

Ηράκλειο 2013-2014



# Διπλωματική εργασία

## ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΙΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR



Πανεπιστήμιο Κρήτης

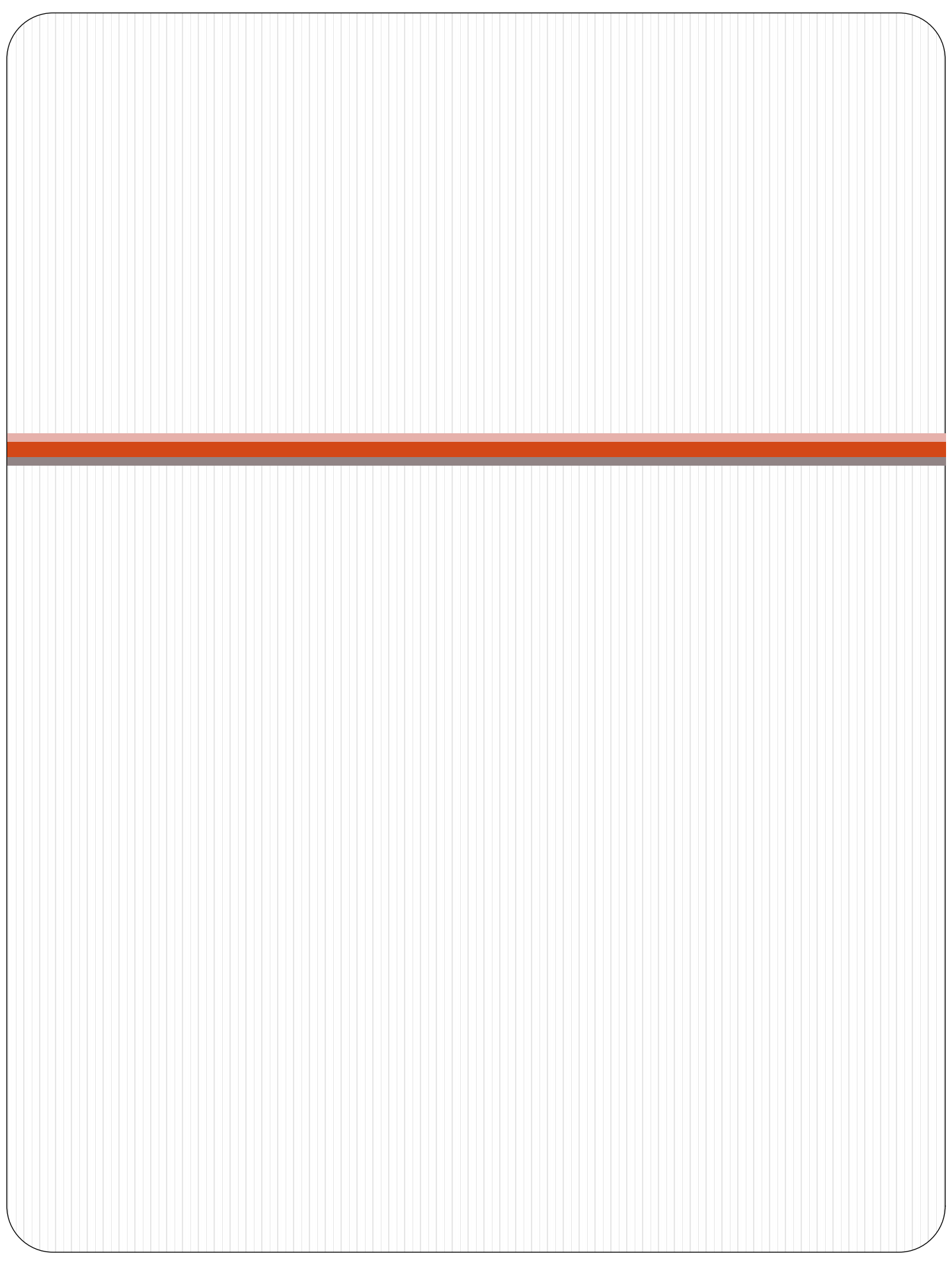
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

