

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο NMR

# Ανάλυση οίνων ΠΟΠ Κρήτης με τη Φασματοσκοπία NMR

Διπλωματική Εργασία

Αλεξάκης Γεώργιος

Επιβλέπων καθ.: Απόστολος Σπύρος

Ηράκλειο 2016

“One should always be drunk.  
That's all that matters...But with  
what? With wine, with poetry,  
or with virtue, as you chose. But  
get drunk.”

— Charles Baudelaire

## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες .....	5
Περίληψη .....	6
Εισαγωγή.....	7
Ιστορικό <sup>[1]</sup> .....	7
Ελληνικός αμπελώνας και Γηγενείς ποικιλίες .....	7
Κρητικός αμπελώνας και σημαντικότερες Κρητικές ποικιλίες.....	8
Κοτσιφάλι.....	9
Μαντηλάρι .....	9
Λιάτικο .....	10
Οίνος και η σύστασή του <sup>[1],[2],[3]</sup> .....	11
Νερό.....	11
Οργανικά οξέα .....	11
Αλκοόλες.....	12
Απλές μονοαλκοόλες .....	12
Ανώτερες μονοαλκοόλες .....	13
Αρωματικές ενώσεις.....	13
Σάκχαρα .....	14
Φαινολικές ενώσεις <sup>[1],[2]</sup> .....	14
Φασματοσκοπία NMR .....	15
Σκοπός Πτυχιακής εργασίας.....	16
Στατιστική ανάλυση.....	16
Ανάλυση κύριων συνιστωσών .....	16
OPLS-DA .....	16
Πειραματική διαδικασία.....	17
Δείγματα .....	17
Προετοιμασία δειγμάτων .....	17
Ανάλυση του φαινολικού προφίλ των οίνων με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) .....	17
Προετοιμασία δειγμάτων σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D <sub>2</sub> O) .....	18
Φάσματα NMR.....	18
Μεταβολομική ανάλυση.....	18
Αποτελέσματα-Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	19
Ανάλυση φασμάτων φαινολικού προφίλ του οίνου .....	19

Ανάλυση φασμάτων σε διαλύτη D <sub>2</sub> O .....	22
Στατιστική ανάλυση .....	25
Συμπεράσματα.....	27
Παράρτημα .....	28
Βιβλιογραφία .....	31

## Ευχαριστίες

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επικ. καθηγητή κ. Απόστολο Σπύρο, για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής ερευνητικής εργασίας και την βοήθειά του καθ'όλη την διάρκεια αυτής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Μαρία Αμαργιανιτάκη για την συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε από την αρχή της εργασίας μέχρι το τέλος, αλλά και για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα παιδιά που δουλεύουν στο εργαστήριο για την υπομονή τους και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν ο καθένας ξεχωριστά αλλά και για το ευχάριστο και φιλόξενο κλίμα εργασίας. Η βοήθεια όλων ήταν πολύτιμη και συντέλεσε στην αίσια ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

## Περίληψη

Η παρούσα μελέτη αναφέρεται στην ανάλυση ερυθρών ξηρών οίνων ΠΟΠ με τη χρήση της Φασματοσκοπίας NMR και της χημειομετρίας. Τα δείγματα οίνου που αναλύθηκαν προέρχονταν από γηγενείς ποικιλίες οινοστάφυλων της Κρήτης (Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι).

Η Φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού μη-πτητικών οργανικών ενώσεων του οίνου, στις οποίες περιλαμβάνονται οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, κιτρικό οξύ, μηλικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ), σάκχαρα ( $\alpha$ - και  $\beta$ -γλυκόζη, σουκρόζη, φρουκτόζη), αμινοξέα (αλανίνη, προλίνη), αλκοόλες (μεθανόλη, γλυκερόλη, ινοσιτόλη, ισοπεντανόλη, 1,3-προπανοδιόλη), φαινολικές ενώσεις (trans-καφταρικό οξύ, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, 2-φαινυλοαιθανόλη), και άλλες ενώσεις (χολίνη, ουριδίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη, τριγονελλίνη, ιστιδίνη, ακεταλδεΐδη).

Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός των πολυφαινολών του οίνου με την χρήση της Φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR, η οποία βασίστηκε στην εκχύλιση στερεάς φάσης για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος του οίνου. Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με αυτή τη μεθοδολογία στους οίνους ήταν οι φλαβονόλες (κερκετίνη, καμφερόλη), οι ανθοκυάνες (μαλβιδίνη, πεονιδίνη), οι φαινολικές αλκοόλες (τυροσόλη, 2-φαινυλοαιθανόλη), οι φλαβανόλες (κατεχίνη, επικατεχίνη), τα φαινολικά οξέα (trans-καφταρικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ) και ο φαινολικός εστέρας (γαλλικός αιθυλεστέρας).

Η χημειομετρική ανάλυση των  $^1\text{H}$  NMR φασματικών δεδομένων των οίνων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης (PCA, OPLS-DA).

## Εισαγωγή

### Ιστορικό<sup>[1]</sup>

Η άμπελος είναι, ίσως, από τα παλιότερα φυτά που παρουσιάστηκαν στη γη. Η ηλικία της, σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, ανέρχεται σε 140 εκατομμύρια χρόνια. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι η άμπελος καλλιεργήθηκε γύρω στα 2400 π.Χ., και μεταγενέστερα.

Αντίθετα με την ύπαρξη της αμπέλου πάνω στη γη, η χρησιμοποίηση σταφυλιών για την παραγωγή οίνου ήρθε αργότερα. Διαπιστώθηκε ότι πριν 10000 χρόνια περίπου ο άνθρωπος πήρε γλεύκος από πίεση σταφυλιών, χωρίς όμως να ξέρουμε την τύχη του. Όπως και να έχουθν όμως τα πράγματα, είναι βέβαιο ότι 3000 χρόνια προ Χριστού η παραγωγή του οίνου ήταν γνωστή. Διάφορες παραστάσεις και κείμενα το μαρτυρούν με βεβαιότητα.

Η προέλευση της αμπέλου δεν είναι ξεκάθαρη. Πολλές χώρες και περιοχές φέρονται ως να είναι οι πρώτοι καλλιεργητές της. Η πιθανότερη, όμως, εκδοχή είναι ότι η αμπελοργία αναπτύχθηκε ταυτόχρονα σε διάφορες χώρες και ιδιαίτερα σε χώρες της Ανατολής.

Η καλλιέργεια της αμπέλου στην Ελλάδα δεν είναι γνωστό από που άρχισε. Μερικοί αναφέρουν ότι αυτή προήλθε από την Κρήτη, από την οποία διαδόθηκε στη Νάξο, Χίο και στη συνέχεια σε όλη τη χώρα. Άλλοι δίνουν την προτεραιότητα στην Αιτωλία και άλλοι στη Θράκη, από όπου οι Έλληνες προμηθεύονταν τον οίνο κατά την πολιορκία της Τροίας. Στη Θράκη παρασκευάζονταν, επίσης, ο ονομαστός οίνος Ίσμαρος, με τον οποίο ο Οδυσσέας μέθυσε τον Πολύφημο και ο Βύβλιος για τον οποίο μιλάει ο Ησίοδος.

Στις μέρες μας, σε όλες τις ηπείρους, η άμπελος καλλιεργείται με σκοπό ο καρπός της να δώσει οίνους ποιότητας. Οι ποικιλές είναι πολλές εκατοντάδες εκατοντάδες, κάθε μια με τα δικά της χαρακτηριστικά και τις δικές της ιδιαιτερότητες.

### Ελληνικός αμπελώνας και Γηγενείς ποικιλίες

Ο Ελληνικός αμπελώνας αποτελείται από αμπελοργικές «νησίδες», οι οποίες καλύπτουν σχεδόν κάθε σημείο της χώρας, ηπειρωτικής και νησιωτικής. Η Ελλάδα, με το μεσογειακό κατά κανόνα κλίμα της, βρίσκεται καθ' όλη την έκτασή της εντός της ευνοϊκής για την αμπελοκαλλιέργεια κλιματικής και γεωγραφικής περιοχής (35° έως 41° βόρειο γεωγραφικό πλάτος). Δέχεται δε την ευεργετική επίδραση της θάλασσας, η οποία περιβάλλει το μεγάλο πλήθος των νησιών της και λόγω του όγκου της επηρεάζει καθοριστικά και το κλίμα ηπειρωτικών περιοχών και ιδιαίτερα αυτό των παραθαλάσσιων αμπελοτοπίων.

Ο αμπελώνας της Ελλάδας εντοπίζεται σε εδάφη και ανάγλυφο που ποικίλλουν έντονα και σε υψόμετρα που ξεκινούν από την επιφάνεια της θάλασσας και φτάνουν να ξεπερνούν τα 1.000μ. Ωστόσο, πολύ μεγάλο μέρος του εκτείνεται σε ορεινά και ημιορεινά αμπελοτόπια και πολύ μικρότερο σε αμπελοτόπια με ηπειρωτικά χαρακτηριστικά.

Χωρίζοντας τον αμπελώνα της Ελλάδας σε μεγάλες γεωγραφικές ενότητες, διακρίνουμε τους αμπελώνες της Βόρειας Ελλάδας, της κεντρικής Ελλάδας (που περιλαμβάνει και αυτόν της Αττικής), της Πελοποννήσου και των νησιών Ιονίου πελάγους, των νησιών του Αιγαίου πελάγους και της Κρήτης. Οι αμπελώνες αυτοί χωρίζονται περαιτέρω σε μικρότερους, με τα δικά τους ιδιαίτερα εδαφοκλιματικά και τοπογραφικά χαρακτηριστικά, τα οποία, σε συνδυασμό με γηγενείς, κυρίως, ποικιλίες αμπέλου, προσδίδουν στα ελληνικά κρασιά τη μοναδικότητα και τη διαφορετικότητα που τα διακρίνουν.

Οι γηγενείς ποικιλίες αμπέλου της Ελλάδας είναι εκατοντάδες, καθιστούν τη χώρα μία από τις πλέον «πολυποικιλιακές» οινοπαραγωγικά και τον ελληνικό αμπελώνα έναν από τους πλουσιότερους του κόσμου. Με άλλα λόγια, η Ελλάδα δεν βασίζεται σε 4-5 ποικιλίες αμπέλου, για την παραγωγή των κρασιών της. Αντίθετα, αποτελώντας κομμάτι του παλαιού οινικού κόσμου (Ευρώπη), αλλά υιοθετώντας και καλές πρακτικές του νέου (Αμερική, Αφρική, Ωκεανία), οι γηγενείς ποικιλίες αμπέλου της Ελλάδας αποτελούν ένα ακαταμάχητο οπλοστάσιο παραγωγής κρασιών κάθε τύπου και στυλ, για κάθε γούστο και ώρα και βέβαια, για οινόφιλους κάθε επιπέδου.

#### Κρητικός αμπελώνας και σημαντικότερες Κρητικές ποικιλίες

Οι αμπελώνες στην Κρήτη εντοπίζονται κυρίως στο ανατολικό τμήμα του νησιού και ιδιαίτερα στη βόρεια πλευρά, η οποία δέχεται την ευνοϊκή επίδραση των βόρειων-βορειοανατολικών θαλασσινών ανέμων. Αναπτύσσονται δε με ταχείς ρυθμούς και καθιστούν το νησί από τους σημαντικότερους σε δυναμική αμπελοτόπους της Ελλάδας.

Οι αμπελώνες στην Κρήτη συγκεντρώνονται κυρίως σε πεδινές εκτάσεις και οροπέδια, σε υψόμετρο έως και 1.000μ. και είναι πλέον διαμορφωμένοι σε γραμμικά σχήματα, αν και διατηρούνται ακόμη πολλά παραδοσιακά κύπελλα. Οι οροσειρές των Λευκών Ορέων, της Ίδης και της Δίκτυς, με πολλές δεκάδες κορυφές, διατρέχουν την Κρήτη, από δύση προς ανατολή, σχηματίζοντας μεγάλα οροπέδια και χαράδρες και δημιουργώντας μια ατελείωτη ποικιλομορφία από αμπελοτόπια, όπου ευδοκιμούν οι τοπικές ποικιλίες βηλάνα, κοτσιφάλι, λιάτικο και η αιγαιοπελαγίτικη μανδηλαριά, καθώς και πλειάδα άλλων γηγενών ποικιλιών αμπέλου, καθώς και διεθνών.

