



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑΤΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

Συγκριτικός προσδιορισμός ανθοκυανών  
από στέμφυλα ποικιλίας Αγιωργίτικο με  
υγροχρωματογραφία χρησιμοποιώντας  
πληρωμένη και μονολιθική στήλη

---

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ Γ. ΚΟΜΠΟΛΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:**

**Δρ. Σταματίνα Καλλίθρακα**

**Δρ. Αναστάσιος Οικονόμου**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του Διπλώματος  
Οινολόγου – Αμπελουργού

Αθήνα, 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑΤΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΔΠΜΣ ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ - ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ

# Συγκριτικός προσδιορισμός ανθοκυανών από στέμφυλα ποικιλίας Αγιωργίτικο με υδροχρωματογραφία χρησιμοποιώντας πληρωμένη και μονολιθική στήλη

---

## Μεταπτυχιακή Διατριβή

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ Γ. ΚΟΜΠΟΛΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ:**

**Δρ. Σταματίνα Καλλίθρακα**

**Δρ. Αναστάσιος Οικονόμου**

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση του Διπλώματος  
Οινολόγου – Αμπελουργού

Αθήνα, 2018

Συγκριτικός προσδιορισμός ανθοκυανών από στέμφυλα  
ποικιλίας Αγιοργίτικο με υδροχρωματογραφία  
χρησιμοποιώντας πληρωμένη και μονολιθική στήλη

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Γ. ΚΟΜΠΟΛΙΑ

Έγκριση

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Πρώτος Εξεταστής Δρ. Σταματίνα Καλλίθρακα  
(Επιβλέπων) Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δεύτερος Εξεταστής Δρ. Αναστάσιος Οικονόμου  
(Επιβλέπων) Καθηγητής  
Τμήμα Χημείας  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τρίτος Εξεταστής Δρ. Αικατερίνη Μπινιάρη  
Επίκουρος Καθηγητής  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

# Συγκριτικός προσδιορισμός ανθοκυανών από στέμφυλα ποικιλίας Αγιωργίτικο με υγροχρωματογραφία χρησιμοποιώντας πληρωμένη και μονολιθική στήλη

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΟΜΠΟΛΙΑ

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήματα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του  
Ανθρώπου και Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Επιβλέποντες καθηγητές: Δρ. Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,  
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης  
Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Δρ. Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Εθνικό και  
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετάται αρχικά ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με τη χρήση δύο στηλών, μιας συμβατικής (αντίστροφης φάση στήλη που αποτελείται από σφαιρικά σωματίδια silica) και μιας μονολιθικής (αποτελείται από ένα μόνο κομμάτι πολυμερούς silica). Η χρήση της μονολιθικής στήλης έγινε με σκοπό την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου η οποία θα μπορεί να προσδιορίσει τη συγκέντρωση των ανθοκυανών ταχύτερα, και με υψηλή ακρίβεια, ενώ η υγρή χρωματογραφία με τη συμβατική στήλη χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η σύγκριση και να εντοπιστεί πιθανή συσχέτιση.

Επιπλέον, μελετάται η επίδραση της καλλιεργητικής τεχνικής του αραιώματος στη σύνθεση και περιεκτικότητα των ανθοκυανών στους φλοιούς των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο, κατά την περίοδο Αύγουστος – Σεπτέμβριος 2017.

Συμπερασματικά από αυτήν την ερευνητική μελέτη παρατηρήθηκε ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε με τη μονολιθική στήλη έχει καλή συσχέτιση με την κλασική μέθοδο (συμβατική στήλη). Επίσης, ο παράγοντας αραιώμα έδειξε ότι επιδράει στατιστικά σημαντικά στη συγκέντρωση κάποιων ανθοκυανών κατά την περίοδο του περκασμού.

**Λέξεις κλειδιά:** ανθοκυάνες, μονολιθική στήλη, HPLC, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, Αγιωργίτικο.

# Comparative identification of anthocyanins from Agiorgitiko grape cultivar with high performance liquid chromatography using conventional and monolithic column

CHRISTINA KOMPOLIA

Agricultural University of Athens, Departments of Food Science and Human Nutrition and Crop Science

Supervisors: Dr. Stamatina Kallithraka, Associate Professor, Agricultural University of Athens, Department of Food Science and Human Nutrition

Dr. Anastasios Oikonomou, Professor, National and Kapodistrian University of Athens, Department of Chemistry

## Abstract

In the present work, qualitative and quantitative determination of anthocyanins by high performance liquid chromatography (HPLC) is studied by using two columns (conventional and monolithic column). The monolithic column was used in order to develop a method that could identify the anthocyanins faster and with high precision, while liquid chromatography with the packed column was used for comparison reasons and investigation of any possible correlation.

The other objective of this study was the effect of thinning on the composition and content of anthocyanins in the Agiorgitiko cultivar during the harvest of 2017.

In conclusion, the present study indicates that there is correlation between the results obtained by the two methods and that there are statistically significant differences between some thinned and not thinned anthocyanins.

**Keywords:** anthocyanins, monolithic column, HPLC, high performance liquid chromatography, Agiorgitiko

Copyright© 2018 Κομπόλια Χριστίνα

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τους συγγραφείς.

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από τα Τμήματα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής των Ανθρώπων και Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων των συγγραφέων.

## Ευχαριστίες

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κα Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το θέμα αυτής της έρευνας και τη βοήθεια της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον κ. Αναστάσιο Οικονόμου, Καθηγητή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη σημαντική βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκτέλεσης του πειραματικού μέρους της μελέτης.

Πάνω απ' όλα όμως θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου και στον Κωνσταντίνο για τη στήριξη, υλική και ηθική, που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Χριστίνα Κομπόλια

## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	1
Περιεχόμενα πινάκων.....	3
Περιεχόμενα διαγραμμάτων .....	4
Περιεχόμενα σχημάτων .....	5
1. Εισαγωγή.....	6
2. Θεωρητικό μέρος.....	8
2.1 Γενικά οι ανθοκυάνες .....	8
2.1.1 Δομή ανθοκυανών.....	8
2.2 Ανθοκυάνες στο σταφύλι.....	9
2.2.1 Εντοπισμός και μορφή στο φυτικό ιστό.....	10
2.2.2 Βιοσύνθεση των ανθοκυανών.....	11
2.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών .....	15
2.3 Αραίωμα Φορτίου.....	18
2.4 Εκχύλιση ανθοκυανών .....	19
2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού ανθοκυανών.....	19
2.5.1 Χρωματογραφία χάρτου (PC).....	20
2.5.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) .....	20
2.5.3 Ηλεκτροφόρηση.....	21
2.5.4 Ανοιχτή χρωματογραφία στήλης.....	21
2.5.5 Αέρια χρωματογραφία .....	22
2.5.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	22
3. Πειραματικό μέρος .....	27
3.1 Υλικά.....	27
3.1.1 Δείγματα .....	27
3.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	28
3.1.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	28
3.2 Μέθοδοι.....	29
3.2.1. Κατεργασία δειγμάτων .....	29
3.2.2 Χρωματογραφική ανάλυση ανθοκυανών .....	30
3.2.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	32
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	33
4.1 Ανάπτυξη Μεθόδου.....	33
4.2 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων ανθοκυανών φλοιών με ανάλυση HPLC.....	43



4.2 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων-συσχέτιση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων.....	46
4.3 Ανάλυση διακύμανσης για τον παράγοντα αραίωμα .....	50
5. Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα.....	53
Βιβλιογραφία .....	55

## Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1 Ποικιλία σταφυλιού που μελετήθηκε, προέλευση, συνώνυμα και περιοχές καλλιέργειας. (Σταυρακάκης Μ. ).....	28
Πίνακας 2 Πρόγραμμα διαλυτών για την ανάλυση ανθοκυανών με HPLC με τη στήλη Restek.....	31
Πίνακας 3 Πρόγραμμα διαλυτών για την ανάλυση ανθοκυανών με HPLC με τη μονολιθική στήλη. ....	31
Πίνακας 4 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 1. ....	33
Πίνακας 5 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 2. ....	34
Πίνακας 6 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 3. ....	35
Πίνακας 7 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 4. ....	35
Πίνακας 8 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 5. ....	36
Πίνακας 9 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 6. ....	37
Πίνακας 10 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 7. ....	37
Πίνακας 11 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 8. ....	38
Πίνακας 12 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 9. ....	39
Πίνακας 13 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 10. ....	40
Πίνακας 14 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 11. ....	41
Πίνακας 15 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 12. ....	42
Πίνακας 16 Συγκεντρώσεις (mg/L) ανθοκυανών με τη μέθοδο αναφοράς.....	44
Πίνακας 17 Συγκεντρώσεις (mg/L) ανθοκυανών με την πειραματική μέθοδο. ....	45
Πίνακας 18 Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων(mg/L) των ανθοκυανών όπως προσδιορίστηκαν με HPLC με τη μέθοδο αναφοράς και με την πειραματική μέθοδο. ....	45
Πίνακας 19 Συγκέντρωση ανθοκυανών ορισμένων ποικιλιών. ....	46
Πίνακας 20 Τιμές του συντελεστή συσχέτισης των ανθοκυανών και για τις 2 μεθόδους. ....	48
Πίνακας 21 Συντελεστής που δείχνει κατά πόσο η πειραματική μέθοδος υπερτιμά.49	
Πίνακας 22 Επίδραση του αραιώματος με τη μέθοδο αναφοράς στη συγκέντρωση των ανθοκυανών (n=18). ....	50
Πίνακας 23 Στατιστική ανάλυση διακύμανσης για τον παράγοντα αραιώμα για τη μέθοδο αναφοράς. ....	51

## Περιεχόμενα διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού ανθοκυανών με τη μέθοδο HPLC με τη στήλη Restek.....	32
Διάγραμμα 2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού ανθοκυανών με τη μέθοδο HPLC με τη μονολιθική στήλη. ....	32
Διάγραμμα 3 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 1. ....	34
Διάγραμμα 4 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 2. ....	34
Διάγραμμα 5 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 3. ....	35
Διάγραμμα 6 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 4. ....	36
Διάγραμμα 7 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 5. ....	36
Διάγραμμα 8 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 6. ....	37
Διάγραμμα 9 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 7. ....	38
Διάγραμμα 10 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 8. ....	39
Διάγραμμα 11 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 9. ....	40
Διάγραμμα 12 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 10. ....	41
Διάγραμμα 13 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 11. ....	41
Διάγραμμα 14 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 12. ....	42
Διάγραμμα 15 Τυπικό χρωματογράφημα ανθοκυανών στα 520 nm. ....	43
Διάγραμμα 16 Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της δελφινιδίνης. ....	46
Διάγραμμα 17 Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της κυανιδίνης. ....	47
Διάγραμμα 18 Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της πετουινιδίνης. ....	47
Διάγραμμα 19 Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της παιονιδίνης. ....	47
Διάγραμμα 20 Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της μαλβιδίνης. ....	48

## Περιεχόμενα σχημάτων

Σχήμα 1 Δομή άγλυκου μέρους ανθοκυανών. ....	8
Σχήμα 2 Ισορροπία ανάμεσα στις διαφορετικές μορφές των ελεύθερων ανθοκυανών που βρίσκονται στα σταφύλια. ....	10
Σχήμα 3 Διπλή δομή πόρων μιας μονολιθικής στήλης. ....	24
Σχήμα 4 Εικόνες SEM του υλικού πλήρωσης α) μιας συμβατικής και β) μιας μονολιθικής στήλης. ....	25

## 1. Εισαγωγή

Οι αποχρώσεις των κόκκινων οίνων οφείλονται στις ίδιες χημικές ενώσεις που δίνουν στα άνθη και στα φρούτα –άρα και στα σταφύλια- το πορφυρό, ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό και ιώδες χρώμα τους. Οι ενώσεις αυτές λέγονται «ανθοκυάνες» γιατί απομονώθηκαν για πρώτη φορά από άνθη με κυανέρυθρα χρώματα. Ανάλογα με τη χημική δομή τους έχουν διαφορετικές αποχρώσεις. Ο χρωματικός πλούτος της φύσης οφείλεται ακριβώς σ' αυτήν τους την ιδιότητα. Οι ανθοκυάνες είναι οι κόκκινες χρωστικές του σταφυλιού οι οποίες έχουν πολλά ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου.

Η πρώτη ύλη, δηλαδή η ποικιλία του σταφυλιού παίζει καθοριστικό ρόλο για την ποιότητα του παραγόμενου οίνου. Η ένταση, η απόχρωση, και η σταθερότητα του χρώματος των οίνων, εξαρτώνται από τον ανθοκυανικό πλούτο και την κατανομή των ανθοκυανών των ποικιλιών από τις οποίες προέρχονται. Για το λόγο αυτό οι ανθοκυάνες των σταφυλιών διαφόρων ποικιλιών αποτέλεσαν από το παρελθόν έως τις μέρες μας αντικείμενο μελέτης για πολλούς ερευνητές.

Στην Ελλάδα καλλιεργούνται περίπου 300 ποικιλίες της ευρωπαϊκής αμπέλου, ενώ παραμένουν ακόμη στη φάση της δοκιμής ή της περιορισμένης διάδοσης, όσες άλλες έχουν εισαχθεί πρόσφατα.

Περίπου το 80% της παραγωγής τους απορροφάται για την παρασκευή οίνων, ενώ το 13% πωλείται ως επιτραπέζια σταφύλια, και το υπόλοιπο χρησιμοποιείται κυρίως για σταφίδες, χυμούς και άλλα προϊόντα.

Τα σταφύλια αποτελούν μία από τις πλουσιότερες πηγές ανθοκυανών, με χαμηλό κόστος. Επιπλέον, η παγκόσμια τάση στη βιομηχανία τροφίμων σήμερα, είναι η αποφυγή τεχνητών χρωστικών ουσιών και η χρήση φυσικών. Το γεγονός αυτό, συνδυαζόμενο με τις αποδεδειγμένα θετικές επιπτώσεις των ανθοκυανών στην υγεία του ανθρώπου, οδήγησε στη σκέψη για την εκμετάλλευση των ανθοκυανών των σταφυλιών, ως χρωστικές τροφίμων. Έτσι, οι φλοιοί των σταφυλιών που αποτελούν παραπροϊόντα της οινοβιομηχανίας, χρησιμοποιήθηκαν, με επιτυχία, από αρκετές χώρες, με προεξάρχουσα την Ιταλία, για την παραγωγή φυσικών χρωστικών.

Πρωταρχική χρήση αυτών των χρωστικών, ήταν η αύξηση του χρώματος των οίνων, αλλά στη συνέχεια βρήκαν εκτεταμένη εφαρμογή, σε χυμούς φρούτων και άλλα προϊόντα τροφίμων.

Η μελέτη των ανθοκυανών των φλοιών των σταφυλιών, πέρα από τα παραπάνω, παρουσιάζει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών στο παρελθόν και η πιο αποτελεσματική από τις τεχνικές ανάλυσης θεωρείται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η οποία έχει επιτρέψει το διαχωρισμό, και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους ανθοκυανών.

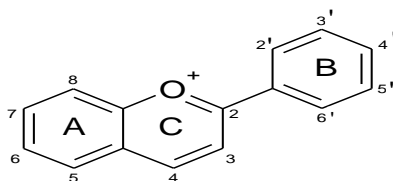
Στην παρούσα εργασία εξετάζεται αρχικά η επίδραση του αραιώματος φορτίου στη σύνθεση των ανθοκυανών, στους φλοιούς των ραγών της ποικιλίας Αγιωργίτικο και στη συνέχεια ο προσδιορισμός των επιμέρους ανθοκυανών των φλοιών, ποιοτικά και ποσοτικά με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με μονολιθική και πληρωμένη στήλη. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών έγινε μια προσπάθεια για την ανάπτυξη μιας μεθόδου με μονολιθική στήλη η οποία θα μπορεί να διαχωρίζει τις ανθοκυάνες πιο γρήγορα συγκριτικά με τη συμβατική στήλη.