Εργαστήριο NMR

Επιβλέπων καθηγητής : Απόστολος Σπύρος

Χριστοφόρου Γεωργία Α.Μ.1483



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον 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 κ. Μαρία Αμαργιανιτάκη για την συνεχή καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε από την αρχή της εργασίας μέχρι το τέλος, αλλά και για την καλή συνεργασία που είχαμε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ευαγγελία Ράλλη και όλα τα υπόλοιπα παιδιά που δουλεύουν στο εργαστήριο και με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο και δημιουργώντας ένα ευχάριστο και φιλόξενο κλίμα εργασίας. Η βοήθειά όλων ήταν πολύτιμη και συντέλεσε στην αίσια ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων σε δείγματα οίνων με την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και την τεχνική solid phase extraction. Ο προσδιορισμός πολυφαινόλων έγινε με σκοπό την σύγκριση στη σύσταση διαφορετικών ποικιλιών οίνου. Επίσης, οι οίνοι ωρίμασαν σε 5 ή 6 διαφορετικά βαρέλια ανά ποικιλία και η ανάλυσή τους βοήθησε στην διεξαγωγή συμπερασμάτων για τις ενώσεις που προσδίδουν τα βαρέλια στα κρασιά. Η φασματοσκοπία NMR αποδείχτηκε ικανή να προσδιορίσει τις επιθυμητές ουσίες αλλά και να πραγματοποιήσει τη ποσοτικοποίηση τους. Επιπλέον, η τεχνική solid phase extraction (SPE) συντέλεσε επιτυχώς στην απομόνωση των φαινολικών ενώσεων μέσω της κατακράτησής τους και έπειτα της έκλουσής τους. Αρχικά, λοιπόν με ειδική τεχνική απομονώθηκαν οι πολυφαινόλες από τα δείγματα οίνου και στην συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματά τους σε μία διάσταση ( $^1\text{H}$ ) αλλά και σε δύο διαστάσεις (COSY, HSQC). Έπειτα, με ειδικό λογισμικό έγινε η επεξεργασία των φασμάτων και η ποσοτικοποίηση των ευρεθέντων ενώσεων. Τέλος, μέσα από τις συγκεντρώσεις που βρέθηκαν να έχουν οι πολυφαινόλες στα κρασιά έγινε μία ποσοτική αλλά και ποιοτική σύγκριση στην σύσταση των κρασιών μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών και διαφορετικών βαρελιών. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν πως υπάρχουν κάποια κοινά όμως και μερικές σημαντικές διαφορές στην φαινολική σύσταση των κρασιών που αναλύθηκαν.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....σελ.4	σελ.4
2. Θεωρία κρασιού.....σελ.4	σελ.4
3. Θεωρία NMR.....σελ.10	σελ.10
4. Σκοπός πτυχιακής εργασίας.....σελ.11	σελ.11
5. Πειραματικό μέρος.....σελ.12	σελ.12
6. Αποτελέσματα.....σελ.15	σελ.15
7. Ταυτοποίηση χημικών ενώσεων.....σελ.19	σελ.19
8. Ποσοτικοποιήσεις ενώσεων.....σελ.30	σελ.30
9. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....σελ.31	σελ.31
10. Συμπεράσματα.....σελ.34	σελ.34
11. Παράρτημα.....σελ.35	σελ.35
12. Βιβλιογραφία.....σελ.38	σελ.38

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το κρασί είναι ένα προϊόν που επιτυγχάνεται αποκλειστικά μέσω της ολικής ή μερικής αλκοολικής ζύμωσης των φρέσκων, αναμειγμένων σταφυλιών ή μούστου από σταφύλια. Τα κρασιά προέρχονται από τον μούστο των σταφυλιών και αυτό έχει ως προϋπόθεση την ύπαρξη των σταφυλιών ως πρώτη ύλη. Συνεπώς, ο τύπος του κρασιού, η κατάσταση του εδάφους και η ξεχωριστή επεξεργασία από τον οινοπαραγωγό είναι θεμελιώδη ζητήματα για την δημιουργία ενός καλού κρασιού. Υπάρχουν αρκετοί λαοί στον κόσμο, που το αμπέλι και το κρασί ήταν ή είναι στενά δεμένο με την καθημερινή ζωή τους. Το κρασί στην καθημερινότητα της Ελλάδας αποτελεί μια πανάρχαια υπόθεση. Για την ακρίβεια, χάνεται στα βάθη του χρόνου. Η σχέση του αμπελιού, που καλλιεργείται σχεδόν σε όλη την Ελλάδα και βέβαια του κρασιού, που παράγεται και καταναλώνεται διαχρονικά, είναι μακρόχρονες. Τόσο τα προϊόντα της αμπέλου, όσο και το κρασί αποτελούν αναπόφευκτα, στοιχεία που αφορούν τον πολιτισμό, την οικονομία, τη θρησκεία, την κοινωνική ζωή, την καθημερινότητα, αλλά και τους τόπους όπου αναπτύχθηκε η αμπελοκαλλιέργεια, η οινοπαραγωγή και η κατανάλωση κρασιού. Ο οίνος, που κυρίως αποτελείται από αλκοόλ και νερό, περιέχει ακόμη μερικές ουσίες πολύ σημαντικές για διάφορους λόγους. Η κατηγορία ενώσεων που θα συζητηθεί και θα αναλυθεί στην παρούσα εργασία είναι οι πολυφαινόλες όπου παρά τις μικρές συνήθως συγκεντρώσεις τους στους οίνους είναι ίσως οι πιο σημαντικές ενώσεις μιας και προσδίδουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού όπως η γεύση, το χρώμα, η υφή και το άρωμα. Επίσης, παρουσιάζουν σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες μιας και είναι αντιοξειδωτικές, βοηθάνε στην καρδιά και σε άλλες παθήσεις. Έτσι, αξίζει να γίνει μία προσπάθεια κατανόησης της σύστασης σε φαινολικές ενώσεις, καθώς και τους τρόπους που αυτές ποικίλουν ανάλογα από πού προέρχονται οι οίνοι, όπως ο χώρος ωρίμανσης (είδος βαρελιού) και η ποικιλία του σταφυλιού.

