348	446,9	448,3	Γλυκοζίτη της καμφερόλης
22	34,315	0,491	226– 350	253– 354	477,1	448,1	3-O- γλυκοζίδιο της ισορχαμεντίνης
23	35,067	3,116	373	371	301,0	302,2	Κερκετίνη

*Πειραματικό, *Θεωρητικό.

Κωδικός δείγματος: 15-Παύλος – Ζάκυνθος – Γράμψας

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁺ (Π)	[M-H] ⁺ (Θ)	Ένωση
1	3,929	2,510	266	-	604,8	-	Άγνωστη
2	7,283	5,214	274	273	146,7	148	Κιναμικό οξύ
3	9,322	5,321	215– 270	217– 270	168,3	170	Γαλλικό οξύ
4	11,825	2,496	220– 283	-	544,5	-	Άγνωστη
5	13,542	1,162	220– 274	-	242,7	-	Άγνωστη
6	14,760	2,698	218– 278	220– 280	576,7	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
7	14,819	1,653	217– 277	220– 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
8	15,159	7,092	278	280	577,0	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
9	15,813	1,642	218– 277	220– 280	865,7	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
10	16,224	1,017	220– 279	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
11	16,314	1,746	220– 277	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
12	17,183	8,228	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
13	17,688	3,974	278– 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
14	18,250	1,259	223– 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
15	18,542	1,898	220, 277	-	729,0	730	Διμερή γαλλική προανθοκυανιδίνη
16	18,935	3,610	219– 278	220– 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
17	19,200	1,008	222– 278	-	896,9	898	Τριμερή γαλλοκατεχίνη-γαλλοκατεχίνη-κατεχίνη
18	20,359	4,199	278	278	289,0	289,07	Επικατεχίνη
19	30,110	2,059	225– 354	254– 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
20	33,950	1,380	264– 348	265– 348	446,5	448,3	Γαλακτοζίτης -καμπερόλης

*Πειραματικό, *Θεωρητικό.

Κωδικός δείγματος: 19-Cabernet – Κέρκυρα

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁺ (Π)	[M-H] ⁺ (Θ)	Ένωση
1	9,348	2,320	215– 270	217– 270	168,3	170,0	Γαλλικό οξύ
2	14,771	1,176	218– 278	220– 280	576,7	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
3	15,177	3,209	217– 277	220– 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
4	16,224	0,576	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
5	17,714	2,742	278– 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
6	18,262	0,996	223, 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
7	18,565	1,509	220– 277	-	729,0	730,0	Διμερή γαλλική προανθοκυανιδίνη
8	18,967	2,003	219– 278	220– 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
9	20,387	2,237	278	278	289,0	289,0	Επικατεχίνη
10	30,187	5,057	225– 354	254– 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
11	34,238	1,729	226– 350	253– 354	477,1	448,1	3-O- γλυκοζίδιο της ισορχαμεντίνης

*Πειραματικό, *Θεωρητικό

Κωδικός δείγματος: 17-Αυγουστιάτης – Κατσακούλιας – Ζάκυνθος – Καλλίνικος

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁺ (Π)	[M-H] ⁺ (Θ)	Ένωση
1	5,040	1,898	274	273	146,7	148,0	Κιναμικό οξύ
2	9,304	2,139	215– 270	217– 270	168,3	170,0	Γαλλικό οξύ
3	13,531	0,666	217	-	330,9	332,2	Μονογαλοϋλογλυκόζη
4	14,719	1,517	218– 278	220– 280	576,7	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
5	15,147	4,268	217– 277	220– 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
6	16,317	1,227	220– 279	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
7	16,610	1,844	220– 277	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
8	17,179	2,385	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
9	17,686	2,982	278– 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
10	18,247	1,438	223– 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
11	18,930	1,397	219– 278	220– 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
12	19,727	0,949	222– 278	-	896,9	898	Τριμερή γαλλοκατεχίνη-γαλλοκατεχίνη-κατεχίνη
13	20,347	0,972	278	278	289,0	289,0	Επικατεχίνη
14	21,024	2,173	224– 278	-	488,9	-	Άγνωστη
15	30,086	6,240	225– 354	254– 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
16	30,687	4,746	226– 355	254– 356	609,1	610,5	Ρουτίνη
17	32,859	2,643	264– 348	265– 348	446,5	448,3	Γαλακτοζίτης -καμφερόλης
18	33,939	5,121	265– 349	265– 348	446,9	448,3	Γλυκοζίτη της καμφερόλης
19	34,169	1,581	226– 350	253– 354	477,1	448,1	3-O- γλυκοζίδιο της ισορχαμεντίνης
20	37,449	0,224	373	371	301,0	302,2	Κερκετίνη

*Πειραματικό, *Θεωρητικό.

Κωδικός δείγματος: 18-Κακοτρύγης – Κέρκυρα – Θεοτόκης

#	Rt (min)	Εμβαδόν (%)	UV-Vis (Π*)	UV-Vis (Θ*)	[M-H] ⁺ (Π)	[M-H] ⁺ (Θ)	Ένωση
1	7,283	0,932	274	273	146,7	148	Κιναμικό οξύ
2	9,321	4,949	215– 270	217– 270	168,3	170	Γαλλικό οξύ
3	11,826	2,348	220– 283	-	544,5	-	Άγνωστη
4	13,354	1,026	218– 264	-	575,5	-	Άγνωστη
5	13,545	1,738	217	-	330,9	332,2	Μονογαλοϋλογλυκόζη
6	15,169	4,107	217– 277	220– 280	576,9	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
7	15,305	5,097	221– 328	217– 328	310,8	312,2	Καφταρικό οξύ
8	15,826	1,145	218– 277	220– 280	865,7	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
9	16,326	1,564	220– 279	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
10	16,627	2,524	220– 277	220– 280	576,6	578,5	Διμερές προκυανιδίνης
11	17,193	4,561	278	279	288,8	290,2	Κατεχίνη
12	17,701	4,543	278– 375	280	576,9	578,5	Τριμερές προκυανιδίνης
13	18,251	1,712	223– 271	276	443,1	442,3	Επικατεχίνη του γαλλικού οξέος
14	18,547	3,191	220– 277	-	729,0	730	Διμερή γαλλική προανθοκυανιδίνη
15	18,958	4,825	219– 278	220– 280	865,0	866,7	Τριμερές προκυανιδίνης
16	19,094	1,759	222– 278	-	896,9	898	Τριμερή γαλλοκατεχίνη-γαλλοκατεχίνη-κατεχίνη
17	20,367	6,153	278	278	289,0	289,0	Επικατεχίνη
18	30,133	7,353	225– 354	254– 354	476,9	478,4	3-γλυκουρονίδιο της κερκετίνης
19	30,726	8,904	226– 355	254– 356	609,1	610,5	Ρουτίνη
20	33,170	1,278	264– 348	265– 348	446,5	448,3	Γαλακτοζίτης -καμφερόλης
21	33,974	5,322	265– 349	265– 348	446,9	448,3	Γλυκοζίτη της καμφερόλης
22	34,215	0,290	226– 350	253– 354	477,1	448,1	3-O- γλυκοζίδιο της ισορχαμεντίνης
23	37,497	0,107	373	371	301,0	302,2	Κερκετίνη

*Πειραματικό, *Θεωρητικό.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ

Χημική δομή και φάσματα πρότυπων ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων

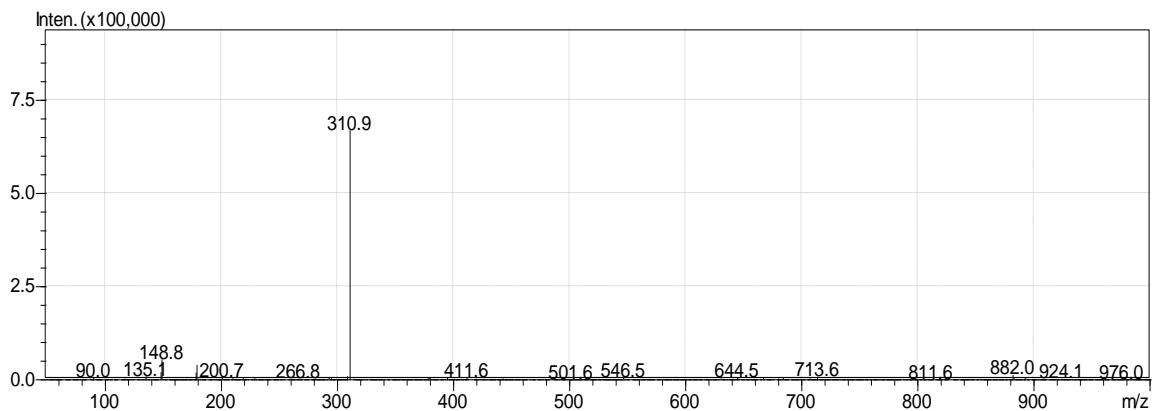
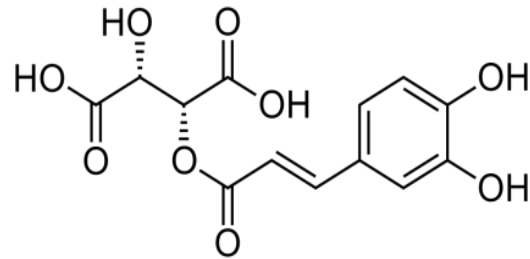
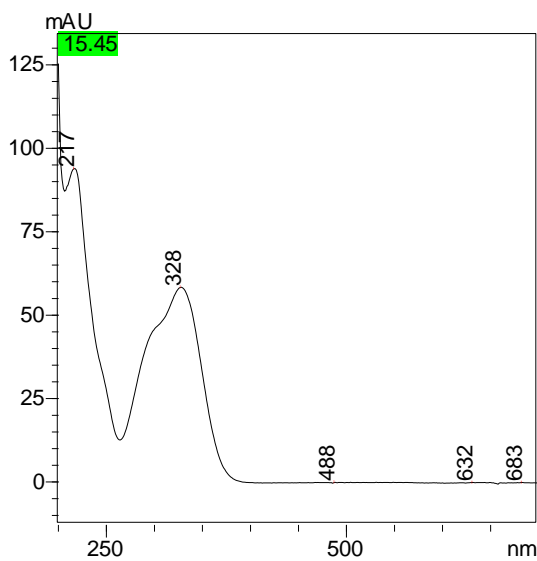
trans- ΚΑΦΤΑΡΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: $C_{13}H_{12}O_9$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 217 \text{ nm}, 328 \text{ nm}$

Mr = 311,040

[M-H]⁻ : 312,229



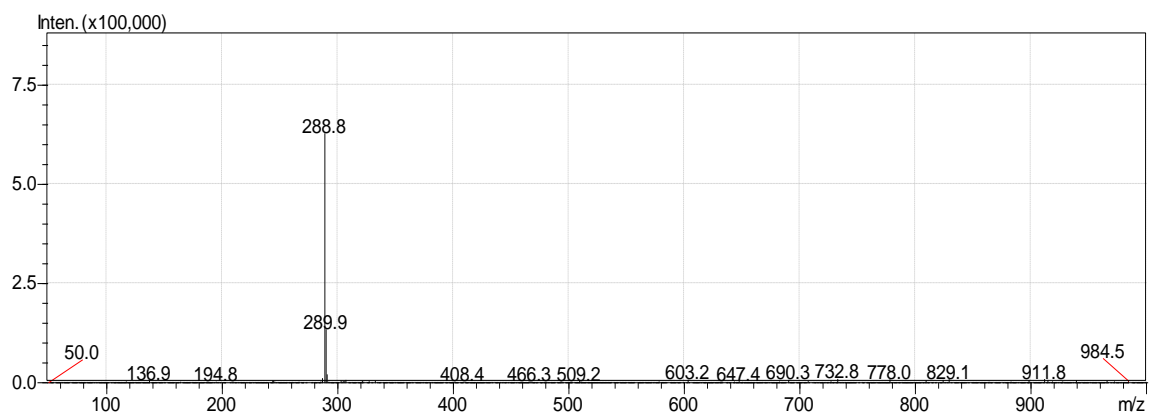
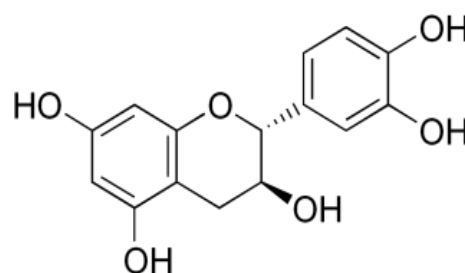
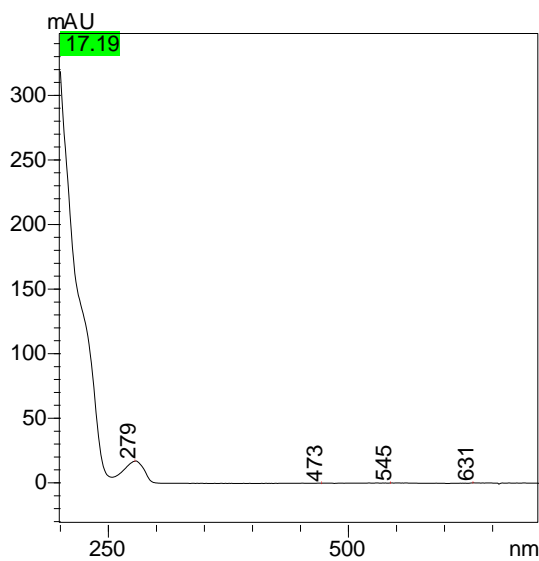
ΚΑΤΕΧΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: C₁₅H₁₄O₆

UV-Vis-DAD: λ_{max} = 279 nm

Mr: 290,079

[M-H]⁻: 289,071



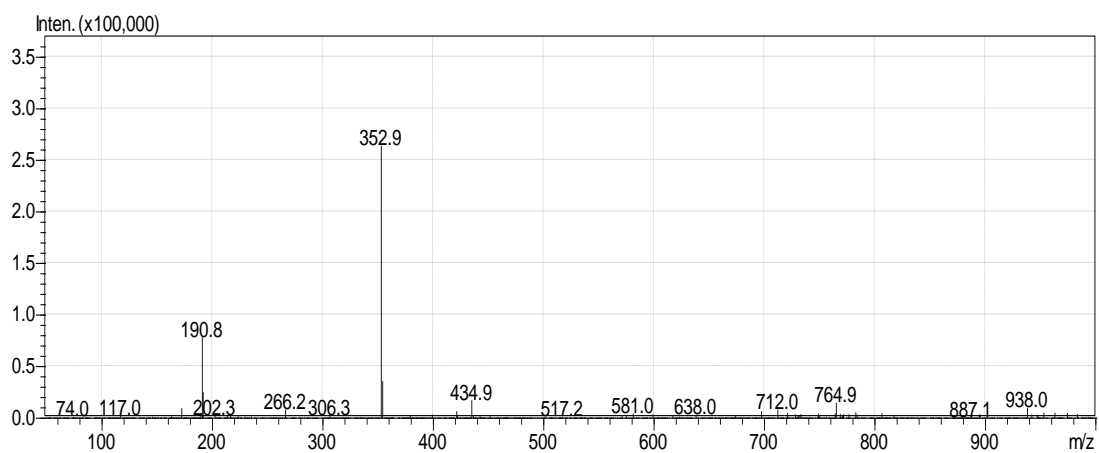
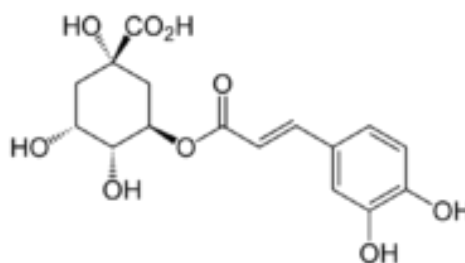
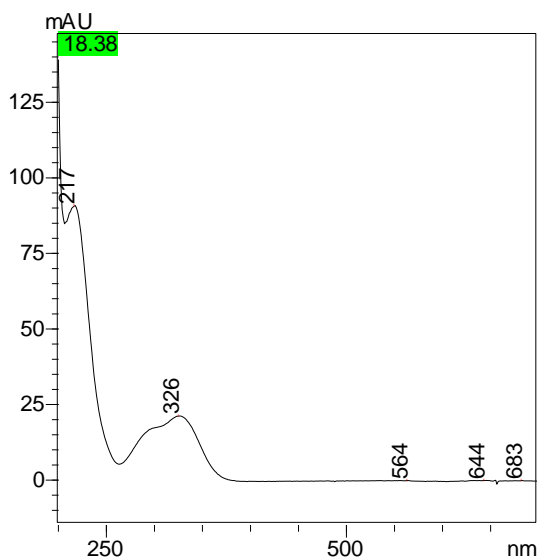
ΧΛΩΡΟΓΕΝΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: $C_{16}H_{18}O_9$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 217 \text{ nm}, 326 \text{ nm}$

Mr: 354,095

[M-H]⁻: 353,087



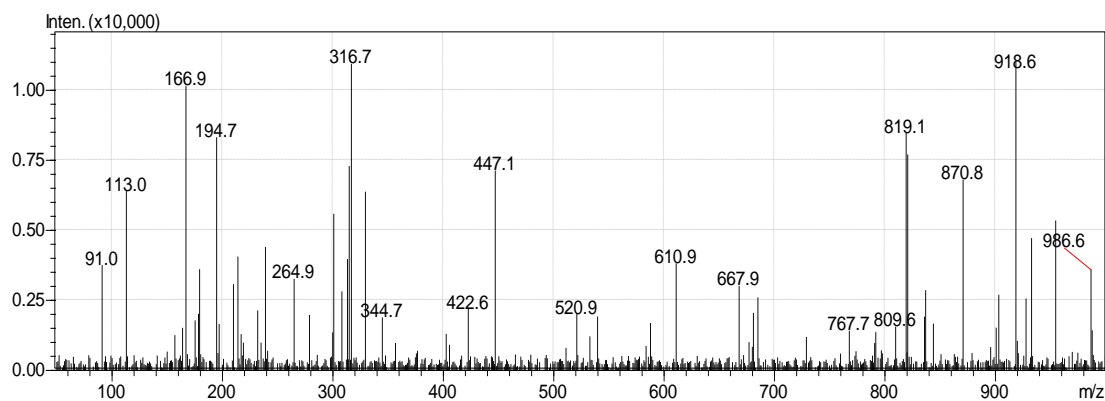
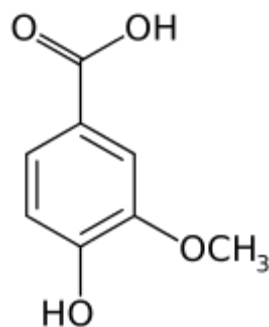
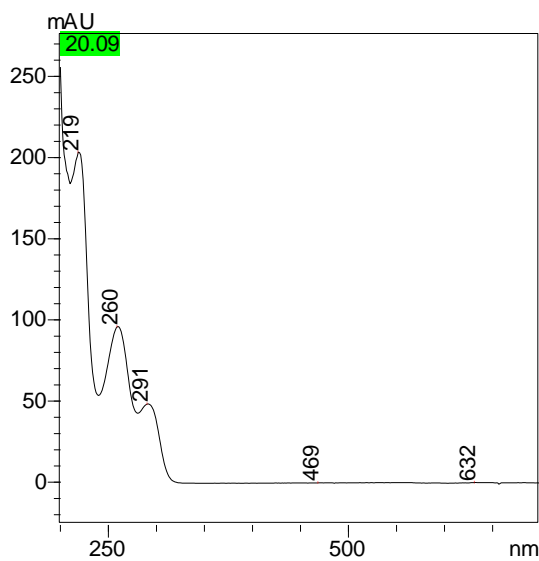
ΒΑΝΙΛΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: $C_8H_8O_4$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 219 \text{ nm}, 260 \text{ nm}, 291 \text{ nm}$