Το ιδιαίτερα ξηροθερμικό κλίμα της Κρήτης, με την ηλιοφάνεια να καλύπτει το 70% των ημερών του έτους και την ελάχιστη θερινή βροχόπτωση (μικρότερη από 50mm), μετριάζεται από τη γειννίαση με το Κρητικό πέλαγος στο βορρά και το Λυβικό στο νότο (παραθαλάσσια αμπελοτόπια) και από το υψόμετρο (ορεινά και ημιορεινά αμπελοτόπια). Αυτοί οι παράγοντες καθιστούν ευκολότερη την προσαρμογή της αμπέλου στο νοτιότερο σημείο της Ελλάδας και της Ευρώπης (βόρειο γεωγραφικό πλάτος 35°).



Οι σημαντικότερες Κρητικές λευκές ποικιλίες είναι αθήρι, βηλάννα, βιδιανό, δαφνί, θραψαθήρι, μαλβάζια ντι κάντια, μοσχάτο Σπίνας, πλυτό ενώ οι σημαντικότερες ερυθρές είναι κοτσιφάλι, λιάτικο, μανδηλαριά, ρωμέικο.

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με το Κοτσιφάλι, το Μαντηλάρι.

### Κοτσιφάλι

Το κοτσιφάλι είναι η ερυθρή ποικιλία-ορόσημο του ονομαστού αμπελώνα στην Κρήτη, η οποία καθορίζει το στυλ πολλών ερυθρών ξηρών οίνων αυτής της εξαιρετικά σημαντικής οινοπαραγωγικής περιοχής του Αιγαίου πελάγους. Επειδή μάλιστα το κόκκινο σταφύλι έχει μάλλον μεγαλύτερη διάδοση σε αυτό το νησί, το κοτσιφάλι μπορεί να θεωρηθεί η πραγματική οινική ψυχή της Κρήτης.

Το κοτσιφάλι δίνει ένα «τυπικό μεσογειακό» ερυθρό κρασί, με απαλό χρώμα, ένταση αρωμάτων, σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη, ήπιες ταννίνες και οξύτητα. Για τους λόγους αυτούς, το κοτσιφάλι αναμειγνύεται με πολλές ερυθρές ποικιλίες αμπέλου, είτε διεθνείς, είτε γηγενείς, με κυριότερη τη μανδηλαριά. Ωστόσο, δεν είναι απλώς ένας «ενισχυτικός παράγοντας» της ποικιλιακής σύνθεσης κρητικών κρασιών. Προσθέτει στρογγυλάδα και ταννική χάρη, ενώ η έκφραση των αρωμάτων του είναι γεμάτη από γλυκά λουλούδια, αποξηραμένα μαύρα φρούτα και συνθέσεις μπαχαρικών. Το κοτσιφάλι καλλιεργείται σε ολόκληρη την Κρήτη, αλλά τα καλύτερα κρασιά προέρχονται από την περιοχή του Ηρακλείου. Ειδικότερα, είναι οι οίνοι ΠΟΠ Πεζά και ΠΟΠ Αρχάνες, που αποτελούν χαρμάνια με μανδηλαριά.

Το κοτσιφάλι δίνει γεμάτα και πλούσια κρασιά, τα οποία απευθύνονται σε οινόφιλους, που προτιμούν τη μαλακιά γεύση. Τα κρασιά που περιέχουν στην ποικιλιακή τους σύνθεση κοτσιφάλι ταιριάζουν εύκολα με φαγητά και συνοδεύουν άριστα πλούσια πιάτα με κρέας, μαγειρευτά κατσαρόλας (λαδερά), λουκάνικα και γευστικά ψητά. Τα περισσότερα κρασιά είναι έτοιμα να καταναλωθούν αμέσως μόλις κυκλοφορήσουν, αλλά αυτά με περισσότερο εκχύλισμα, που ωριμάζουν συνήθως για αρκετούς μήνες σε βαρέλι, μπορούν να εξελιχθούν για 5-8 έτη, παρουσιάζοντας δομή που στηρίζεται στην ωριμότητα και τη γευστική πολυπλοκότητα.

### Μαντηλάρι

Αμοργιανό, παριανό, βάφτρα, μαύρη κουντούρα, μαντηλάρι... είναι λίγα μόνο από τα ονόματα της όψιμης ερυθρής ποικιλίας μανδηλαριά, που μαρτυρούν το βαθμό της εξάπλωσής της, ιδιαίτερα στη νησιωτική Ελλάδα. Από την εποχή του Πausanias, η μανδηλαριά συμμετείχε ήδη στην παραγωγή του φημισμένου χιώτικου Αριούσιου οίνου. Σήμερα συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό ερυθρών, ροζέ, καθώς και επιδόρπιων κρασιών, με ισχυρή ταυτότητα και χαρακτήρα, αν και τα δείγματα μονοποικιλιακών από μανδηλαριά είναι σπάνια.

Στο Αιγαίο πέλαγος και στην Κρήτη χτυπά η καρδιά της μανδηλαριάς. Δεν είναι άλλωστε τυχαίο ότι εκεί συμμετέχει στους ερυθρούς οίνους ΠΟΠ Πεζά, ΠΟΠ Αρχάνες, ΠΟΠ Πάρος, ενώ είναι υπεύθυνη εξ ολοκλήρου για τον ερυθρό οίνο ΠΟΠ Ρόδος.

Στους ανεμοδαρμένους και ηλιοκαμένους αμπελώνες αυτών των νησιών η μανδηλαριά –συνήθως διαμορφωμένη σε κύπελλο– αποκτά χαρακτηριστικά πέρα από τα συνηθισμένα: βαθύ σκούρο χρώμα, αρώματα υπερώριμων φρούτων, ζωικά αρώματα (π.χ. δέρματος) και μέτριο σώμα, με ατίθασες, στιβαρές ταννίνες. Με σκληρή δουλειά στο αμπέλι και στο οινοποιείο, αλλά και μέσω ανάμειξης με άλλες ποικιλίες –όπως είναι η λευκή μονεμβασιά στην Πάρο ή το μαλακό ερυθρό κοτσιφάλι στην Κρήτη– πολλοί αξιόλογοι οινοπαραγωγοί προσπαθούν να τιθασεύσουν το γενικώς αχαλίνωτο χαρακτήρα της μανδηλαριάς. Ωστόσο, μερικά χρόνια στη φιάλη είναι μάλλον ο καλύτερος τρόπος για να βρεθούμε μπροστά σε ένα «ευρωπαϊκό» κρασί, που με τη γεύση του μεταφέρει νοερά στον υπέροχο τόπο προέλευσής του.

Με την επιβλητική της προσωπικότητα, η μοναδική ποικιλία μανδηλαριά αφήνει ανεξίτηλο το αποτύπωμά της στο ελληνικό κρασί, το οποίο άλλοτε είναι πιο βαθύ και άλλοτε ανεπαίσθητο, αποκαλύπτοντας όμως πάντα την ταυτότητα του terroir του. Με δεδομένο μάλιστα τον πολυδύναμο χαρακτήρα της, κάθε τολμηρός οινόφιλος, που θέλει να διευρύνει την αρωματική και τη γευστική παλέτα του, θα βρει αφορμή για να φέρει μια μανδηλαριά στο ποτήρι του.

### Λιάτικο

Το λιάτικο είναι κορυφαία ποικιλία-πρεσβευτής ενός πολύ ξεχωριστού και συχνά παρεξηγημένου στυλ, ενώ παράλληλα, έχει θεσπέσια γεύση. Είναι μια ερυθρή ποικιλία αμπέλου που μπορεί να δώσει ερυθρά ξηρά κρασιά εξαιρετικής φινέτσας, αλλά φτάνει στο απόγειό της στα γλυκά κρασιά. Ωστόσο, ενώ οι περισσότερες ερυθρές ποικιλίες αμπέλου συνδυάζονται με την προσθήκη αλκοόλης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, για τη δημιουργία ενισχυμένων γλυκών κρασιών, τα γλυκά κρασιά από λιάτικο φτιάχνονται από λιαστά σταφύλια (λιαστά κρασιά).

Τα κρασιά από λιάτικο έχουν σχετικά χαμηλή ένταση χρώματος, κλίνοντας στο κόκκινο-γκρενά. Η μύτη τους είναι έντονη, με πλούσια, ώριμα κόκκινα φρούτα και γλυκά μπαχαρικά. Το στόμα είναι γεμάτο, με υψηλά επίπεδα αλκοόλης και χαμηλές, πολύ μαλακές ταννίνες. Επειδή τα σταφύλια συμπυκνώνονται στον ήλιο, τα γλυκά κρασιά από λιάτικο είναι ακόμα πιο έντονα στη μύτη, εμφανίζοντας χαρακτήρες πιο γλυκών και πιο ώριμων φρούτων. Αντίστοιχα και τα γευστικά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση, με πιο έντονη την οξύτητα. Η μακρά παλαίωση σε βαρέλι είναι σημαντική και συνήθως λαμβάνει χώρα σε μεγάλα, παλιά βαρέλια. Το λιάτικο απαντάται σε όλη την Κρήτη, αλλά τα καλύτερα κρασιά προέρχονται από το Ηράκλειο (οίνος ΠΟΠ Δαφνές) και το Λασιθί (οίνος ΠΟΠ Σητεία), όπου μπορεί να προστεθεί και 20% μανδηλαριάς.

Το λιάτικο είναι η επιτομή του ζεστού καιρού, που παρατηρείται σε ορισμένες περιοχές της Κρήτης (τα ξηρά κρασιά της ποικιλίας είναι στρογγυλά, γεμάτα και μαλακά, ενώ τα γλυκά είναι πιο πλούσια και πυκνά). Τα επιδόρπια κρασιά από λιάτικο (για παράδειγμα, αυτά με τη γεωγραφική ένδειξη «Σητεία») είναι ιδανικά για

όσους θέλουν να απολαύσουν γλυκά κόκκινα κρασιά με χαμηλότερη αλκοόλη από αυτή των περισσότερων ενισχυμένων οίνων και εξελίσσονται όμορφα με την πάροδο του χρόνου. Ως λιαστά μπορούν να βελτιώνονται για δεκαετίες, ενώ τα ξηρά κρασιά χρειάζονται τουλάχιστον πέντε χρόνια για να γίνουν πιο απολαυστικά, ενώ παλαιώνουν άνετα για δέκα ή και περισσότερα.

## Οίνος και η σύστασή του<sup>[1],[2],[3]</sup>

Σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ αριθ. 1493/1999 του Συμβουλίου της 17<sup>ης</sup> Μαΐου 1999 για την κοινή οργάνωση της αμπελοοινικής αγοράς, Παράρτημα Ι, παράγραφος 10, «οίνος είναι το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με ολική ή μερική αλκοολική ζύμωση, νωπών σταφυλιών, τα οποία έχουν υποστεί έκθλιψη ή όχι, ή γλεύκους σταφυλιών».<sup>[4]</sup>

Από χημική άποψη ο οίνος θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί ως ένα υδατικό διάλυμα στο οποίο περιέχεται αιθανόλη και οργανικές ενώσεις όπως είναι το οξέα και οι φαινολικές ενώσεις. Δεν είναι όμως όλοι οι οίνοι το ίδιο. Υπάρχει μια πληθώρα ενώσεων που ανάλογα με την ύπαρξη τους ή όχι στον οίνο αλλά και με τις σχετικές τους συγκεντρώσεις το κρασί αποκτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Η παρουσία και η συγκέντρωση τέτοιων ενώσεων στο προϊόν εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ενδεικτικά και μόνο αναφέρονται οι γεωγραφικές συντεταγμένες, το κλίμα, οι εδαφολογικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές τεχνικές, οι ποικιλία του σταφυλιού, οι οινοποιητικές μέθοδοι και πολλές ακόμα παράμετροι.