## **ΘΕΩΡΙΑ ΚΡΑΣΙΟΥ**

### **Τρόπος παραγωγής κρασιού**

Η οινοποίηση περιλαμβάνει ορισμένα βήματα ξεκινώντας από την συγκομιδή. Λόγω της επίδρασής του στη σύσταση των σταφυλιών, ο κατάλληλος συγχρονισμός της συγκομιδής είναι μεγάλης σπουδαιότητας. Η πρόωρη συγκομιδή οδηγεί στα λεπτά, χαμηλής περιεκτικότητας σε οινόπνευμα κρασιά, ενώ η καθυστερημένη συγκομιδή μπορεί να παραγάγει κρασιά με υψηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ και χαμηλή οξύτητα. Η συγκομιδή μπορεί να ολοκληρωθεί σε ένα ή περισσότερα στάδια. Οι συστάδες σταφυλιών κόβονται από την άμπελο και τοποθετούνται σε κάδους ή σε κουτιά και έπειτα μεταφέρονται σε μεγαλύτερα εμπορευματοκιβώτια για τη μεταφορά στα οινοποιία. Έπειτα ακολουθεί η θραύση, όπου τα σταφύλια συνήθως συνθλίβονται και αποσπάται το κοτσάνι τους συγχρόνως από έναν θραυστήρα, που αποτελείται από ένα διάτρητο κύλινδρο που περιέχει πτερύγια που περιστρέφονται με 600 έως 1.200 στροφές το λεπτό. Τα σταφύλια συνθλίβονται και πέφτουν μέσα από τις οπές του κυλίνδρου, οι περισσότεροι από τους μίσχους περνούν από το τέλος του κυλίνδρου. Για να γίνει ο διαχωρισμός του χυμού συχνότερα, τα συντετριμμένα σταφύλια τοποθετούνται σε έναν πιεστήριο. Μία οριζόντια πρέσα που εφαρμόζει πίεση και στις δύο άκρες, αντικαθιστά βαθμιαία την παραδοσιακή πρέσα. Διάφορες συμπίεσεις μπορούν να γίνουν χωρίς εκτενή χειρονακτική εργασία. Στη συνέχεια γίνεται η κατεργασία του μούστου μιας και οι λευκοί μούστοι είναι συχνά θολοί και είναι απαραίτητη η κατακάθιση των αιωρούμενων σωματιδίων ώστε να γίνει ο διαχωρισμός τους. Μέτρα όπως η προσθήκη διοξειδίου του θείου και η ελάττωση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της

καθίζησης βοηθούν ώστε να αποτραπεί η ζύμωση και επιτρέπουν στο αιωρούμενο υλικό να καθιζάνει κανονικά. Σε πολλές περιοχές τα οινοποιία υποβάλλουν το λευκό μούστο σε φυγοκέντρηση ώστε να αφαιρεθούν τα στερεά. Η διεργασία της αλκοολικής ζύμωσης, ακολούθως, απαιτεί προσεκτικό έλεγχο για την παραγωγή κρασιών υψηλής ποιότητας. Απαραίτητες προϋποθέσεις είναι ο περιορισμός της ανάπτυξης των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, η παρουσία ικανού αριθμού επιθυμητών ζυμών, η παρουσία κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη των ζυμών, η ρύθμιση της θερμοκρασίας για την αποφυγή υπερθέρμανσης, η αποτροπή της οξειδωσης και σωστή διαχείριση των επιπλεόντων φλοιών στους κόκκινους μούστους. Η εξαγωγή των γεύσεων και των χρωμάτων δεν είναι ιδιαίτερα προβληματική στους λευκούς μούστους, η συντετριμμένη μάζα σταφυλιών είναι συνήθως χωρισμένη από τις φλούδες πριν από τη ζύμωση. Η ζύμωση των λευκών μούστων στις σχετικά ψυχρές θερμοκρασίες (περίπου 10 με 15°C) οδηγεί σε μεγαλύτερους σχηματισμό και διατήρηση των επιθυμητών παραπροϊόντων. Στους μούστους κόκκινου κρασιού, η βέλτιστη εξαγωγή χρώματος ταυτόχρονα με την ανάπτυξη ζύμης εμφανίζεται στους περίπου 22 με 28°C. Επίσης, η επαφή με τον αέρα πρέπει να περιοριστεί ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Με κατάλληλη σύνθεση του μούστου, είδος ζύμης, θερμοκρασία και άλλους παράγοντες, η αλκοολική ζύμωση σταματά όταν το διαθέσιμο ποσό της ζάχαρης που μπορεί να ζυμωθεί γίνεται πολύ χαμηλό (περίπου 0,1 τοις εκατό). Η ζύμωση των κανονικών μούστων ολοκληρώνεται συνήθως σε δέκα έως τριάντα ημέρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το σημαντικότερο μέρος των κυττάρων της ζύμης θα βρεθεί σύντομα στο ίζημα, ή στα κατακάθια. Στην συνέχεια, ακολουθεί μια δεύτερη ζύμωση από τα βακτηρίδια του γαλακτικού οξέος, γνωστή ως μηλογαλακτική ζύμωση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα βακτηρίδια γαλακτικού οξέος μετατρέπουν το μηλικό οξύ σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>), γεγονός που οδηγεί σε ελάττωση της οξύτητας του κρασιού. Οι μεταβολικές δραστηριότητες των βακτηριδίων αλλάζουν επίσης τη φρουτώδη γεύση του κρασιού και εισάγουν μερικές αρωματικές ενώσεις. Η θερμοκρασία, το pH, και η διαθεσιμότητα άλλων πηγών ενέργειας έχουν επιπτώσεις στο ποσοστό ανάλωσης του μηλικού οξέος. Μετά από τη ζύμωση, πραγματοποιείται πρόσθετη λεύκανση στο κρασί με διήθηση και έπειτα σταθεροποίηση. Οι γεύσεις του κρασιού μπορούν να συνεχίσουν να αλλάζουν ενώ το κρασί αποθηκεύεται στα ξύλινα βαρέλια, τις δεξαμενές ανοξειδωτού χάλυβα, και τα γυάλινα μπουκάλια. Ο διαχωρισμός του επιπλέοντος κρασιού από τα κατακάθια καλείται racking. Επίσης, γίνεται η αφαίρεση του αποβαλλόμενου υλικού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης που καλείται διαχωρισμός. Οι σημαντικότερες διαδικασίες που συμπεριλαμβάνονται είναι ο εξευγενισμός, η διήθηση, η φυγοκέντρηση, η ψύξη, η ιονική ανταλλαγή και η θέρμανση. Η ποιότητα πολλών κρασιών βελτιώνεται, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε βαρέλια και μπουκάλια. Τέτοια κρασιά φθάνουν μετά από ορισμένο χρόνο στην μεγίστη ακμή τους, αλλά με περαιτέρω ωρίμανση αρχίζουν να υποβαθμίζονται. Κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης ή παλαίωσης, η οξύτητα μειώνεται, γίνεται πρόσθετη λεύκανση και σταθεροποίηση, καθώς ανεπιθύμητες ουσίες καθιζάνουν και τα διάφορα συστατικά του κρασιού σχηματίζουν σύνθετες ενώσεις που επηρεάζουν την γεύση και το άρωμα. Συνοψίζοντας, η παραγωγή του κρασιού περιλαμβάνει πολλά βήματα τα οποία απαιτούν καλή γνώση και μεγάλη προσοχή κατά την διεξαγωγή τους από τους οινοπαραγωγούς ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα στην γεύση, το χρώμα και την ποιότητα του κρασιού.