## 2. Θεωρητικό μέρος

### 2.1 Γενικά οι ανθοκυάνες

#### 2.1.1 Δομή ανθοκυανών

Οι ανθοκυάνες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών καθώς χαρακτηρίζονται δομικά από τον ανθρακικό σκελετό του τύπου  $C_6C_3C_6$  (Geissman, 1962). Είναι γλυκοζίτες, των οποίων το άγλυκο μέρος, που καλείται ανθοκυανιδίνη, είναι υδροξυλιωμένο και μεθοξυλιωμένο παράγωγο του φαινυλ-2-βενζοπυριλίου (Σχήμα 1). Με βάση τη διαφοροποίησή τους κυρίως από τη θέση των υδροξυλίων και μεθοξυλίων στο Β δακτύλιο του μορίου των ανθοκυανιδινών διακρίνουμε τις παρακάτω έξι βασικές κατηγορίες ανθοκυανών: δελφινιδίνη, κυανιδίνη, πετουνιδίνη, παιονιδίνη, μαλβιδίνη και πελαργονιδίνη (Σχήμα 1).



Άγλυκο μέρος	3	5	7	3'	4'	5'
Πελαργονιδίνη(Pg)	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H
Κυανιδίνη(Cy)	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H
Δελφινιδίνη(Dp)	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
Παιονιδίνη(Pn)	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H
Πετουνιδίνη(Pt)	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH
Μαλβιδίνη(Mv)	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>

Σχήμα 1 Δομή άγλυκου μέρους ανθοκυανών.

Έχουν απομονωθεί πάνω από 250 ανθοκυάνες (Harborne J. B., 1993) οι οποίες κυρίως απαντούν :

- είτε σαν μονογλυκοζίτες με το σάκχαρο ενωμένο στο –OH της θέσης 3,
- είτε σαν διγλυκοζίτες με τα μόρια του σακχάρου ενωμένα στα –OH των θέσεων 3 και 5
- και σπάνια ως τριγλυκοζίτες.

Σ' όλες αυτές τις περιπτώσεις το σάκχαρο είναι κυρίως γλυκόζη αλλά συμβαίνει να είναι και αραβινόζη, ραμνόζη, ξυλόζη, γαλακτόζη και σπανιότερα άλλοι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες (κυρίως ρουτινόζη, σαμπουμπιόζη, ή σοφορόζη) ή τρισακχαρίτες.

Απαντούν επίσης ακυλιωμένες ανθοκυάνες. Οι ενώσεις αυτές έχουν το –OH στη θέση 6 του σακχάρου εστεροποιημένο με ένα οργανικό οξύ της αλειφατικής ή αρωματικής σειράς, όπως το οξικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό, σιναπικό, π-υδροξυβενζοϊκό, μηλονικό, οξαλικό και μηλικό (Harborne & Mabry, 1982).

## 2.2 Ανθοκυάνες στο σταφύλι

Οι ανθοκυάνες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες οργανικών ενώσεων του σταφυλιού. Πληθώρα εργασιών με αντικείμενο την ταυτοποίηση των ανθοκυανών των σταφυλιών έχει δείξει ότι:

- ανευρίσκονται ως γλυκοζίτες μόνο των πέντε άγλυκων: δελφινιδίνης, κυανιδίνης, πετουνιδίνης, παιονιδίνης, και μαλβιδίνης,
- απαντούν κυρίως ως μονο- και διγλυκοζίτες εκτός από το γένος *Vitis vinifera* όπου δεν παράγει διγλυκοζίτες,
- το μόριο της γλυκόζης μπορεί να είναι επιπλέον εστεροποιημένο με οξικό, κουμαρικό ή καφεϊκό οξύ.



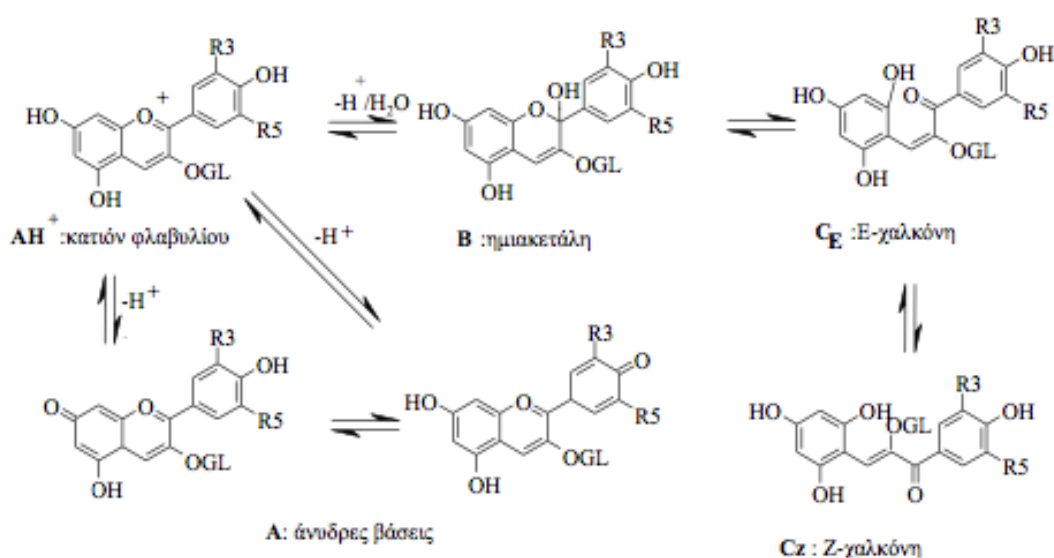
### 2.2.1 Εντοπισμός και μορφή στο φυτικό ιστό

Η σύνθεση και αποθήκευση των ανθοκυανών γίνεται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων της πρώτης υποδερμικής στιβάδας στους φλοιούς των κόκκινων σταφυλιών. Οι επόμενες δύο υποδερμικές στιβάδες μπορεί να περιέχουν μικρά ποσά ανθοκυανών, τα οποία τείνουν στο ελάχιστο έως την έκτη υποδερμική στιβάδα, όπου σπάνια εμφανίζεται χρωματισμός (Ribereau-Gayon, 2006).

Εξαιρεση αποτελούν οι λεγόμενες «βαφικές ποικιλίες» στις οποίες απαντώνται ανθοκυάνες και στο σάρκωμα των σταφυλιών. Σε άλλες περιπτώσεις, χρώμα εμφανίζεται στη σάρκα, όταν το φρούτο έχει υπερωριμάσει και καθώς τα κύτταρα γερνούν, τα χρωστικά τους στοιχεία διαχέονται στη σάρκα.

Οι ελεύθερες ανθοκυάνες απαντούν στα χυμοτόπια με τέσσερις διαφορετικές μορφές (Σχήμα 2) που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους (Cody, Middleton, & Harborne, 1986):

- ως κατιόντα του φλαβυλίου με ερυθρό χρώμα ( $AH^+$ )
- ως άνυδρες βάσεις, χρώματος ιώδους (A)
- ως άχρωμες ψευδοβάσεις (B)
- ως χαλκόνες, πολύ ανοιχτού κίτρινου χρώματος (C)



Σχήμα 2 Ισορροπία ανάμεσα στις διαφορετικές μορφές των ελεύθερων ανθοκυανών που βρίσκονται στα σταφύλια.

Κάθε ένα από τα παραπάνω μοριακά είδη έχει έναν αριθμό ταυτομερών μορφών στις οποίες μετατρέπεται ταχέως. Επιπλέον, οι χαλκόνες εμφανίζονται είτε με την -cis είτε με την -trans μορφή, κάτι που δημιουργεί ακόμη μεγαλύτερη πολυπλοκότητα.

Κατά την ωρίμαση, η συγκέντρωση των ανθοκυανών στην εξωτερική υποδερμική στιβάδα αυξάνει ως το βαθμό του κορεσμού, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα, να δημιουργούνται σύμπλοκα με χρωστικές, ενωμένες είτε μεταξύ τους (self-association) είτε με άλλες ουσίες (copigmentation) (Somers & Vérette, 1988). Οι δεσμοί που αναπτύσσονται ανάμεσα στις ανθοκυανιδίνες είναι υδρόφοβοι, ενώ ανάμεσα στα σάκχαρα υδρόφιλοι. Ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ ανθοκυανών ευνοείται όταν το pH είναι χαμηλό, ενώ σε υψηλότερες τιμές pH δημιουργούνται κυρίως σύμπλοκα με άλλες ενώσεις. Αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων στο φρούτο ευνοεί αυτό το φαινόμενο. Φλαβονοειδείς φαινόλες, εστέρες του υδροξυκιναμωμικού οξέος και πολυφαινόλες εμπλέκονται συχνά σε τέτοια σύμπλοκα (Webb & Amerine, 1982).

### 2.2.2 Βιοσύνθεση των ανθοκυανών

Ο μηχανισμός σχηματισμού των ανθοκυανών είναι παρόμοιος με εκείνον όλων των άλλων φλαβονοειδών φαινολών, παραμένουν όμως άγνωστα αρκετά στάδιά του.

Η σύνθεση ξεκινάει με τη συμπύκνωση της ερυθρόζης που παράγεται από τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών και του φωσφοενολοπυροσταφυλικού που παράγεται από τη γλυκόλυση. Η φαινυλαλανίνη που δημιουργείται έτσι, μετατρέπεται σε κιναμικό οξύ, μέσω του κύκλου του σικιμικού οξέος. Περαιτέρω μετατροπή του κιναμικού οξέος, οδηγεί σε διάφορες μη φλαβονοειδείς φαινόλες ή ενσωματώνεται ως Β δακτύλιος στη σύνθεση των φλαβονοειδών φαινολών. Ο Α δακτύλιος των φλαβονοειδών φαινολών προέρχεται από το οξικό μέσω του μηλόνηλου συνενζύμου Α.

Σύμφωνα με τους Ebel και Hahlbrock (Harborne & Mabry, 1982), υπάρχει μια κοινή ενδιάμεση ουσία για όλες τις φλαβονοειδείς φαινόλες. Πρόκειται για μία

χαλκόνη, που κυκλοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου χαλκονο-ισομεράση, προς μία φλαβανόνη, από την οποία σχηματίζονται οι διάφορες φλαβόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβονόνες και ανθοκυάνες, με διάφορες αντιδράσεις υδροξυλίωσης, μεθοξυλίωσης, εστεροποίησης με σάκχαρα και ακυλίωσης του σακχαρικού μορίου, που καταλύονται από εξειδικευμένα ένζυμα.

Φαίνεται, όμως, ότι στην περίπτωση των ανθοκυανών υπάρχει μία ιδιαιτερότητα. Συγκεκριμένα, ενώ στις άλλες φλαβονοειδείς φαινόλες τα άγλυκα είναι τα μόνα υποστρώματα δράσης των ενζύμων που καταλύουν τις υδροξυλίώσεις και μεθοξυλίώσεις, η δε εστεροποίηση με σάκχαρο και η ακυλίωση του σακχάρου είναι τα τελευταία στάδια στην αλυσίδα των μετασχηματισμών, στις ανθοκυάνες φαίνεται ότι προηγείται η εστεροποίηση με σάκχαρο, η οποία συνεπάγεται σταθεροποίηση του ασταθούς ανθοκυανιδικού μορίου. Μόνον έτσι μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι στη φύση δεν έχουν βρεθεί ελεύθερες ανθοκυανιδίνες (Roggero et al, 1986).

Με βάση τα στοιχεία των ερευνών του, επί της συμπεριφοράς των ανθοκυανών κατά την πορεία ωρίμασης των σταφυλών γαλλικών ποικιλιών της *Vitis Vinifera*, και ειδικότερα τριών κλώνων της ποικιλίας *Syrah*, ο Roggero διατύπωσε μια θεωρία σχετικά με την αλυσίδα σχηματισμού και μετασχηματισμού των ανθοκυανών, της οποίας τα στάδια απεικονίζονται στο Σχήμα 3 (Roggero et al, 1986). Η θεωρία αυτή έχει ως εξής:

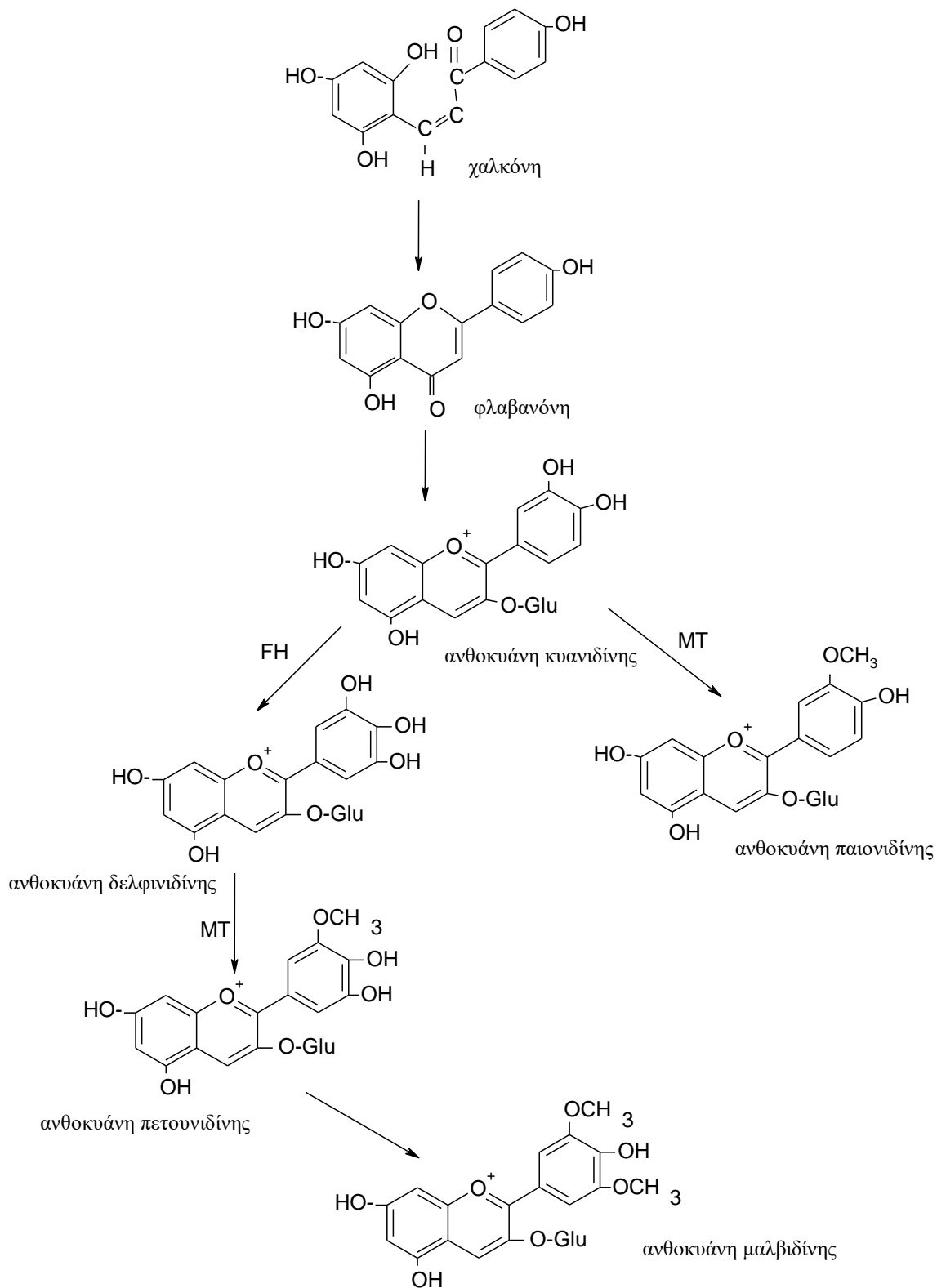
Στα φυτά της αμπέλου, καθώς δεν απαντάται πελαργονιδίνη, η κυανιδίνη είναι η πρώτη ανθοκυάνη που παρουσιάζεται στους φλοιούς των ερυθρών σταφυλών κατά τον περκασμό. Στην αρχή το ποσοστό της είναι αρκετά υψηλό και η συγκέντρωσή της αυξάνεται, αλλά στη συνέχεια μειώνεται τάχιστα, διότι η ασταθής αυτή ανθοκυάνη μετασχηματίζεται υπό την επίδραση δύο ενζύμων μίας φλαβονο-3' υδροξυλάσης (FH) και ενός ενζύμου που καταλύει τις μεθοξυλίώσεις (MT), αφενός σε δελφινιδίνη (με υδροξυλίωση), και αφετέρου σε παιονιδίνη (με μεθυλίωση).