Έτσι, ο οίνος εκτός από το νερό το οποίο είναι το πρώτο σε ποσότητα συστατικό του, περιέχει ακόμα οργανικά συστατικά τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής, οργανικά οξέα, αλκοόλες, αρωματικές ενώσεις, σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, φαινολικές ενώσεις, αζωτούχες ενώσεις, ένζυμα, βιταμίνες. Ακόμα περιέχονται και διάφορα ανόργανα συστατικά. Αυτά μπορεί να είναι ανιόντα όπως  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{BO}_3^{3-}$  κ.α. ή κατιόντα όπως  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  κ.α. Σε αυτά θα γίνει μόνο σε αυτό το σημείο αναφορά καθώς δε θα μας απασχολήσουν ιδιαίτερα στην παρούσα εργασία.

## Νερό

Αποτελεί το πρώτο σε ποσότητα συστατικό του οίνου και βρίσκεται σε ποσοστό 80%-85% κατ' όγκο. Προέρχεται από το σταφύλι και είναι υπεύθυνο για την πυκνότητα του οίνου. Η αλκοόλη που περιέχεται στον οίνο και έχει πυκνότητα μικρότερη του νερού ισοσταθμίζει την πυκνότητα των βαρύτερων συστατικών.

## Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα είναι από τα σημαντικότερα συστατικά του οίνου. Η βαρύτητά τους ως τέτοια έγκειται στο γεγονός ότι όχι μόνο είναι υπεύθυνα για την όξινη γεύση του οίνου αλλά και του ότι δρουν ως συντηρητικά καθώς προστατεύουν τον οίνο από μικροβιολογικές και χημικές προσβολές. Ακόμα, βοηθούν στη διατήρηση του χρώματος. Επιπλέον βάση μπορεί να δοθεί στα οργανικά οξέα καθώς μερικά από αυτά είναι ευπαθή απέναντι σε μικροοργανισμούς. Κάτι τέτοιο δεν αποτελεί

απαραίτητα πρόβλημα καθώς δίνεται η δυνατότητα μέσω τέτοιων προσβολών ο οινοποιός να προσδώσει επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. μηλογαλακτική ζύμωση).<sup>[1],[2]</sup>

Τα κυριότερα οξέα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1 Κυριότερα οξέα που περιέχονται στον οίνο**

	Οξέα σταφυλιού	
		<b>Σταθερά οξέα</b>
1	Τρυγικό οξύ	
2	Μηλικό οξύ	
3	Κιτρικό οξύ	
4	Ουρονικό οξύ	
5	Γλυκουρονικό οξύ	
6	Οξαλικό οξύ	
7	Ασκορβικό οξύ	
	<b>Οξέα ζυμώσεων και προσβολών</b>	
8	Ηλεκτρικό οξύ	
9	Γαλακτικό οξύ	
10	Κιτρομηλικό οξύ	
11	Διμεθυλογλυκερικό οξύ	
12	Πυρουβικό οξύ	
13	α-Κετογλουταρικό οξύ	
		<b>Πτητικά οξέα</b>
14	Οξικό οξύ	
15	Μυρμηκικό οξύ	
16	Προπιονικό οξύ	
17	Ισοβουτυρικό οξύ	
18	Βουτυρικό οξύ	

## Αλκοόλες

Απλές μονοαλκοόλες

### Μεθανόλη

Η μεθανόλη είναι συστατικό με μεγάλη πτητικότητα και έχει σημείο βρασμού 67,4° C. Περιέχεται σε όλους ανεξαιρέτα τους οίνους. Προέρχεται από την υδρόλυση των πηκτινών του σταφυλιού και όχι από την αλκοολική ζύμωση.

### Αιθανόλη

Η αιθανόλη αποτελεί το 10-16% του όγκου του οίνου. Το ποσοστό αυτό μπορεί να είναι ακόμα μεγαλύτερο στους ειδικούς τύπους οίνου, στους οποίους προστίθεται επιπλέον ποσότητα αλκοόλης.

Η αιθανόλη αποτελεί το κύριο προϊόν του μεταβολισμού των σακχάρων. Τα κοινά στελέχη ζυμών μπορούν να φτάσουν, όταν η σύσταση του γλεύκους το επιτρέπει, την παραγωγή της αιθανόλης στο 16%. Από αυτό το σημείο και άνω η αιθανόλη παρουσιάζει τοξικότητα για τους ζυμομύκητες με αποτέλεσμα η ζύμωση να διακόπτεται. Υπάρχουν όμως και στελέχη όπως είναι ο *Saccharomyces bayanus* που σε εξαιρετικές περιπτώσεις μπορούν να φτάσουν τον αλκοολικό βαθμό στο 18%.

Ο αλκοολικός βαθμός ή αλκοολομετρικός τίτλος του οίνου ασκεί σημαντική επίδραση στην ποιότητα στη συντήρηση και στην εμπορική αξία του οίνου.

Η αλκοόλη αποτελεί μαζί με τα αναγωγικά σάκχαρα και τη γλυκερόλη τα γλυκά συστατικά των οίνων και μετριάζουν την όξινη γεύση των οξέων και την πικράδα των φαινολικών ενώσεων.

### Ανώτερες μονοαλκοόλες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αλκοόλες που περιέχουν περισσότερα από δυο άτομα άνθρακα στο μόριό τους.

Με εξαίρεση την εξανόλη-1 η οποία προέρχεται από το σταφύλι, οι ανώτερες αλκοόλες είναι δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης.

Σαν δευτερεύοντα προϊόντα οι συγκεντρώσεις τους τείνουν να είναι σχετικά μικρές. Παρόλα αυτά όμως ασκούν από μόνες τους ή κυρίως με τους εστέρες τους σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση του αρωματικού προφίλ των οίνων.

Ο σχηματισμός τους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Χαρακτηριστικά μπορούμε να αναφέρουμε τη σύσταση του γλεύκους, τις συνθήκες αερισμού του γλεύκους κατά τη ζύμωση, το είδος των ζυμών που πραγματοποιεί τη ζύμωση, τις συνθήκες ζύμωσης (θερμοκρασία, pH) κ.α.

Οι κυριότερες από τις αλκοόλες αυτές είναι: προπανόλη-1, ισοπροπανόλη, βουτανόλη-1, ισοβουτανόλη, δευτερεύουσα βουτανόλη, μεθυλο-3 βουτανόλη-1 (ισσαμυλική), μεθυλο-2 βουτανόλη-1, πεντανόλη-1, εξανόλη-1, φαινυλο-2 αιθανόλη.

### Αρωματικές ενώσεις

Στους οίνους διακρίνονται δυο κατηγορίες αρωματικών ενώσεων. Εκείνες που συνιστούν το άρωμα στους νεαρούς οίνους και εκείνες που συνιστούν το μπουκέτο ή ανθοσμία στους παλαιωμένους.

Στην περίπτωση των νεαρών οίνων, το άρωμα συντίθεται από το άρωμα του σταφυλιού (χαρακτηριστικό για κάθε ποικιλία) και το άρωμα της ζύμωσης (χαρακτηριστικό των ζυμών και των συνθηκών ζύμωσης).

Η ανάπτυξη του μπουκέτου στους παλαιωμένους οίνους είναι αποτέλεσμα του μετασχηματισμού του αρώματος των νεαρών οίνων. Για συγκεκριμένους τύπους οίνων όπως είναι τα Madera και Xégès ο μετασχηματισμός αυτός είναι οξειδωτικός, ενώ για τους περισσότερους τύπους οίνων είναι αναγωγικός.

Υπάρχει πληθώρα ενώσεων που συμβάλουν αλλά εδώ θα αναφερθούν μερικές που θεωρούνται σημαντικότερες.

Πίνακας 2 Κυριότερες αρωματικές ενώσεις του οίνου

Κυριότερες αρωματικές ενώσεις	
Φαινυλ-2 αιθανόλη	<b>Αλκοόλες</b>
Τυροσόλη	
Οξικός αιθυλεστέρας	<b>Εστέρας</b>
Ακεταλδεΐδη	<b>Καρβονυλικές Ενώσεις</b>
Ακετάλη	
Υδροξυ-μεθυλο-φουρφουραλη	
Ακετυλο-μεθυλο-καρβινολη (ακετοΐνη)	
Διακετύλιο	
Λιναλόλη	
Νερόλη	<b>Τερπενικές Ενώσεις</b>
Γερανιόλη	
α-τερπινεόλη	

### Σάκχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούν σημαντικά συστατικά του γλεύκους διότι μέσω της αλκοολικής ζύμωσης θα μετατραπούν κυρίως σε αιθανόλη και δευτερεύοντα προϊόντα. Τα κυριότερα σάκχαρα που βρίσκονται στα σταφύλια είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Η ποσότητά τους στον καρπό εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων όπως είναι το κλίμα, οι εδαφολογικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές τεχνικές, τις οινολογικές πρακτικές, την προσβολή από ευγενή σήψη (*Botrytis Cinerea*) κ.α.

Η τελική περιεκτικότητα των οίνων σε αναγωγικά σάκχαρα τους κατηγοριοποιεί σε ξηρούς, ημίξηρους, ημίγλυκους, γλυκούς.

### Φαινολικές ενώσεις<sup>[1],[2]</sup>

Οι φαινολικές ενώσεις ως συστατικά των οίνων διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες. Αυτές είναι τα φαινολικά οξέα, οι φλαβόνες, οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες.

Στο σύνολό τους οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον καθώς συνεισφέρουν στη διαμόρφωση γευστικών χαρακτηριστικών των οίνων (τραχύτητα, στυφάδα), αρωματικών χαρακτηριστικών (π.χ. βανιλίνη, άρωμα βανίλιας, καφεϊκό οξύ, άρωμα καφέ), προσφέρουν όμως και προστασία στον οίνο από οξειδώσεις και βακτηριακές προσβολές. Μεγάλος, όμως, είναι και ο ρόλος τους στην παλαίωση και σε διάφορες τεχνολογικές επεξεργασίες (π.χ. κολλάρισμα).

Απαντώνται στα στερεά μέρη των σταφυλιών και είναι αυτές που κάνουν τη διαφορά ανάμεσα στους ερυθρούς και λευκούς οίνους.

Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται στα βενζοϊκά (p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, βανιλλικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, σαλικυλικό οξύ, γεντισικό οξύ) και τα κινναμωμικά οξέα (p-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ).

Οι φλαβανόλες αποτελούν τις κίτρινες χρωστικές των φυτών. Αυτές είναι η καμπφερόλη, η κερκετίνη και η μυρισετίνη. Τα συστατικά αυτά βρίσκονται στο φλοιό των σταφυλιών. Φυσικό λοιπόν είναι στους ερυθρούς οίνους να συναντούνται ενώ αντίθετα στους λευκούς να μη βρίσκονται παρά ίχνη αυτών. Αυτό γιατί στην ερυθρή οινοποίηση υπάρχει το στάδιο της εκχύλισης, της συμπαραμονής δηλαδή στέμφυλων και γλεύκους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Οι ανθοκυάνες είναι οι ερυθρές χρωστικές του σταφυλιού οι οποίες, εκτός από ελάχιστες ποικιλίες, βρίσκονται αποκλειστικά στο φλοιό των ραγών. Η μαλβιδίνη είναι η σημαντικότερη από άποψη ποσότητας χρωστική και για αυτό το λόγο πολλές φορές ονομάζεται και οινιδίνη.

Οι ταννίνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στην χημική τους δομή. Για τον λόγο αυτό με σκοπό να ορισθούν οι ταννίνες γίνεται χρήση των ιδιοτήτων τους μερικές από τις οποίες είναι γνωστές στον άνθρωπο αρκετούς αιώνες (χρήση ταννινών για την κατεργασία δέρματος). Στην οινολογία το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν είναι ότι καθιζάνουν τις πρωτεΐνες του σιέλου με αποτέλεσμα να οφείλονται για την τραχύτητα, στυφάδα και πικρή γεύση των οίνων. Επίσης, βοηθούν στο κολλάρισμα του οίνου καθώς όταν καθιζάνουν με κολλαριστικά προϊόντα (ζελατίνη, αλβουμίνη, κ.α.) παρασύρουν διάφορα αιωρήματα.