## **Ιστορία του κρασιού και το κρασί στην Κρήτη**

Η ιστορία του αμπελιού ξεκινάει πολλούς αιώνες πριν. Τα κουκούτσια αγριοστάφυλων έχουν βρεθεί ακόμα και σε σπηλιές που κατοικήθηκαν από νομαδικά προϊστορικά φύλα. Πριν από την εποχή των παγετώνων η άμπελος ευδοκίμωσε στην πολική ζώνη. Οι παγετώνες όμως περιόρισαν την εξάπλωσή της, ωθώντας διάφορα είδη άγριων αμπέλων προς θερμότερες ζώνες, όπως η κεντρική και ανατολική Ασία, η κεντρική και νότια Ευρώπη, αλλά και η ευρύτερη περιοχή του νότιου Καυκάσου. Εκεί γεννήθηκε το είδος «Άμπελος η Οινοφόρος» (*Vitis vinifera*), που σήμερα σε διάφορες ποικιλίες του καλλιεργείται σχεδόν αποκλειστικά. Η τέχνη της αμπελοργίας εικάζεται ότι ξεκίνησε με την αγροτική επανάσταση γύρω στο 5000 π.Χ. Από τους πρώτους γνωστούς αμπελοκαλλιεργητές θεωρούνται οι Άριοι (πρόγονοι των Περσών και των Ινδών που ζούσαν στην περιοχή Καυκάσου-Κασπίας), οι σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Το κρασί μάλιστα εκείνη την εποχή ήταν γνωστό ακόμα και στην αρχαία Κίνα. Κατόπιν οι τέχνες της αμπελοργίας και της οινοποιίας πέρασαν στους Αιγύπτιους, στους λαούς της Παλαιστίνης, της Φοινίκης και στους Έλληνες. Οι Έλληνες ανέπτυξαν ιδιαίτερα την οινοποιία, σχεδόν μονοπωλώντας την αγορά για αιώνες. Γνώρισαν το κρασί πιθανότατα από την αρχή της εγκατάστασής τους στο σημερινό τους τόπο. Δεν είναι ακόμα βέβαιο από πού διδάχτηκαν την τέχνη της οινοποιίας, σύμφωνα όμως με μια από τις επικρατέστερες θεωρίες, την έμαθαν από τους ανατολικούς λαούς (Φοίνικες ή Αιγύπτιους) με τους οποίους είχαν ανεπτυγμένες εμπορικές σχέσεις, ιδίως οι Μινωίτες. Οι Μινωίτες καλλιεργούσαν τη γη τους και γεύονταν αυτά που απλόχερα τους προσέφερε. Στις εκατοντάδες πινακίδες που έφερε στο φως η αρχαιολογική σκαπάνη φαίνεται μια ακμάζουσα οικονομία με γεωργικές, κτηνοτροφικές και εμπορικές δραστηριότητες. Μεταξύ των προϊόντων που καλλιεργούσαν με επιτυχία και εμπορεύονταν οι αρχαίοι Κρήτες ξεχωρίζουν το λάδι, τα σιτηρά, αλλά και το κρασί.