Mr: 168,042

$[M-H]^-$: 167,035



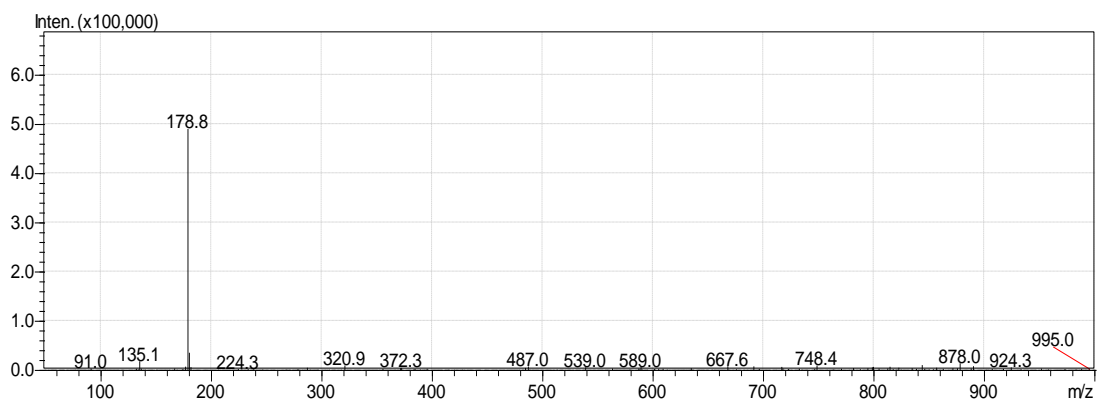
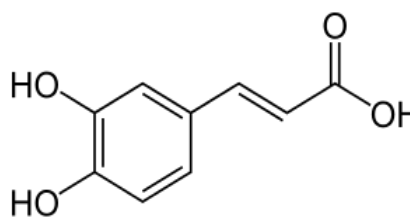
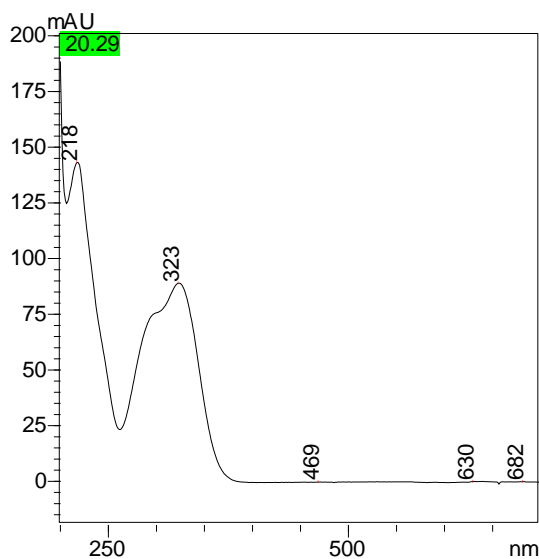
ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: $C_9H_8O_4$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 218 \text{ nm}, 323 \text{ nm}$

Mr: 180,042

[M-H]⁻ : 179,035



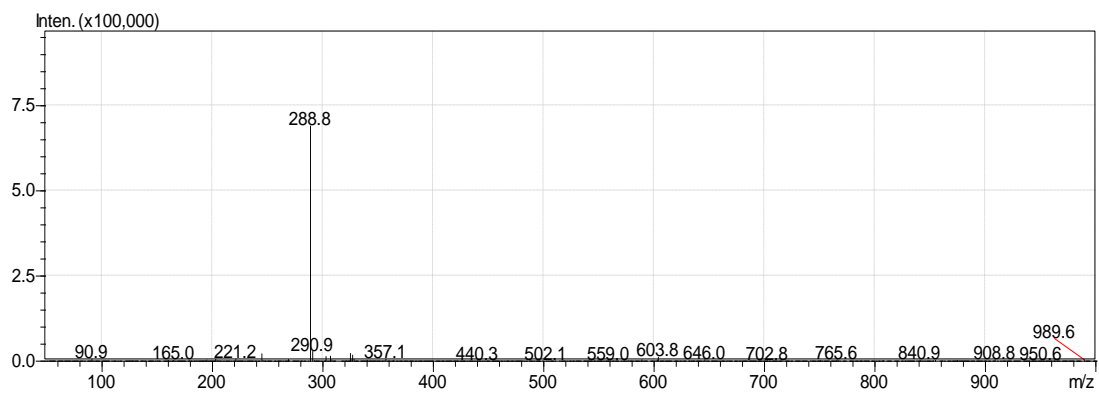
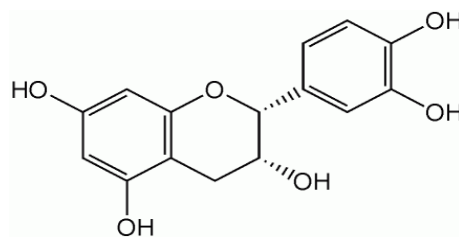
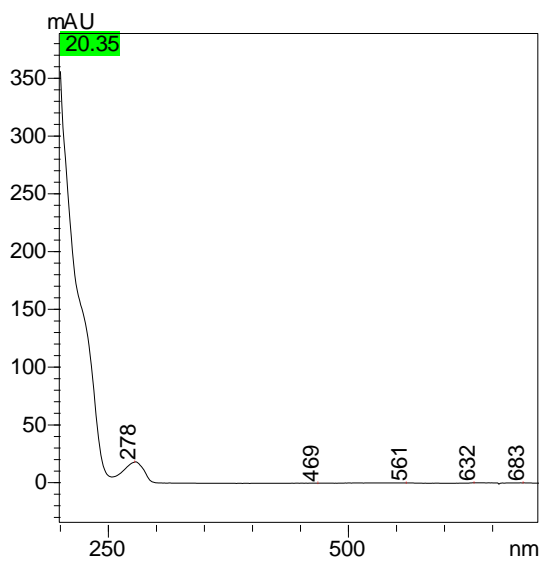
ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: C₁₅H₁₄O₆

UV-Vis-DAD: λ_{max}= 278 nm

Mr: 290,079

[M-H]⁻: 289,071



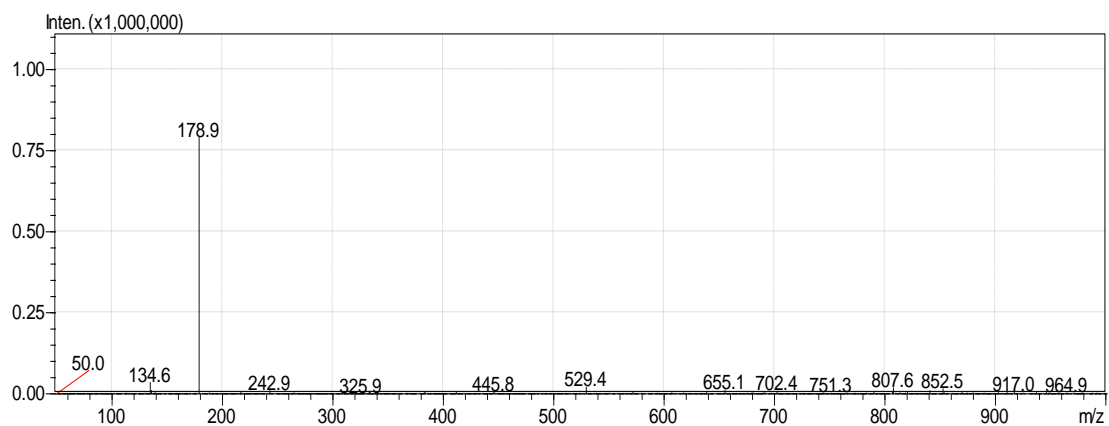
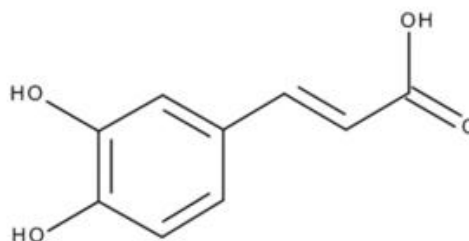
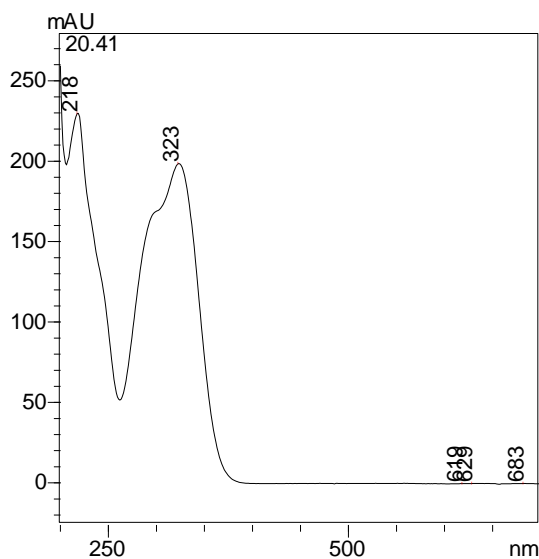
3,4-ΔΥΔΡΟΞΥΚΙΝΑΜΟΝΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: C₉H₈O₄

UV-Vis-DAD: λ_{max}= 218 nm, 323nm

Mr: 180,0423

[M-H]⁻ : 179,0350



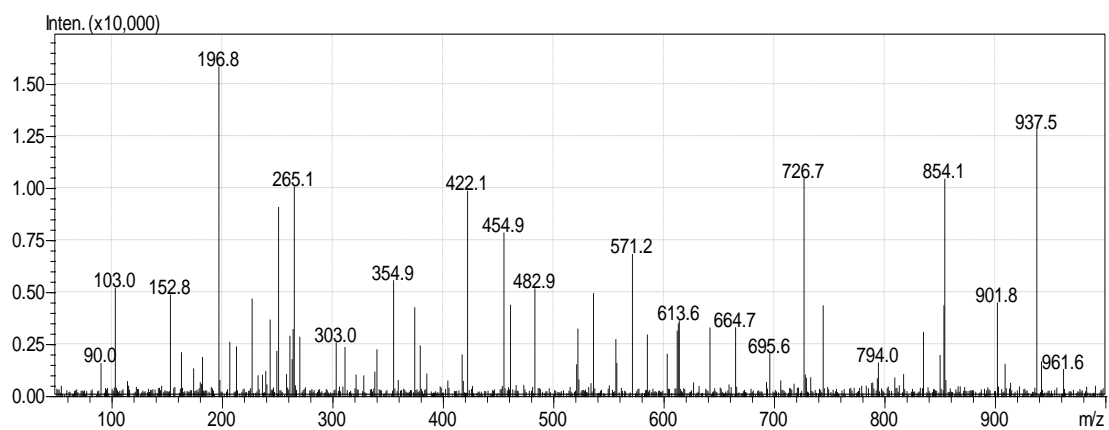
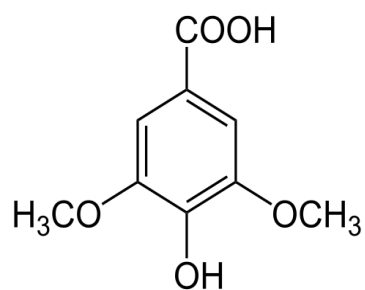
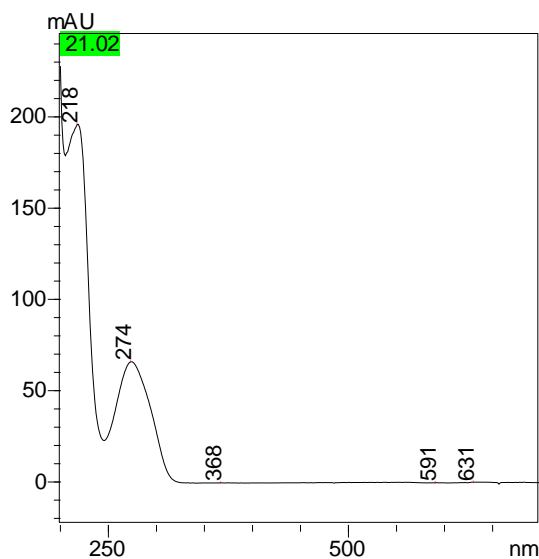
ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: $C_9H_{10}O_5$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 218 \text{ nm}, 274 \text{ nm}$

Mr: 198,052

$[M-H]^-$: 197,045



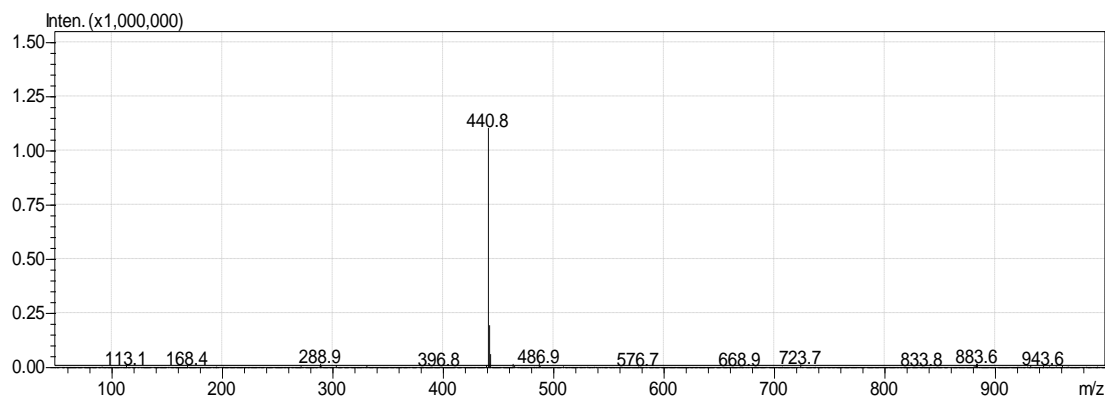
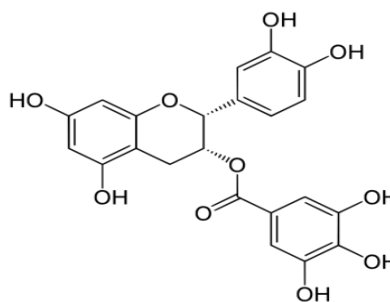
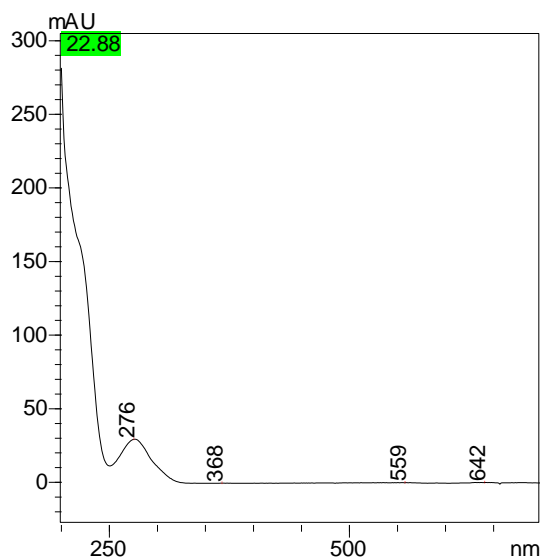
ΕΠΙΚΑΤΕΧΙΝΗ ΤΟΥ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΩΣ

Μοριακός Τύπος: $C_{22}H_{18}O_{10}$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 276 \text{ nm}$

Mr: 442,090

$[M-H]^-$: 441,082



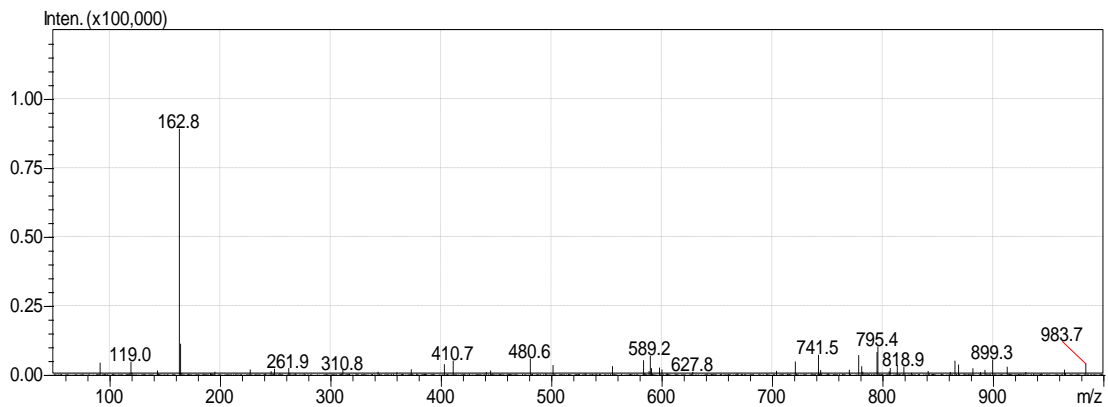
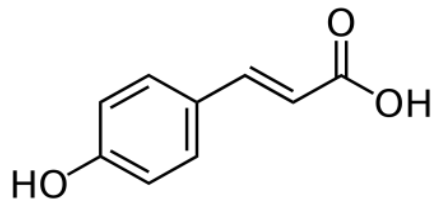
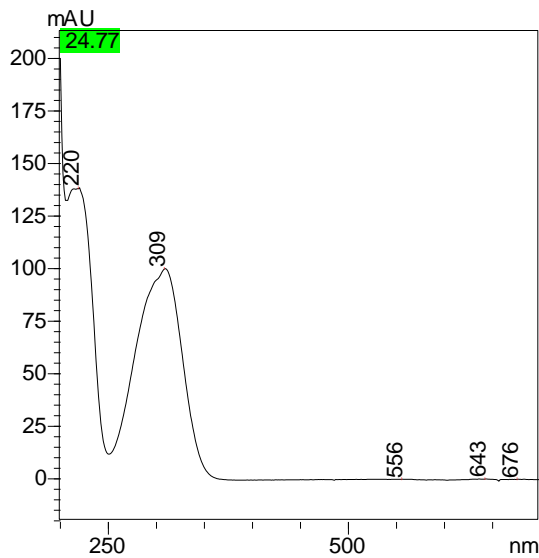
π-ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: C₉H₈O₃