Την ίδια περίοδο, η συγκέντρωση της δελφινιδίνης αυξάνεται πολύ περισσότερο από αυτή της κυανιδίνης, αφού σχηματίζεται από αυτήν. Όμως η δελφινιδίνη που είναι και αυτή ασταθής λόγω των -OH σε ο-θέση, μετασχηματίζεται

σε πετουνιδίνη και ως εκ τούτου το ποσοστό της μειώνεται. Αλλά και η πετουνιδίνη έχει δύο –OH σε ο-θέση. Παρόλο που είναι σταθερότερη από την κυανιδίνη και τη δελφινιδίνη, το ποσοστό της εξαρτάται από το μετασχηματισμό της σε μαλβιδίνη, η οποία συνεχώς συσσωρεύεται και αντιπροσωπεύει την κύρια ανθοκυάνη σχεδόν σε όλες τις ποικιλίες αμπέλου.

Με βάση αυτή τη σχηματική παρουσίαση της βιοσύνθεσης των ανθοκυανών, ο Roggero κατατάσσει τις ανθοκυάνες:

- σε ασταθείς και ακολούθως μετασχηματιζόμενες (κυανιδίνη, δελφινιδίνη),
- σε ενδιάμεσες, που σχηματίζονται και μετασχηματίζονται (πετουνιδίνη),
- σε σταθερές και τελικές στην αλυσίδα των μετασχηματισμών (παιονιδίνη, μαλβιδίνη).



Σχήμα 3 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων σχηματισμού και μετασχηματισμού ανθοκυανών στα σταφύλια.

Τέλος, υποστηρίζει ότι: σε περίπτωση που το φυτό δεν εξασφαλίζει στα σταφύλια επαρκή ενζυματική δραστικότητα, τότε το ποσοστό του μονογλυκοζιτη-3 της κυανιδίνης και της δελφινιδίνης παραμένει σε υψηλά επίπεδα, διότι δεν καταλύεται επαρκώς ο μετασχηματισμός τους προς σταθερότερες ανθοκυάνες. Αυτό σημαίνει ότι παραμένουν στα σταφύλια ανθοκυάνες ασταθείς, εκτεθειμένες στη δράση των φαινολοξειδασών, με συνέπεια ακόμη και εάν η συνολική ποσότητα ανθοκυανών είναι υψηλή, το χρώμα να είναι ασταθές.

Μία απότομη μείωση αυτών των ανθοκυανών περί το μέσον της πορείας ωρίμασης, δεν σημαίνει πια, σύμφωνα με αυτήν την άποψη, ότι μετασχηματίζονται, αλλά ότι καταστρέφονται υπό την επίδραση οξειδασών.

### **2.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών**

Εκτός από το χαρακτηριστικό ανθοκυανικό προφίλ που έχει κάθε ποικιλία και τη μέγιστη συγκέντρωση ανθοκυανών που μπορεί να δώσει (ανθοκυανικό δυναμικό), υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των ανθοκυανών σε μια συγκεκριμένη ποικιλία. Οι παράγοντες αυτοί ομαδοποιούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες και οι καλλιεργητικές τεχνικές.

Εδαφοκλιματικές συνθήκες

#### ➤ Έδαφος

Στη 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 (Σταυρακάκης Μ. Ν., 2013).

#### ➤ Υψόμετρο

Από το υψόμετρο προσδιορίζονται οι θερμικές δυνατότητες του κλίματος μιας περιοχής. Η επίδραση του υψόμετρου είναι ευνοϊκή στις μεσημβρινές περιοχές ενώ δυσμενής στις περιοχές που βρίσκονται κοντά στο βόρειο όριο καλλιέργειας της

αμπέλου (Downey, 2006).

➤ Θερμοκρασία

Είναι δύσκολο να προσδιοριστούν ξεχωριστά οι επιδράσεις της θερμοκρασίας και της ηλιακής ενέργειας στη συσσώρευση των ανθοκυανών αφού είναι προφανής η αλληλοσυσχέτιση αυτών των δύο παραγόντων, φαίνεται όμως από μελέτες, ότι η θερμοκρασία ίσως παίζει το σημαντικότερο ρόλο στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για την σύνθεση των ανθοκυανών κυμαίνεται από 17°C εως 26°C.

Γενικά εως σήμερα, από ερευνητικά δεδομένα προκύπτει ότι πολύ υψηλές και πολύ χαμηλές θερμοκρασίες αναστέλλουν την παραγωγή χρωστικών ουσιών. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι χαμηλές νυκτερινές θερμοκρασίες (15-20°C) συμβάλλουν περισσότερο στον χρωματισμό των σταφυλιών (Jackson & Lombard, 1993).

➤ Ηλιακή Ακτινοβολία

Σε πληθώρα ερευνητικών εργασιών εξετάζεται η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Οι Cortell and Kennedy (2006) παρατήρησαν ότι στους βότρυες με σκίαση η συγκέντρωση των ανθοκυανών ήταν περίπου 30% λιγότερη απ' αυτή των μη σκιαζόμενων. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση στην ίδια εργασία είναι ότι ο μονογλυκοζίτης-3 της παιονιδίνης είχε αντίθετη συμπεριφορά από τις υπόλοιπες ανθοκυάνες και στις σκιαζόμενες ράγες η συγκέντρωσή του ήταν διπλάσια.

Επίσης από την ερευνητική μελέτη των Dokoozlian and Kliewer (1996) για τις ποικιλίες Cabernet Sauvignon και Pinot noir, φαίνεται ότι η έκθεση των ραγών σε ηλιακή ακτινοβολία στα στάδια I και II της αναπτυξής τους είναι απαραίτητη για την μέγιστη παραγωγή χρωστικών. Αν και η βιοσύνθεσή τους ξεκινά στο στάδιο III της ανάπτυξης των ραγών, όταν οι ράγες εκτίθενται από το πρώτο στάδιο μέχρι και το τελευταίο παρατηρείται η μέγιστη συσσώρευση ανθοκυανών. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση ή η δραστηριότητα ενός ή μερικών ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των ανθοκυανών.

## Καλλιεργητικές τεχνικές

### ➤ Κλάδεμα

Ξεκινώντας από το σύστημα μόρφωσης, το σχήμα που δίνεται στα πρέμνα, αξιοποιεί κατά το καλύτερο δυνατό τρόπο κάποια φυσικά χαρακτηριστικά του φυλλώματος (γεωμετρικό σχήμα, ύψος και κατεύθυνση), τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τη δημιουργία επιθυμητού μικροκλίματος εντός του φυλλώματος και στο επίπεδο των ραγών (Σταυρακάκης Μ. , Αμπελουργία, 2013). Τα νεότερα σχήματα μόρφωσης όπου το φυλλικό τοίχος είναι διαιρούμενο (π.χ Geneva Double Curtain, Lyre) σχεδιάστηκαν για τη βελτίωση του μικροκλίματος και σε περιπτώσεις ερυθρών ποικιλιών παρατηρήθηκε αύξηση των ανθοκυανών (Jackson R. , 2008).

Επίσης με το κατάλληλο χειμερινό κλάδεμα καρποφορίας επιτυγχάνεται η ισορροπία βλάστησης προς καρποφορίας με αποτέλεσμα την παραγωγή αμπελουργικού προϊόντος ποιότητας. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις πολύ ζυερών ποικιλιών – ανάλογα και το υποκείμενο- με την σωστή επιλογή χειμερινού κλαδέματος (μόρφωσης και καρποφορίας) μειώνεται εως ένα όριο η ζυερότητα των πρέμνων ώστε να μην αποβαίνει σε βάρος της ποιότητας του φορτίου και γενικά στην ευρωστία του.

Γενικά με τα χλωρά κλαδέματα (κορυφολόγημα, βλαστολόγημα, ξεφύλλισμα και αραίωμα φορτίου, χαραγή) επιδιώκεται η βελτιστοποίηση της παραγωγής ποιοτικά. Πιο συγκεκριμένα, το ξεφύλλισμα αποσκοπεί κυρίως στη βελτίωση των χαρακτήρων ποιότητας των ραγών και ιδιαιτέρως του χρώματος τους, αφού η εφαρμογή του συμβάλλει στην καλύτερη έκθεση των ραγών στο φως.

### ➤ Εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών.

Σε πολλές εργασίες μελετάται η επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών όπως αμπισικό οξύ, αιθυλένιο, κυτοκινίνες, γιββερελλίνες και αυξίνες στη βιοσύνθεση των φαινολικών συστατικών. Σε πρέμνα της ποικιλίας Cabernet Sauvignon το αμπισικό οξύ αύξησε τη συγκέντρωση των ανθοκυανών, ενώ η εφαρμογή γιββερελλινών (GA3) σε ράγες φαίνεται να μειώνει την περιεκτικότητά τους. Επίσης οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες γενικά στα φυτά έχουν θετική επίδραση στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών και η εξωγενής εφαρμογή αιθυλενίου ενίσχυσε το χρώμα στους φλοιούς ραγών (Downey, 2006).



### ➤ Λίπανση

Με τη λίπανση εμπλουτίζουμε το έδαφος με θρεπτικά στοιχεία απαραίτητα για την ανάπτυξη και παραγωγή των πρέμνων. Η υπερβολική λίπανση με άζωτο N και κάλιο K θα οδηγήσει σε μειωμένη συγκέντρωση 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 & Lombard, 1993).

### ➤ Άρδευση

Ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν ότι υδατικό έλλειμμα αυξάνει στις ράγες την περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες (Downey, 2006). Κυρίως η επίδραση της έλλειψης νερού επιδρά στο μέγεθος των ραγών –μείωση- και έτσι αλλάζει η αναλογία βάρους φλοιού της ράγας προς ολικό βάρος ράγας με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα των ανθοκυανών και ταννινών στις ράγες. Το πολύπλοκο με τις επεμβάσεις υδατικού στρες είναι ότι κύριες λειτουργίες του πρέμνου όπως και κάθε φυτού είναι αδύνατες χωρίς την απαραίτητη ποσότητα νερού. Έτσι το πρέμνο αντιδρώντας στην έλλειψη νερού μειώνει την φωτοσυνθετική δραστηριότητα κλείνοντας τα στομάτια, με συνέπεια πιθανόν την μείωση της συσσώρευσης των μεταβολιτών (υδατάνθρακες) και τέλος την μειωμένη ανάπτυξη των βλαστών και του ριζικού συστήματος.

## 2.3 Αραίωμα Φορτίου

Το αραίωμα του φορτίου αφορά κυρίως την αφαίρεση ολόκληρων ταξιανθιών ή σταφυλών μετά την καρπόδεση. Βασικοί στόχοι αυτού του χλωρού κλαδέματος είναι η επίτευξη της ισορροπίας μεταξύ βλάστησης και καρποφορίας, ώστε να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή ποιοτικά και ποσοτικά, χωρίς να εξασθενίσουν τα πρέμνα.

Η εργασία αυτή γίνεται χειρωνακτικά, είναι ταχεία και ανάλογα με την ποικιλία και τις λοιπές συνθήκες είναι δυνατή η αύξηση του βάρους των σταφυλών κατά περίπου 70-80%, ενώ σημαντικά αυξάνει και το μήκος του βοστρύχου.

Το αραίωμα εφαρμόζεται κατά κύριο λόγο στις πολύ παραγωγικές ποικιλίες οινοποιίας, οι σταφυλές των οποίων προορίζονται για την παραγωγή οίνων ΠΟΠ με τον περιορισμό του φορτίου στο επιτρεπόμενο όριο.

Συνήθως αμέσως μετά την καρπόδεση αφαιρείται το κατώτερο τμήμα της σταφυλής με τρόπο ώστε να παραμένουν αρκετές κύριες διακλαδώσεις του βοστρύχου, να μην αλλοιώνεται πολύ το σχήμα της σταφυλής και αυτή να μην καταστεί πυκνόραγη από την μεγάλη αύξηση των ραγών. Η αύξηση του μεγέθους των ραγών στις εγγίγαρτες ποικιλίες αμπέλου μπορεί να υπερβεί το 30%, σε αντίθεση με τις αγίγαρτες ποικιλίες, όπου το αραίωμα του φορτίου επιδρά μόνο στην πυκνότητα της σταφυλής. (Σταυρακάκης Μ. , Αμπελουργία, 2013)

## 2.4 Εκχύλιση ανθοκυανών

Οι ανθοκυάνες είναι γενικά πολύ διαλυτές στο νερό και μπορούν εύκολα να εξαχθούν με πολικούς διαλύτες. Οι πιο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη και η ακετόνη, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε καθαροί, είτε αναμεμειγμένοι με νερό. Η εκχύλιση των ανθοκυανών επιτυγχάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες με οξινισμένη μεθανόλη. Η χρησιμοποίηση οξέος διατηρεί την ανθοκυάνη στην πιο σταθερή μορφή φλαβιλίου αλλά μπορεί να προκαλέσει αποικοδόμηση της ακυλιωμένης ανθοκυανίνης. Η χρησιμοποίηση 1% HCl σε μεθανόλη μπορεί να προκαλέσει μερική υδρόλυση των ακυλιωμένων ανθοκυανών, ενώ η χρησιμοποίηση 0,1% HCl σε MeOH δεν προκαλεί αποικοδόμηση (Andersen, 2005).

## 2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού ανθοκυανών

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση κάθε μίας από τις ανθοκυάνες δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί παρά μόνο από το 1948 και μετά, χάρις στη μέθοδο της χρωματογραφίας επί χάρτου, που εφαρμόστηκε για τη μελέτη των ουσιών αυτών από τον Bate Smith (Bate-Smith, 1948) και επέτρεψε το διαχωρισμό και τη διαφοροποίηση των πολύπλοκων αυτών ενώσεων με την τόσο συγγενική δομή.

Ακολούθησαν εργασίες που βασιζόταν στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και αργότερα η χρήση της απλής υγρής χρωματογραφίας (LC) επέτρεψε τον προσδιορισμό των ανθοκυανών που βρίσκονταν σε μεγαλύτερες ποσότητες.

Αν και όλες αυτές οι τεχνικές είναι πολύ χρήσιμες οι περισσότερες απαιτούν πολύ χρόνο για να ολοκληρωθούν, είναι δαπανηρές και δεν είναι άμεσα διαθέσιμες. Η ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού φωτός (UV-vis) ή ακόμη πιο πρόσφατα με φασματοφωτόμετρα διπλής σάρωσης (DAD), επέτρεψε έναν πιο γρήγορο, ευαίσθητο και αξιόπιστο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ανθοκυανών στις σταφυλές και άνοιξε νέους δρόμους για την πληρέστερη μελέτη τους (Oszimianski, 1988).

### **2.5.1 Χρωματογραφία χάρτου (PC)**

Σχεδόν όλη η πρωτοποριακή εργασία στον τομέα της αναγνώρισης των ανθοκυανών έχει πραγματοποιηθεί με χρωματογραφία χάρτου. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο διαχωρισμό των ενώσεων μεταξύ μιας ακίνητης (χαρτί χρωματογραφίας) και μιας κινητής φάσης (διαλύτης διαχωρισμού) ανάλογα με τη διαλυτότητα τους. Όταν το χαρτί χρωματογραφίας τοποθετείται σε έναν διαλύτη διαχωρισμού, μέσα σε έναν θάλαμο χρωματογραφίας (θάλαμος ανάπτυξης), ο διαλύτης κινείται με τριχοειδή ροή μέσω των πόρων του χαρτιού και βαθμιαία προχωράει πάνω σε αυτό συμπαρασύροντας τις ανθοκυάνες του οίνου. Δεδομένου ότι κάθε ανθοκυάνη έχει διαφορετική σχέση – δέσμευση με το χαρτί και το διαλύτη, οι διαφορετικές ανθοκυάνες του οίνου διανύουν διαφορετικές αποστάσεις από την αφετηρία και έτσι διαχωρίζονται (Κοτσερίδης κ. α., 2015). Η βιβλιογραφία είναι γεμάτη με πληροφορίες σχετικά με συστήματα διαλυτών και τιμές συντελεστών κατακράτησης (Rf) για τις περισσότερες γνωστές ανθοκυανίνες.