Το αμπέλι καλλιεργείται συστηματικά στην Κρήτη εδώ και περίπου 4.000 χρόνια. Δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι το αρχαιότερο πατητήρι σταφυλιών, ηλικίας μεγαλύτερης των 3.500 ετών, έχει ανακαλυφθεί στην περιοχή του Βαθύπετρου. Από τον Όμηρο γνωρίζουμε πως τα κρητικά κρασιά ήταν ξακουστά σε όλο τον τότε γνωστό κόσμο. Πέρα από το ηλικίας 3.500 ετών πατητήρι, εντυπωσιακοί αμφορείς, τεράστιοι υπόγειοι χώροι αποθήκευσης, σχετικές απεικονίσεις σε όλα τα μινωικά ανάκτορα, αλλά και αναρίθμητες καταχωρίσεις για μεγάλες ποσότητες κρασιού στα μινωικά αρχεία σηματοδοτούν όχι μόνο τον κεντρικό ρόλο που έπαιζε το κρασί στη ζωή του νησιού, αλλά και το υψηλό επίπεδο γνώσης των Μινωιτών για αυτό. Η καλλιέργεια του αμπελιού και η παραγωγή κρασιού στην Κρήτη συνεχίζονται ασταμάτητα στη διάρκεια των αιώνων. Στον «Κώδικα της Γόρτυνας», το αρχαιότερο νομικό κείμενο στην Ευρώπη, φαίνεται πρώτη φορά μια σειρά από κανόνες για την καλλιέργεια του αμπελιού.

Ακόμα και σήμερα πολλές από τις σύγχρονες επιχειρήσεις που φτιάχνουν και εξάγουν τα κρασιά αυτά, που γίνονται ολοένα και πιο γνωστά στις ξένες αγορές και βραβεύονται σε διεθνείς διαγωνισμούς, προέρχονται από οικογένειες μεγάλων και μεσαίων γαιοκτημόνων που κράτησαν ζωντανή όλα αυτά τα χρόνια τόσο την παράδοση, όσο και την αγάπη για το κρασί. Στη σύγχρονη πραγματικότητα το κρητικό κρασί εδώ και χρόνια έχει κερδίσει και συνεχίζει να κερδίζει την προσοχή και την προτίμηση της ευρύτερης κοινής γνώμης. Τα κρητικά κρασιά αποτελούν πολύτιμη παρακαταθήκη παραδοσιακών ποικιλιών, εναρμονισμένων απολύτως στις κλιματολογικές συνθήκες του νησιού. Το πλήθος των ντόπιων ποικιλιών, η ποικιλομορφία και η μοναδικότητα των



διαφόρων οινοπεριοχών, αλλά και η μεγάλη παράδοση των Κρητικών στο κρασί είναι οι βάσεις για το σημερινό ποιοτικό πρόσωπο του κρασιού της Κρήτης και τη συνεχή ανοδική του πορεία.

### **Βασικά συστατικά κρασιού**

Το κρασί είναι ουσιαστικά ένα διάλυμα αλκοόλης σε νερό το οποίο περιέχει επίσης ένα μεγάλο αριθμό των πτητικών ή χημικών ουσιών σε διάλυμα ή σε εναιώρημα. Η περιεκτικότητα σε αλκοόλη κυμαίνεται γενικά μεταξύ 8% και 21% κατά μέσο όρο, ενώ η ποσότητα του νερού είναι συνήθως 80-85%. Η αιθυλική αλκοόλη με την αντισηπτική της δράσης έναντι των μικροοργανισμών, συμβάλλει στη διατήρηση των κρασιών, βοηθά στην έκλυση των αρωμάτων τους, συνεισφέρει στην προσωπικότητα και στη γευστική ισορροπία τους καθώς και στη ρευστότητα και στην ηδύτητά τους. Επιπλέον, υπάρχει γλυκερόλη σε μέση περιεκτικότητα 10g/l. Το κρασί περιέχει επίσης σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη ( 0-2 g / L σε ξηρά κρασιά) και ( 50 έως 60 g / L) σε γλυκά αλλά και οξέα όπως τρυγικό, κιτρικό, οξικό, γαλακτικό, μηλικό, ηλεκτρικό, οξαλικό, βορικό, φωσφορικό, επτά-αμινο-βενζοϊκό και κινναμωμικό οξύ. Γενικά, το κρασί, κόκκινο, λευκό ή ροζέ περιέχει ακόμη ανόργανα άλατα και πολυάριθμες αρωματικές ενώσεις όπως ταννίνες σε μικρές ή μεγάλες ποσότητες, ανάλογα με το χρώμα και την μέθοδο παραγωγής, αντιοξειδωτικές ουσίες (φλαβονοειδή, φαινόλες, προκυανιδίνες, ανθοκυανιδίνες, ρεσβερατρόλη, κλπ.), και διάφορες χρωστικές, συμπεριλαμβανομένων και των ανθοκυανινών.