UV-Vis-DAD: λ_{max}= 220 nm, 309 nm

Mr: 164,047

[M-H]⁻: 163,040



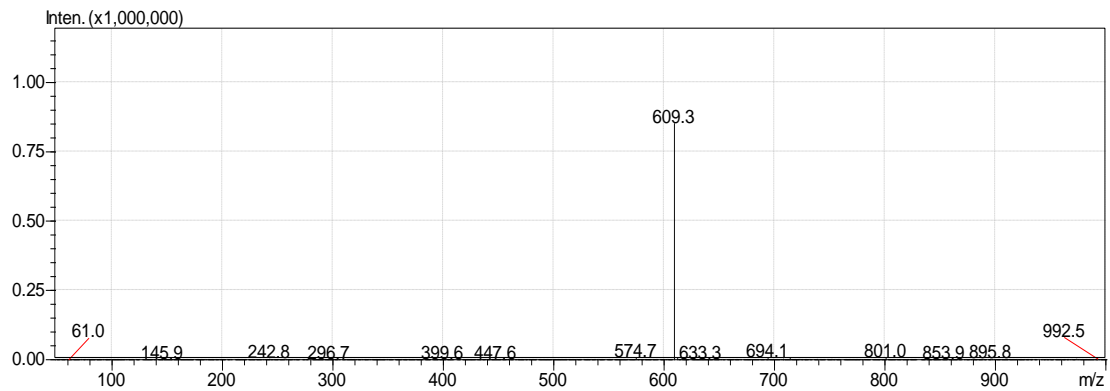
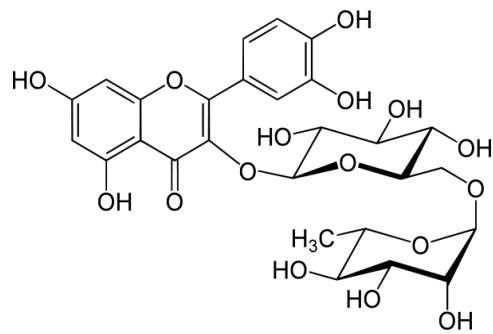
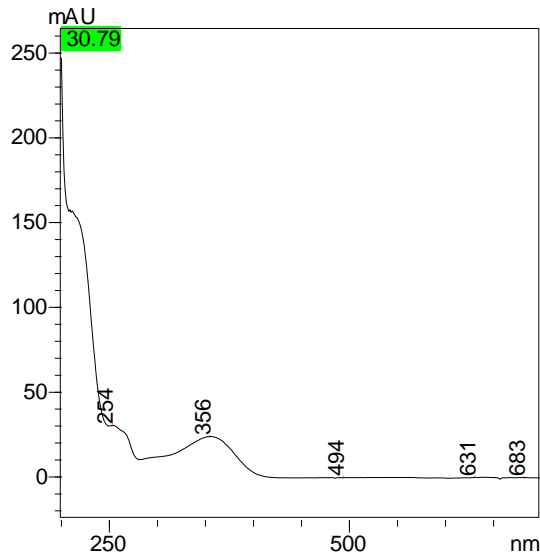
ΡΟΥΤΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: $C_{27}H_{30}O_{16}$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 254 \text{ nm}, 356 \text{ nm}$

Mr: 610,153

[M-H]⁻ : 609,146



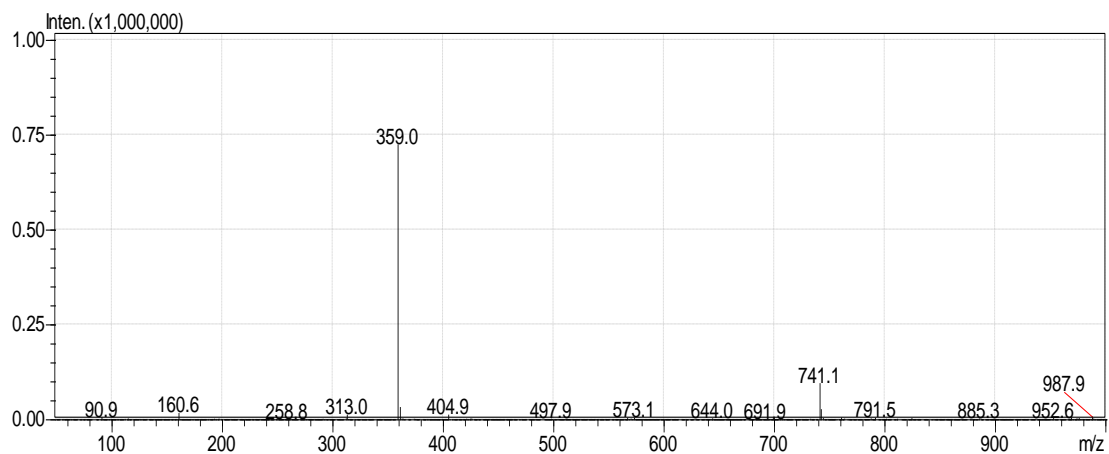
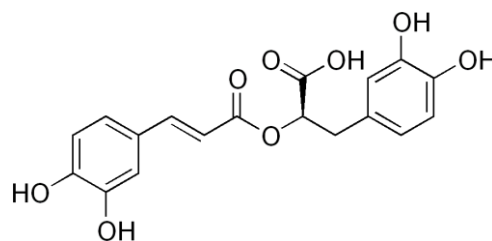
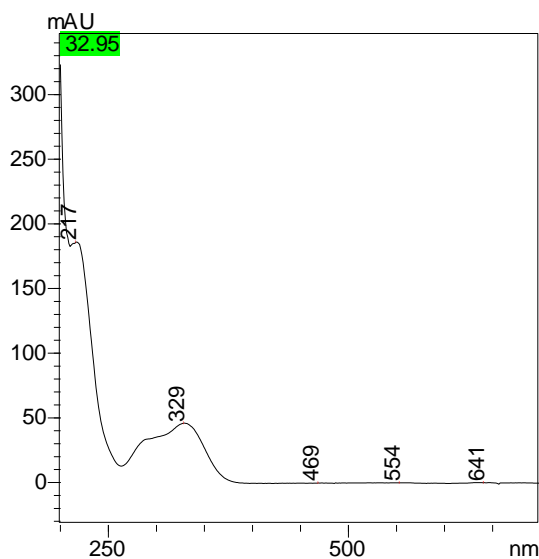
ΡΟΣΜΑΡΙΝΙΚΟ ΟΞΥ

Μοριακός Τύπος: $C_{18}H_{16}O_8$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 217 \text{ nm}, 329 \text{ nm}$

Mr: 360,084

$[M-H]^-$: 359,077



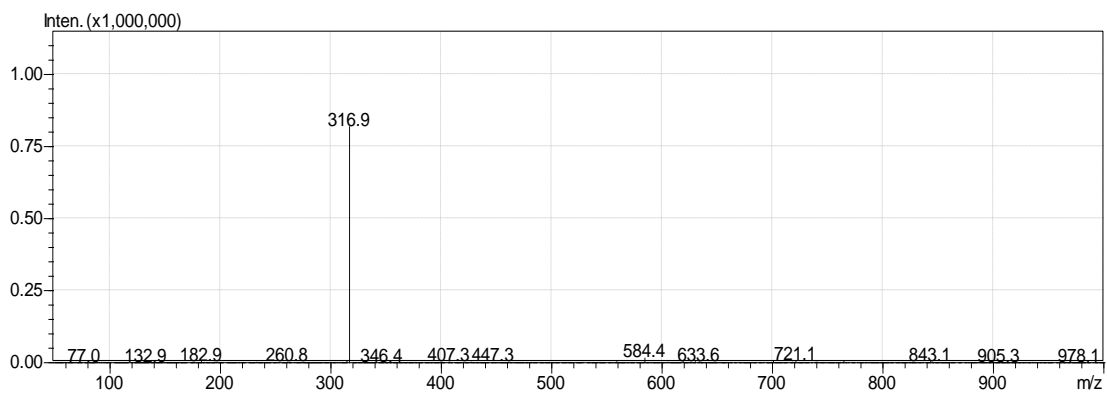
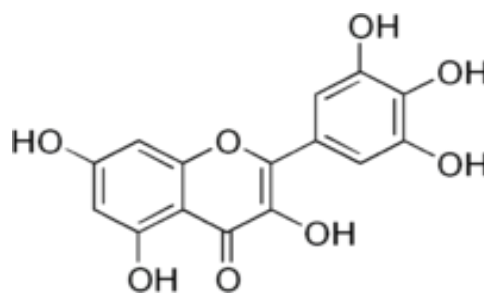
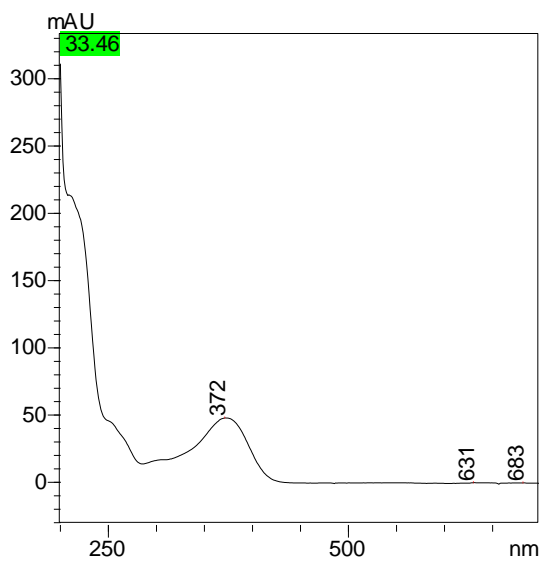
ΜΥΡΙΚΕΤΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: $C_{15}H_{10}O_8$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 372$ nm

Mr: 318,0376

[M-H]⁻: 317,0303



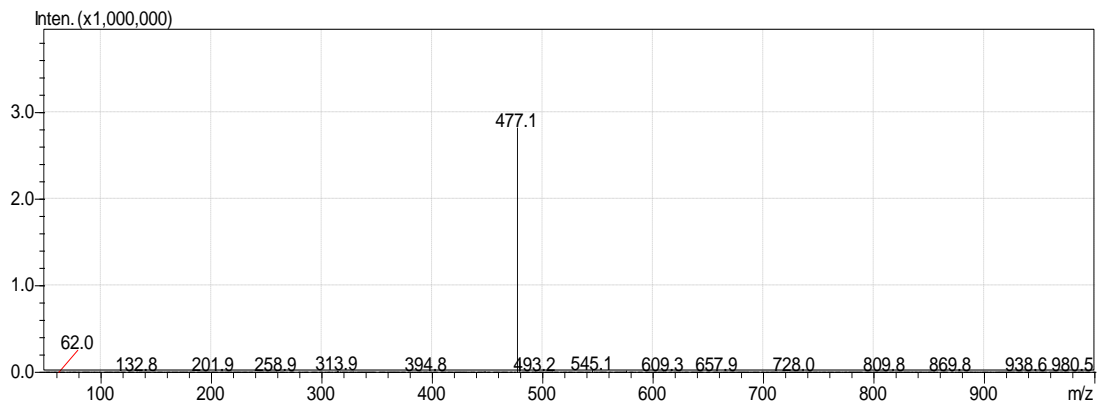
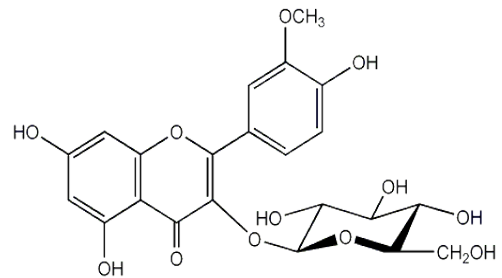
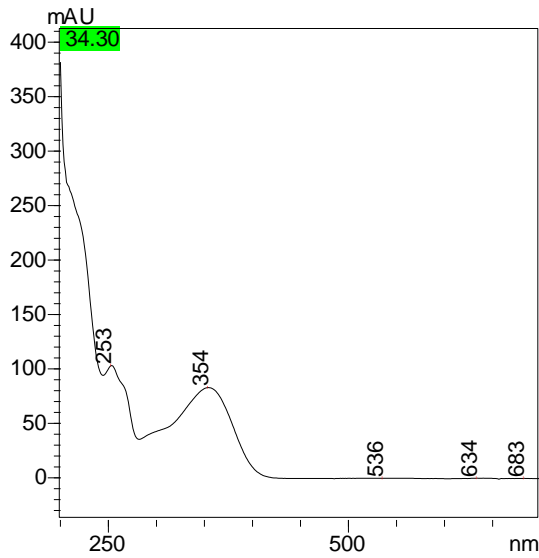
3-Ο-ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΤΗΣ ΙΣΟΡΧΑΜΝΕΤΙΝΗΣ

Μοριακός Τύπος: $C_{22}H_{22}O_{12}$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 253 \text{ nm}, 354 \text{ nm}$

Mr: 478,1111

[M-H]⁻: 477,1038



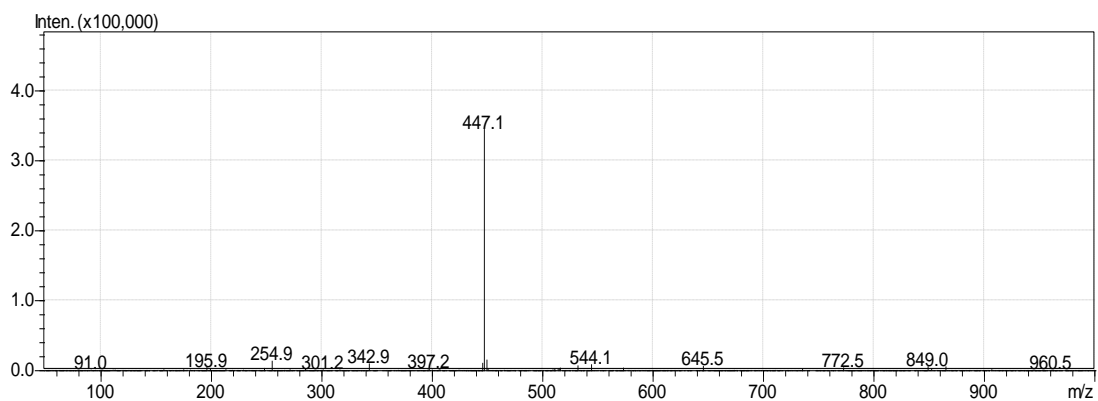
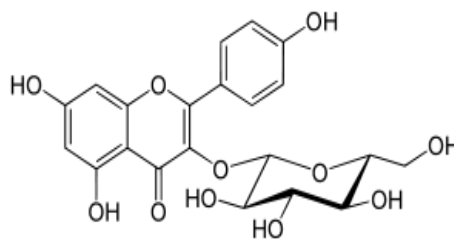
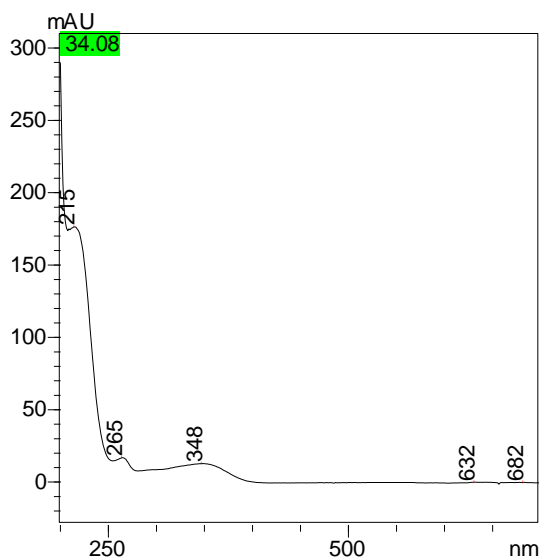
ΓΛΥΚΟΖΙΤΗΣ ΤΗΣ ΚΑΜΦΕΡΟΛΗΣ

Μοριακός Τύπος: $C_{21}H_{20}O_{11}$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 215 \text{ nm}, 265 \text{ nm}, 348 \text{ nm}$

Mr: 448,1006

[M-H]⁻: 447,0933



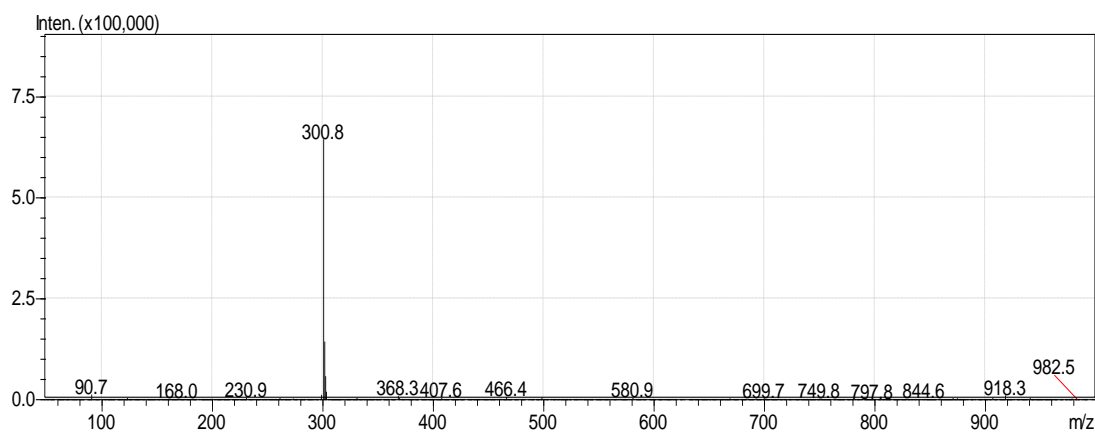
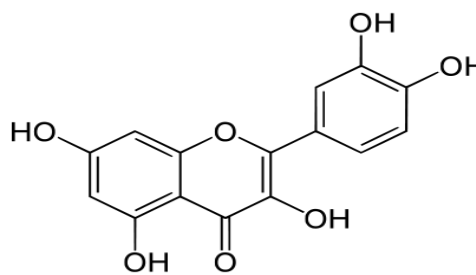
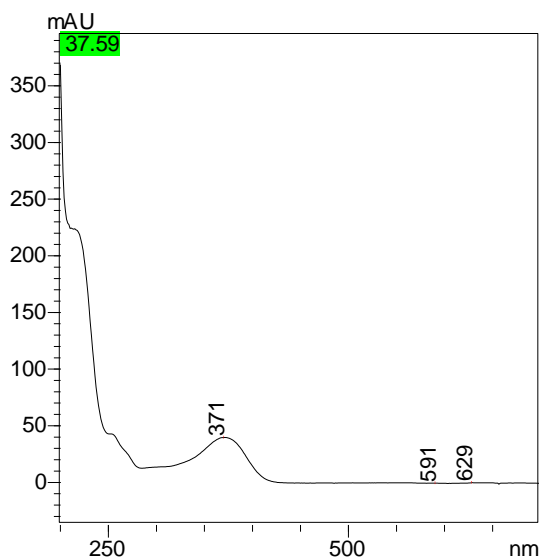
ΚΕΡΚΕΤΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: $C_{15}H_{10}O_7$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 371 \text{ nm}$