### **2.5.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)**

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υπήρξε μια εναλλακτική λύση συγκριτικά με τη χάρτου. Είναι σε γενικές γραμμές παρόμοια με την PC με τη διαφορά ότι αντί

του χρωματογραφικού χαρτιού, σαν ακίνητη φάση χρησιμοποιείται κάποιο προσροφητικό υλικό, όπως ενώσεις του πυριτίου (silica), το οποίο επιστρώνεται με κατάλληλο τρόπο επάνω σε γυαλί ή φύλλο πλαστικού ή αλουμινίου. Δεδομένου ότι κάθε ανθοκυάνη έχει διαφορετική σχέση – συγγένεια με το προσροφητικό υλικό και το διαλύτη, οι διαφορετικές ανθοκυάνες του οίνου διανύουν διαφορετικές αποστάσεις από την αφετηρία και έτσι διαχωρίζονται. Σε σχέση με τη χρωματογραφία χάρτου, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιεί μικρότερη ποσότητα διαλύτη και παρέχει γρηγορότερο διαχωρισμό (Κοτσερίδης κ. α., 2015). Δυστυχώς οι τιμές Rf δεν είναι τόσο αξιόπιστες στην TLC όσο στην PC λόγω των διαφορών στο πάχος της στιβάδας από πλάκα σε πλάκα. Στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτούνται ενώσεις αναφοράς για την επιβεβαίωση της ταυτότητας.

Η χρωματογραφία επί χάρτου είναι απίθανο να αντικατασταθεί εξολοκλήρου από τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Lee & Hong, 1992).

### 2.5.3 Ηλεκτροφόρηση

Η τεχνική αυτή έχει περιορισμένη εφαρμογή στον τομέα της απομόνωσης και του διαχωρισμού των φλαβονοιδών. Οι ανθοκυάνες έχουν ιονική φύση, δηλαδή εξαρτώνται από το pH και επομένως αναμένεται να είναι κινητές σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ωστόσο, η ηλεκτροφόρηση δε χρησιμοποιείται στον τομέα του διαχωρισμού των ανθοκυανών καθώς προσφέρει λίγο ή και καθόλου πλεονέκτημα σε σχέση με τη χρωματογραφία χάρτου. Σε όξινο ρυθμιστικό διάλυμα οι ανθοκυάνες δεν μετακινούνται πολύ. Ο ιονισμός των ανθοκυανών με αλκάλια προκαλεί οξειδωτική αποσύνθεση με τον αέρα. Επιτυχημένα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την ηλεκτροφόρηση σε χαρτί χρησιμοποιώντας ως ηλεκτρολύτη 0,1 M κιτρικό οξύ σε pH 2 (Lee & Hong, 1992).

### 2.5.4 Ανοιχτή χρωματογραφία στήλης

Στην αναζήτηση μεθόδων για διαχωρισμό μεγαλύτερης κλίμακας και για ποσοτικοποίηση της κάθε ανθοκυανίνης έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι χρωματογραφίας στήλης. Ένας μεγάλος αριθμός πληρωτικών υλικών στήλης έχει δοκιμαστεί χωρίς επιτυχία, συμπεριλαμβανομένου του οξειδίου του αλουμινίου,

σκόνη κυτταρίνης, ρητίνες ανταλλαγής ιόντων και Shefadex gel. Η μεγαλύτερη επιτυχία είχε επιτευχθεί με PVP (Lee & Hong, 1992).

### 2.5.5 Αέρια χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Όταν μια ουσία εισάγεται στον αέρια χρωματογραφία, εάν είναι δυνατόν ακαριαίως, αυτή εξαερώνεται (εάν δε βρίσκεται ήδη στην αέρια κατάσταση) και παρασυρόμενη από την κινητή φάση, φέρον αέριο, εισέρχεται με αυτή μέσα στη στήλη (Κούππαρη & Χατζηιωάννου, 2010).

Η ανάλυση των ανθοκυανών με αέρια χρωματογραφία δεν έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα λόγω της περιορισμένης πτητικότητας και της αστάθειας που παρουσιάζουν οι ανθοκυάνες. Είναι η δομή και οι ιδιότητες τους που κάνουν δύσκολο το διαχωρισμό τους (Harborne & Mabry, 1982). Σε περιπτώσεις μη πτητικών ουσιών, αυτές μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με κατάλληλα αντιδραστήρια (Χατζηιωάννου, 2010). Όμως η παραγοντοποίηση των ανθοκυανών για την αέρια χρωματογραφία είναι δύσκολη εξαιτίας των αλλαγών που συμβαίνουν στη δομή αυτών των χρωστικών. Πιο συγκεκριμένα σε pH 0,5-1 τα διαλύματα των ανθοκυανών παίρνουν ένα πιο έντονα κόκκινο χρώμα (φλαβύλιο), ενώ όσο αυξάνεται το pH το κόκκινο χρώμα εξασθενεί σε σημείο που γίνονται άχρωμες. Σε pH 7 οι ανθοκυάνες υφίστανται σχάση δεσμού και παράγονται οι χαλκόνες. Έτσι κάτω από τις συνθήκες που είναι κατάλληλες για την παραγοντοποίηση, υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές μορφές αυτών των χρωστικών (Harborne & Mabry, 1982).

### 2.5.6 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό των φλαβονοειδών, λόγω των συνεχόμενων βελτιώσεων στην οργανολογία, στα υλικά συσκευασίας και της στήλης (Andersen, 2006).

Η τεχνική αυτή είναι η βάση της τεχνικής διαχωρισμού στην ανάλυση τροφίμων, ειδικά για υδατοδιαλυτές, μη πτητικές, θερμικά ασταθείς ανθοκυανίνες. Ο διαχωρισμός των ανθοκυανών με την HPLC στηρίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση των ουσιών σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις, μια στατική και μια κινητή.

Μια τυπική διάταξη HPLC περιλαμβάνει:

- Φιάλες κινητής φάσης
- Αντλία υψηλής πίεσης
- Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος
- Χρωματογραφική στήλη
- Σύστημα ανίχνευσης
- Σύστημα συλλογής και καταγραφής των αποτελεσμάτων

Το δείγμα εισάγεται κάθε φορά από τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος. Στις φιάλες αποθήκευσης βρίσκονται οι διαλύτες (κινητή φάση) που χρησιμοποιούνται κάθε φορά για τη έκλυση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η κινητή φάση προωθείται με τη βοήθεια αντλίας υψηλής πίεσης στη χρωματογραφική στήλη, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ουσιών. Η αντλία είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα της παροχής της κινητής φάσης (ταχύτητα ροής). Με την αντλία μπορεί να συνδυαστεί σύστημα βαθμωτής έκλυσης, όπου αλλάζει βαθμιαία η σύσταση της κινητής φάσης ή σύστημα ισοκρατικής έκλυσης κατά το οποίο η σύσταση της κινητής φάσης είναι σταθερή. Οι ουσίες μετά την έκλουσή τους από τη στήλη της υγρής χρωματογραφίας οδηγούνται σε ένα σύστημα ανίχνευσης. Το σύστημα που δίνουν στον ανιχνευτή οι προσδιοριζόμενες ουσίες καταγράφεται από ένα σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων και λαμβάνεται τελικά το χρωματογράφημα.

Από τα εξαρτήματα των διατάξεων της HPLC που προαναφέρθηκαν, σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του διαχωρισμού παίζει η χρωματογραφική στήλη. Πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας, ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η χρωματογραφική στήλη αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης. Ο εξωτερικός κύλινδρος μπορεί να είναι κατασκευασμένος

από μέταλλο, ανοξειδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές (Snyder & Dolan, 1998). Το υλικό πλήρωσης (στατική φάση) βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που θα διαχωριστούν.

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας διαχωρίζονται ανάλογα με το υπόστρωμα τους και διακρίνονται σε :

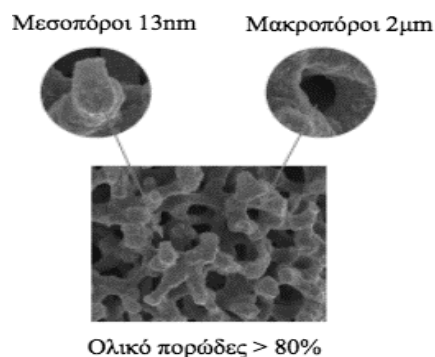
➤ Συμβατικές

Η χρησιμοποίηση αυτών των στηλών είναι η πιο κοινή μέθοδος για το διαχωρισμό των ανθοκυανών. Αυτές οι στήλες είναι πακεταρισμένες με σφαιρικά σωματίδια silica τα οποία συνδέονται με άτομα άνθρακα (C18). Το μειονέκτημα αυτών των στηλών είναι ότι συνήθως η χρωματογραφική ανάλυση είναι χρονοβόρα και μερικές φορές η εξισορρόπηση της στήλης απαιτεί χρόνο (Benedicte et al, 2013).

➤ Μονολιθικές

Οι μονόλιθοι είναι ένας νέος τύπος στατικής φάσης και πλεονεκτούν έναντι των συμβατικών στηλών λόγω των ιδιοτήτων τους. Αυτή η στήλη φτιάχνεται από ένα μόνο κομμάτι πολυμερούς silica, υψηλής καθαρότητας και δεν είναι πληρωμένη με μικρά σωματίδια (silica). Αυτή η νέα τεχνολογία επιτυγχάνει μεγάλες ταχύτητες ροής της κινητής φάσης σε σχέση με τις συμβατικές στήλες, χωρίς να αναπτύσσονται υψηλές πιέσεις, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο ανάλυσης (Jandera, 2005). Έτσι μπορούν να διαχωριστούν μεγάλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες με υψηλές ταχύτητες σε μικρό χρόνο (Frantisek & Yongqin , 2015).

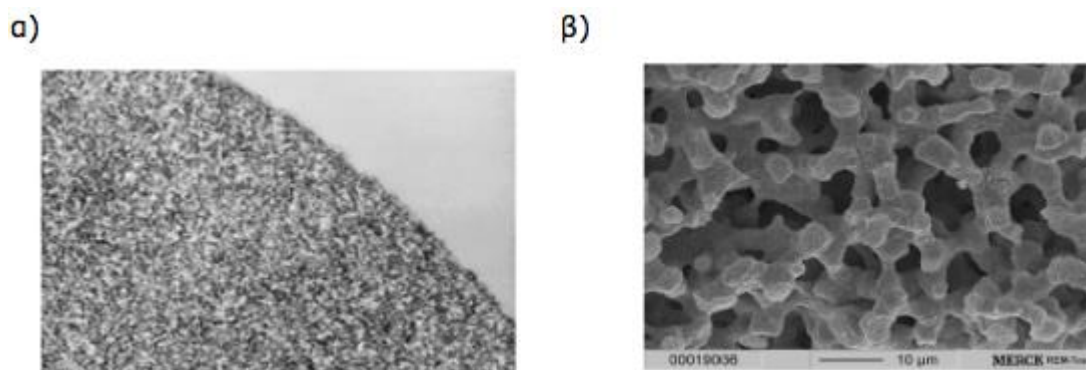
Διαθέτουν διπλή δομή των πόρων. Πιο συγκεκριμένα, οι μακροπόροι (2 $\mu$ m) ελαττώνουν δραστικά την πίεση της στήλης και επιτρέπουν τη χρήση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής της κινητής φάσης, μειώνοντας έτσι σημαντικά το χρόνο ανάλυσης ενώ οι μεσοπόροι σχηματίζουν μια λεπτή πορώδη δομή (μέσο μέγεθος πόρων 13 nm) και δημιουργούν το μεγάλο ομοιόμορφο εμβαδόν επιφάνειας στο οποίο λαμβάνει χώρα η απορρόφηση



**Σχήμα 3** Διπλή δομή πόρων μιας μονολιθικής στήλης.

επιτρέποντας έτσι τον υψηλής ποιότητας χρωματογραφικό διαχωρισμό (Σχήμα 3).

Το σχήμα 4 δείχνει εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) του υλικού πλήρωσης μιας συμβατικής και μίας μονολιθικής στήλης (Hsieh et al,2003), (Lesins & Ruckenstein, 1989).



Σχήμα 4 Εικόνες SEM του υλικού πλήρωσης α) μιας συμβατικής και β) μιας μονολιθικής στήλης.

Τα περισσότερα ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά πλήρωσης των συμβατικών στηλών της HPLC είναι:

- Ανόργανα οξείδια και ιδιαίτερα διοξείδιο του πυριτίου (silica gel)
- Οργανικά πολυμερή
- Γραφίτικός άνθρακας
- Ορυκτά φωσφορικού ασβεστίου
- Διάφοροι πολυσακχαρίτες

Η πορώδης πηκτή (gel) του διοξειδίου του πυριτίου αποτελεί το σημαντικότερο υλικό που χρησιμοποιείται ως στατική φάση διότι έχει χαμηλότερο κόστος και δεν καταστρέφεται εύκολα

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας μπορούν να διαχωριστούν και ως προς τη διάμετρο τους. Έτσι διακρίνονται σε στήλες μεγάλης διαμέτρου, σε μικροστήλες, σε νανοδιαμετρικές, σε τριχοειδείς και στήλες τόσο μικρής διαμέτρου, όσο το μέγεθος ενός chip (Jandera, 2005).

Μια τυπική αναλυτική στήλη έχει μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και είναι πληρωμένη με σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 3,5 μm (Hsieh, 2003).



Η HPLC ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται σε κανονικής και ανεστραμμένης φάσης. Στην κανονική φάση (normal phase) η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση είναι μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλούνται τελευταίες από τη στήλη. Με αύξηση της πολικότητας του διαλύτη, ελαττώνεται ο χρόνος κατακράτησης των συστατικών. Μεγαλύτερη επιτυχία στον διαχωρισμό των ανθοκυανών και ανθοκυανιδών παρουσιάζει η αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφία (RP-HPLC) στην οποία παρατηρείται μεγαλύτερη πολικότητα της κινητής φάσης σε σχέση με τη στατική φάση, η οποία θεωρητικά θα πρέπει να συμπεριφέρεται σαν μια ιδανική μη πολική στατική φάση (Jandera, 2005), (Jandera & Churasek, 1985).

Υπάρχουν διάφοροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συχνά στην HPLC αλλά αυτός που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη είναι ο ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους, ο οποίος είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος, λόγω του γεγονότος ότι οι περισσότερες οργανικές ενώσεις απορροφούν στην περιοχή UV του φάσματος (Jandera & Churasek, 1985). Αυτοί οι ανιχνευτές μετρούν την απορρόφηση της ακτινοβολίας μιας χημικής ένωσης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η απόκριση του ανιχνευτή εξαρτάται από το πόσο ισχυρά απορροφά το δείγμα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, καθώς και πόσο απορροφά η κινητή φάση που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό.

## 3. Πειραματικό μέρος

### 3.1 Υλικά

#### 3.1.1 Δείγματα

Μελετήθηκε μία ποικιλία, το Αγιωργίτικο, που ανήκει στο γένος *Vitis Vinifera*. Στον πίνακα 1, παρατίθενται ορισμένα στοιχεία για την ποικιλία αυτή, όπως οι περιοχές στις οποίες ευδοκμεί καθώς και τα συνώνυμα με τα οποία απαντάται συνήθως (Σταυρακάκης Μ. , Αμπελογραφία, 2010).

Τα σταφύλια συλλέχθηκαν από τον αμπελώνα που βρίσκεται εντός της αμπελουργικής ζώνης ΠΟΠ Νεμέα.

Έγιναν συνολικά τρεις δειγματοληψίες, 17/8/17, 31/8/17, 16/9/17, οι οποίες προέρχονταν από τον ίδιο αμπελώνα συνεπώς ίσχυαν οι ίδιες κλιματολογικές συνθήκες.

Σε 24 πρέμνα εφαρμόστηκε αραίωμα βοτρύων. Πιο συγκεκριμένα αφαιρέθηκε το 40% της παραγωγής, στην αρχή του περκασμού (04/08/2017). Στα υπόλοιπα 24 δεν έγινε καμία διεργασία (μάρτυρες).

Η δειγματοληψία εκτελούνταν την ίδια πάντα ώρα της ημέρας. Συλλέγονταν συνολικά για κάθε δείγμα 200 ράγες από όλα τα πρέμνα.

Καταβλήθηκε προσπάθεια ώστε οι ράγες να λαμβάνονται από διαφορετικές θέσεις του σταφυλιού και από σταφύλια που βρίσκονταν σε διάφορες θέσεις στα πρέμνα από πλευράς προσανατολισμού, ηλιοφάνειας, ύψους από το έδαφος και θέσης στην κληματίδα.

Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονταν γρήγορα στο εργαστήριο, ζυγίζονταν και καταψύχονταν για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών.