### **Πολυφαινόλες στο κρασί**

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των σταφυλιών και των κρασιών όπως το χρώμα, το άρωμα, η πικράδα, και στυπτικότητα. Η γνώση της σχέσης μεταξύ της ποιότητας ενός κρασιού και της φαινολικής σύστασής του, είναι σήμερα η μεγαλύτερη πρόκληση στην έρευνα της οινολογίας. Επίσης, οι φαινόλες είναι σημαντικές από ταξινομικής άποψης. Είναι γνωστό ότι μερικές τάξεις φλαβονοειδών, όπως οι ανθοκυανίνες, βρίσκονται υπό αυστηρό γενετικό έλεγχο και ότι η σύστασή τους διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες αμπελιών. Η σύσταση των μη πτητικών φαινολών στο κρασί εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία, η ωρίμανση (το είδος του βαρελιού), οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στα αμπέλια και η τεχνολογία της οινοπαραγωγής. Η ανάλυση φαινολών θεωρείται κατάλληλη για σκοπούς αυθεντικότητας, προστατεύοντας έτσι τους καταναλωτές κατά της εξαπάτησης. Οι φαινόλες προστατεύουν επίσης τα φυτά από οξειδωτική καταστροφή. Στη ομάδα των φαινολών κατατάσσονται περισσότερα από 800 φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, πολλές από τις οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των καρπών και των ανθέων. Σε αυτά οφείλεται το κιτρινωπό χρώμα των λευκών κρασιών και στις ανθοκυανίνες ή ανθοκυανίνες το ερυθροϊώδες έως ερυθρό χρώμα των κόκκινων. Οι ανθοκυανίνες έχουν την τάση να δίνουν αδιάλυτα συσσωματώματα με το χρόνο και να σχηματίζουν ίζημα στη φιάλη, προκαλώντας μείωση της έντασης του χρώματος του οίνου. Στην αποφυγή αυτών των προβλημάτων, οι ταννίνες παίζουν καθοριστικό ρόλο διότι είναι αντιοξειδωτικές, προστατεύοντας έτσι τις ανθοκυανίνες από τις παρενέργειες του οξυγόνου και έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις ανθοκυανίνες, έντονου χρώματος και μικρής στυφάδας. Οι ταννίνες, περιέχονται στο λευκό αλλά κυρίως στο κόκκινο κρασί όπου η ύπαρξή τους είναι απαραίτητη, τόσο

για να εξισορροπεί τη δομή του, σε σχέση με όλα τα άλλα χαρακτηριστικά του, όσο και για να αυξάνει τη δυναμική παλαίωσης, έτσι ώστε το κρασί να διατηρήσει τη ζωντάνια και το χαρακτήρα του σε βάθος χρόνου. Είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι οι τανίνες προσαρτώνται στις λιπαρές πρωτεΐνες, και αυτό είναι το μυστικό του επιτυχημένου συνδυασμού του κόκκινου κρέατος με το κόκκινο κρασί.

Πιο συγκεκριμένα, οι μη πτητικές φαινολικές ουσίες στο κρασί αποτελούνται από μερικές ομάδες: φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, τανίνες, στυλβένια, κουμαρίνες, φαινυλπροπανολικά παράγωγα, lignans και neolignans.

### **Φαινολικά οξέα (μη φλαβονοειδής μονομοριακές φαινόλες):**

Συνήθως χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες: βενζοϊκά οξέα που περιέχουν μερικά άτομα άνθρακα (C6-C1) και κινναμικά οξέα που έχουν 9 άτομα άνθρακα (C6-C3). Αυτά τα οξέα βρίσκονται κυρίως ως υδροξυβενζοϊκά και ως υδροξυκινναμικά και μπορεί είναι στην ελεύθερη ή στην δεσμευμένη μορφή τους. Μερικά από τα σημαντικότερα παράγωγα βενζοϊκού οξέος είναι: π-υδροξυβενζοϊκό, πρωτοκατεχνικό, βανιλικό, γαλλικό, συριγγικό και σαλικυλικό οξύ. Παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος είναι τα: π-κουμαρικό, καφεϊκό, φερουλικό και σιναπικό οξύ. Επίσης, τα φαινολοξέα υπάρχουν και ως ετεροζίτες ή εστέρες-τανίνες του γαλλικού και του ελλαγιικού οξέος.

Στις μη φλαβονοειδής φαινόλες συγκαταλέγονται επίσης η τυροσόλη και τα στυλβένια. Η τυροσόλη συνυπάρχει με άλλες μη φαινολικές αλκοόλες όπως η τρυπτοφόλη και η φαινυλαιθυλαλκοόλη. Στα στυλβένια συγκαταλέγεται μία σημαντική για τα κρασιά ένωση η ρεσβερατρόλη.