## Φασματοσκοπία NMR

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο ένας πυρήνας μέσα σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά και εκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το φαινόμενο αυτό ανακαλύφθηκε το 1945 ξεχωριστά από τις ομάδες των Purcell και Bloch. Πάνω στο φαινόμενο αυτό βασίζεται η φασματοσκοπία NMR, η οποία χρησιμοποιεί τις μαγνητικές ιδιότητες ενός ατομικού πυρήνα για να προσδιορίσει τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των ατόμων ή μορίων μέσα στο διάλυμα. Η φασματοσκοπία NMR είναι εφαρμόσιμη σε οποιοδήποτε δείγμα περιέχει περιττό αριθμό πρωτονίων ή νετρονίων ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ), σε οποιαδήποτε φάση δείγματος (στερεή, υγρή, αέρια) και σε οποιοδήποτε μέγεθος μορίων. Για τους παραπάνω λόγους η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση διαφόρων ουσιών.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για την διέγερση των πυρήνων έχει συχνότητα  $3 \cdot 10^8 - 3 \cdot 10^9$  Hz, βρίσκεται δηλαδή στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων.

Χρησιμεύει τόσο για την ποιοτική όσο και για την ποσοτική ανάλυση, καθώς το εμβαδόν των κορυφών είναι ανάλογο του αριθμού των πυρήνων που ευθύνονται για

την κορυφή. Έτσι επιτυγχάνεται απευθείας ποσοτικός προσδιορισμός του δείγματος χωρίς να προηγηθεί κάποια διαδικασία βαθμονόμησης.<sup>[6]</sup>

## Σκοπός Πτυχιακής εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάλυση ερυθρών ξηρών οίνων ΠΟΠ με τη χρήση της Φασματοσκοπίας NMR και της χημειομετρίας. Τα εμπορικά δείγματα οίνου που αναλύθηκαν προέρχονταν από γηγενείς ποικιλίες οινοστάφυλων της Κρήτης (Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι). Η Φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού μη-πτητικών οργανικών ενώσεων του οίνου. Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός των πολυφαινολών του οίνου με την χρήση της Φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR, η οποία βασίστηκε στην εκχύλιση στερεάς φάσης για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος του οίνου. Η χημειομετρική ανάλυση των  $^1\text{H}$  NMR φασματικών δεδομένων των οίνων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων ανάλυσης (PCA, OPLS-DA).

## Στατιστική ανάλυση

### Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) θεωρείται η πιο εύκολη και εύχρηστη τεχνική αναγνώρισης προτύπων. Χρησιμοποιείται για να αντιμετωπίσει μεγάλο όγκο δεδομένων που προκύπτουν από μια ανάλυση. Γενικά απεικονίζει οποιαδήποτε σχέση (τάσεις, ακραίες τιμές) μεταξύ των παρατηρήσεων (δείγματα).

Επίσης με την μέθοδο PCA είναι δυνατή η ανακάλυψη ισχυρών και μέτριων έκτροπων δειγμάτων – σημείων. Έκτροπα σημεία είναι οι παρατηρήσεις με τιμές που δεν προσαρμόζονται στο μοντέλο. Επομένως η αναγνώριση ισχυρά έκτροπων σημείων είναι σημαντική για την αξιολόγηση της βάσης δεδομένων.

Η ποιότητα των μοντέλων που έχουν καλή προσαρμογή, περιγράφονται με την μεταβλητή  $R^2$ , ενώ η προβλεπτική ικανότητα με την μεταβλητή  $Q^2$ . Η  $R^2$  ( $0 \leq R^2 \leq 1$ ) εξηγεί την μεταβολή στο μοντέλο PCA, αποτελώντας έτσι ένα ποσοτικό μέτρο του πόσο καλά ήταν δυνατόν να αναπαραχθούν τα δεδομένα. Η συνολική προγνωστική ικανότητα του μοντέλου αξιολογείται από το  $Q^2$  ( $Q^2(\text{cum}) \geq 0.80$ ), το οποίο αντιπροσωπεύει το κλάσμα της μεταβολής του  $Y$  που μπορεί να προβλεφθεί από το μοντέλο.

### OPLS-DA

Η μέθοδος αυτή είναι προέκταση της PCA και χρησιμοποιείται σε περίπτωση που θέλουμε να προβλέψουμε την ομάδα ή την τάξη στην οποία ανήκει ένα σύνολο δειγμάτων, με βάση ορισμένες πειραματικές μεταβλητές διαχωρισμού ή πρόγνωσης.



## Πειραματική διαδικασία

### Δείγματα

Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι εμπορικά δείγματα οίνου από τις ποικιλίες Κοτσιφάλι και Μανδηλάρι. Υπήρχαν και μονοποικιλιακά δείγματα καθώς και μείγματα των ποικιλιών. Η εσοδεία, ο περιέκτης και ο χρόνος παραμονής στον περιέκτη ποικίλουν. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα στοιχεία των δειγμάτων.

Πίνακας 3 Πληροφορίες διεγμάτων οίνου που αναλύθηκαν. Η περίοδος του τρύγου και ο περιέκτης διαφέρουν. Και οι δυο αυτοί παράγοντες συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση του οίνου.

Όνομα	Ποικιλία	Παραγωγός	Εσοδεία	Περιέκτης	A/A
Μαυρολιάτης	Λιάτικο	ΕΑΣ Ηρακλείου	2007	Γαλλική δρυς	1
Κοτσιφάλι	Κοτσιφάλι	Ζαχαριουδακης	2011	Γαλλική δρυς	2
Λαγκάδα	Μανδηλάρι	Mediterra	2013	Δεξαμενή	3
Κοτσιφάλι	Κοτσιφάλι	Μιχαλάκης	2010	Γαλλική&Αμερικάνικη δρυς	4
Ιδαία γη	KM	Ιδαία οينوποιητική	2010	Γαλλική δρυς	5
Domain Paterianakis	KM	Κτήμα Πατεριανάκη	2010	Γαλλική δρυς	6
Κοτσιφάλι Μαντηλάρι	KM	ΕΑΣ Πεζών	2012	Γαλλική δρυς	7
Καρίκι	KM	Αλεξάκης	2012	Δεξαμενή	8
Λαγκάδα	Μανδηλάρι	Mediterra	2014	Δεξαμενή	9

### Προετοιμασία δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία, κάθε δείγμα οίνου, αναλύθηκε από δυο σκοπιές. Η μια είναι αυτή της ανάλυσης του φαινολικού προφίλ του οίνου και η άλλη αφορά την ανάλυση όλων των συστατικών του δείγματος.

#### Ανάλυση του φαινολικού προφίλ των οίνων με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Για την ανάλυση του φαινολικού προφίλ των δειγμάτων οίνου απαραίτητη ήταν η απομόνωση των φαινολικών συστατικών από το δείγμα. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση στήλης εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).

Αρχικά, σε 2 ml οίνου προστίθενται 2 ml διαλύματος HCl συγκέντρωσης 0,01N. Έπειτα, το η παραπάνω ποσότητα μεταφέρεται σε στήλη SPE η οποία έχει ενεργοποιηθεί με τη προσθήκη 3 ml MeOH και 3 ml HCl 0.01 N. Αφού το δείγμα

διέλθει από τη στήλη, στη συνέχεια το νιάλ που το περιείχε ξεπλένεται με 4 ml HCl 0.01 N και η ποσότητα αυτή περνάει στη στήλη.

Από τη στήλη λαμβάνεται το πρώτο κλάσμα το οποίο και απορρίπτεται καθώς δεν έχει κάποια σημασία για αυτήν την μελέτη. Η στήλη στη συνέχεια στεγνώνει με τη χρήση κενού για περίπου 30 min.

Αφού η στήλη έχει πλέον στεγνώσει, αυτό που έχει μείνει είναι οι φαινολικές ενώσεις. Για να ληφθούν αυτές, από τη στήλη διέρχονται 40 ml μείγματος ακετονιτρίλιο : HCl σε αναλογία 95:5. Λαμβάνετε το έκλουσμα και πλέον θα ονομάζεται δεύτερο κλάσμα.

Το δεύτερο κλάσμα οδηγείτε σε ρότορα όπου και απομακρύνεται ο διαλύτης (Ac:HCl) μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 700 ml MeOD που περιείχε 0,05% w/v τερεφθαλικού οξέος. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε NMR tubes 5 mm για την λήψη φασμάτων.<sup>[9]</sup>

#### Προετοιμασία δειγμάτων σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D<sub>2</sub>O)

2 ml δείγματος οίνου λυοφιλοποιήθηκαν και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 400 ml D<sub>2</sub>O και 200 ml oxalate buffer (pH=4). Εν συνεχεία, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 13000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε σωληνά NMR 5 mm για την λήψη φασμάτων.

#### Φάσματα NMR

Για την λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H NMR των δειγμάτων οίνου χρησιμοποιήθηκε η ακολουθία παλμών WET για την καταστολή των ισχυρών σημάτων του νερού και της μεθανόλης στο φαινολικό κλάσμα του οίνου και η ακολουθία παλμών zgpg για την καταστολή του σήματος του νερού στο συνολικό κλάσμα του οίνου.

Η ποσοτική ανάλυση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με την ολοκλήρωση των κορυφών των φασμάτων που αντιστοιχούσαν σε γνωστές ενώσεις με το λογισμικό WIN-NMR, έχοντας λάβει υπ' όψιν τον αριθμό των πρωτονίων που συνεισφέρουν σε κάθε σήμα. Οι ποσοτικές ολοκληρώσεις των φασμάτων NMR έγιναν σε σχέση με το γνωστής έντασης ολοκλήρωμα της κορυφής των εσωτερικών προτύπων. Στην περίπτωση του φαινολικού κλάσματος χρησιμοποιήθηκε DMT ενώ στο συνολικό κλάσμα του οίνου TSP.

#### Μεταβολομική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SIMCA 13.02 για την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων του οίνου με τη χρήση μοντέλων ανάλυσης κύριων συνηστωσών (PCA) και ανάλυσης δικαριτότητας μερικών ορθογωνικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA). Η PCA είναι μια μη επιβλεπόμενη στατιστική μέθοδος στην οποία η διαφοροποίηση των δειγμάτων γίνεται αποκλειστικά με βάση τις πειραματικές τιμές των διαφόρων μεταβλητών τους. Στην μέθοδο OPLS-DA η διαφοροποίηση του μεταβολομικού προφίλ των δειγμάτων οίνου πραγματοποιήθηκε με βάση την ποικιλία και επιπλέον έγινε σύγκριση των εμπορικών εμφιαλωμένων οίνων με μια μεταβολομική βάση δεδομένων από μονοποικιλιακά δείγματα (Κοτσιφάλι, Μαντηλάρι) που έχει δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας.<sup>[7]</sup>

## Αποτελέσματα-Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση μονοδιάστατης και της διδιάστατης Φασματοσκοπίας NMR και την χρήση βάσεων δεδομένων.<sup>[8]</sup>