**Πίνακας 1** Ποικιλία σταφυλιού που μελετήθηκε, προέλευση, συνώνυμα και περιοχές καλλιέργειας. (Σταυρακάκης Μ. ).

Προέλευση	Ποικιλία	Συνώνυμα	Περιοχές καλλιέργειας
Ελληνική	Αγιωργίτικο	Μαύρο Νεμέας	Πελοπόννησος, Ν.Α Αττική, Πειραιώς, Ν. Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας, Εύβοιας

### 3.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπερκάθαρο από τη συσκευή Milli-Q, της Millipore. Η μεθανόλη και το μεθανικό οξύ ήταν καθαρότητας κατάλληλης για χρήση σε HPLC. Ως πρότυπη ουσία για το χρωματογραφικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε ο μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Malvidin-3-O-glucoside chloride).

### 3.1.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας της Shimadzu, εφοδιασμένο με

- Φιάλες κινητής φάσης
- Αντλία υψηλής πίεσης
- Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος
- Χρωματογραφική στήλη
- Φούρνο για τη στήλη
- Απαερωτή
- Ανιχνευτή ορατού υπεριώδους
- Σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες:

- Μονολιθική στήλη αντίστροφης φάσης (2μm, 4,6x25mm) της Merck (RP – 18e).
- Pinnacle II C18 (5μm, 4,6x250mm) της Restek.

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1. Κατεργασία δειγμάτων

Οι ράγες ζυγίζονται και οι φλοιοί διαχωρίζονται κατά το δυνατόν από τις ράγες χειρωνακτικά. Οι φλοιοί εκπλένονται με λίγο απιονισμένο νερό και ξηραίνονται μεταξύ φύλλων διηθητικού χαρτιού. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε πορώδες νάilon ύφασμα και καταψύχονται. Ακολουθεί λυοφυλίωση για 24 ώρες. Οι ξηροί φλοιοί αλέθονται σε εργαστηριακό μύλο και μετατρέπονται σε λεπτή σκόνη.

Η παραλαβή των ανθοκυανών από τη σκόνη φλοιών πραγματοποιείται με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε μεθανόλη (HCl 0,1%) κατά την εξής διαδικασία: από κάθε δείγμα ζυγίζονται 0,5 gr λυοφυλιωμένης σκόνης φλοιών, τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου με καπάκι και προστίθενται 20 ml υδροχλωρικού οξέος σε μεθανόλη. Το αιώρημα αναδεύεται σε shaker για 4 ώρες στους 20°C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 8000 rpm, στους 20°C. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απομακρύνεται, συλλέγεται σε κλειστό δοχείο και προστατεύεται από το φως.

Στο στερεό υπόλειμμα που παραμένει μετά την πρώτη φυγοκέντρωση προστίθενται 10 ml HCl σε MeOH και η εκχύλιση συνεχίζεται για ακόμα 18 ώρες στο shaker στις ίδιες συνθήκες. Το μείγμα φυγοκεντρείται ξανά για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ενώνεται με το προηγούμενο.

Στο στερεό υπόλειμμα που παραμένει μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση προστίθενται 10 ml HCl σε MeOH και η εκχύλιση συνεχίζεται για ακόμα 24 ώρες στο shaker στις ίδιες συνθήκες. Το μείγμα φυγοκεντρείται για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ενώνεται με τα προηγούμενα.

Ποσότητα του δείγματος φιλτράρεται από φίλτρο 0,2 μm πριν την εισαγωγή στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

### 3.2.2 Χρωματογραφική ανάλυση ανθοκυανών

Το δείγμα εισάγεται κάθε φορά από τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος. Στις φιάλες αποθήκευσης βρίσκονται οι διαλύτες (διαλύτης Α: 10% μεθανικό οξύ σε  $H_2O$ , διαλύτης Β: μεθανόλη) που χρησιμοποιούνται κάθε φορά και αποτελούν την κινητή φάση. Η κινητή φάση προωθείται στη χρωματογραφική στήλη με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ουσιών. Η σειρά έκλουσης των ανθοκυανών είναι ανάλογη με την πολικότητά τους. Έτσι τα πιο πολικά συστατικά εμφανίζονται πρώτα και τα λιγότερο πολικά τελευταία. Στην περίπτωση των ανθοκυανών η πολικότητα είναι ευθέως ανάλογη προς το βαθμό υδροξυλίωσης του πλευρικού δακτυλίου του μορίου τους. Οι ενώσεις γίνονται πιο πολικές καθώς ο αριθμός των  $-OH$  στον πλευρικό δακτύλιο αυξάνει και λιγότερο πολικές καθώς αυξάνει ο αριθμός των  $-OCH_3$ . Επομένως ο μονογλυκοζίτης-3 της δελφινιδίνης εμφανίζεται πρώτος και ακολουθούν οι μονογλυκοζίτες της κυανιδίνης, πετουνιδίνης, παιονιδίνης, και μαλβιδίνης. Με την ίδια σειρά έκλουσης εμφανίζονται και τα ακυλιωμένα παράγωγα των ενώσεων αυτών. Οι ουσίες μετά την έκλουση τους από τη στήλη οδηγούνται σε ένα σύστημα ανίχνευσης. Το σήμα που δίνουν στον ανιχνευτή οι προσδιοριζόμενες ουσίες καταγράφεται από ένα σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων και λαμβάνεται τελικά το χρωματογράφημα.

Στο δείγμα, πριν την έγχυση, γίνεται αραιώση 1:5 με μεθανόλη και διήθηση από φίλτρο 0,2  $\mu m$ . Ακολουθεί έγχυση του δείγματος (20  $\mu L$ ), σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας εφοδιασμένο με φωτομετρικό (UV-Vis) ανιχνευτή. Το μήκος κύματος που ανιχνεύεται η παρουσία των ανθοκυανών είναι τα 520 nm. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες. Αρχικά η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με τη στήλη Pinnacple II C18 (5  $\mu m$ , 4,6 x 250 mm) και ακολούθησε η ανάλυση με μονολιθική στήλη (4,6 x 25 mm) και το πρόγραμμα διαλυτών περιγράφεται στους Πίνακες 2 και 3 για την κάθε στήλη αντίστοιχα.

**Πίνακας 2** Πρόγραμμα διαλυτών για την ανάλυση ανθοκυανών με HPLC με τη στήλη Restek.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ροή (ml/min)
0.01	90	10	1
22.00	50	50	1
22.01	50	50	1
32.00	5	95	1
34.01	5	95	1
35.00	90	10	1

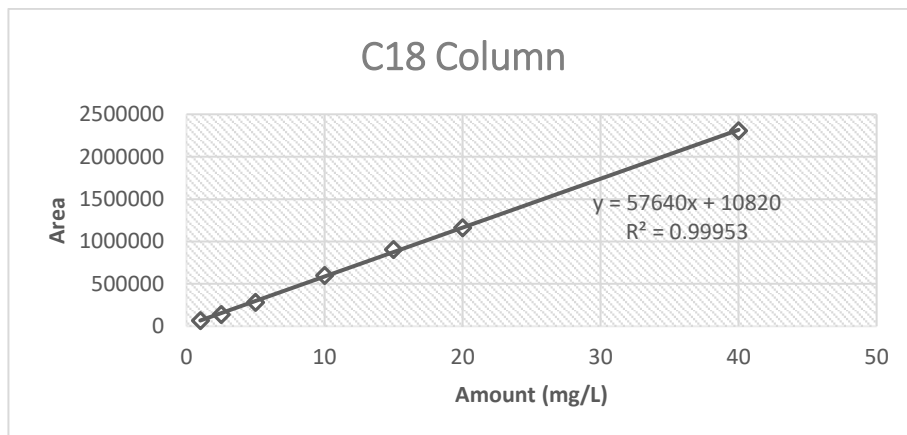
**Πίνακας 3** Πρόγραμμα διαλυτών για την ανάλυση ανθοκυανών με HPLC με τη μονολιθική στήλη.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ροή (ml/min)
0.01	90	10	1
8.00	90	10	1
8.01	90	10	1
9.00	5	95	1
12.01	5	95	1
12.02	90	10	1

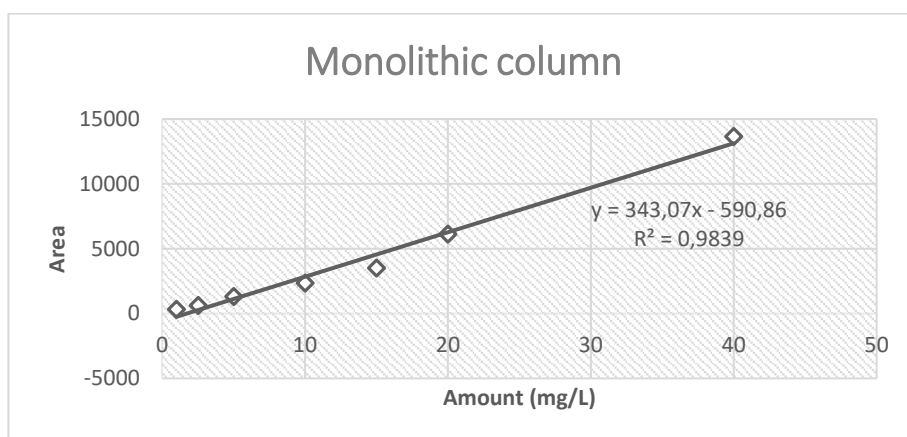
Η ταυτοποίηση των κορυφών στηρίζεται στη σύγκριση του χρόνου έκλουσης τους με την πρότυπη ουσία .

Η απουσία προτύπων των ανθοκυανών στο εμπόριο έχει ως συνέπεια η συγκέντρωση των ανθοκυανών να εκφράζεται σε ισοδύναμα μονογλυκοζίτη-3 της μαλβιδίνης (mg/l), που είναι ένα πρότυπο εμπορικά διαθέσιμο. Άρα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ανθοκυανών χρησιμοποιείται ως εξωτερικό πρότυπο ο μονογλυκοζίτης -3 της μαλβιδίνης για να παρασκευαστούν πρότυπα διαλύματα σε διάφορες συγκεντρώσεις . Έπειτα κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς και για τις δύο μεθόδους (Διάγραμμα 1, 2), όπου η συγκέντρωση της ουσίας είναι συνάρτηση του εμβαδού της κορυφής της. Από την καμπύλη αυτή και μετρώντας το εμβαδόν της κορυφής της άγνωστης ουσίας βρίσκεται η ποσότητα της στο δείγμα.

Από τις πρότυπες καμπύλες και λύνοντας την εξίσωση ως προς x εκφράζεται η κάθε μία από τις πέντε ανθοκυάνες ως ισοδύναμα μαλβιδίνης mg/L.



**Διάγραμμα 1** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού ανθοκυανών με τη μέθοδο HPLC με τη στήλη Restek.



**Διάγραμμα 2** Πρότυπη καμπύλη αναφοράς προσδιορισμού ανθοκυανών με τη μέθοδο HPLC με τη μονολιθική στήλη.

### 3.2.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (one – way ANOVA) με το λογισμικό πακέτο Microsoft Office Excel έχοντας ως παράγοντα την επέμβαση «αραίωμα», για να ελέγξουμε αν οι τιμές διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ή όχι.

Επίσης, υπολογίστηκε ο δείκτης γραμμικής συσχέτισης για να δούμε αν τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων συσχετίζονται γραμμικά.

## 4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

### 4.1 Ανάπτυξη Μεθόδου

Σκοπός τη μελέτης είναι η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταχύτερο προσδιορισμό των ανθοκυανών γλευκών και οίνων με τη χρήση μονολιθικών στηλών υγρής χρωματογραφίας. Παρακάτω φαίνονται τα προγράμματα έκλουσης και τα χρωματογραφήματα που καταγράφηκαν για κάθε μία μέθοδο. Οι δοκιμές έγιναν με στόχο να βρεθεί ένα πρόγραμμα έκλουσης το οποίο θα διαχωρίζει τις ανθοκυάνες. Επειδή οι εστέρες των ανθοκυανών δε μπόρεσαν να διαχωριστούν λόγω του μικρού μήκους της στήλης παρακάτω φαίνονται τα χρωματογραφήματα μόνο για τις πέντε ανθοκυάνες.

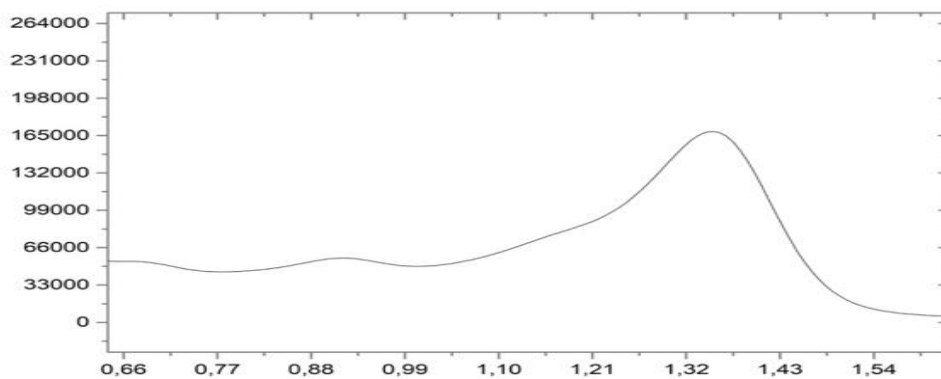
- Ο διαλύτης Α είναι σε όλες τις δοκιμές 10% μεθανικό οξύ σε H<sub>2</sub>O.
- Ο διαλύτης Β είναι σε όλες τις δοκιμές μεθανόλη.
- Η ανάλυση εκτελέστηκε με ρυθμό ροής 1 ml/min για τις δοκιμές 1-10 και ρυθμό ροής 2 ml/min για τις δοκιμές 11 και 12, με όγκο δείγματος 20 μl στα 520 nm για όλες τις δοκιμές.
- Το πρόγραμμα που επιλέχθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος περιγράφεται στη δοκιμή 10.

#### Δοκιμή 1

Πίνακας 4 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 1.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	80	20
15.00	5	95
15.01	80	20





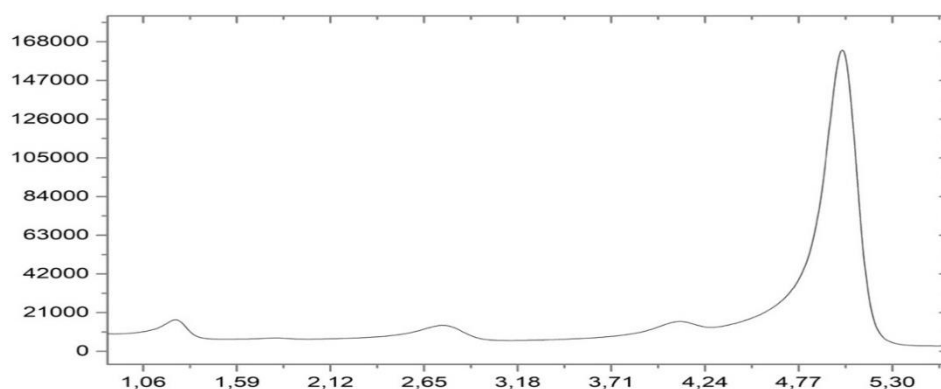
Διάγραμμα 3 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 1.

Απορρίπτεται η δοκιμή 1 (διάγραμμα 3) καθώς δε διαχωρίζονται οι ανθοκυάνες.

## Δοκιμή 2

Πίνακας 5 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 2.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	90	10
15.00	20	80
15.01	90	10



Διάγραμμα 4 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 2.

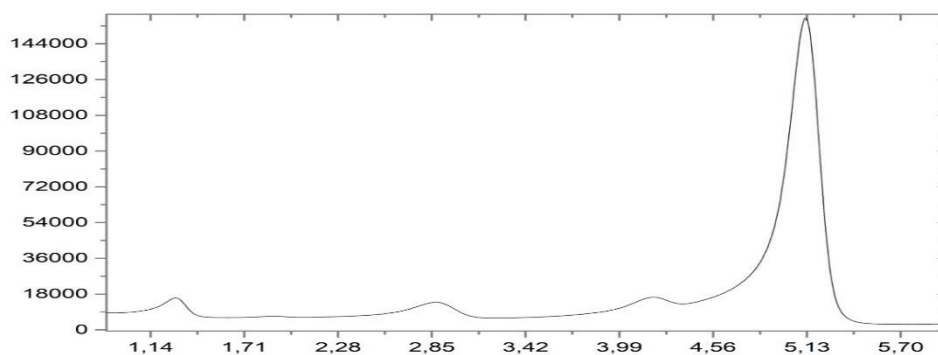
Απορρίπτεται η δοκιμή 2. Ο διαχωρισμός είναι καλός αλλά δε φαίνεται καλά η δεύτερη κορυφή (κυανιδίνη), γι'αυτό στην επόμενη προσπάθεια έγινε

αλλαγή του ποσοστού των διαλυτών για να δούμε μήπως μπορέσει να διαχωριστεί καλύτερα.