Mr: 302,0427

[M-H]⁻: 301,0354



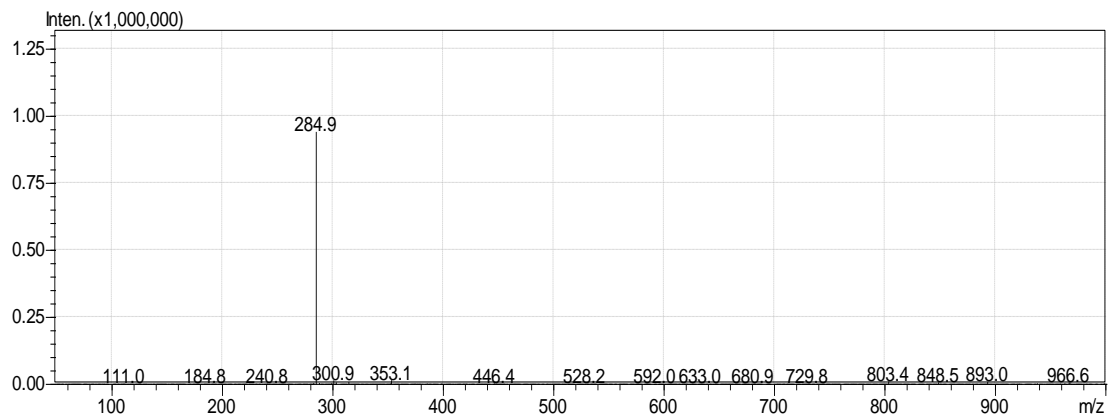
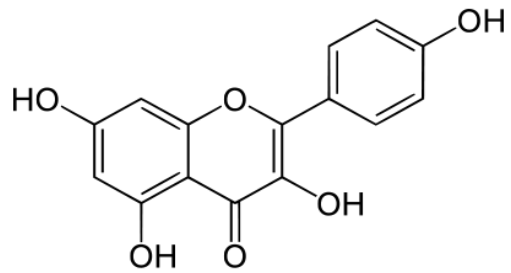
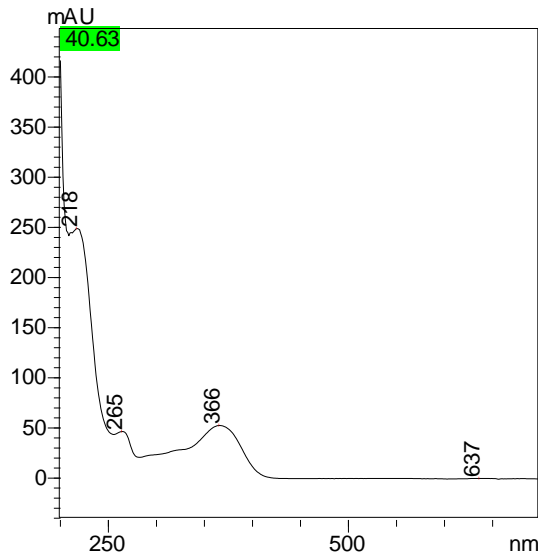
ΚΑΜΦΕΡΟΛΗ

Μοριακός Τύπος: C₁₅H₁₀O₆

UV-Vis-DAD: λ_{max}= 218 nm, 265 nm, 366 nm

Mr: 286,0477

[M-H]⁻: 285,0405



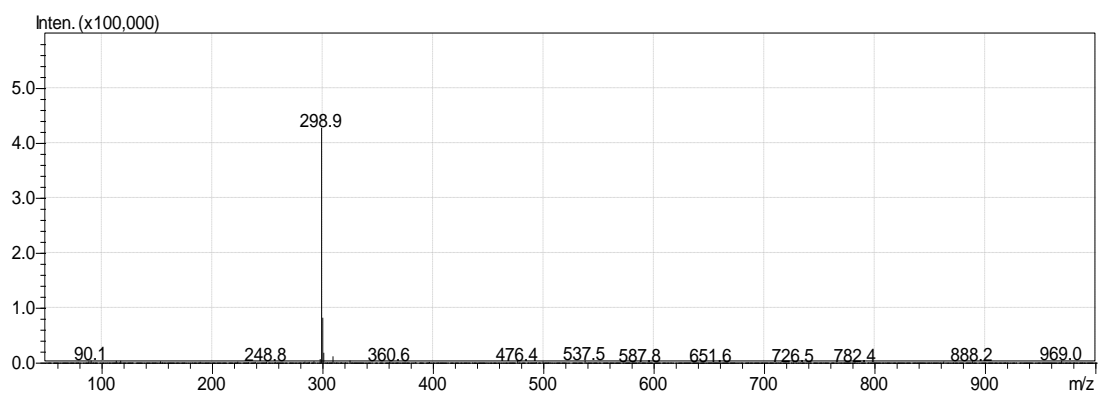
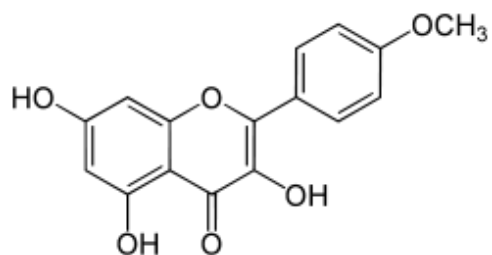
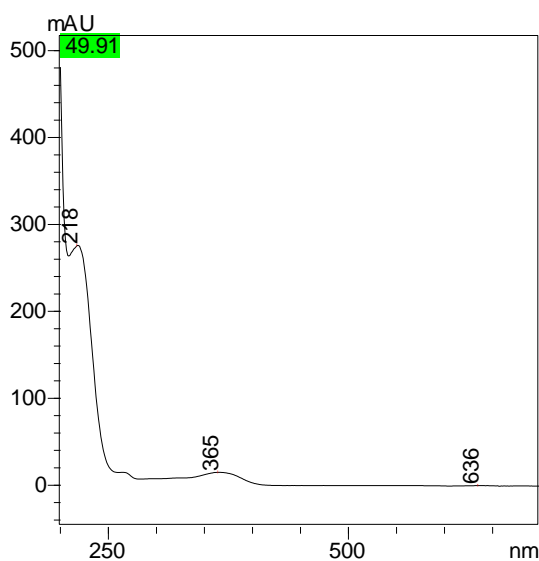
4'-Ο-ΜΕΘΥΛΟΚΑΜΦΕΡΟΛΗΣ

Μοριακός Τύπος: C₁₆H₁₂O₆

UV-Vis-DAD: λ_{max}= 218 nm, 365 nm

Mr: 300,0634

[M-H]⁻ : 299,0561



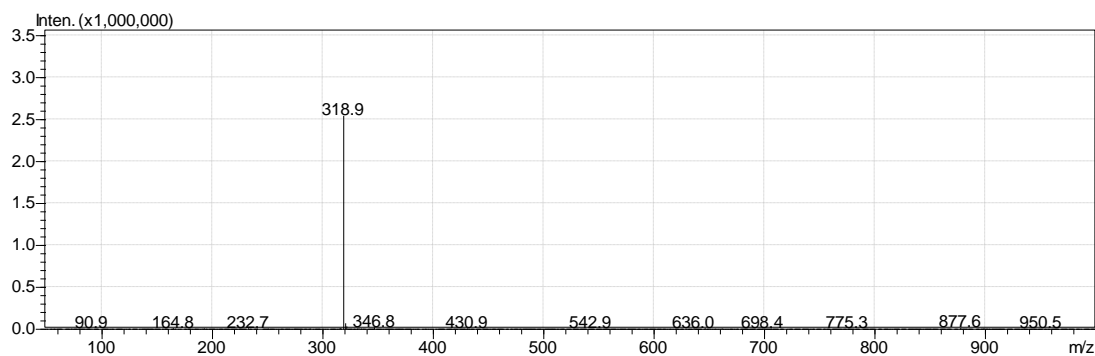
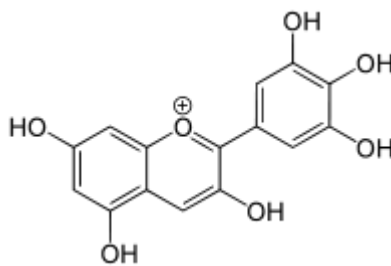
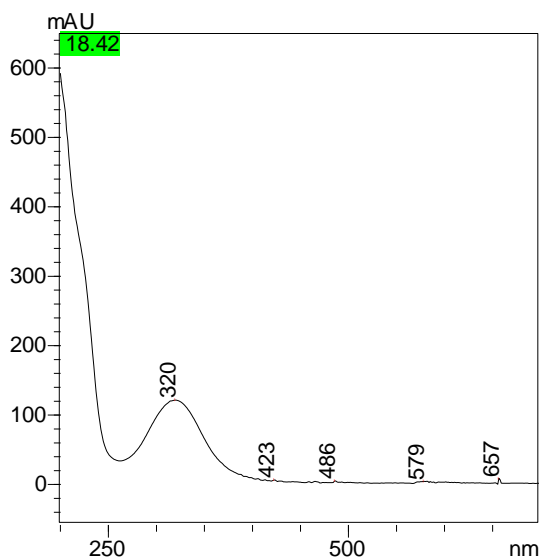
ΔΕΛΦΙΝΙΔΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: $C_{15}H_{11}O_7$

UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 320 \text{ nm}$

Mr: 303,050

$[M-H]^-$: 302,043



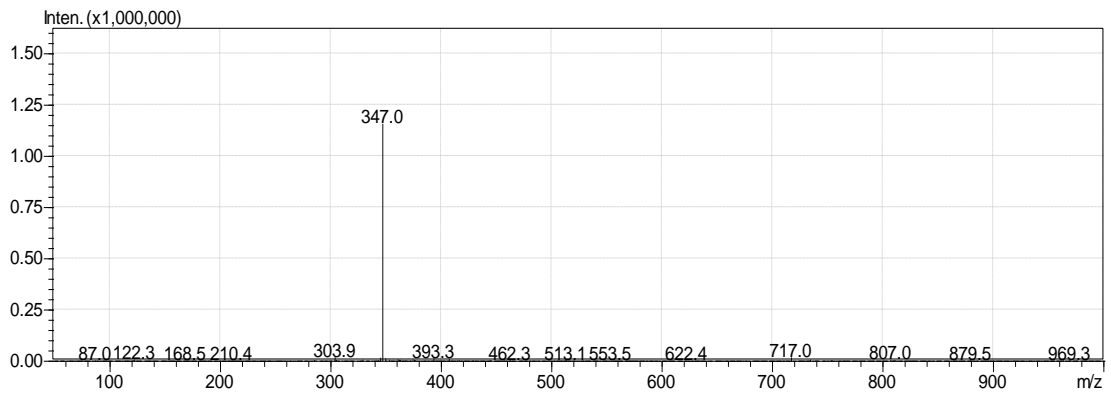
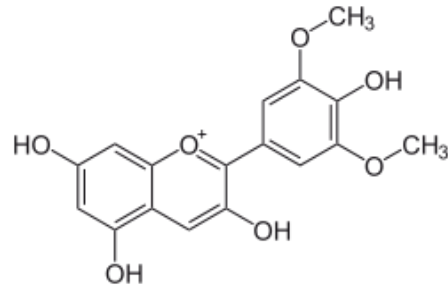
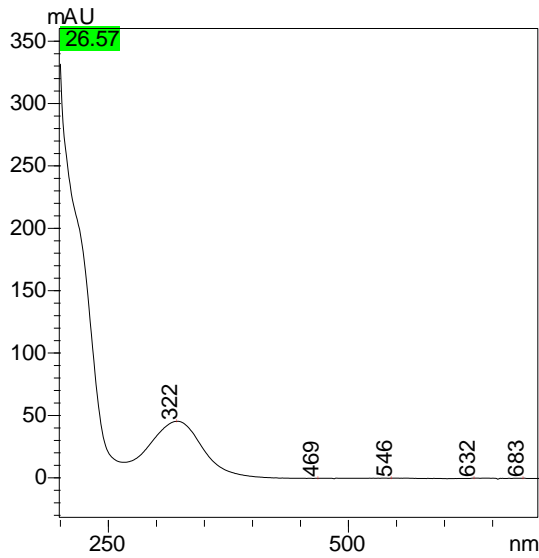
ΜΑΛΒΙΑΙΝΗ

Μοριακός Τύπος: $C_{17}H_{15}O_7$

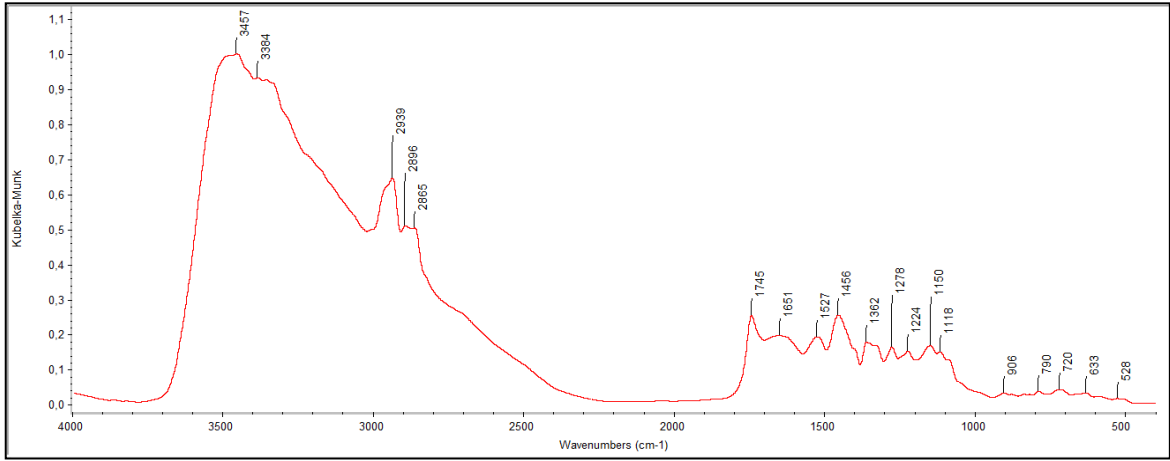
UV-Vis-DAD: $\lambda_{max} = 322 \text{ nm}$

Mr: 331,081

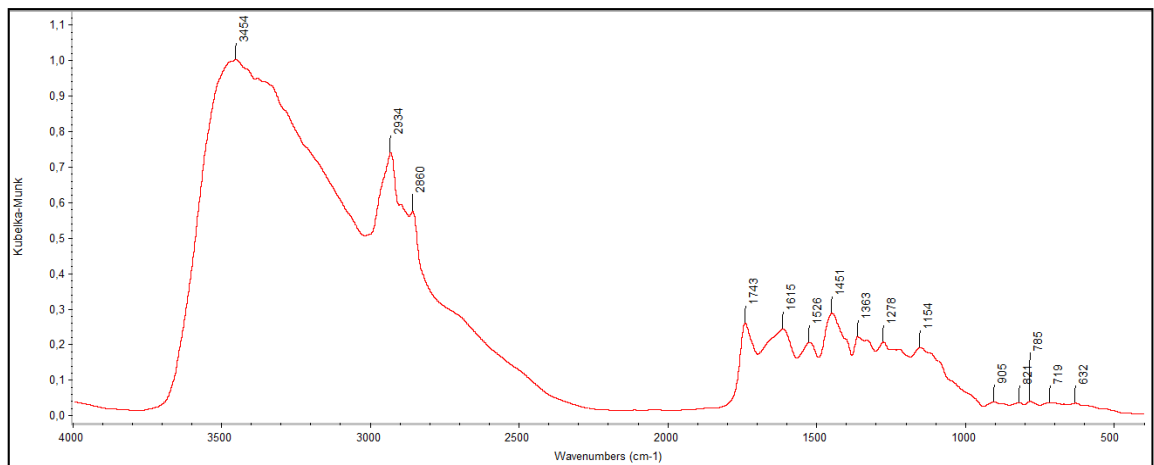
[M-H]⁻ : 330,074



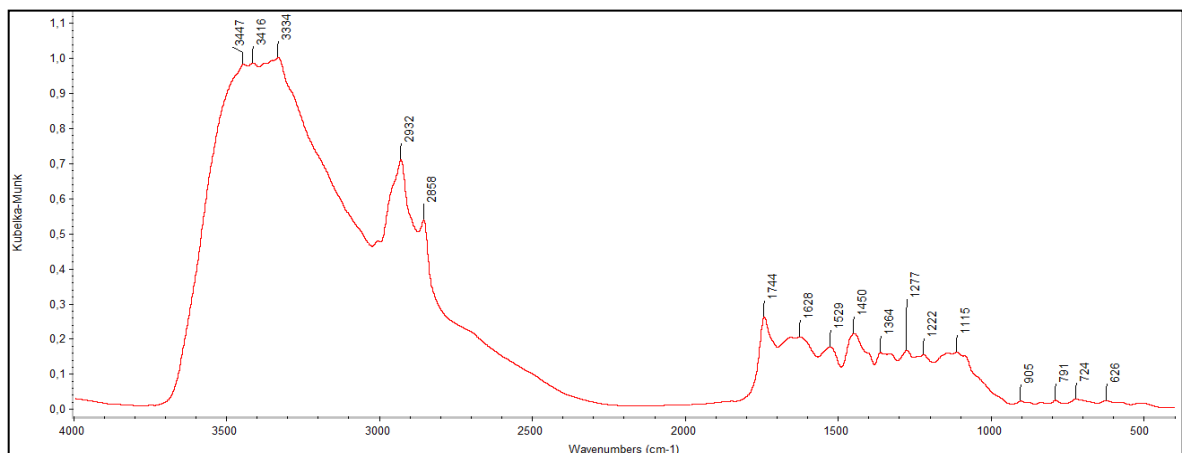
Φάσματα FT-IR (DRIFTS) αλεσμένου φυτικού υλικού