### **Φλαβονοειδή φαινόλες (πολυμοριακές):**

Αυτό το είδος φαινολών έχει βασικό σκελετό 15 ατόμων άνθρακα (C6-C3-C6) του τύπου 2-φαινυλβενζοπυρόνη. Σε αυτή τη κατηγορία υπάρχουν πολλές υποκατηγορίες:

- **Φλαβόνες:** χαρακτηρίζονται από τον διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C2-C3 και από την απουσία της υδροξυλικής ομάδας στον C3. Αυτές οι ενώσεις έχουν σημαντική φαρμακευτική σημασία. Παρόλο που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε πολλά φυτά στα κρασιά υπάρχουν σε ίχνη. Η γενιστεΐνη είναι μία ισοφλαβόνη που έχει ταυτοποιηθεί σε σταφύλια και κρασί.
- **Φλαβανόνες** (από ξύλινα βαρέλια): παρουσιάζουν μία κορεσμένη ανθρακική αλυσίδα μεταξύ των ανθράκων C2 και C3. Η eriodictiol, ναριγγενίνη και εσπεριτίνη είναι αυτές που έχουν βρεθεί σε κρασί.
- **Φλαβονόλες:** έχουν τον διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων C2 και C3 και από μία υδροξυλική ομάδα στον C3. Έτσι, συχνά ονομάζονται 3-υδροξυφλαβανόνες. Επίσης περισσότερο από το 90% των φλαβονολών είναι υδροξυλιωμένες στον C3, C5 και C7, χαρακτηριζόμενες ως

3,5,7 τριυδροξυλιωμένα παράγωγα. Στα σταφύλια έχουν παρατηρηθεί γλυκοζίτες από τα ακόλουθα άγλυκα: κερσετίνη, καεμπερόλη, ισοραμετίνη, μυρικετίνη, λαρικιτρίνη και η συριγκετρίνη.

- Φλαβανόνολες: χαρακτηρίζονται από την απουσία του διπλού δεσμού στον ετεροκυκλικό δακτύλιο και από την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στον C3. Η διυδροκερσετίνη και η διυδροκαεμπερόλη είναι χαρακτηριστικές ενώσεις τις ομάδας αυτής που μπορούν να εντοπιστούν σε κρασιά.

- Φαινολαιθέρες όπως η ευγενόλη και η γουαϊακόλη.

- Κατεχίνες και προκυανιδίνες: είναι η φλαβανόλη-3 και τα υδροξυλιωμένα παράγωγά της όπως κατεχίνες που συμβάλλουν στο καφέ χρώμα των οίνων. Επίσης, υπάρχουν και τα συμπυκνωμένα φαινολικά παράγωγα όπως η κυανιδίνη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη. Τα παράγωγα της κατεχίνης που προέρχονται από τις προκυανιδίνες δίνουν διμερής προκυανιδίνες που εμφανίζονται σε νέους οίνους και είναι πρόδρομες των τανινών.

- Υδρολιόμενες και συμπυκνωμένες τανίνες: Οι τανίνες ενώνονται με πρωτεΐνες και άλλα πολυμερή όπως πολυσακχαρίτες. Οι υδρολιόμενες έχουν ένα σάκχαρο όπου πολλά υδροξύλια είναι εστεροποιημένα με φαινολικά οξέα (γαλλικό-γαλλοταννίνες, διγαλλικό-διγαλλοταννικό, ελλαγικό-ελλαγοταννίνες κ.α). Οι συμπυκνωμένες τανίνες προκύπτουν από αντίδραση πολυμερισμού της προκυανιδίνης, όπως προαναφέρθηκε, και αποτελούν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων όπου αυξάνονται με την ηλικία του κρασιού.

- Ανθοκυάνες: Είναι υπεύθυνες για το χρώμα των σταφυλιών και των κρασιών, ένα χαρακτηριστικό που προκύπτει από την χημική τους δομή, τον βαθμό υδροξυλίωσης, μεθυλίωσης και/ή γλυκοζυλίωσης. Στο κρασί έχουν ταυτοποιηθεί 6 ανθοκυάνες: κυανιδίνη, πεονιδίνη, δελφινιδίνη, πελαργονιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται επίσης στα κρασιά στην γλυκοζυλιωμένη τους μορφή (π.χ. 3-μονογλυκοζίδια) που ονομάζονται ανθοκυανιδίνες.