### Δοκιμή 3

Πίνακας 6 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 3.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	90	10
20.00	5	95
20.01	90	10



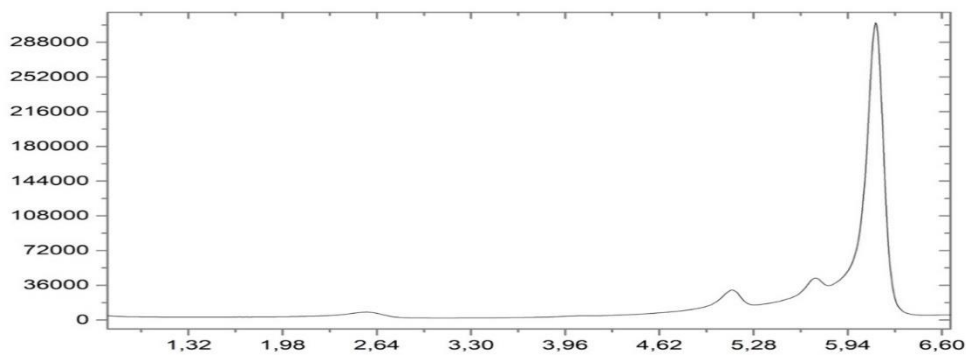
Διάγραμμα 5 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 3.

Στο διάγραμμα 5 παρατηρείται κακός διαχωρισμός καθώς η τέταρτη κορυφή (παιονιδίνη) δε διαχωρίζεται από την πέμπτη (μαλβιδίνη).

### Δοκιμή 4

Πίνακας 7 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 4.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	95	5
15.00	5	95
15.01	95	5



Διάγραμμα 6 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 4.

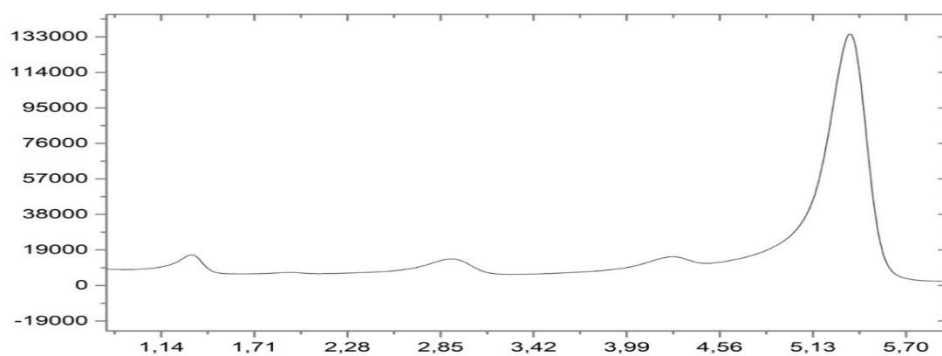
Απορρίπτεται η δοκιμή 4 λόγω ελλιπούς διαχωρισμού των ανθοκυανών.

### Δοκιμή 5

Πίνακας 8 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 5.

**Χρόνος(min) Διαλύτης A (%) Διαλύτης B (%)**

0.01	90	10
6.00	72	28
6.01	72	28
20.00	0	100
20.01	90	10



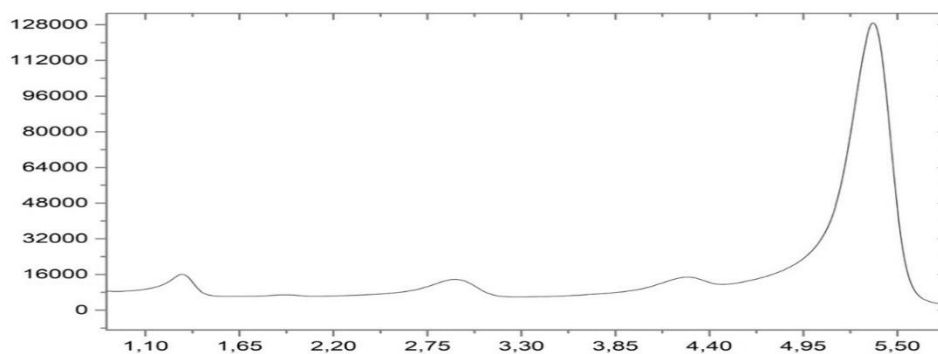
Διάγραμμα 7 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 5.

Στη δοκιμή 5 (διάγραμμα 7) η παιονιδίνη δε διαχωρίζεται από τη μαλβιδίνη.

## Δοκιμή 6

Πίνακας 9 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 6.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
0.01	90	10
6.00	72	28
6.01	72	28
8.00	5	95
10.01	5	95
10.02	90	10



Διάγραμμα 8 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 6.

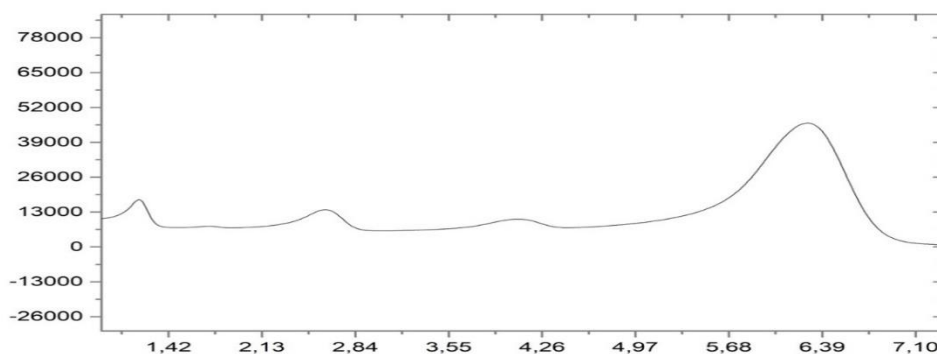
Στη δοκιμή 6 έγινε αλλαγή του διαλύτη A (μεθανικό οξύ σε νερό) για να εξεταστεί αν θα διαχωριστούν οι παιονιδίνη και μαλβιδίνη, που δε μπόρεσαν να διαχωριστούν στη δοκιμή 5, αλλά και πάλι ο διαχωρισμός δεν είναι καλός.

## Δοκιμή 7

Πίνακας 10 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 7.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
0.01	90	10
15.00	90	10
15.01	90	10
17.00	5	95
19.01	5	95

19.02	90	10
-------	----	----



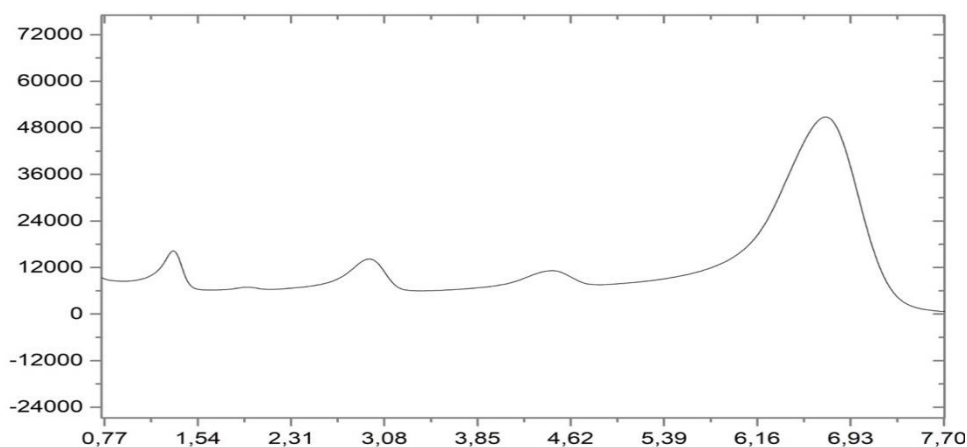
**Διάγραμμα 9** Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 7.

Στη δοκιμή 7 (διάγραμμα 9) έγινε αλλαγή της σύστασης των διαλυτών σε ισοκρατικό μίγμα. Ο διαχωρισμός της κυανιδίνης και της μαλβιδίνης δεν είναι καλός.

### Δοκιμή 8

**Πίνακας 11** Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 8.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	90	10
8.00	90	10
8.01	90	10
10.00	5	95
12.01	5	95
12.02	90	10



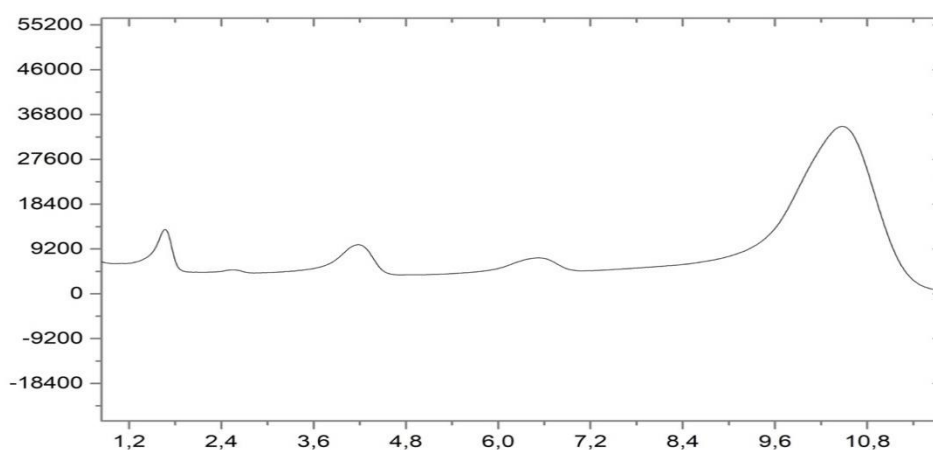
**Διάγραμμα 10** Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 8.

Στη δοκιμή 8 συνεχίζουμε με ισοκρατικό σύστημα έκλουσης, όπως στη δοκιμή 7, με τη διαφορά ότι έγινε μείωση του χρόνου. Ο διαχωρισμός είναι καλύτερος αλλά και πάλι δε διαχωρίζονται πολύ καλά οι παιονιδίνη και μαλβιδίνη.

### Δοκιμή 9

**Πίνακας 12** Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 9.

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)
0.01	90	8
10.00	90	8
10.01	90	8
12.00	5	95
14.01	5	95
14.02	90	8



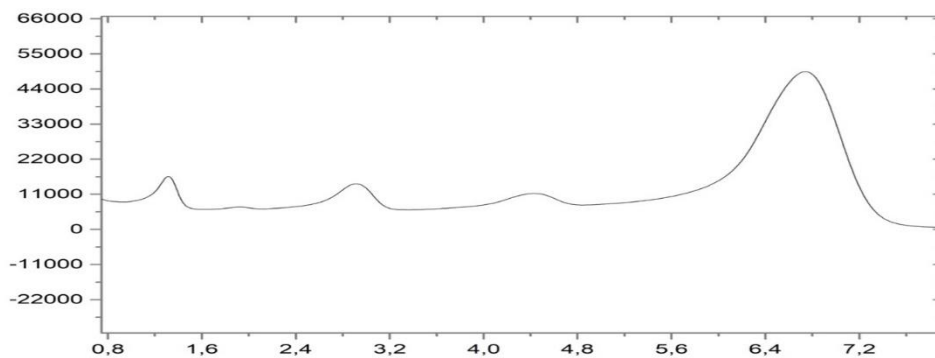
Διάγραμμα 11 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 9.

Στη δοκιμή 9 (διάγραμμα 11) έγινε αλλαγή στο χρόνο έκλουσης (κατά 2 λεπτά), σε σχέση με τη δοκιμή 8, για να γίνει ο διαχωρισμός της παιονιδίνης από τη μαλβιδίνη, αλλά προέκυψε μεγάλη απόσταση του χρόνου έκλουσης μεταξύ των 2.

### Δοκιμή 10

Πίνακας 13 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 10.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	90	10
8.00	90	10
8.01	90	10
10.00	5	95
12.01	5	95
12.02	90	10



Διάγραμμα 12 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 10.

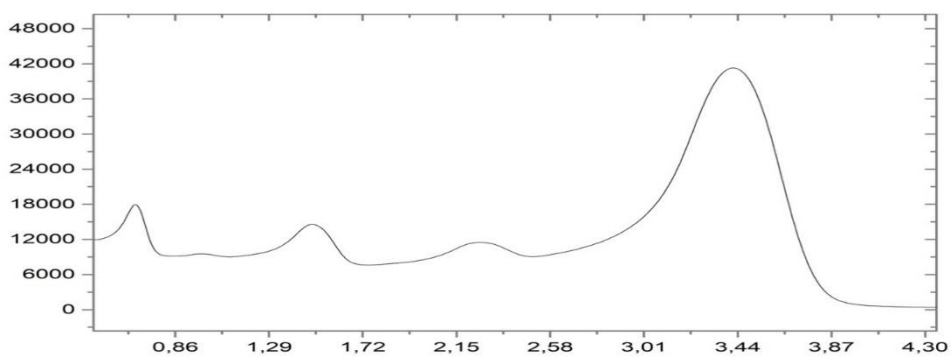
Στη δοκιμή 10 είναι καλός ο διαχωρισμός αλλά παρακάτω έχουν γίνει άλλες 2 προσπάθειες για να μειώσουμε ακόμη περισσότερο το χρόνο, με ταχύτητα ροής 2 ml/min.

### Δοκιμή 11

Πίνακας 14 Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 11.

**Χρόνος (min) Διαλύτης Α (%) Διαλύτης Β (%)**

0.01	90	10
5.00	90	10
5.01	90	10
6.00	5	95
9.01	5	95
9.02	90	10



Διάγραμμα 13 Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 11.

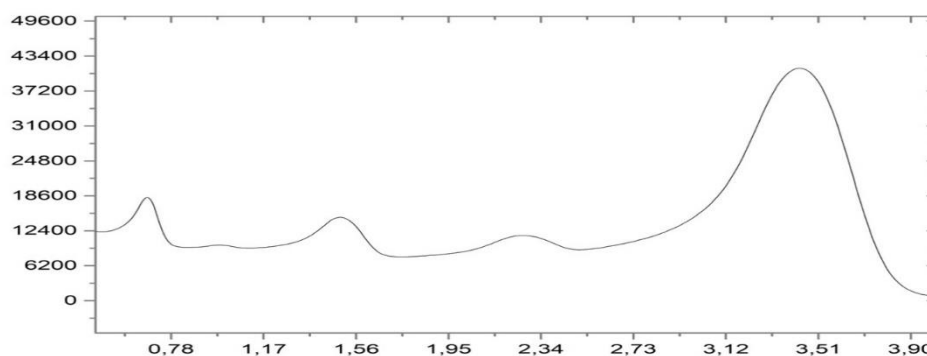


Στη δοκιμή 11 έγινε προσπάθεια να ελαττωθεί περισσότερο ο χρόνος έκλουσης των πέντε ανθοκυανών σε σχέση με τη δοκιμή 10 με αλλαγή στην ταχύτητα ροής, από 1 ml/min στα 2 ml/min. Αφού η μονολιθική στήλη είναι μικρή σε μήκος δεν υπάρχει κίνδυνος να αυξηθεί η πίεση. Γι'αυτό μειώσαμε το χρόνο από τα 8 λεπτά στα 5 λεπτά αλλά ο διαχωρισμός δεν ήταν καλός.

## Δοκιμή 12

*Πίνακας 15* Πρόγραμμα έκλουσης για τη δοκιμή 12.

Χρόνος (min)	Διαλύτης Α (%)	Διαλύτης Β (%)
0.01	90	10
4.00	90	10
4.01	90	10
5.00	5	95
8.01	5	95
8.02	90	10



*Διάγραμμα 14* Χρωματογράφημα για τη δοκιμή 12.