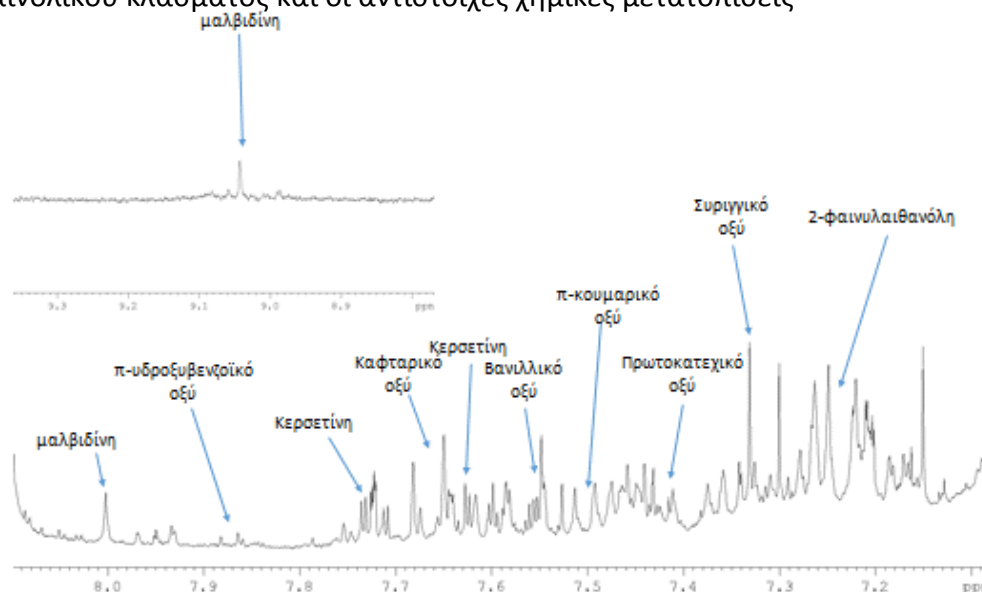
### Ανάλυση φασμάτων φαινολικού προφίλ του οίνου

Αναλύοντας το φάσμα του συμπυκνωμένου φαινολικού κλάσματος των οίνων βρέθηκαν οι εξής ενώσεις:

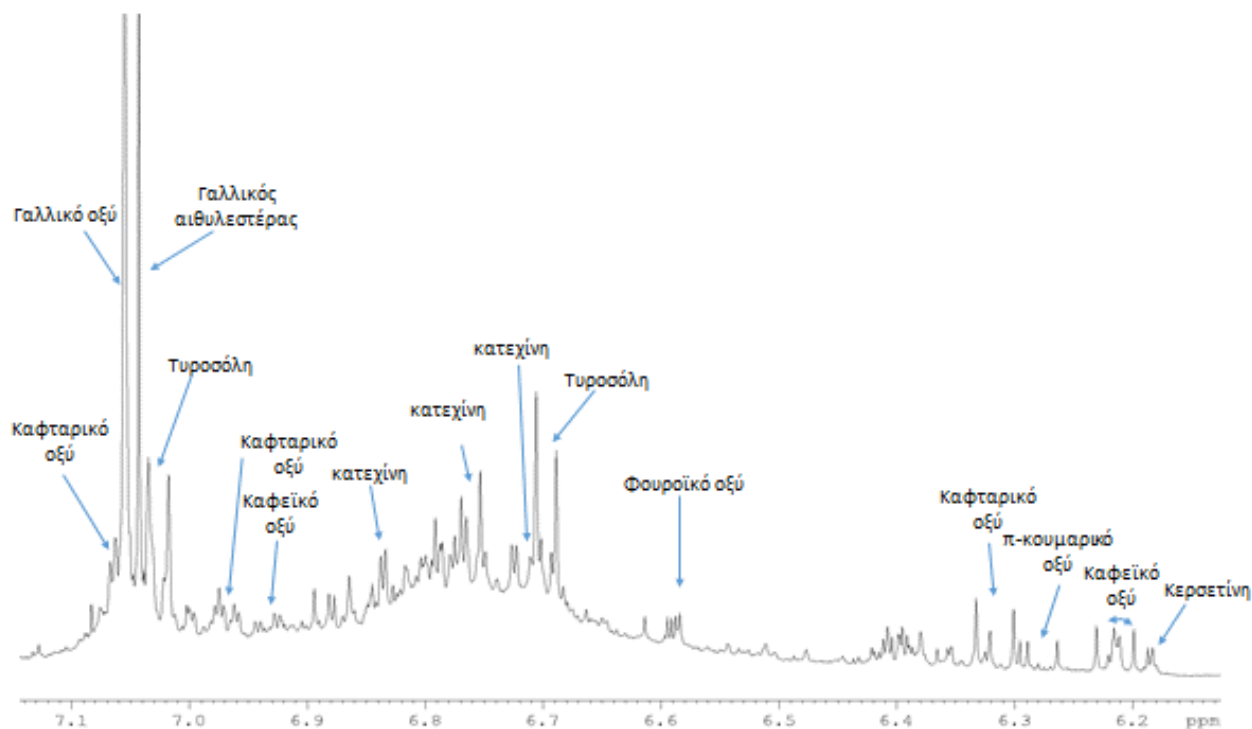
Πίνακας 4 Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο φαινολικό κλάσμα του οίνου και οι χημικές τους μετατοπίσεις στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR.

Ενώσεις	Χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm)
Μαλβιδίνη	9.05, 8.0
ρ-υδροξυβενζοϊκό οξύ	7.87
Κερσετίνη	7.7, 6.18
Καφταρικό οξύ	7.66, 7.06, 6.97, 6.78, 6.33
ρ-κουμαρικό οξύ	7.61, 6.26
Πρωτοκατεχικό οξύ	7.42
Συριγγικό οξύ	7.33
2-φαινυλαιθανόλη	7.26, 7.19, 3.74, 2.71
Γαλλικό οξύ	7.05
Γαλλικός αιθυλεστέρας	7.04
Τυροσόλη	7.02, 6.69, 3.68, 2.71
Φουροϊκό οξύ	6.58
Καφεϊκό οξύ	6.2
Βανιλλικό οξύ	3.89

Στις παρακάτω δυο εικόνες φαίνονται οι αναθέσεις των κορυφών σε φάσμα φαινολικού κλάσματος και οι αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις

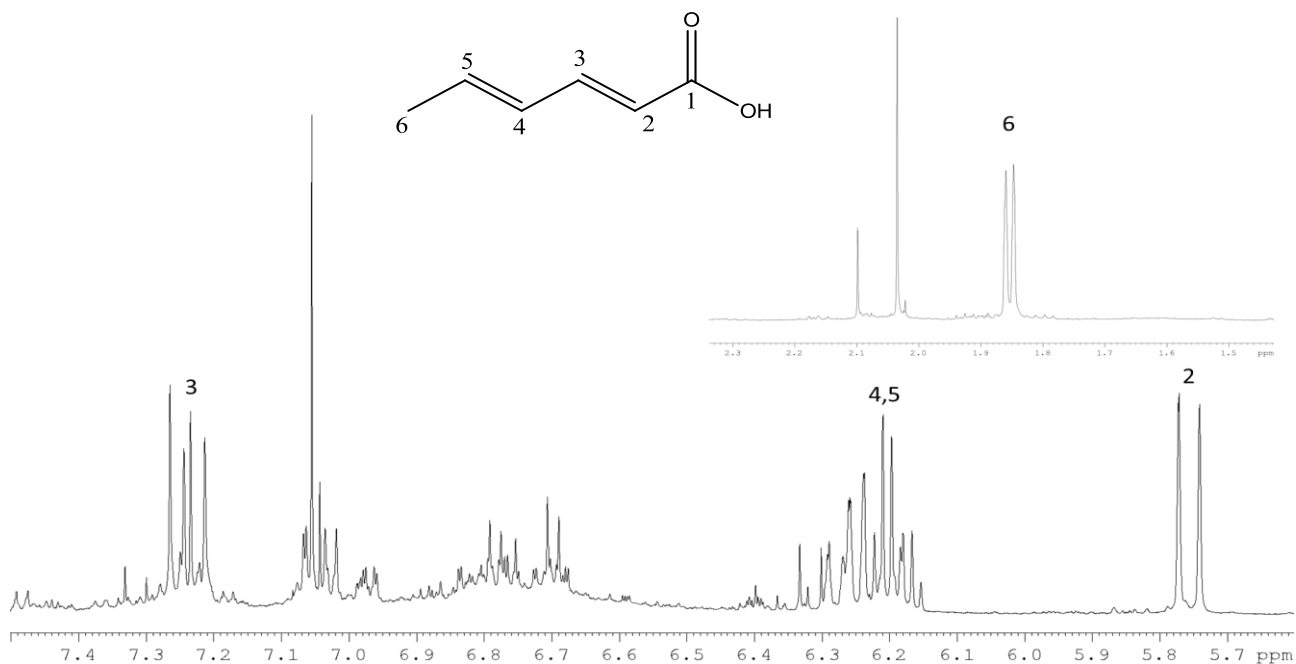


Εικόνα 1 Αρωματική περιοχή (7.1-8.1 ppm) του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του φαινολικού κλάσματος εμπορικού δείγματος οίνου και οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν.



Εικόνα 2 Αρωματική περιοχή (6.1-7.1 ppm) του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του φαινολικού κλάσματος εμπορικού δείγματος οίνου και οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν.

Σε ένα δείγμα οίνου ανιχνεύτηκε σημαντική ποσότητα σορβικού οξέος του οποίου οι αναθέσεις και οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα. Η ΕΕ ορίζει σύμφωνα με τον Κανονισμό 606/2009 για τις εγκεκριμένες οινολογικές πρακτικές και επεξεργασίες ως ανώτατο όριο προσθήκης τα 200 mg/l.<sup>[5]</sup>



Εικόνα 3 Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ενός δείγματος εμπορικού οίνου και η πλήρης ανάθεση των κορυφών του σορβικού οξέος.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων σε mg/L όπως αυτές υπολογίστηκαν από τις ολοκληρώσεις των αντίστοιχων κορυφών. Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων χρησιμοποιήθηκε το εσωτερικό πρότυπο DMT (dimethyl terephthalate).

Πίνακας 5 Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με την χρήση <sup>1</sup>H NMR στο φαινολικό κλάσμα του οίνου και οι ποσότητες αυτών (mg/L οίνου) όπως υπολογίστηκαν από την ολοκλήρωση των αντίστοιχων κορυφών.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Μαβιδίνη		4,93	32,07	4,93	9,86	29,60	7,40	12,33	32,07
DMT	175,01	175,01	175,01	175,01	175,01	175,01	175,01	175,01	175,01
π-υδροξυβενζοϊκό οξύ	0,76	0,76	0,38	0,76	0,76	0,38	0,76	0,76	0,76
κερσετίνη	1,51	4,53	1,51	7,55	3,02	3,02	9,06	3,02	0
Πρωτοκατεχικό οξύ		7,71			10,01	9,24	8,47	6,93	6,16
Συριγγικό οξύ		1,32	1,16	1,48	1,15	0,82	0,49	0,49	0,49
2-φαινυλαιθανόλη	17,41	58,03	15,57	36,64	39,70	37,25	46,42	37,86	33,59
Γαλλικό οξύ	41,26	58,27	37,00	122,49	19,56	19,13	45,08	31,47	41,68
Γαλλικός αιθυλεστέρας				30,22	4,95	4,45	8,91	7,43	7,43
τυροσόλη	14,16	44,21	19,34	19,68	29,70	26,25	28,32	16,23	20,37
Καφταρικό οξύ	115,52	56,20	42,15	18,73	88,98	78,05	60,88	9,36	28,10
κατεχίνη		11,61	17,41	24,67					23,22
Φουροϊκό οξύ	6,16	5,04	2,24	7,28	2,80	2,80	3,36	2,24	1,68
π-κουμαρικό οξύ		5,85		4,38	2,92	1,46	2,92	4,38	4,38
Καφεϊκό οξύ	7,21	5,40	5,40	10,80	3,60	1,80	5,40	5,40	5,40
Βανιλλικό οξύ	3,36	2,52	2,94	7,56	2,52	2,24	1,68	4,20	1,68
Σορβικό οξύ	0	0	157,16	0	0	0	0	0	0