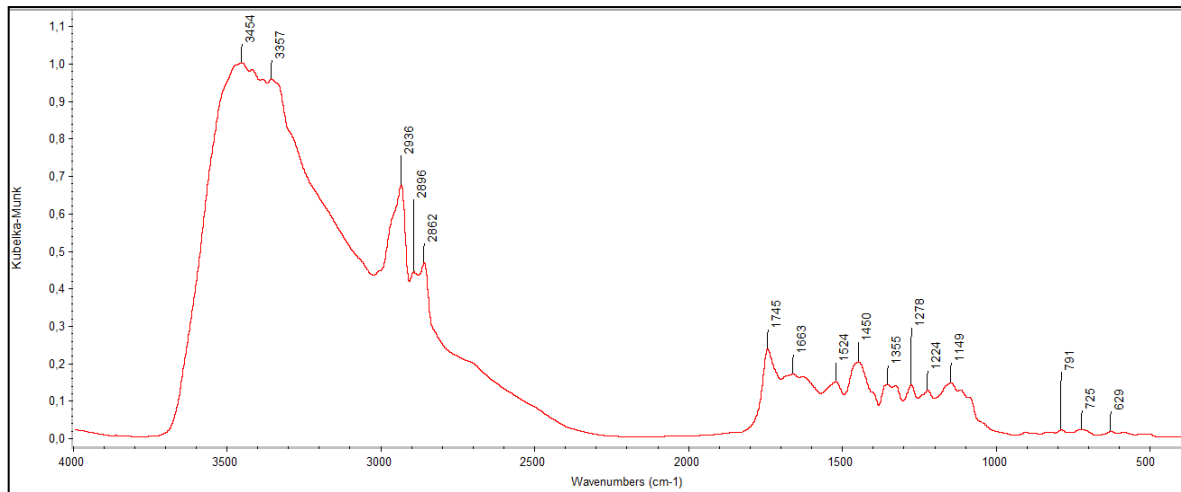
Εικόνα 108: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



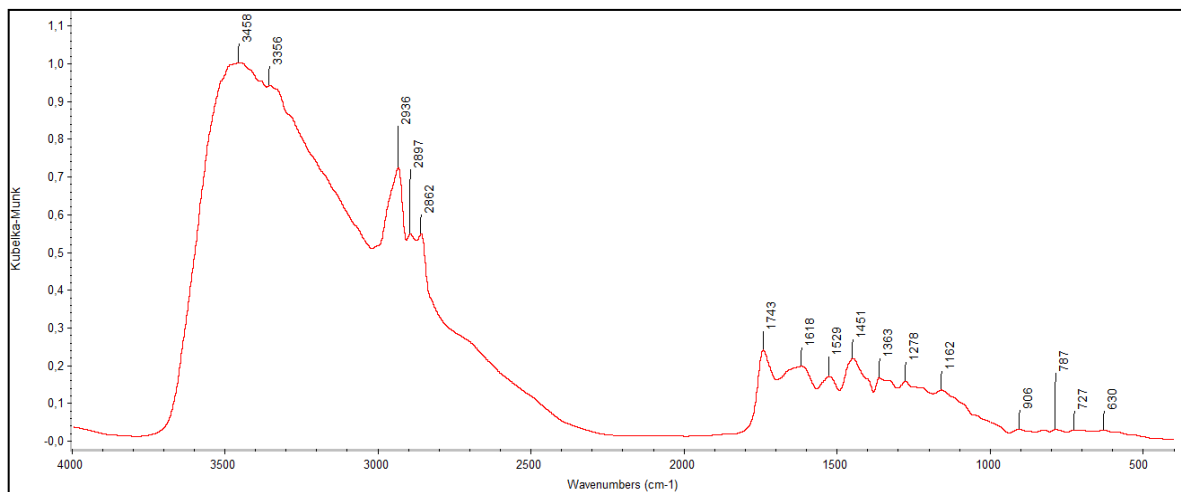
Εικόνα 109: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



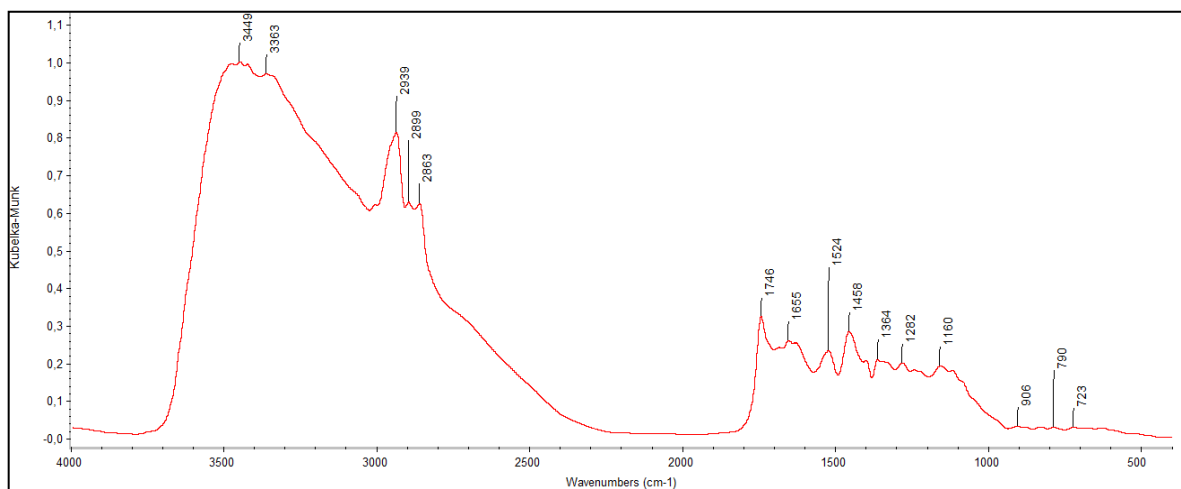
Εικόνα 110: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



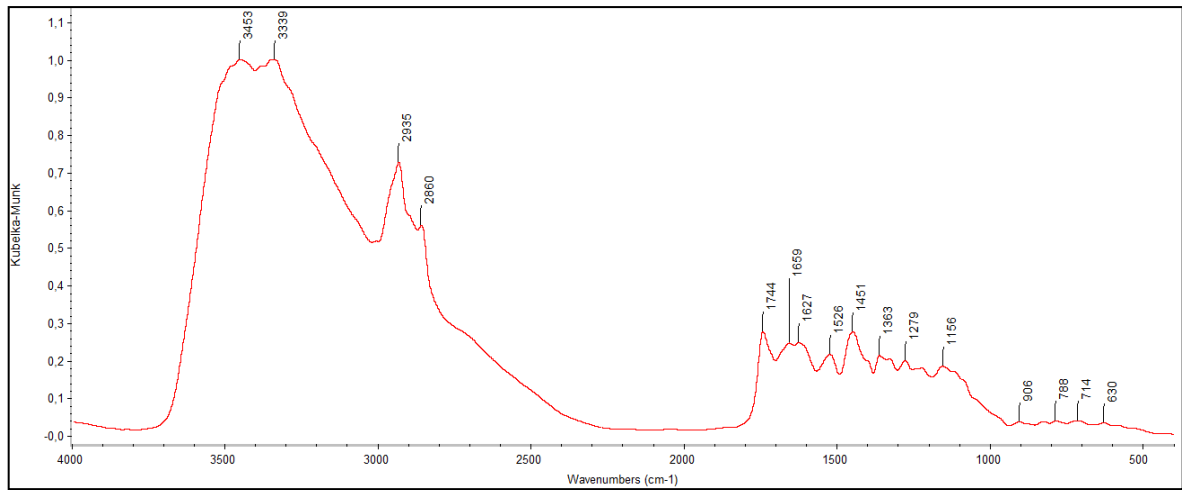
Εικόνα 111: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



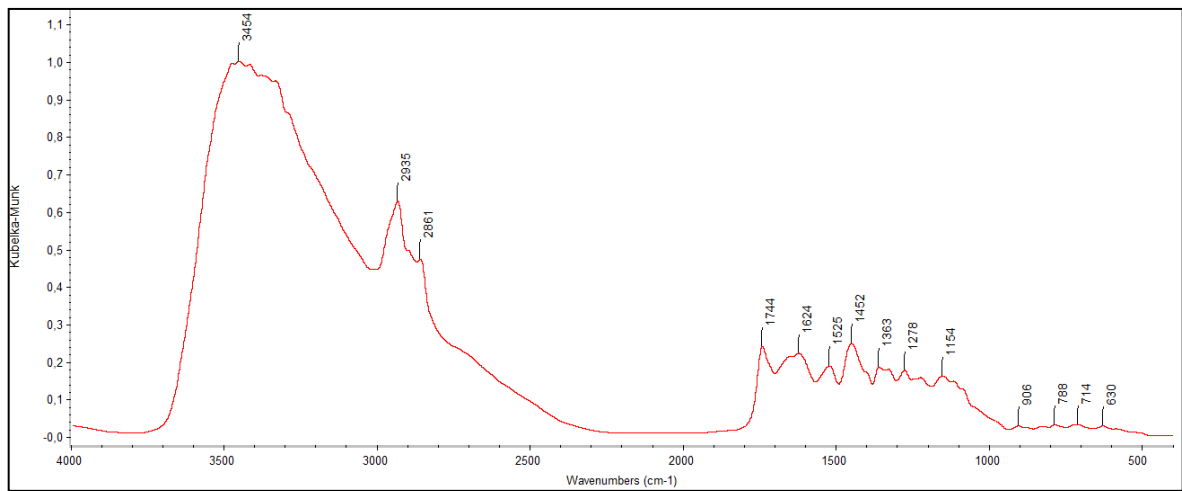
Εικόνα 112: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



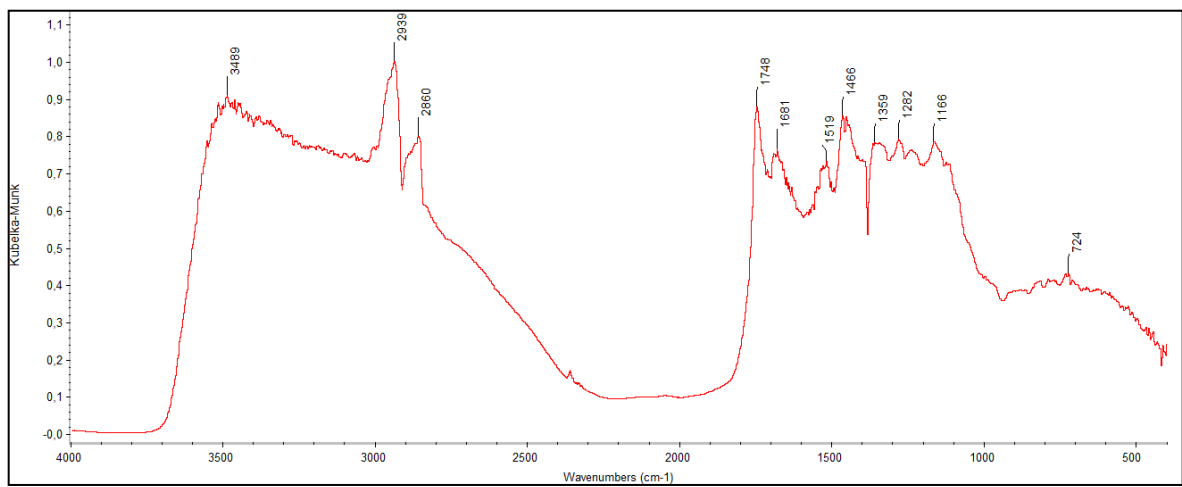
Εικόνα 113: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφη-Βοστυλίδι -Κεφαλονιά.



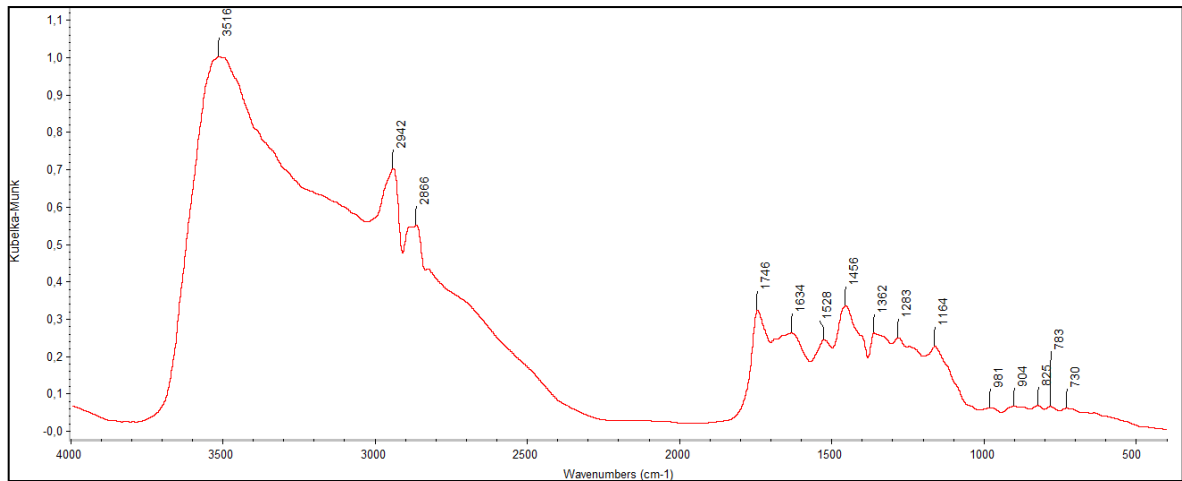
Εικόνα 114: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



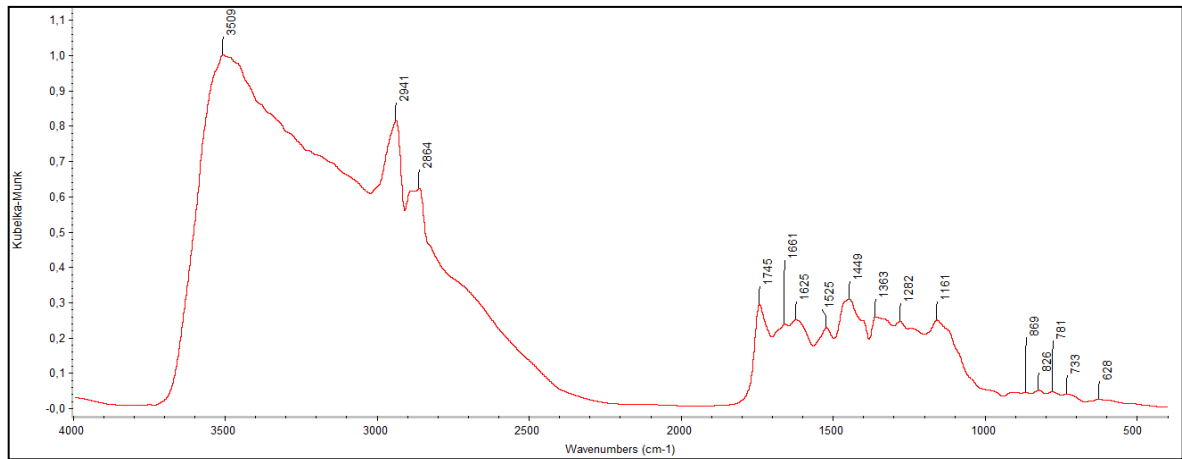
Εικόνα 115: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



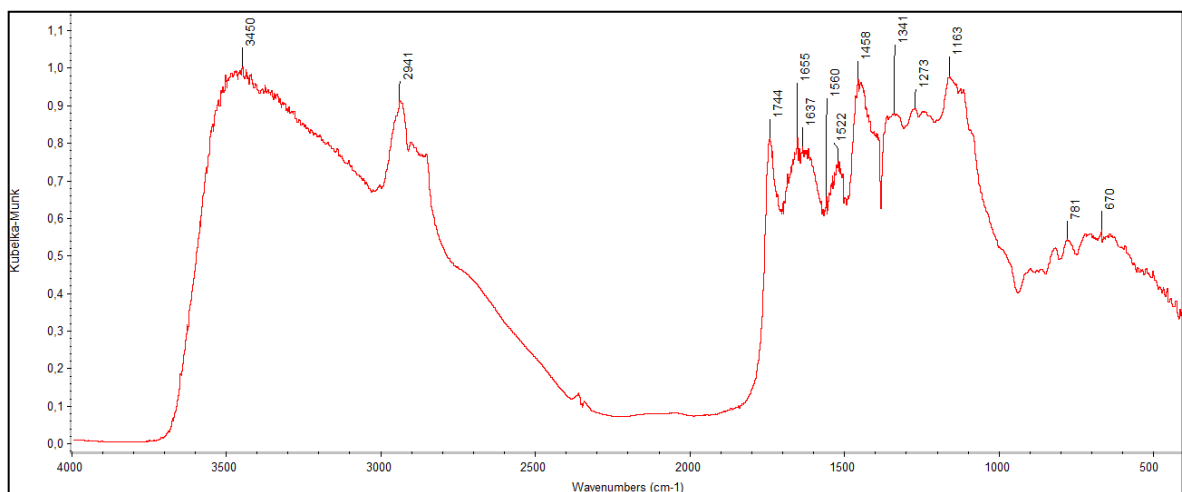
Εικόνα 116: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουστιátis-Κεφαλονιά.



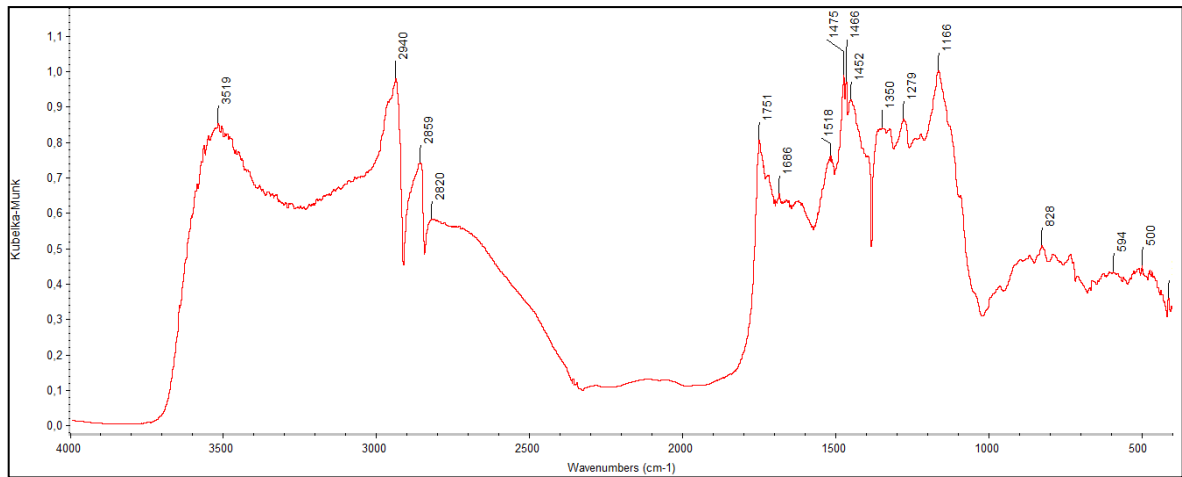
Εικόνα 117: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.