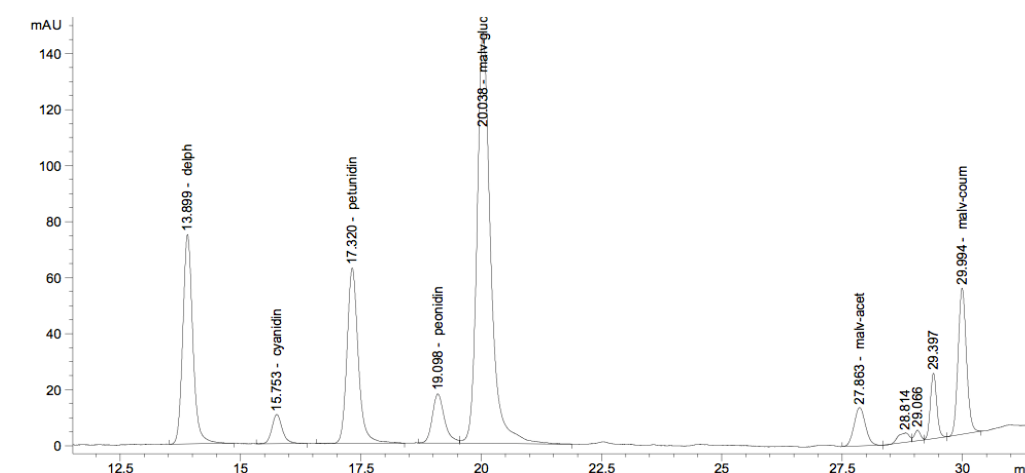
Στη δοκιμή 12 έγινε πάλι σύμφωνα με το πρόγραμμα διαλυτών της δοκιμής 10 αλλά χρησιμοποιήθηκε ταχύτητα ροής 2 ml/min και μειώσαμε ακόμη περισσότερο το χρόνο. Ο διαχωρισμός δεν είναι καλός.

Άρα τελικά χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα διαλυτών της δοκιμής 10 στην οποία διαχωρίστηκαν και οι πέντε ανθοκυάνες ταχύτερα σε σχέση με το πρόγραμμα διαλυτών που χρησιμοποιείται με πληρωμένη στήλη.

## 4.2 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων ανθοκυανών φλοιών με ανάλυση HPLC

Στο Διάγραμμα 15 δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα ανθοκυανών που εκχυλίστηκαν από φλοιούς σταφυλιών. Με την HPLC είναι εφικτός τόσο ο ποιοτικός, όσο και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανών. Στην παρούσα εργασία έγινε ο προσδιορισμός των μονογλυκοζιτών των ανθοκυανών, δηλαδή του μονογλυκοζίτη της δελφινιδίνης, της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και της μαλβιδίνης με 2 στήλες, μια πληρωμένη και μια μονολιθική.

Η πολικότητα των ανθοκυανών είναι ευθέως ανάλογη προς το βαθμό υδροξυλίωσης του πλευρικού δακτυλίου του μορίου τους. Επομένως, ο μονογλυκοζίτης 3 της δελφινιδίνης εμφανίζεται πρώτος και ακολουθούν οι μονογλυκοζίτες της κυανιδίνης, της πετουνιδίνης, της παιονιδίνης και στο τέλος ο λιγότερο πολικός, δηλαδή η μαλβιδίνη.



Διάγραμμα 15 Τυπικό χρωματογράφημα ανθοκυανών στα 520 nm.

Στους Πίνακες 16 και 17 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών όλων των δειγμάτων (n=18) και με τις δύο μεθόδους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έδειξε ότι η συνολική συγκέντρωση των χρωστικών (Πίνακας 18) που ανιχνεύτηκε στα 520 nm ποικίλλει και στις 2 μεθόδους (αναφοράς και πειραματική) με κύρια ανθοκυανή τον μονογλυκοζίτη 3 της μαλβιδίνης (μέση τιμή 155,17 mg/L και 155,42 mg/L αντίστοιχα), σε αντίθεση με το μονογλυκοζίτη – 3 της κυανιδίνης που είχε τη

μικρότερη συγκέντρωση (μέση τιμή 0,68 mg/L και 9,34 mg/L αντίστοιχα). Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που έγιναν σε διάφορες ποικιλίες (Πίνακας 19, Καλλίθρακα, 2005). Η κυρίαρχη ανθοκυάνη σύμφωνα με τον Πίνακα 19 είναι ο μονογλυκοζίτης-3 της μαλβιδίνης, η οποία αντιστοιχεί στο 67,5 % του συνόλου, ακολουθούμενη από το μονογλυκοζίτη-3 της πεονιδίνης (62,3 mg kg/mi, 8,5%). Αντίθετα ο μονογλυκοζίτης -3 της κυανιδίνης είχε τη μικρότερη συγκέντρωση σε όλα τα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν (1,2%), με εξαίρεση το Λιάτικο, όπου ανιχνεύτηκαν μόνο οι μονογλυκοζίτες – 3 της κυανιδίνης, πεονιδίνης και μαλβοδίνης.

**Πίνακας 16** Συγκεντρώσεις (mg/L) ανθοκυανών με τη μέθοδο αναφοράς.

**ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ**

<b>Δείγματα</b>	<b>Δελφινιδίνη</b>	<b>Κυανιδίνη</b>	<b>Πετουνιδίνη</b>	<b>Παιονιδίνη</b>	<b>Μαλβιδίνη</b>
M <sub>1</sub> 17/8/17	8,5	0,5	11,8	7,8	134,9
M <sub>2</sub> 17/8/17	5,9	0,1	8,6	7,1	100,6
M <sub>3</sub> 17/8/17	5,8	0,4	8,5	10,1	94,5
A <sub>1</sub> 17/8/17	8,7	0,6	12,8	10,6	138,5
A <sub>2</sub> 17/8/17	6,2	0,5	9,4	9,6	104,8
A <sub>3</sub> 17/8/17	11,3	1,1	14,8	12,7	139,2
M <sub>1</sub> 31/8/17	8,7	0,5	12,8	10,3	162,2
M <sub>2</sub> 31/8/17	5,5	0,1	9,4	9,2	142,0
M <sub>3</sub> 31/8/17	11,4	1,6	15,6	23,8	169,3
A <sub>1</sub> 31/8/17	11,2	1,0	15,9	17,5	189,6
A <sub>2</sub> 31/8/17	7,5	0,7	11,8	15,9	169,3
A <sub>3</sub> 31/8/17	12,3	1,4	17,0	18,0	192,6
M <sub>1</sub> 16/9/17	8,1	0,6	12,8	15,5	197,5
M <sub>2</sub> 16/9/17	6,2	0,3	10,3	13,9	173,9
M <sub>3</sub> 16/9/17	10,4	1,2	14,9	21,7	201,8
A <sub>1</sub> 16/9/17	5,2	0,3	9,0	16,1	168,9
A <sub>2</sub> 16/9/17	6,0	0,5	9,4	14,6	161,4
A <sub>3</sub> 16/9/17	6,5	1,1	9,9	23,3	152,0

**Πίνακας 17** Συγκεντρώσεις (mg/L) ανθοκυανών με την πειραματική μέθοδο.

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ**

Δείγματα	Δελφινιδίνη	Κυανιδίνη	Πετουνιδίνη	Παιονιδίνη	Μαλβιδίνη
M <sub>1</sub> 17/8/17	15,4	9,1	18,7	15,1	146,7
M <sub>2</sub> 17/8/17	12,8	9,1	15,4	13,7	102,1
M <sub>3</sub> 17/8/17	13,2	9,2	15,6	16,6	109,9
A <sub>1</sub> 17/8/17	13,8	9,2	16,8	15,5	120,0
A <sub>2</sub> 17/8/17	12,6	9,1	15,1	14,8	99,9
A <sub>3</sub> 17/8/17	17,3	9,5	21,6	19,3	157,0
M <sub>1</sub> 31/8/17	15,1	9,4	19,0	16,6	177,9
M <sub>2</sub> 31/8/17	13,0	8,8	16,5	15,0	147,2
M <sub>3</sub> 31/8/17	17,7	10,0	22,6	30,0	201,9
A <sub>1</sub> 31/8/17	16,3	9,8	20,5	21,0	190,7
A <sub>2</sub> 31/8/17	13,7	9,2	18,0	20,5	169,6
A <sub>3</sub> 31/8/17	16,0	10,0	20,2	22,0	183,4
M <sub>1</sub> 16/9/17	13,0	9,3	17,0	18,3	179,4
M <sub>2</sub> 16/9/17	12,6	9,2	15,3	17,4	159,2
M <sub>3</sub> 16/9/17	14,4	9,5	18,7	21,4	182,4
A <sub>1</sub> 16/9/17	12,0	8,9	15,3	19,6	168,7
A <sub>2</sub> 16/9/17	13,0	9,2	15,3	19,2	162,8
A <sub>3</sub> 16/9/17	12,3	9,4	15,3	25,0	138,5

**Πίνακας 18** Μέσοι όροι των συγκεντρώσεων(mg/L) των ανθοκυανών όπως προσδιορίστηκαν με HPLC με τη μέθοδο αναφοράς και με την πειραματική μέθοδο.

**Συγκέντρωση ± Τυπική Απόκλιση**

Ανθοκυάνες	Μέθοδος Αναφοράς	Πειραματική Μέθοδος
Δελφινιδίνη	8,08 ± 2,53	14,11 ± 1,79
Κυανιδίνη	0,68 ± 0,44	9,34 ± 0,34
Πετουνιδίνη	11,93 ± 2,78	17,60 ± 2,42
Παιονιδίνη	14,31 ± 5,14	18,94 ± 4,08
Μαλβιδίνη	155,17 ± 32,45	155,42 ± 30,80

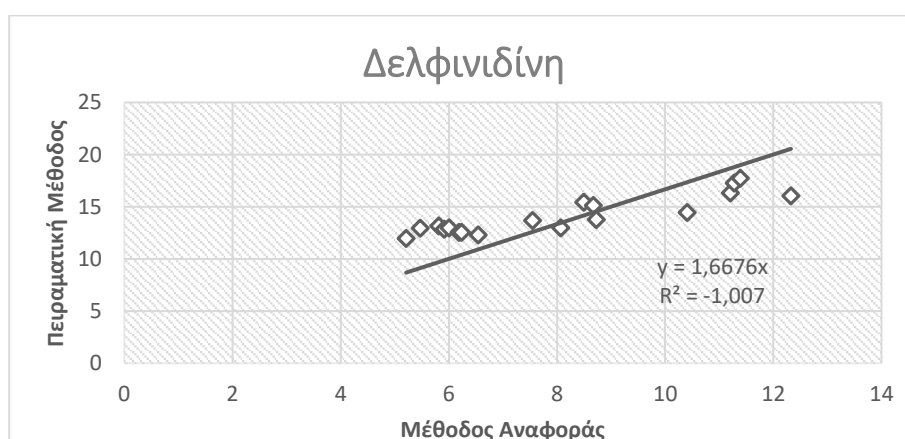
**Πίνακας 19** Συγκέντρωση ανθοκυανών ορισμένων ποικιλιών.

Analytical anthocyanin composition of the cultivars examined

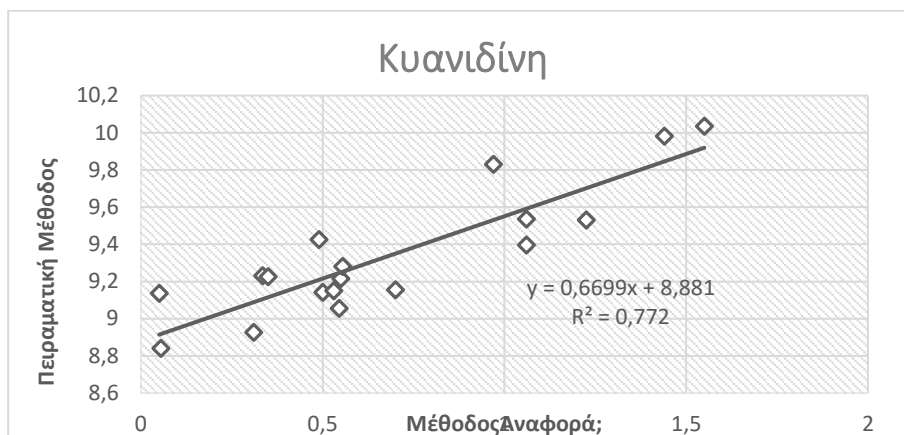
Cultivars	Anthocyanin content (mg kg <sup>-1</sup> fresh berry weight) <sup>a</sup>						
	Dp	Cy	Pt	Pn	Mv	MvCoum	Total
Xinomavro	9.2±0.4	0.0	14.6±0.6	30.7±0.7	399.3±1.9	91.6±0.8	545.8±0.6
Mandilaria	29.9±1.1	6.9±0.4	43.6±0.4	137.5±1.3	943.5±2.4	309.4±3.2	1470.8±8.8 <sup>b</sup>
Thrapsa	15.7±0.2	4.2±0.5	22.0±0.7	67.2±1.3	470.5±2.8	117.3±2.5	697.0±8.1
Aidani Mavro	33.2±1.2	0.0	30.0±1.9	32.2±0.9	368.7±3.3	62.0±0.7	526.1±6.3
Sangiovese	73.2±1.7	66.3±1.6	72.6±1.5	67.1±1.5	341.1±1.9	0.0	620.3±8.1
Pardala	0.0	0.0	9.7±0.1	21.3±1.1	532.1±1.1	0.0	563.1±2.2
Papadiko	34.3±1.7	20.9±0.9	35.0±0.8	68.0±1.4	248.0±0.6	73.6±1.4	479.9±0.0
Mavrodafni	109.3±2.0	11.0±0.4	95.0±1.1	35.5±1.3	694.6±2.1	208.8±3.7	1154.2±10.5 <sup>b</sup>
Liatiko	0.0	11.1±0.1	0.0	27.3±0.7	47.3±1.0	0.0	85.7±0.2 <sup>b</sup>
Grenache Rouge	45.8±0.4	4.1±0.1	43.4±0.1	27.5±1.0	513.7±1.6	118.8±2.0	753.3±4.9
Karlachanas	7.2±0.6	0.0	10.5±0.4	50.3±0.7	306.9±1.9	56.8±0.9	431.8±0.2
Merlot	19.9±0.7	9.3±0.6	29.0±1.4	55.2±1.1	357.1±4.7	80.0±1.3	550.6±3.7
Limnio	13.9±1.1	0.0	20.1±0.7	80.9±2.1	367.3±3.9	48.7±0.7	530.8±3.0
Araklinos	14.1±0.8	0.0	19.2±0.8	33.0±1.6	399.4±2.9	92.2±2.7	558.0±0.2
Negoska	14.9±1.0	0.0	22.5±1.0	73.8±2.5	651.5±2.7	90.2±1.1	852.9±4.1
Vapsa	50.3±0.7	9.1±0.6	69.4±1.5	192.7±1.9	1202.6±4.3	389.9±3.1	1914.0±5.9 <sup>b</sup>
Cabernet Sauvignon	43.9±0.7	7.3±0.8	36.2±0.6	58.3±0.8	552.5±2.4	7.7±0.1	705.9±2.2
Mean	30.3 (4.1) <sup>f</sup>	8.8 (1.2)	33.7 (4.6)	62.3 (8.5)	493.9 (67.5)	102.8 (14.0)	731.7

## 4.2 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων-συσχέτιση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων

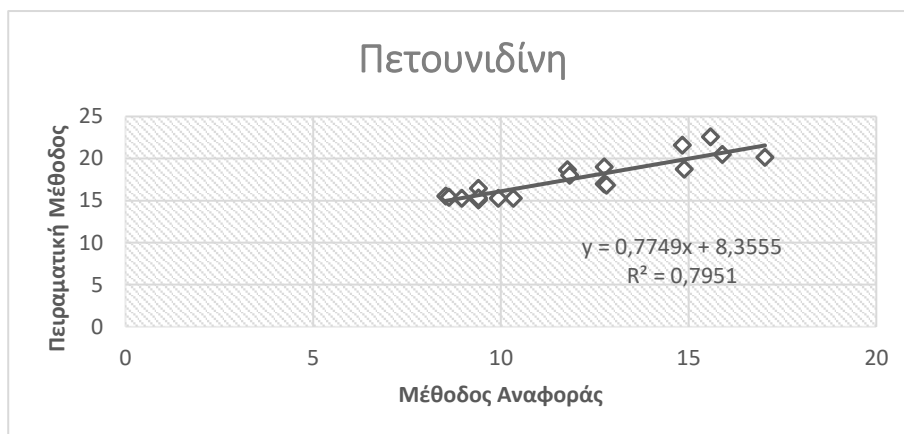
Υπολογίζεται ο δείκτης γραμμικής συσχέτισης μεταξύ των τιμών των συγκεντρώσεων των ανθοκυανών υπολογισμένων με τις 2 μεθόδους για την κάθε ανθοκυανή χωριστά.