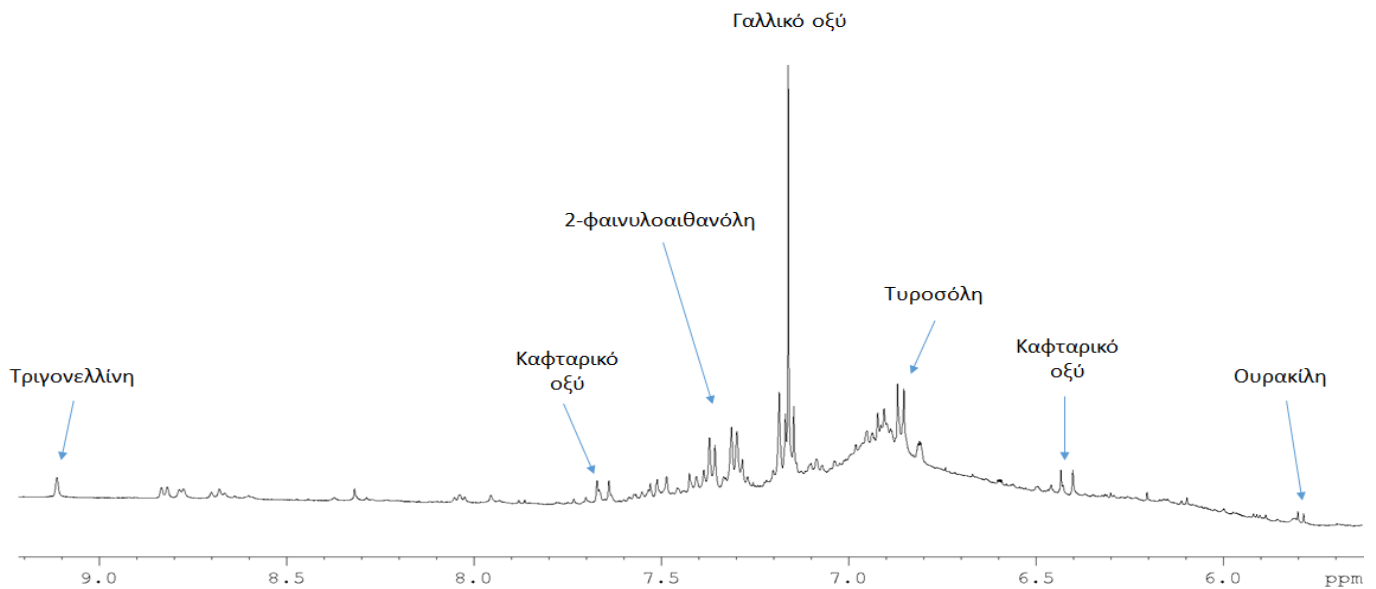
## Ανάλυση φασμάτων σε διαλύτη D<sub>2</sub>O

Στα φάσματα με διαλύτη δευτεριωμένο νερό, παρατηρούμε τις κορυφές των οργανικών μη πτητικών ενώσεων του οίνου. Μπορούμε λοιπόν να παρατηρήσουμε οργανικά οξέα, σάκχαρα, ορισμένα αμινοξέα όπως και ανώτερες αλκοόλες. Στον παρακάτω πίνακα παραθέτονται οι ενώσεις και οι αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις.

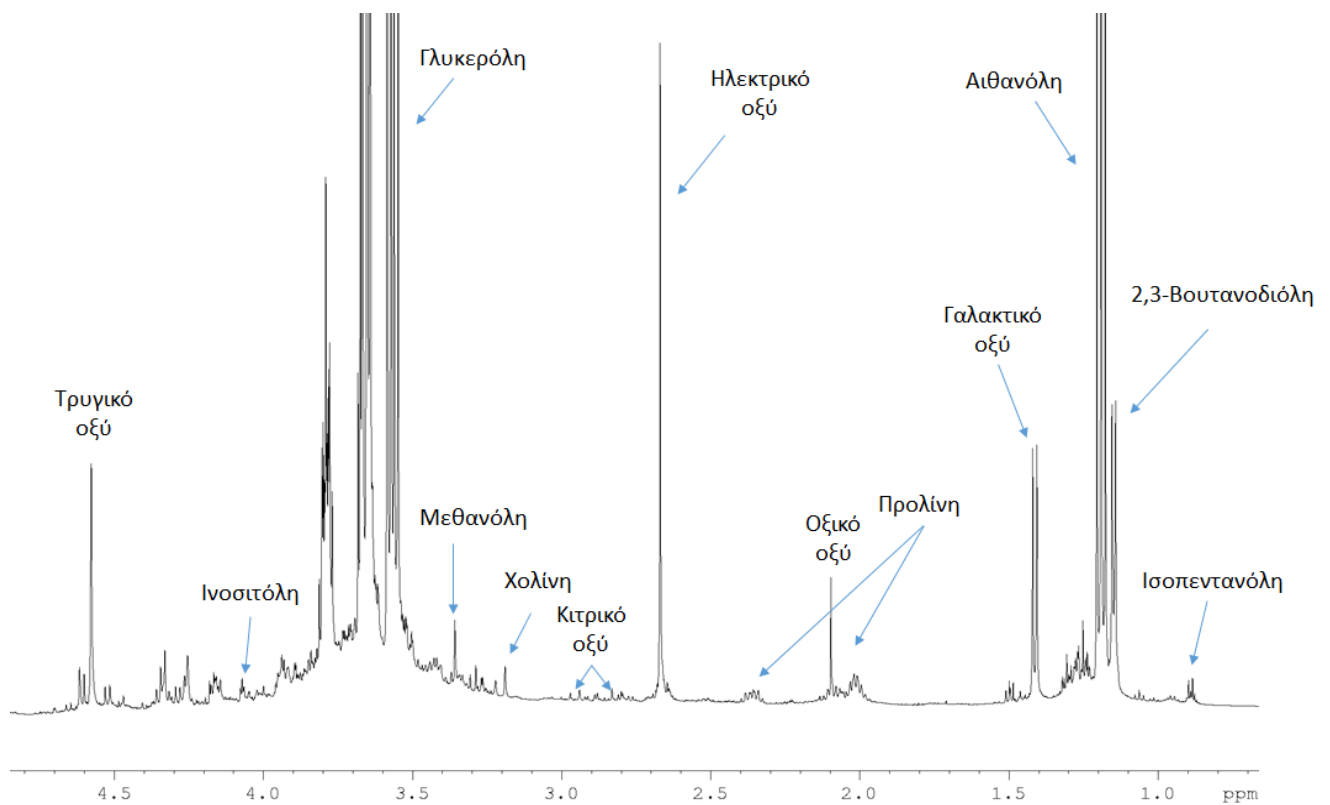
Πίνακας 6 Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο ολικό κλάσμα του οίνου με <sup>1</sup>H NMR και οι χημικές τους μετατοπίσεις.

Ενώσεις	Χημικές μετατοπίσεις (ppm)
Τριγονελίνη	8.81, 9.11
Ουριδίνη	7.86
2-φαινυλαιθανόλη	7.30
Γαλλικό οξύ	7.15
Τυροσόλη	6.86, 7.18
Φουροϊκό οξύ	6.80
Καφταρικό οξύ	6.41, 7.64
Ουρακίλη	5.79
Γαλακτουρονικό οξύ	5.32
β-γλυκόζη	3.25, 4.65
Τρυγικό οξύ	4.57
Ινοσιτόλη	4.07
Φρουκτόζη	4.03
Γλυκερόλη	3.57, 3.66, 3.78
Χολίνη	3.19
Κιτρομηλικό οξύ	1.42
Κιτρικό οξύ	2.91, 2.77
Ηλεκτρικό οξύ	2.65
Προλίνη	2.01, 2.09
Οξικός αιθυλεστέρας	2.10
Ισοπεντανόλη	1.66
Αλανίνη	1.51
Λακτικό οξύ	1.41
2,3-βουτανοδιόλη	1.15
α-γλυκόζη	5.23
Μηλικό οξύ	2.89
Μεθανόλη	3.36

Στις παρακάτω δυο εικόνες παρουσιάζονται οι αναθέσεις των κορυφών στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR στο ολικό κλάσμα δείγματος οίνου.



Εικόνα 4 Αρωματική περιοχή φάσματος  $^1\text{H}$  NMR εμπορικού δείγματος οίνου και η ανάθεση των κυριότερων ενώσεων που ταυτοποιούνται σε αυτό.



Εικόνα 5 Αλειφατική περιοχή φάσματος  $^1\text{H}$  NMR εμπορικού δείγματος οίνου και η ανάθεση των κυριότερων ενώσεων που ταυτοποιούνται σε αυτό.

Πίνακας 7 Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με την χρήση <sup>1</sup>H NMR στο ολικό κλάσμα και οι ποσότητες αυτών (mg/L οίνου) όπως υπολογίστηκαν από την ολοκλήρωση των αντίστοιχων κορυφών.

	1	2	3	4	5	6	7	8
Τριγονελλίνη	4,74	5,12	3,70	5,42	6,65	4,01	6,73	5,63
Ουριδίνη	1,83	2,48	1,30	4,72	2,16	1,95	2,53	4,68
2-φαινουαιθανολη	18,4	42,0	30,44	34,07	28,42	34,31	28,83	25,13
Γαλλικό οξύ	52,71	63,53	22,63	138,55	15,22	37,67	40,93	65,02
Τυροσόλη	12,96	31,96	19,00	23,77	26,20	18,65	21,34	20,68
Φουροϊκό	7,55	29,16	6,95	20,02	16,40	37,88	13,75	13,32
Καφταρικό	46,96	27,55	40,89	19,11	62,34	44,63	35,42	17,43
Ουρακίλη	3,04	3,29	86,57	4,35	1,30	1,09	2,14	2,11
Γαλακτουρονικό οξύ	242,70	323,39	230,00	542,55	471,08	295,77	395,21	304,31
Τρυγικό οξύ	684,92	614,32	495,80	909,76	698,07	1273,47	1381,39	1115,78
Ινοσιτόλη	312,62	482,21	214,46	400,31	392,35	426,99	315,28	327,04
Φρουκτόζη	24,98	65,63	41,95	92,00	6,12	15,11	23,35	334,20
Γλυκερόλη	4823,41	7248,37	4412,82	6782,47	8180,38	4319,39	6508,79	6556,44
Μεθανόλη	10,51	32,11	13,89	20,33	31,88	9,33	21,65	26,97
Χολίνη	21,74	31,01	17,89	36,93	24,73	24,06	19,43	29,79
Κιτρικό οξύ	0	499,74	0	0	96,35	102,48	81,09	26,82
Μηλικό οξύ	0	0	0	0	28,71	0	151,62	416,46
Ηλεκτρικό οξύ	397,58	803,00	520,37	665,36	941,86	825,38	754,17	709,87
Προλίνη	239,03	608,36	208,16	349,87	456,56	74,88	269,95	440,12
Οξικό οξύ	87,72	115,92	63,44	172,24	124,39	101,73	87,63	102,76
Ισοπεντανόλη	21,75	40,87	16,98	52,79	34,40	18,09	20,37	23,45
Αλανίνη	15,65	23,15	9,09	29,73	16,28	1,64	10,98	10,54
Λακτικό οξύ	515,33	907,24	503,39	1022,09	718,08	872,80	634,65	493,05
2,3-βουτανοδιόλη	251,71	355,79	199,26	330,14	449,32	334,97	421,44	426,12
α-γλυκόζη	6,07	241,51	26,11	13,58	0	26,05	28,62	62,60
β-γλυκόζη	28,30	203,75	58,17	122,20	13,29	35,14	51,54	204,01
Σορβικό οξύ	0	0	174,34	0	0	0	0	0

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι ποσότητες των ενώσεων όπως αυτές υπολογίστηκαν από τις ολοκληρώσεις των αντίστοιχων κορυφών.