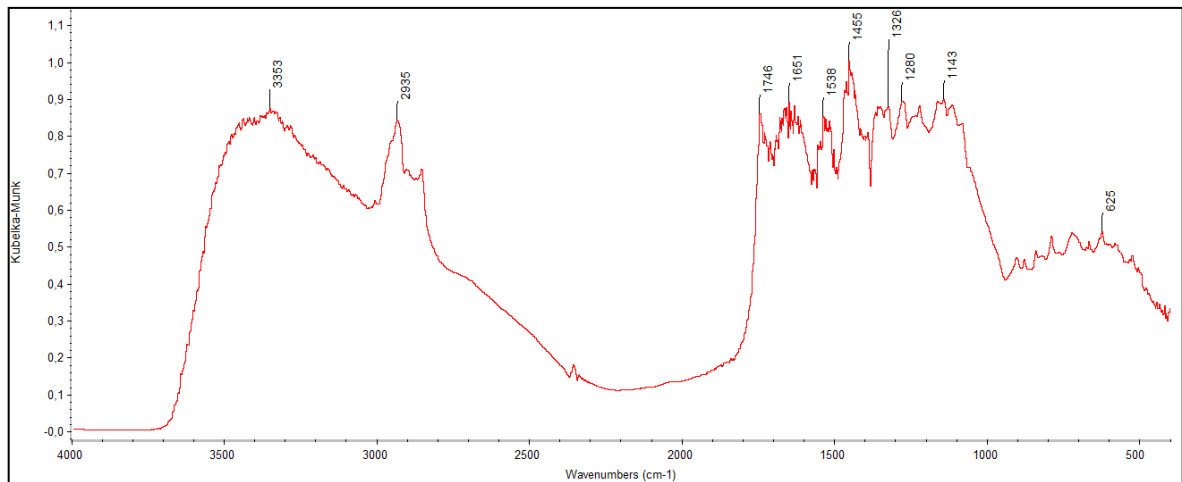
Εικόνα 118: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουσιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο - Ζάκυνθος.



Εικόνα 119: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουσιάτης-Κατσακούλιας-Ζάκυνθος.

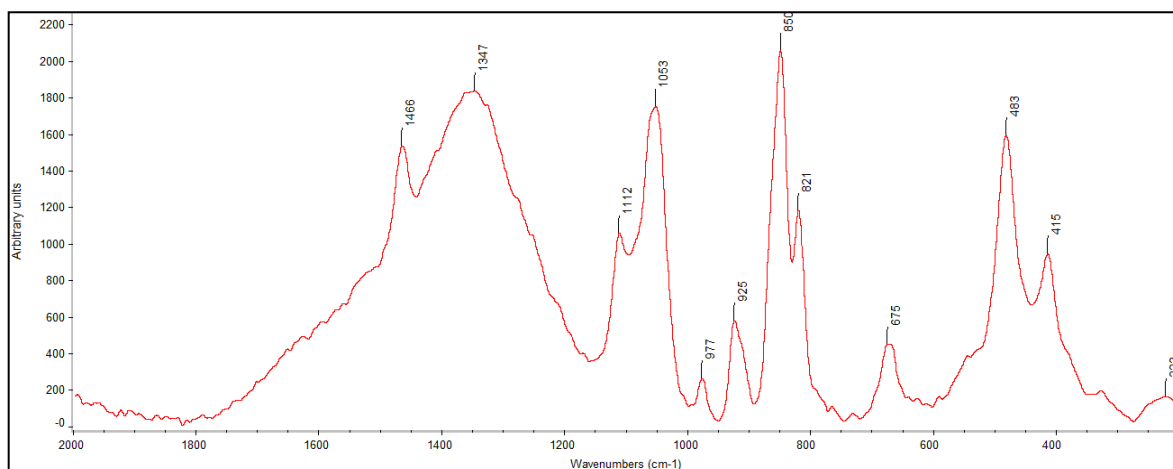


Εικόνα 120: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.

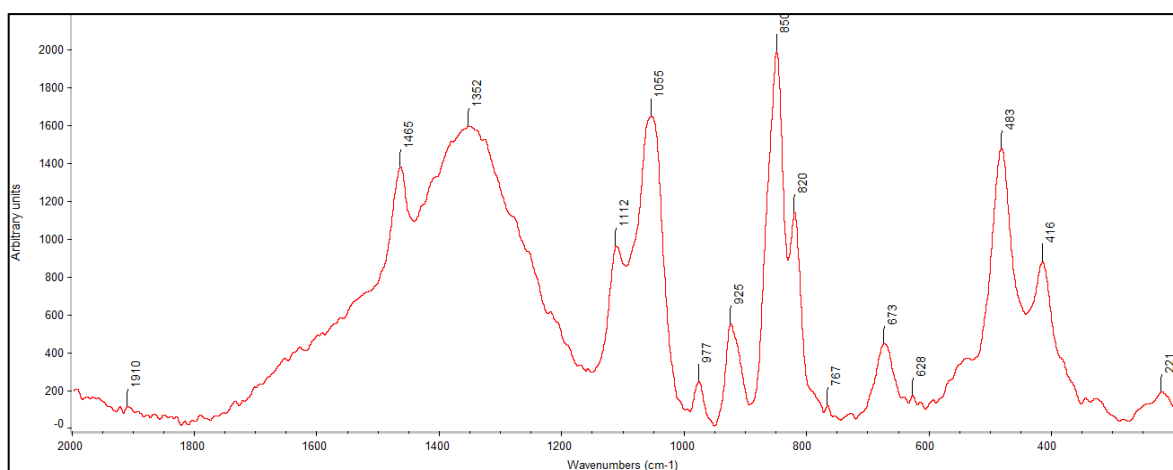


Εικόνα 121: Φάσμα FT-IR του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.

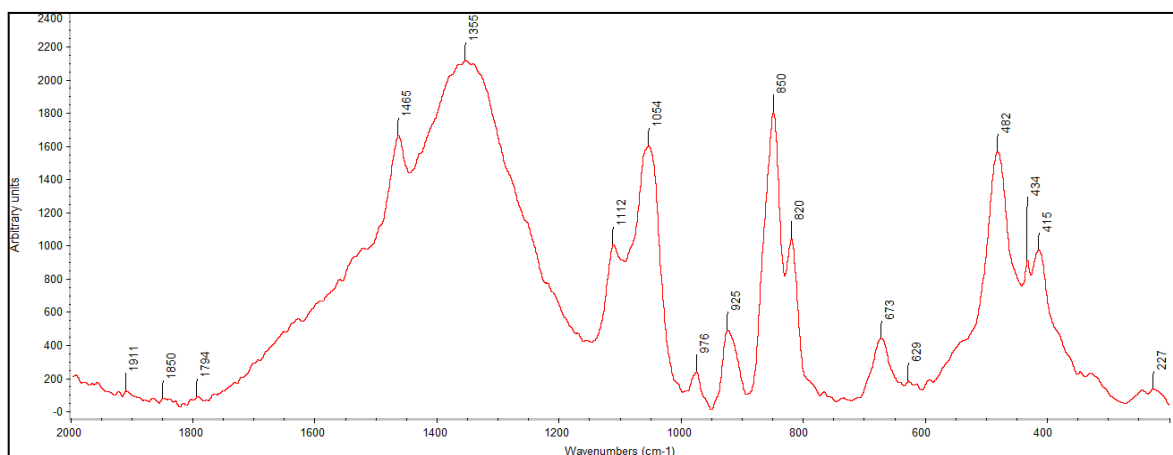
Φάσματα Raman ακατέργαστων εκχυλισμάτων



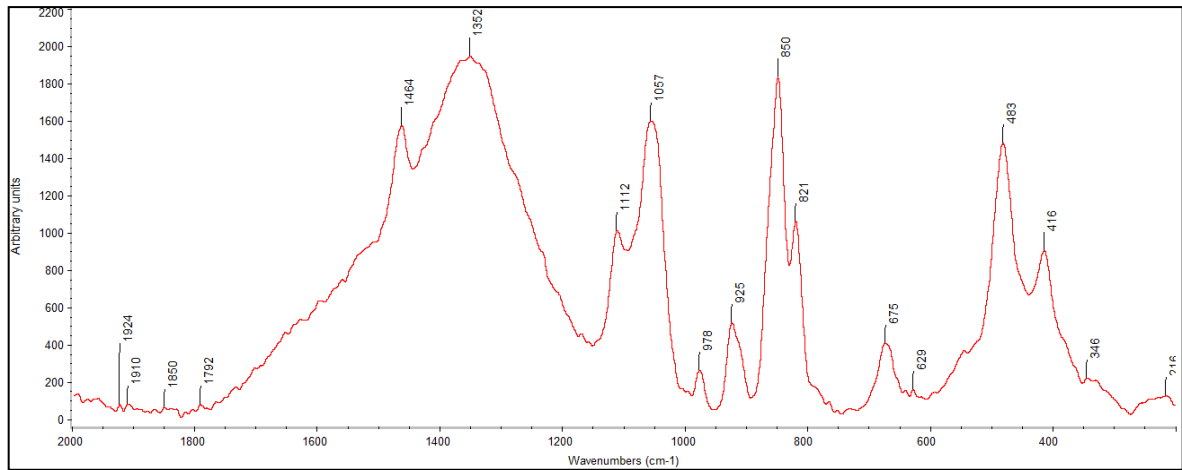
Εικόνα 122: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



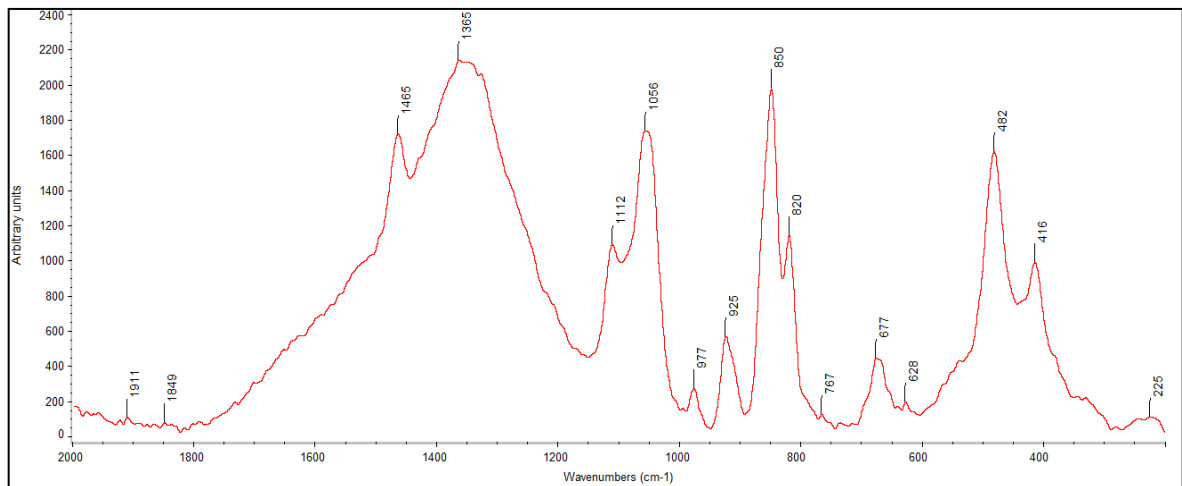
Εικόνα 123: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



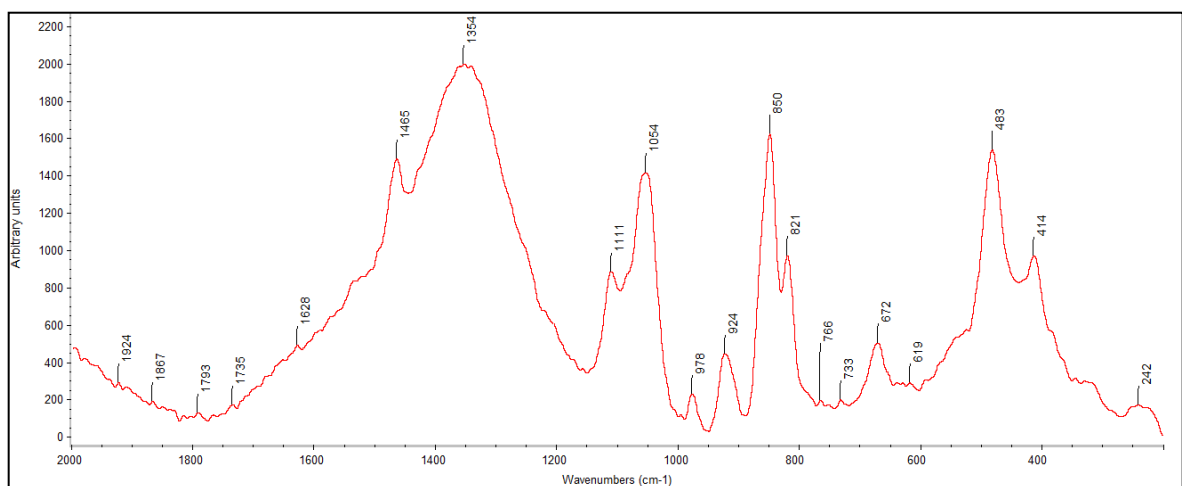
Εικόνα 124: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



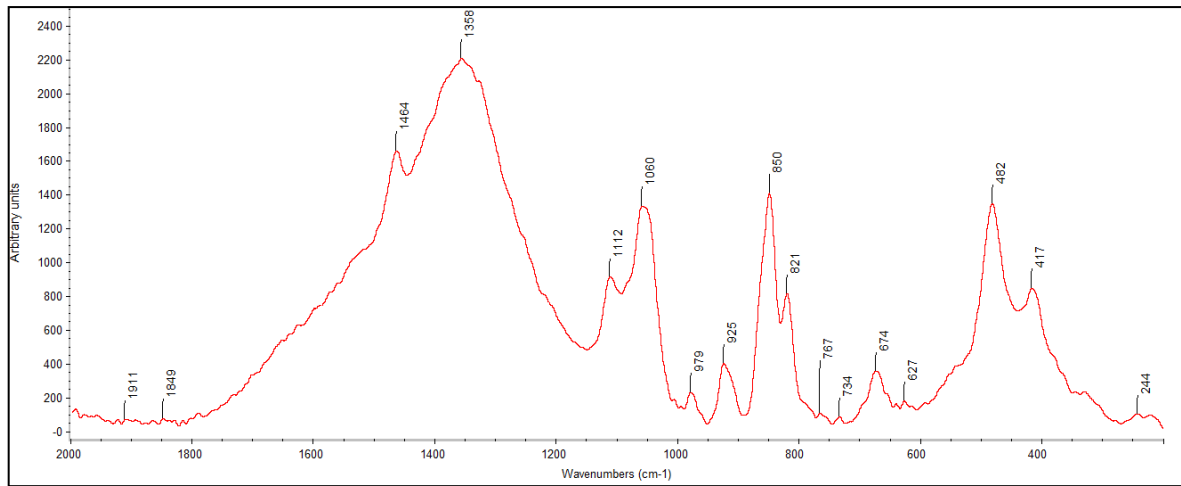
Εικόνα 125: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



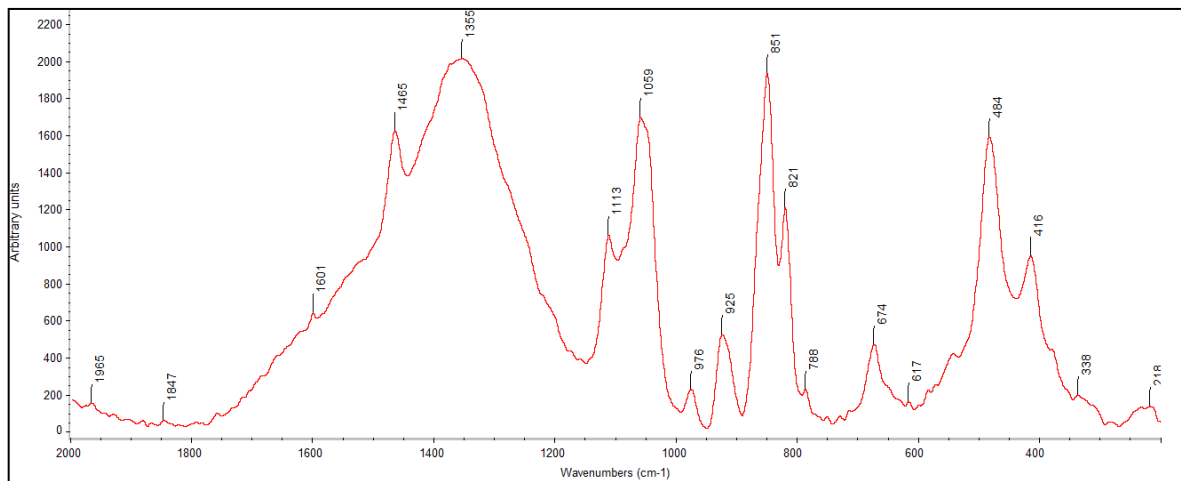
Εικόνα 126: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



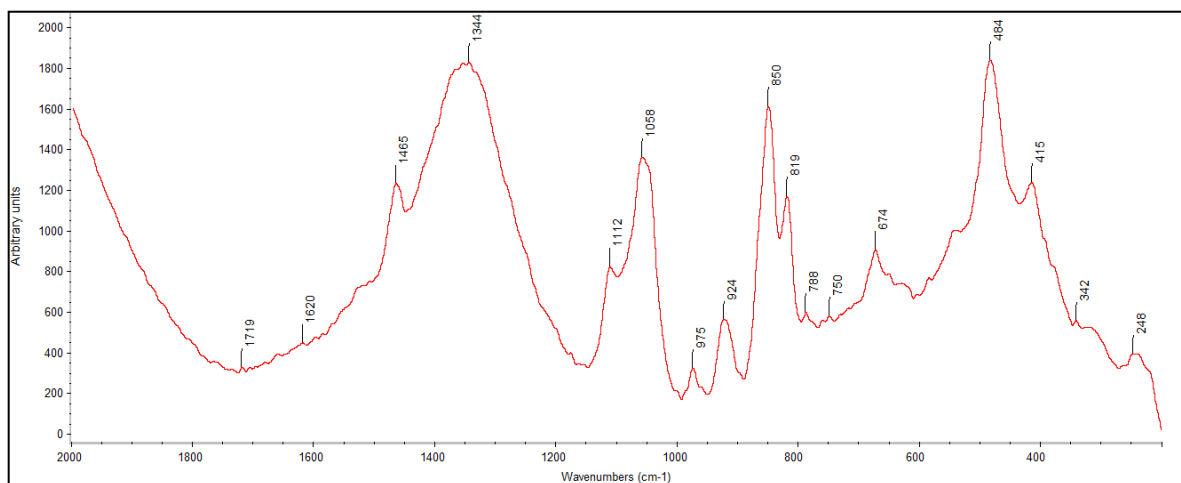
Εικόνα 127: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι -Κεφαλονιά.