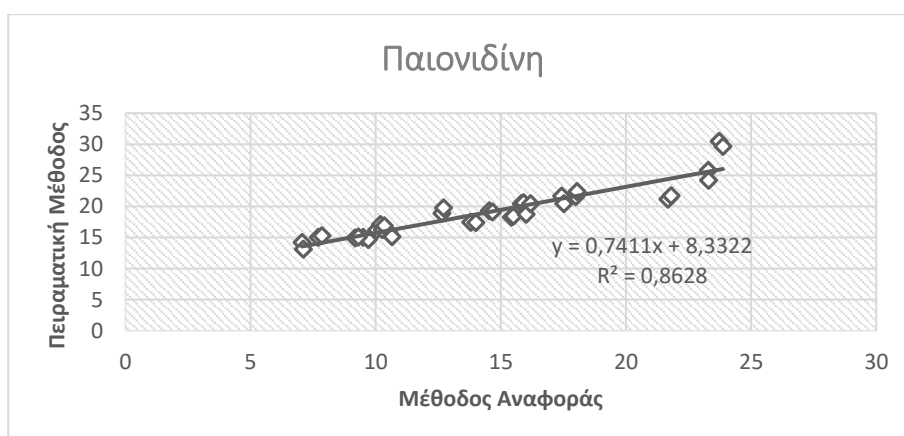
**Διάγραμμα 16** Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της δελφινιδίνης.



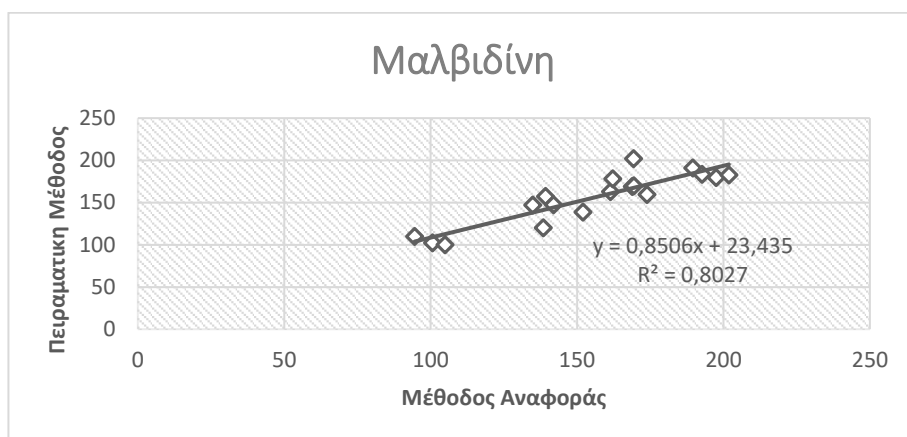
**Διάγραμμα 17** Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της κυανιδίνης.



**Διάγραμμα 18** Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της πετουιδίνης.



**Διάγραμμα 19** Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της παιονιδίνης.



**Διάγραμμα 20** Σύγκριση συσχέτισης των δύο μεθόδων όσον αφορά τα αποτελέσματα της μαλβιδίνης.

**Πίνακας 20** Τιμές του συντελεστή συσχέτισης των ανθοκυανών και για τις 2 μεθόδους.

Ανθοκυάνες	Συντελεστής συσχέτισης μεταξύ μεθόδων
Δελφινιδίνη	0,90
Κυανιδίνη	0,88
Πετουνιδίνη	0,89
Παιονιδίνη	0,93
Μαλβιδίνη	0,90

Στον πίνακα 20 υπολογίστηκε ο δείκτης συσχέτισης μεταξύ των μεθόδων και για τις πέντε ανθοκυάνες (n=18) ώστε να εντοπιστεί αν η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων είναι γραμμική.

Είναι γνωστό ότι τιμές του δείκτη συσχέτισης κοντά στην μονάδα, που αποτελεί τη μέγιστη δυνατή τιμή του, υποδηλώνουν υψηλή συσχέτιση των τιμών των δύο μεταβλητών. Αντίθετα τιμές κοντά στο μηδέν, που αποτελεί την ελάχιστη δυνατή τιμή του, υποδηλώνουν ότι οι δύο μεταβλητές είναι στατιστικά ασυσχέτιστες μεταξύ τους.

Παρόλο που οι δύο μέθοδοι συσχετίζονται, παρατηρείται μία ανοδική τάση στη συγκέντρωση των ανθοκυανών με την πειραματική μέθοδο σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς (Πίνακες 16 και 17). Βρίσκοντας το μέσο όρο των διαφορών των

τιμών κατά απόλυτη τιμή βρίσκεται ένας συντελεστής που δείχνει κατά πόσο διαφέρουν η μία μέθοδος από τη άλλη, δηλαδή κατά πόσο η πειραματική μέθοδος υπερεκτιμά τη συγκέντρωση των ανθοκυανών σε σχέση με την αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, για τη δελφινιδίνη η πειραματική μέθοδος υπερεκτιμά κατά 6,03, για την κυανιδίνη κατά 8,66, για την πετουνιδίνη κατά 5,67, για την παιονιδίνη κατά 4,66 και για τη μαλβιδίνη κατά 11,18 (Πίνακας 21).

**Πίνακας 21** Συντελεστής που δείχνει κατά πόσο η πειραματική μέθοδος υπερεκτιμά.

<b>Ανθοκυάνες</b>	<b>Συντελεστής</b>
<b>Δελφινιδίνη</b>	6,03
<b>Κυανιδίνη</b>	8,66
<b>Πετουνιδίνη</b>	5,67
<b>Παιονιδίνη</b>	4,66
<b>Μαλβιδίνη</b>	11,18

Πολλές μελέτες αποδεικνύουν τα πλεονεκτήματα τέτοιου είδους στηλών. Για παράδειγμα οι, Castelari et al. ανέφεραν ότι με τη μονολιθική στήλη είναι εφικτή η λειτουργία υψηλότερων ταχυτήτων ροής της κινητής φάσης σε σύγκριση με μια συμβατική αντίστροφης φάσης στήλη, με μειωμένη πίεση και μικρότερο χρόνο πλύσης και εξισορρόπησης της στήλης. Επιτεύχθηκε ένας πιο γρήγορος διαχωρισμός (36 λεπτά) των μονομερών φαινολικών ενώσεων καθώς επίσης και μια βελτίωση στο σήμα / θόρυβο. Αργότερα, οι Liazid et al, χρησιμοποιώντας αντίστροφης φάσης (18 e) μονολιθική στήλη, ανέπτυξαν μια πιο γρήγορη μέθοδο (8 λεπτά) επιτρέποντας το διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών του κρασιού.



### 4.3 Ανάλυση διακύμανσης για τον παράγοντα αραιώμα

Για το έτος 2017 για την ποικιλία Αγιωργίτικο παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανών στα πρέμνα που έχουν υποστεί αραιώμα φορτίου σε σχέση με τους μάρτυρες (Πίνακας 22) . Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς βασικός στόχος αυτού του χλωρού κλαδέματος είναι η αύξηση του μεγέθους και η βελτίωση του χρώματος των ραγών και η ομοιόμορφη ωρίμανση του φορτίου.

**Πίνακας 22** Επίδραση του αραιώματος με τη μέθοδο αναφοράς στη συγκέντρωση των ανθοκυανών (n=18).

<b>Ανθοκυάνες</b>	<b>Μάρτυρας (χωρίς)</b>	<b>Αραιώμα φορτίου</b>
Δελφινιδίνη	7,83 ± 2,01	8,34 ± 2,51
Κυανιδίνη	0,57 ± 0,52	0,79 ± 0,36
Πετουνιδίνη	11,62 ± 2,45	12,23 ± 2,9
Παιονιδίνη	13,27 ± 5,69	15,35 ± 3,93
Μαλβιδίνη	152,97 ± 36,16	157,37 ± 25,92

Για να ελέγξουμε αν ο παράγοντας αραιώμα φορτίου είναι στατιστικά σημαντικός ή όχι πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (one-way Anova) στις τιμές (n=6) των ανθοκυανών με την κλασική μέθοδο. Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

**Πίνακας 23** Στατιστική ανάλυση διακύμανσης για τον παράγοντα αραίωμα για τη μέθοδο αναφοράς.

<b>Ανθοκυάνες</b>	<b>F - Ratio</b>	<b>P-Value</b>
Δελφινιδίνη	8,34524	0,0161
Κυανιδίνη	0,102389	0,7556
Πετουνιδίνη	14,36023	0,0036
Παιονιδίνη	0,178683	0,6815
Μαλβιδίνη	23,16837	0,0007

Γνωρίζουμε ότι όταν το  $p$  value  $< 0,05$  υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο αραιωμένο και μη αραιωμένο. Αν όμως το  $p$  value  $> 0,05$  τότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Από τον Πίνακα 22 προκύπτει ότι οι μονογλυκοζίτες - 3 της δελφινιδίνης, πετουνιδίνης και μαλβιδίνης παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αραιωμένου και μη, ενώ οι μονογλυκοζίτες - 3 της κυανιδίνης και της παιονιδίνης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Στις περισσότερες έρευνες στα πρέμνα που έχουν υποστεί αραίωμα φορτίου, η ποιότητα του σταφυλιού είναι βελτιωμένη καθώς το περιεχόμενο σε ανθοκυάνες είναι υψηλότερο (Guidoni et al, 2002; Rajitna et al, 2007; Petrie et al, 2006), υπάρχουν και κάποιες έρευνες που στις οποίες δεν παρατηρείται βελτίωση της φαινολικής σύνθεσης των σταφυλιών. Έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι οι ανθοκυάνες που βρίσκονται στους φλοιούς των ραγών μειώθηκαν, το οποίο συμπίπτει με τη φυσιολογική και φαινολική ωριμότητα των ραγών. Η περιεκτικότητα σε ανθοκυάνες και το χρώμα του κρασιού αυξήθηκε παρόλο που οι ανθοκυάνες του σταφυλιού μειώθηκαν (Ribereau – Gayon et al 1999).

Ο σχηματισμός και η συσσώρευση των ανθοκυανών εξαρτάται από την ποικιλία, την ποσότητα των διαθέσιμων σακχάρων, τη θερμοκρασία, την ηλιακή ακτινοβολία, την υδατική κατάσταση των πρέμνων. Οι ακριβείς συνθήκες για την έναρξη του σχηματισμού των ανθοκυανών δεν είναι εντελώς γνωστές, αλλά φαίνεται ότι, όταν η συγκέντρωση των σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη) στα κύτταρα του

φλοιού ανέλθει στα 9 έως 10 Brix ενεργοποιούνται τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των ανθοκυανών (Keller and Hrazdina, 1998).

## 5. Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα

Εκατοντάδες δημοσιεύσεις για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων των σταφυλιών έχουν εμφανιστεί τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες. Νέες αναλυτικές τεχνικές έχουν αποκαλύψει ορισμένες δομές που προέρχονται από ανθοκυάνες στον οίνο και καθορίζουν τον τρόπο με τον οποίο σχηματίζονται. Έτσι, η ποικιλομορφία των μεθόδων και των πειραματικών διαδικασιών αντικατοπτρίζει την πολυπλοκότητα των φαινολικών αναλυτών στα σταφύλια και τον οίνο.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη μιας μεθόδου με την οποία θα είναι εφικτό να προσδιοριστούν ταχύτερα οι ανθοκυάνες γλυκών και οίνων με τη χρήση μονολιθικής στήλης υγρής χρωματογραφίας. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος αναφοράς μια αντίστροφης φάσης στήλη. Επιπλέον, εξετάστηκε ο παράγοντας αραίωμα στη σύνθεση των ανθοκυανών.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη παρουσιάζονται στα επιμέρους κεφάλαια και συνοψίζονται στη συνέχεια.

Από τη σύγκριση που έγινε μεταξύ της μεθόδου αναφοράς και της πειραματικής βρέθηκε ότι ο δείκτης συσχέτισης είναι κοντά στη μονάδα, που αποτελεί τη μέγιστη δυνατή τιμή του, υποδηλώνοντας έτσι την υψηλή συσχέτιση των μεθόδων.

Επίσης, ο παράγοντας αραίωμα φαίνεται να επιδρά στη σύνθεση των ανθοκυανών, καθώς αύξησε τις συγκεντρώσεις του μονογλυκοζίτη – 3 της κυανιδίνης, δελφινιδίνης, πετουνιδίνης, παιονιδίνης και μαλβιδίνης. Από την ανάλυση διακύμανσης (one way – ANOVA) παρατηρήθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αραιωμένου και μη για το μονογλυκοζίτη – 3 της δελφινιδίνης, της πετουνιδίνης και της μαλβιδίνης ( $p$ -value < 0,05), ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά για τους μονογλυκοζίτες της κυανιδίνης και παιονιδίνης ( $p$ -value > 0,05).

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής δοκιμάστηκε η αποτελεσματικότητά μιας μονολιθικής στήλης μέσα από μια σειρά πειραμάτων και παρότι εξήχθησαν σημαντικά αποτελέσματα, μια πιο κατάλληλη δοκιμασία θα ήταν να χρησιμοποιηθεί

μεγαλύτερη μονολιθική στήλη η οποία θα μπορεί να διαχωρίσει και τους εστέρες, οι οποίοι δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν σε αυτήν την έρευνα.

## Βιβλιογραφία

- Andersen, O. M. (2005). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*.
- Andersen, O. M. (2006). *Flavonoid: Chemistry, Biochemistry and Applications*.
- Bate-Smith, E. C. (1948). Paper Chromatography of antocyanins.
- Cody, V., Middleton, E., & Harborne, J. (1986). *Plant flavonoids in biology and medicine II. Biochemical, cellular, and medicinal properties*.
- Downey, M. (2006). Cultural Practice and Environmental Impacts on th Flavonoids Composition of Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Frantisek , S., & Yongqin , L. (2015). Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for.
- Geissman. (1962). The Chemistry of Flavonoids Compounds.
- Harborne, J. B. (1993). *The flavonoids: Advances in Research Since 1986*.
- Harborne, J., & Mabry, T. (1982). *The Flavonoids: Advances in Research*.
- Hsieh, V., Wang, G., Wang, Y., Chachalamannil, S., & Korfmacher, W. (2003). *Analytical Chemistry*.
- Jackson , D., & Lombard, P. (1993). Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality. *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Jackson, R. (2008). *Wine Science*.
- Jandera, P. (2005). *Gradient elution in liquid column chromatography-prediction of retention and optimization of separation*.
- Jandera, P., & Churasek, J. (1985). Gradient Elusion in Liquid Chromatography. *Elsevier*.
- Lee, H., & Hong, V. (1992). *Chromatographic analysis of anthocyanins*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Lee, H., & Hong, V. (1992). *Chromatographic analysis of anthocyanins*. Amsterdam: Elsevier Science.
- Lesins, V., & Ruckenstein, E. (1989). Gradient flow programming: a coupling of gradient elution and flow programming. *Journal of Chromatography*.
- Oszimianski, J., Ramos, T., & Bourzeix, M. (1988). Fractionation of Phenolic Compounds . *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Ribereau-Gayon, O. (2006). *The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*.
- Roggero, J., Coen, S., & Ragonnet, B. (1986). High Performance Liquid Chromatography Survey on Changes in Pigment Content in Ripening Grapes of Syrah. An Approach to Anthocyanin Metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture*.

- Snyder, L., & Dolan, J. (1998). *Advances in chromatography*.
- Somers, T., & Vérette, E. (1988). *Wine Analysis*.
- Webb, A., & Amerine, M. (1982). *Grape and wine centennial symposium proceedings*.  
Davis.
- Κοτσερίδης, Γ., Καλλίθρακα, Σ., & Προξενιά, Ν. (2015). *Εργαστήριο Οινολογίας*.
- Κοτσερίδης, Γ., Καλλίθρακα, Σ., & Προξενιά, Ν. (2015). *Οινολογία II Εργαστηριακές  
Ασκήσεις*.
- Κούππαρη, Μ., & Χατζηιωάννου, Θ. (2010). *Ενόργανη Ανάλυση*.
- Σταυρακάκης, Μ. (2010). *Αμπελογραφία*.
- Σταυρακάκης, Μ. (2013). *Αμπελουργία*.
- Χατζηιωάννου, Θ. (2010). *Ενόργανη Ανάλυση*.