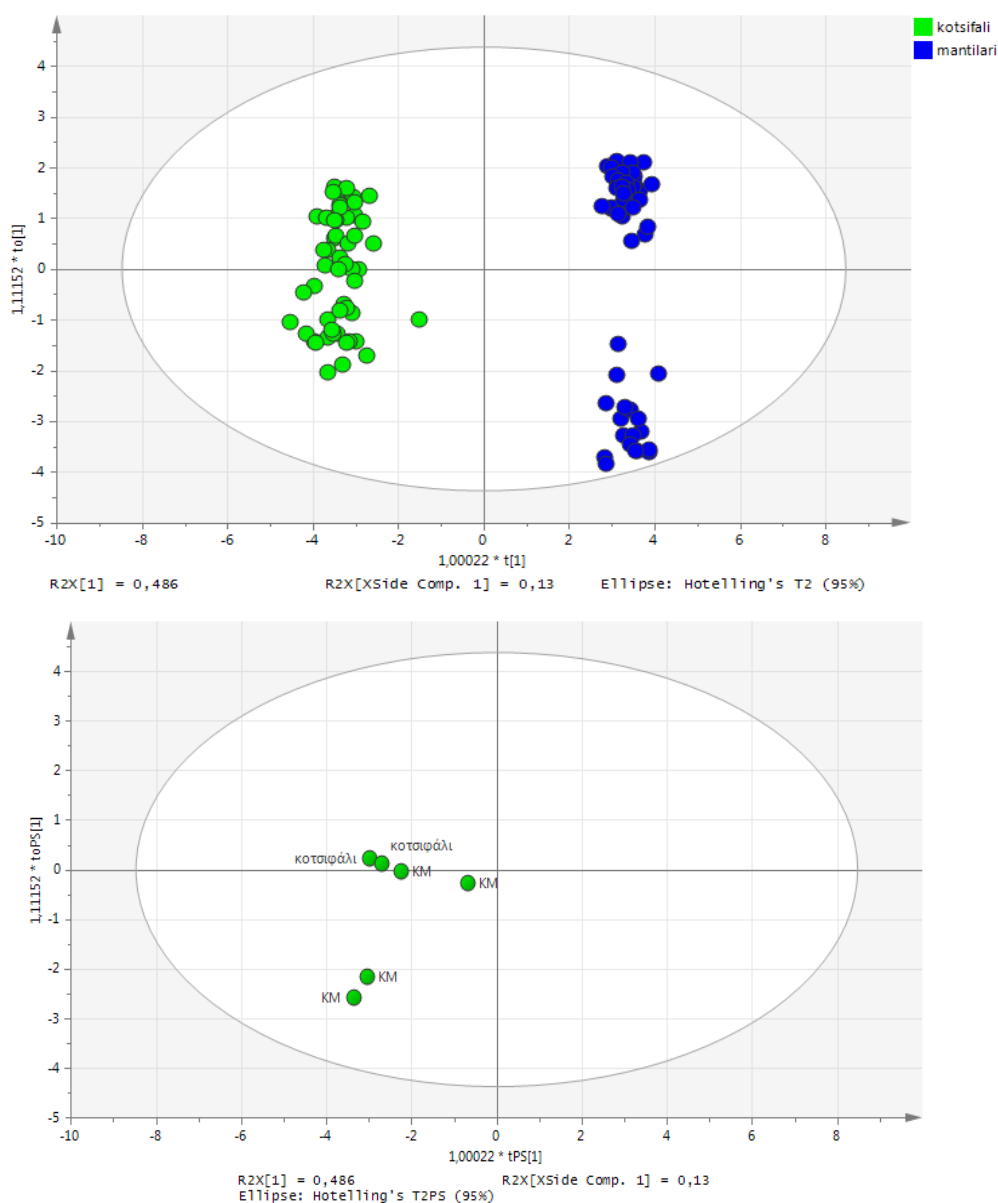


## Στατιστική ανάλυση

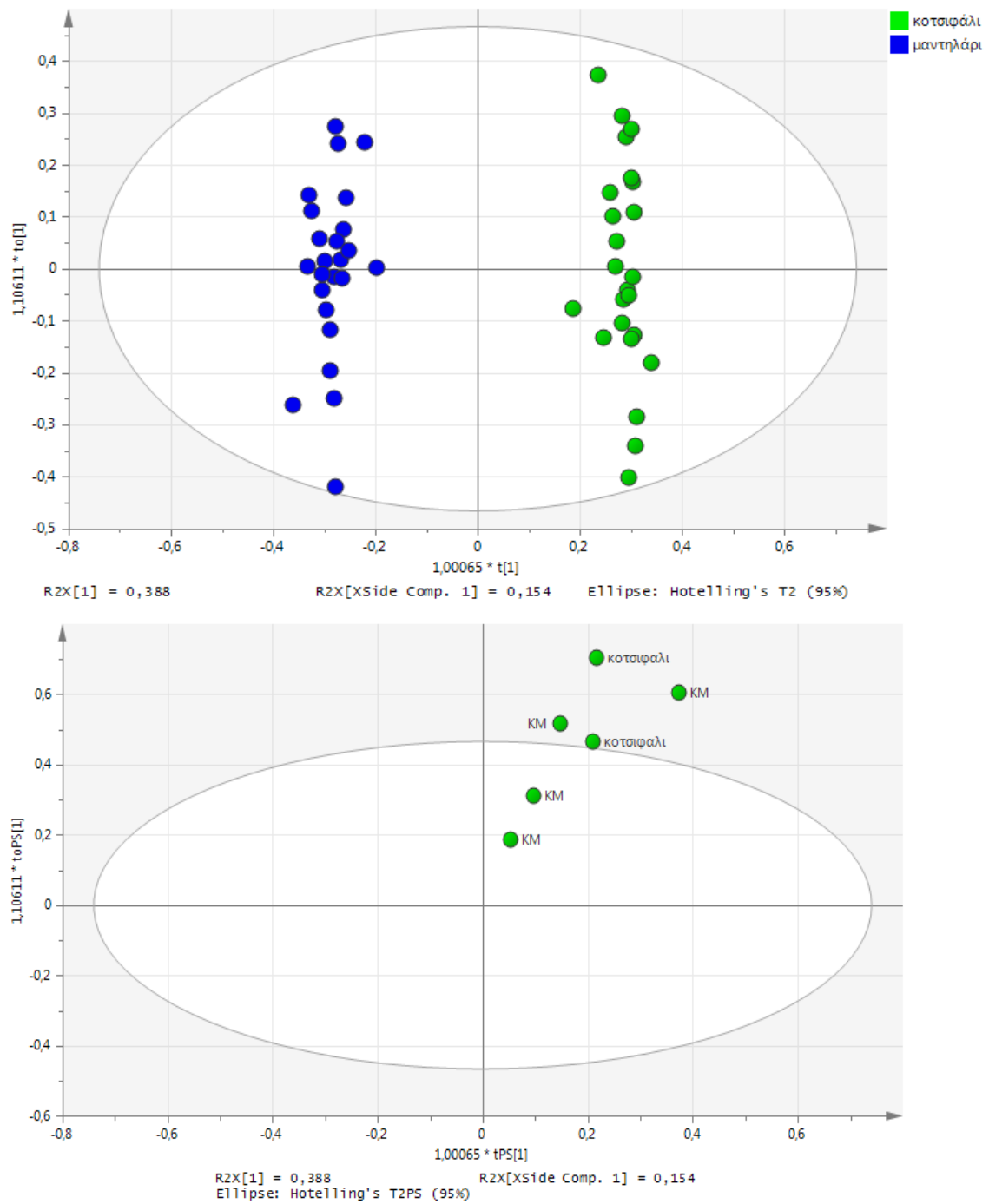
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν δυο ειδών αναλύσεις. Στοχευμένη ανάλυση στην οποία τα δεδομένα για κάθε μεταβολίτη εισήχθησαν σε μια φόρμα, καθώς και μη στοχευμένη στην οποία ολόκληρα τα φάσματα χρησιμοποιούνται απευθείας ως δεδομένα εισόδου των στατιστικών μοντέλων χωρίς ποσοτικοποίηση των επιμέρους χημικών συστατικών τους.<sup>[7]</sup>

Χρησιμοποιώντας βάση δεδομένων για κάθε ποικιλία που είχε δημιουργηθεί στο εργαστήριό μας, έγινε δυνατή η δημιουργία μοντέλου πρόβλεψης σύστασης των δειγμάτων.

Όπως φαίνεται και από τις παρακάτω εικόνες είναι δυνατός ο διαχωρισμός της ποικιλίας για το συνολικό κλάσμα του οίνου αλλά και για το φαινολικό προφίλ αυτού αντίστοιχα.



Εικόνα 6 (Πάνω) OPLS-DA του συνολικού κλάσματος των ερυθρών οίνων (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι) (Κάτω) το μοντέλο πρόβλεψης των δειγμάτων που αναλύθηκαν σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό.



Εικόνα 7 (Πάνω) OPLS-DA του φαινολικού κλάσματος των ερυθρών οίνων (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι) και (Κάτω) το μοντέλο πρόβλεψης των δειγμάτων που αναλύθηκαν σε διαλύτη δευτεριωμένη μεθανόλη.

## Συμπεράσματα

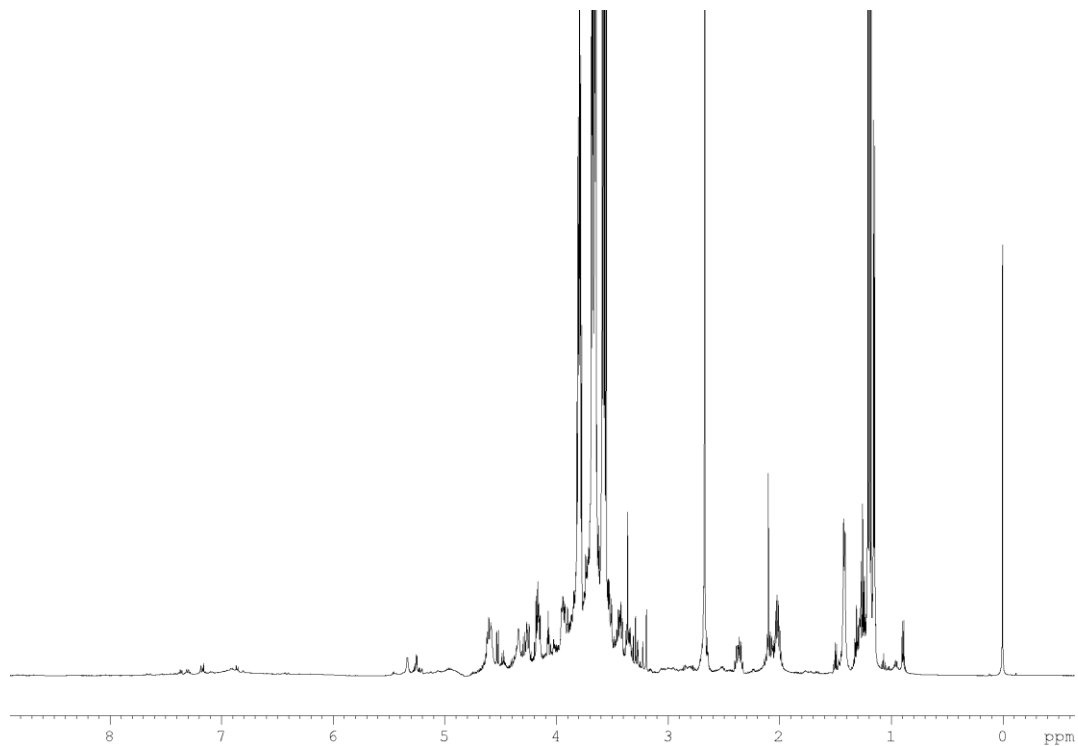
Η φασματοσκοπία NMR με τα πολύ μικρά όρια ανίχνευσης επιτρέπει μια εις βάθος ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του οίνου, την ανίχνευση και ταυτοποίηση ενώσεων που βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες καθώς και την ποσοτικοποίηση αυτών με πολύ καλή ακρίβεια.

Η μεταβολομική ανάλυση NMR σε συνδυασμό με κατάλληλα στατιστικά πολυπαραμετρικά μοντέλα επέτρεψε τον επιτυχή διαχωρισμό των εμπορικών δειγμάτων οίνου με βάση την σύστασή τους (μονοποικιλιακά-μίγματα Κοτσιφάλι-Μαντηλάρι).