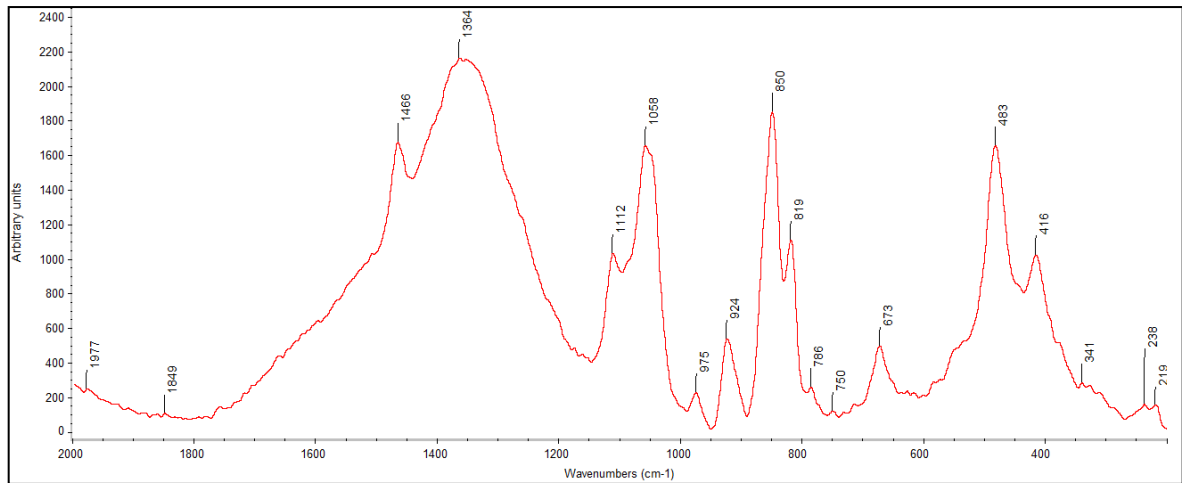
Εικόνα 128: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



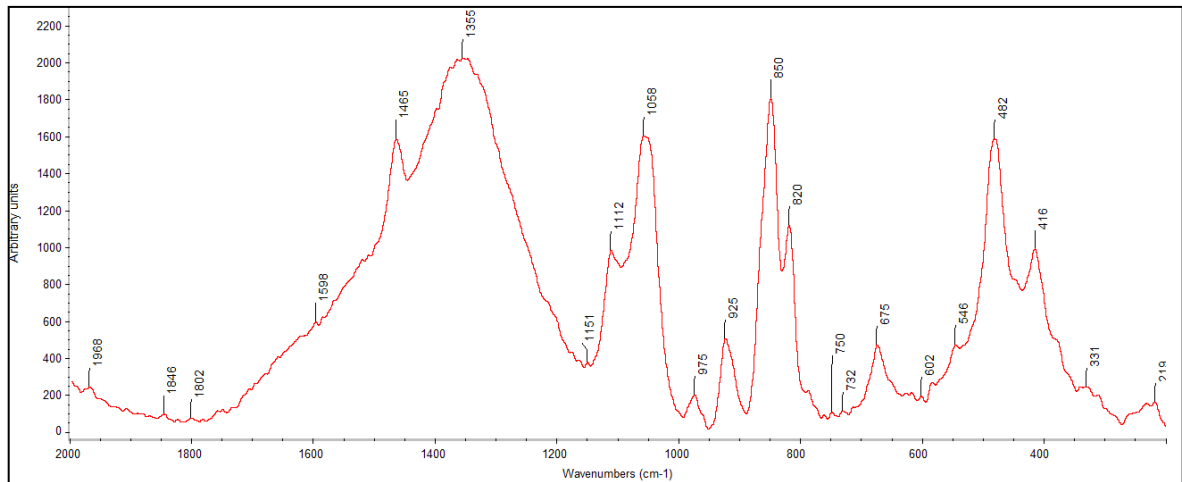
Εικόνα 129: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



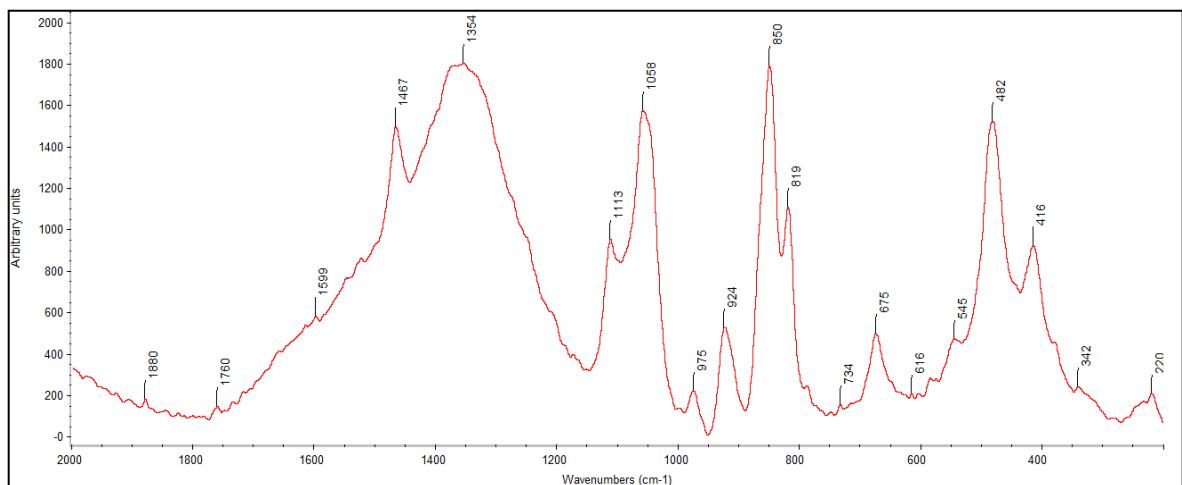
Εικόνα 130: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 14-Αyγouciátis-Κεφαλονιά.



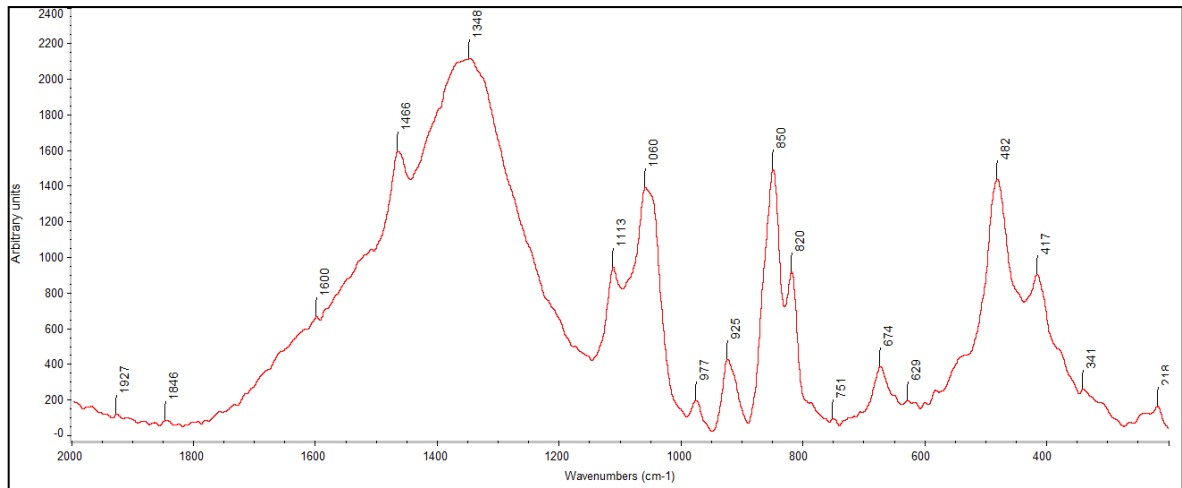
Εικόνα 131: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.



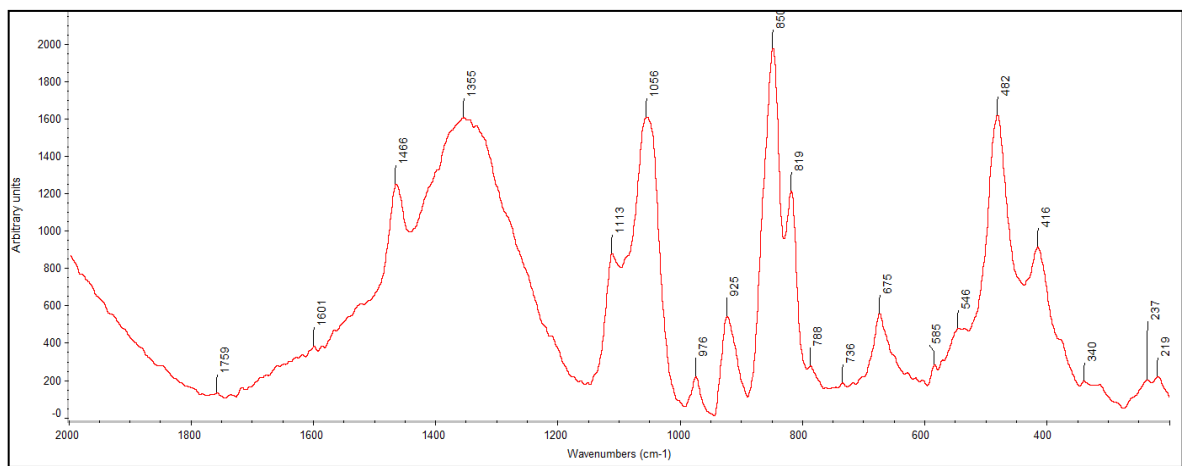
Εικόνα 132: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.



Εικόνα 133: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουσιτιάτης-Κατσακούλιας-Ζάκυνθος.

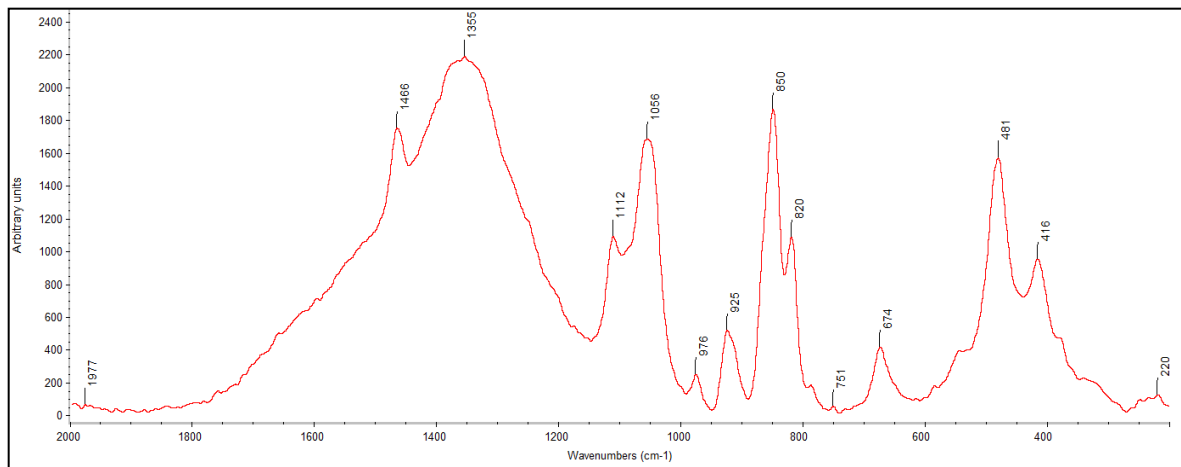


Εικόνα 134: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.

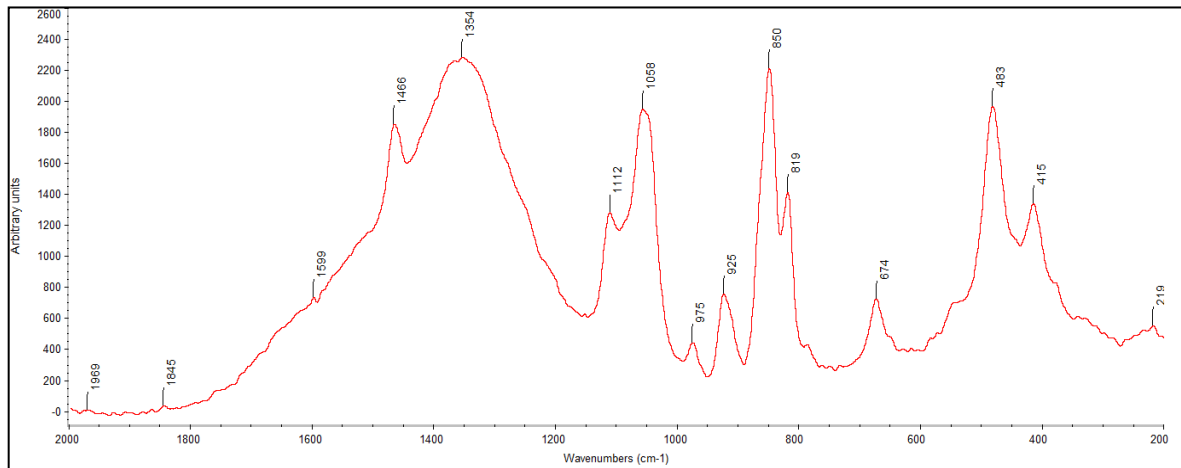


Εικόνα 135: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.

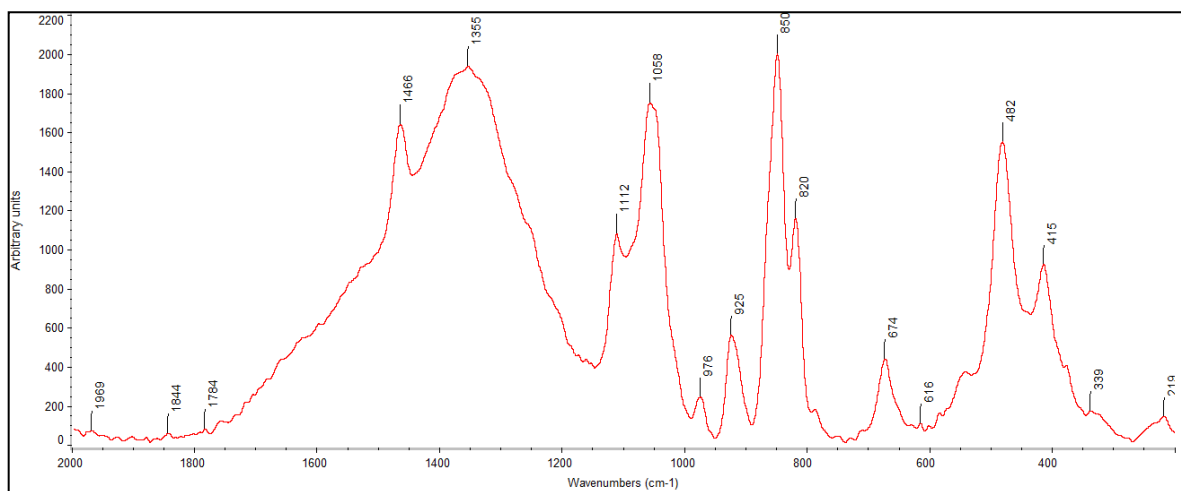
Φάσματα Raman Υδρολυμένων εκχυλισμάτων



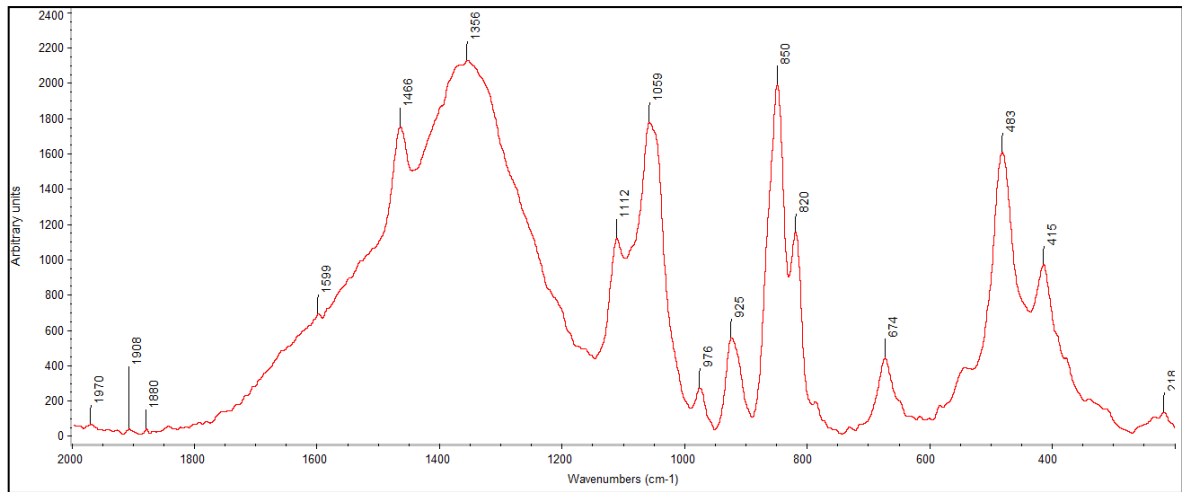
Εικόνα 136: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 03-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



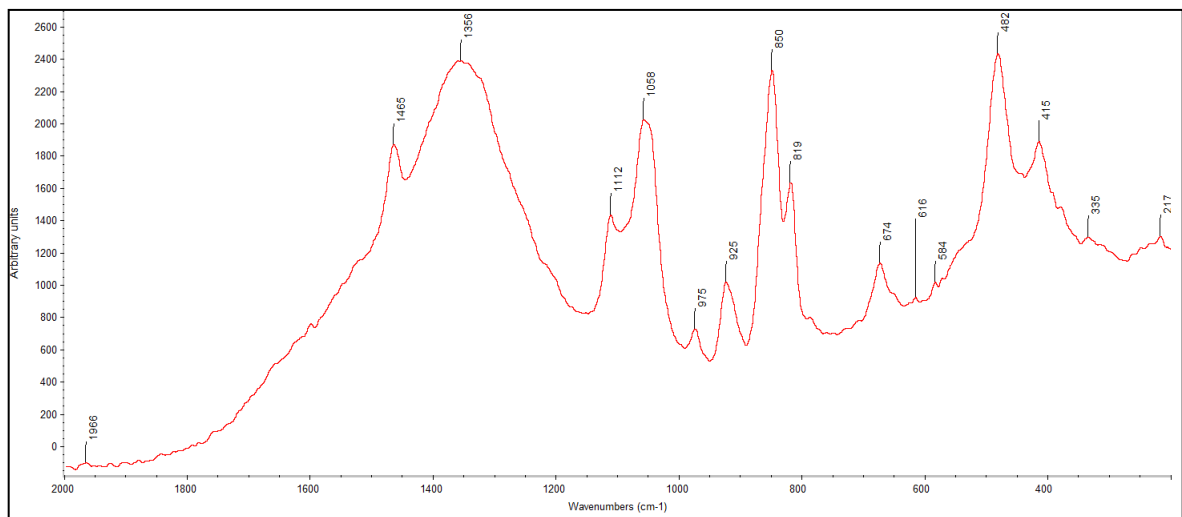
Εικόνα 137: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 06-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