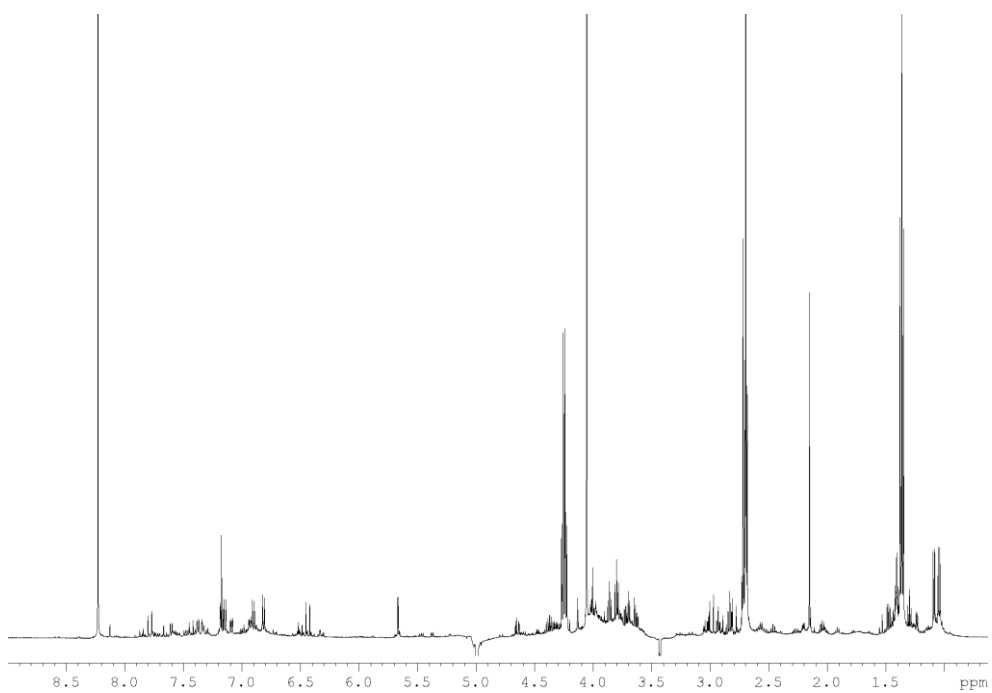
Η ανάπτυξη εκτεταμένων μεταβολομικών βάσεων δεδομένων NMR και για άλλες σημαντικές τοπικές κρητικές ποικιλίες οινοστάφυλων θα επιτρέψει την ανάδειξη του οινοποιητικού δυναμικού και θα αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο και την αυθεντικοποίηση των Κρητικών οίνων.

## Παράρτημα

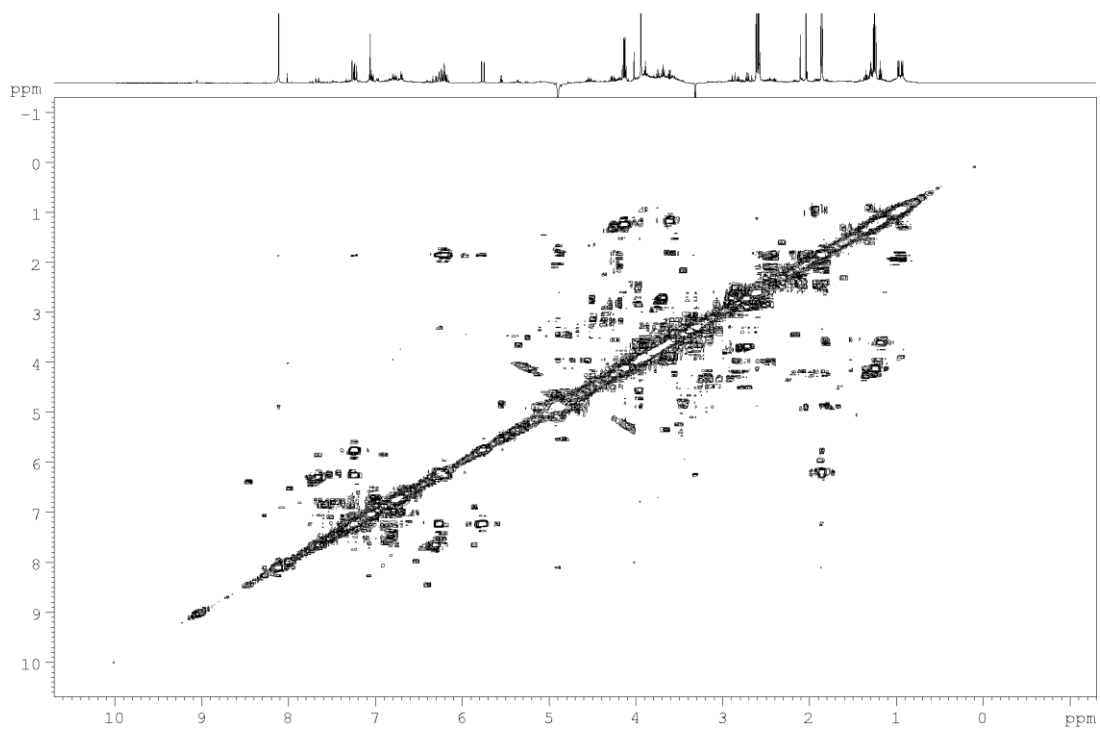
**Μονοδιάστατο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR εμπορικού δείγματος οίνου σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$**



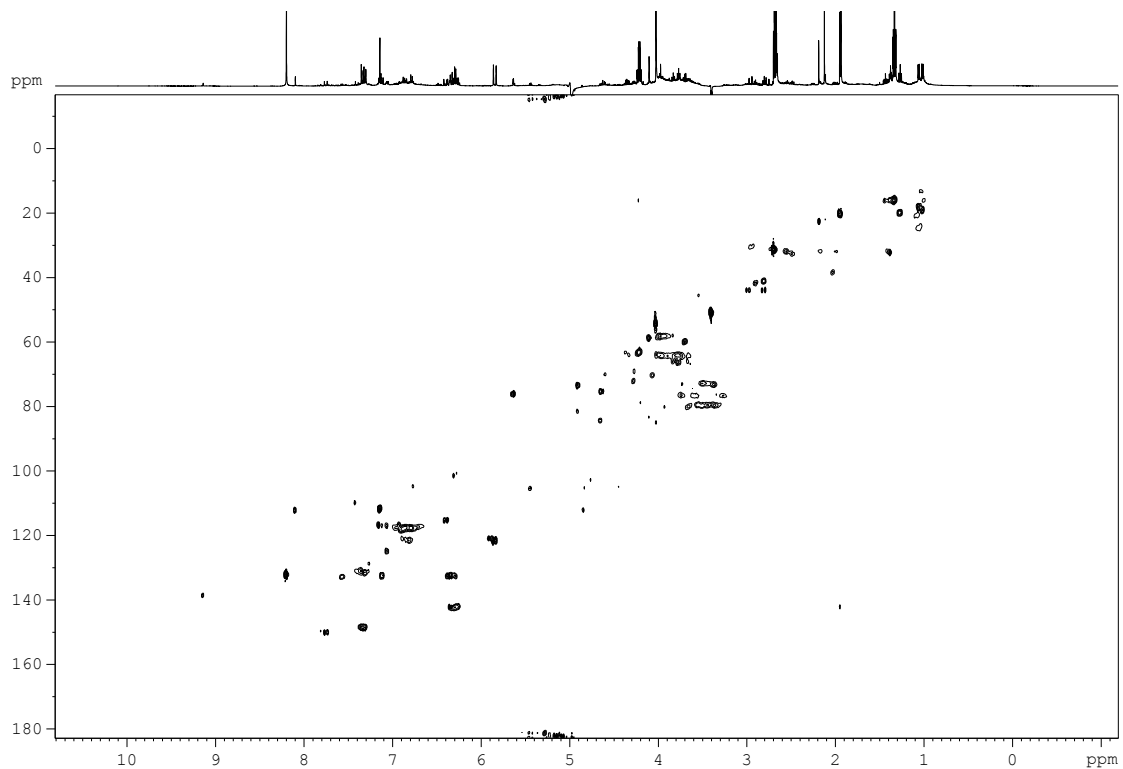
**Μονοδιάστατο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR φαινολικού κλάσματος εμπορικού δείγματος οίνου σε διαλύτη MeOD**



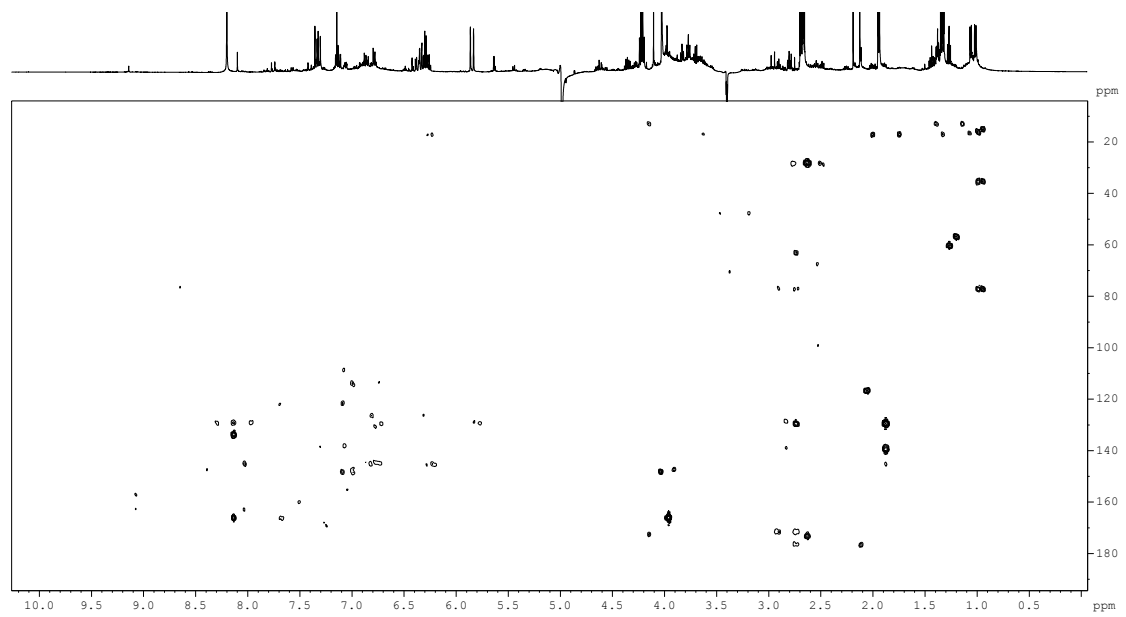
**2D φάσμα gCOSY ομοπυρηνικής συσχέτισης ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) φαινολικού κλάσματος  
εμπορικού οίνου**



**2D φάσμα gHSQC ετεροπυρηνικής συσχέτισης ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) φαινολικού κλάσματος  
εμπορικού οίνου**



**2D φάσμα gHMBC ετεροπυρηνικής συσχέτισης μακράς εμβέλειας ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )  
φαινολικού κλάσματος εμπορικού οίνου**



## Βιβλιογραφία

1. Α. Τσακίρης, Οινολογία: από το σταφύλι στο κρασί. Εκδόσεις Ψύχαλου
2. Ε. Σουφλερός, Οινολογία: επιστήμη και τεχνογνωσία. Θεσσαλονίκη 2012
3. Ε. Σουφλερός, Οίνος και αποστάγματα: Μέθοδοι ανάλυσης. Θεσσαλονίκη 2009
4. Επίσημη εφημερίδα της ευρωπαϊκής ένωσης, L 148 6.6.2008 (479/2008)
5. Επίσημη εφημερίδα της ευρωπαϊκής ένωσης, L 193 24.7.2009 (606/2009)
6. Apostolos Spyros & Photis Dais : NMR spectroscopy in food analysis. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013, Chap. 8, 202-240
7. K.F. Vajargah, R. Mehdizadeh, H. Sadeghi-Bazargani, Applications of OPLS Statistical Method in Medicine, J. Math. Computer Sci., 2014, 8, 411-422
8. <http://www.hmdb.ca/> HMDB The human metabolome database
9. D. W. Jeffery, M. D. Mercurio, M. J. Herderich, Y Hayasaka, P. A. Smith, Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid-phase extraction, J. Agric. Food Chem., 2008, 56, 2571-2580