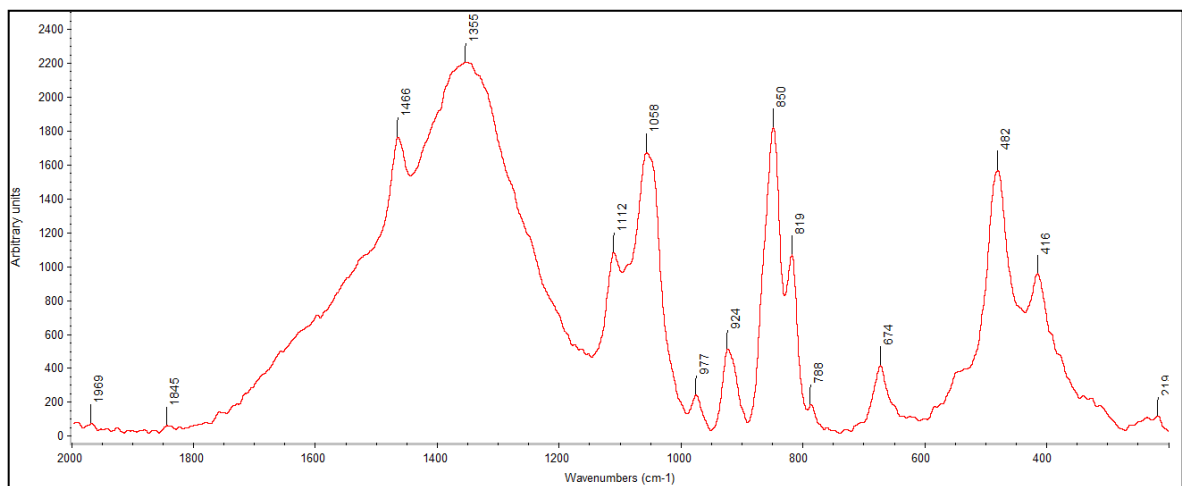
Εικόνα 138: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 07-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



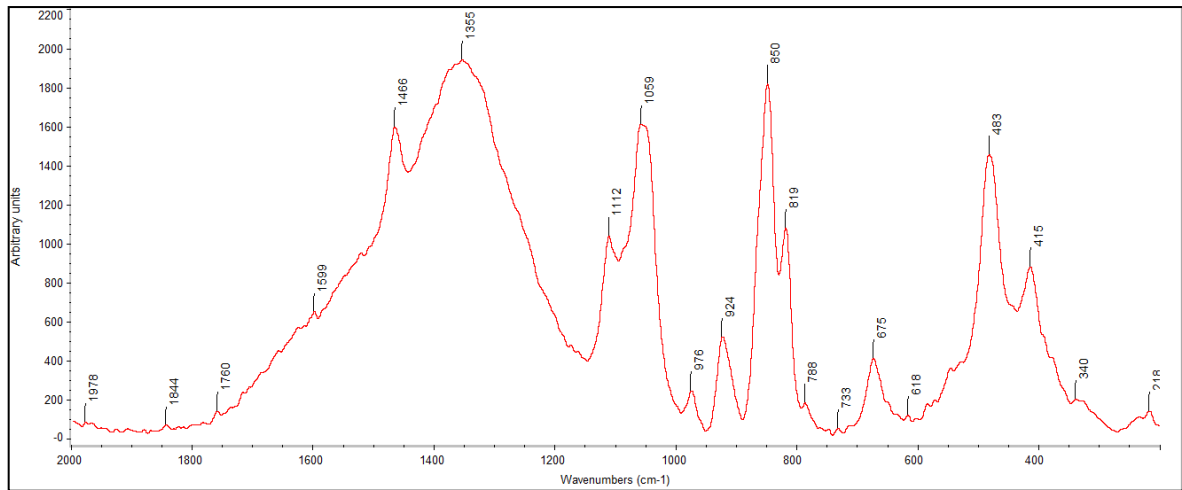
Εικόνα 139: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 09-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



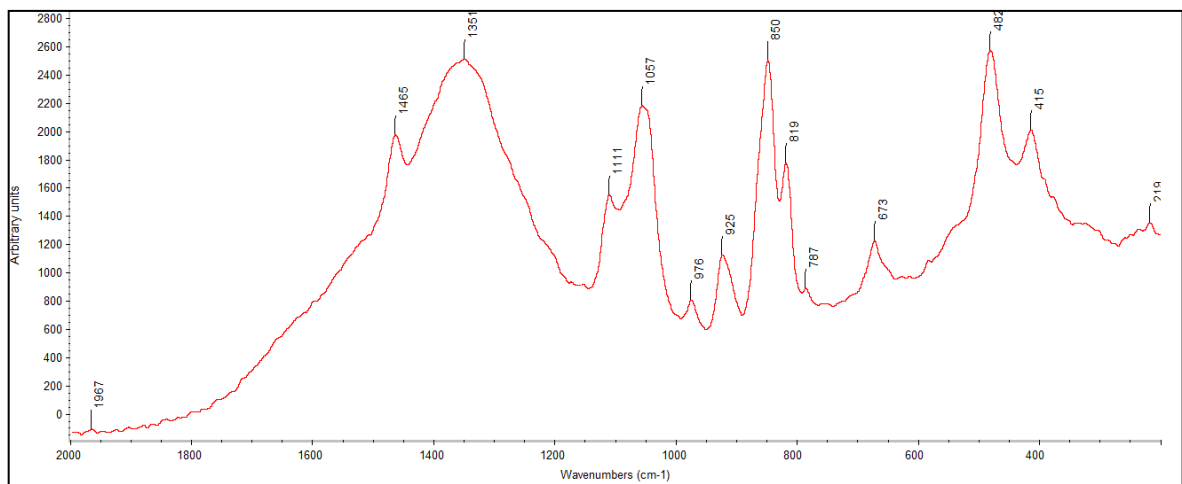
Εικόνα 140: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 10-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



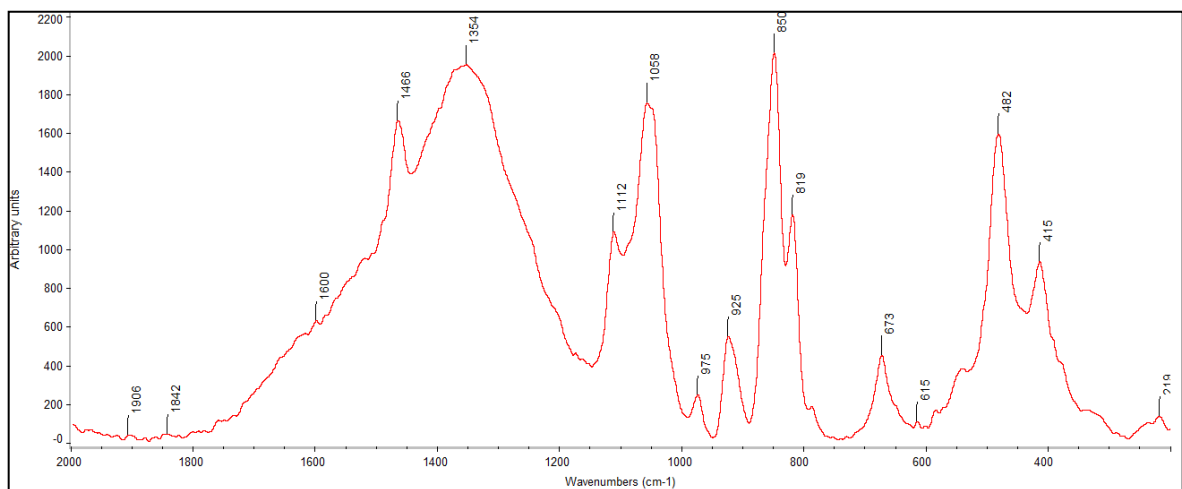
Εικόνα 141: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 11-Μαυροδάφνη-Βοστυλίδι-Κεφαλονιά.



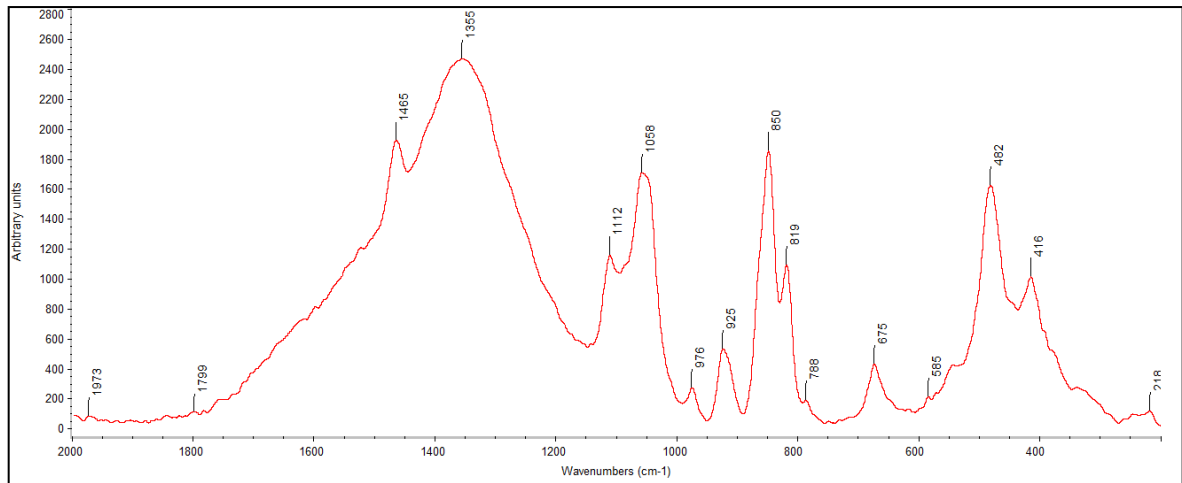
Εικόνα 142: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 12-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



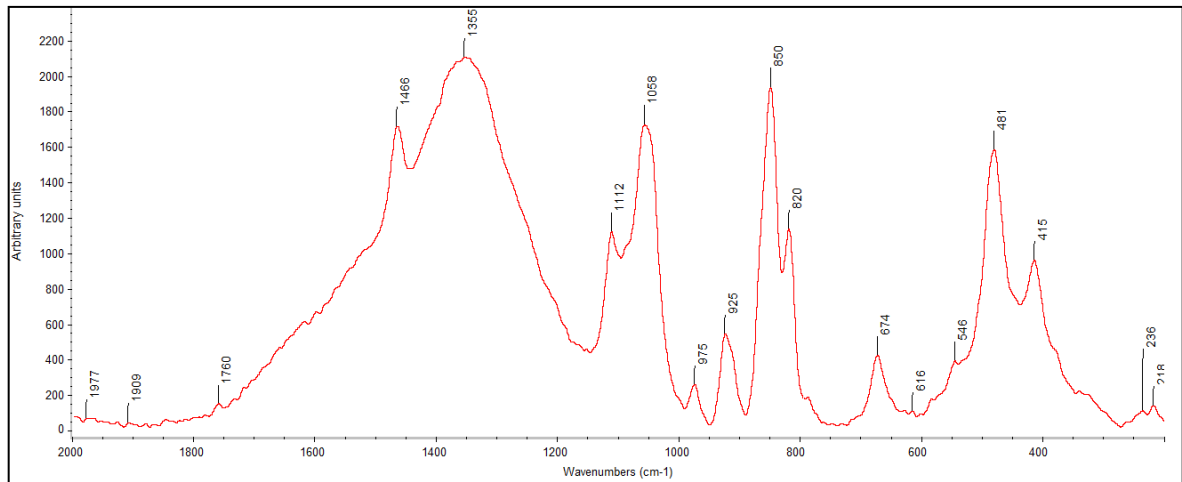
Εικόνα 143: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 13-Ρομπόλα-Κεφαλονιά.



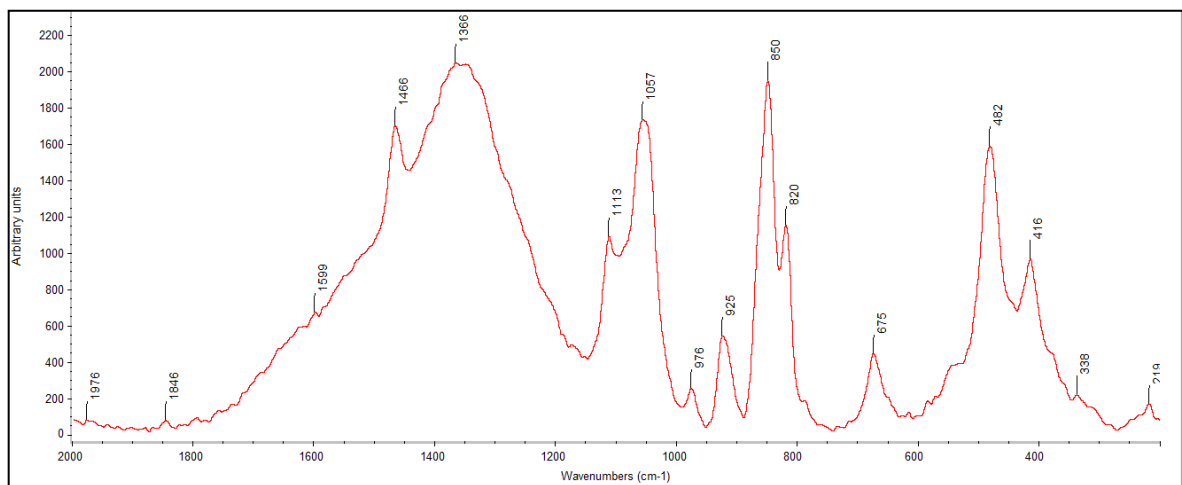
Εικόνα 144: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 14-Αυγουστιάτης-Κεφαλονιά.



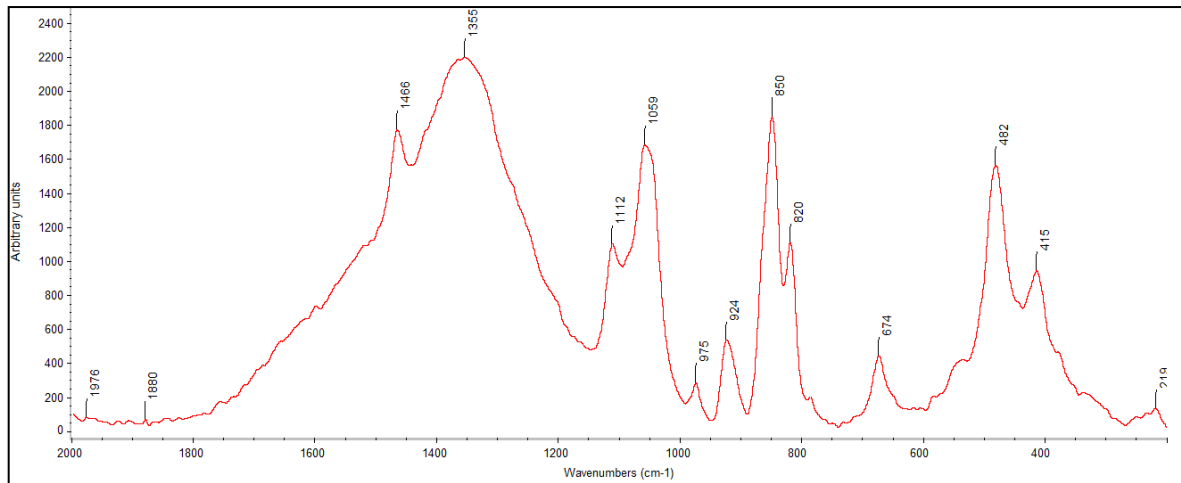
Εικόνα 145: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 15-Παύλος-Ζάκυνθος.



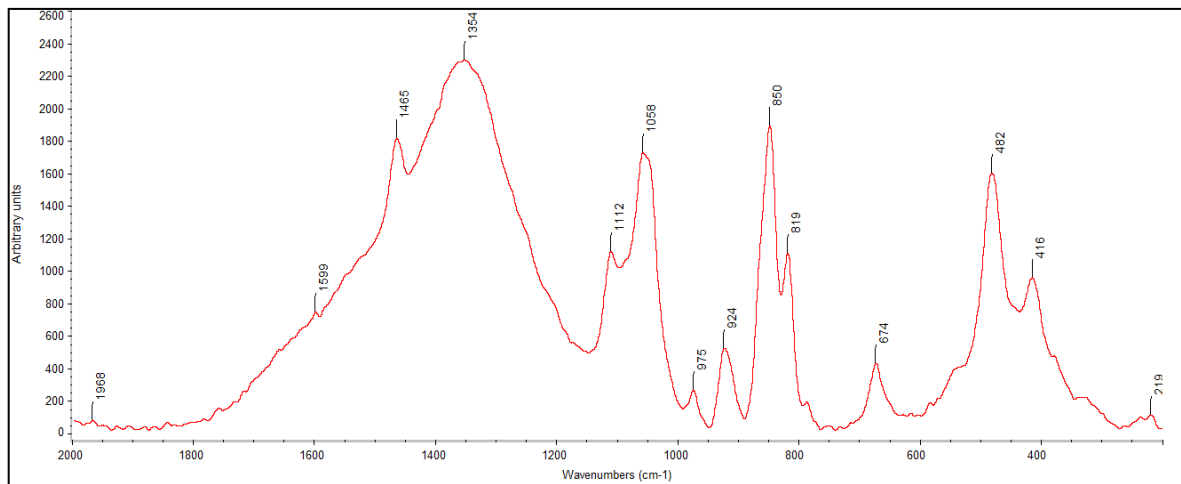
Εικόνα 146: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 16-Αυγουστιάτης-Κατσακούλιας-Σκιαδόπουλο-Ζάκυνθος.



Εικόνα 147: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 17-Αυγουσιάτης-Κατσακούλιας-Ζάκυνθος.



Εικόνα 148: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 18-Κακοτρύγης-Κέρκυρα.



Εικόνα 149: Φάσμα Raman του δείγματος με κωδικό 19-Cabernet-Κέρκυρα.