## ΘΕΩΡΙΑ NMR

### Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Ως γνωστόν τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου έχουν spin με αποτέλεσμα να συμπεριφέρονται ως στοιχειώδεις μαγνήτες. Πέρα από τα ηλεκτρόνια όμως, τα πρωτόνια και τα νετρόνια ενός πυρήνα ανάλογα με την διεύθεσή τους μπορούν επίσης να έχουν spin. Τα άτομα που εμφανίζουν πυρηνικό spin έχουν περιττό αριθμό πρωτονίων ή νετρονίων. Παραδείγματα πυρήνων με spin είναι το υδρογόνο-1 ( $^1\text{H}$ ), ο άνθρακας-13 ( $^{13}\text{C}$ ) και το φθόριο-19 ( $^{19}\text{F}$ ). Ένας πυρήνας με spin έχει συμπεριφορά που μοιάζει με αυτόν του ηλεκτρονίου, δηλαδή όπως ένας ραβδόμορφος μαγνήτης, όμως είναι πολύ μικρότερος σε μέτρο. Παρόλα αυτά, μπορεί πολύ εύκολα να γίνει αντιληπτός με την βοήθεια κατάλληλων οργάνων και έτσι εισάγεται η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance). Αυτό το είδος φασματοσκοπίας είναι από τις σπουδαιότερες μεθόδους προσδιορισμού μοριακών δομών. Οι δύο καταστάσεις spin του πρωτονίου, όταν βρίσκεται εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου, έχουν διαφορετική ενέργεια. Γενικά, το δείγμα βρίσκεται μέσα σε πεδίο μεταβλητού ηλεκτρομαγνήτη, κοντά σε δύο πηνία που το ένα είναι πομπός ραδιοκυμάτων και το άλλο δέκτης και είναι κάθετα μεταξύ τους. Ο πομπός ακτινοβολεί κύματα κάποιων MHz όπου το δείγμα απορροφάει και κατά την μετάπτωσή του από την υψηλότερη κατάσταση spin στην χαμηλότερη, θα εκπέμψει τα αντίστοιχα ραδιοκύματα λειτουργώντας ως πομπός. Μεταβάλλοντας την συχνότητα του πομπού (δυνατότητα από 4 έως 900MHz) ο πυρήνας σε κάποιο σημείο θα υποστεί συντονισμό. Επειδή κάθε πρωτόνιο σε μία ουσία περιβάλλεται από ηλεκτρόνια που δημιουργούν τα δικά τους μαγνητικά πεδία, το μαγνητικό περιβάλλον ενός πρωτονίου εξαρτάται εν μέρει από το είδος του ατόμου που συνδέεται με το συγκεκριμένο πρωτόνιο. Οι συχνότητες λοιπόν που θα καταγράψει ο δέκτης από τις εκπομπές των πυρήνων, δίνουν πληροφορίες για τον προσδιορισμό της δομής του μορίου. Τα φάσματα που μπορούν να ληφθούν από ένα φασματόμετρο NMR μπορούν να είναι δύο ή περισσότερων διαστάσεων, δίνοντας περισσότερες και αναλυτικότερες πληροφορίες για το είδος και τον τρόπο ένωσης των ατόμων σε μόρια.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για αναλύσεις διαφόρων δειγμάτων στερεάς ή υγρής κατάστασης, για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών τους. Επίσης, ο πυρηνικός μαγνητισμός αποτελεί τη βάση του ιατρικού διαγνωστικού εργαλείου «απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό MRI».

### Επιλογή τεχνικής NMR

Η τεχνική φασματοσκοπίας NMR επιλέχθηκε λόγω των διάφορων προνομίων που παρέχει στην ανάλυση των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, το δείγμα δεν καταστρέφεται γεγονός σημαντικό αν χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Επιπλέον, η τεχνική είναι γρήγορη και εκτελείται σχεδόν αυτόματα από το φασματόμετρο με την ρύθμιση μόνο μερικών παραμέτρων. Έτσι δεν απαιτεί πολύ χρόνο και αποτελεί οικονομικό τρόπο ανάλυσης μιας και το μόνο που χρειάζεται είναι το δείγμα και ο διαλύτης σε μικρή ποσότητα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR είναι ιδανική για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων που περιλαμβάνουν πολλές χημικές ουσίες οι οποίες μπορούν να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν ακόμα και όταν βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες.

### Σκοπός πτυχιακής εργασίας

Σκοπός αυτής της έρευνας είναι ο προσδιορισμός πολυφαινολών σε δείγματα οίνου με την χρήση της τεχνικής SPE και η ποσοτικοποίηση τους με την φασματοσκοπία NMR σε διαλύτη δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD). Τα δείγματα των οίνων προέρχονται από 4 διαφορετικές ποικιλίες ωρίμανσης 9 μηνών σε 5 ή 6 είδη διαφορετικών βαρελιών. Έτσι, σκοπός είναι επίσης η επισήμανση σημαντικών διαφορών στην σύσταση πολυφαινολών μεταξύ διαφορετικών ποικιλιών σε ίδια βαρέλια και ίδιων ποικιλιών σε διαφορετικά βαρέλια. Τα φάσματα NMR που λήφθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν είναι μίας διάστασης  $^1\text{H}$  και δύο διαστάσεων ομοπυρηνικής συσχέτισης  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COZY) και ετεροπυρηνικής συσχέτισης  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC-HMBC).

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Δείγματα οίνων

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν 22 δείγματα οίνων προερχόμενα από 4 διαφορετικές ποικιλίες (2 κόκκινοι και 2 λευκοί) που ωρίμασαν για 9 μήνες σε 5 διαφορετικά βαρέλια οι λευκοί οίνοι και σε 6 διαφορετικά βαρέλια οι κόκκινοι. Όλα τα δείγματα προέρχονται από την Γ.Ε.Α Α.Ε Αλάγνι Ηρακλείου Κρήτης, με την επωνυμία Lygarakis.

Βαρέλια/Ποικιλίες	Μαντηλάρι	Κοτσιφάλι	Δαφνί	Βηλάνα
Δεξαμενή inox	1	1	1	1
Chips	2	2	2	2
Αμερικάνικη δρυς	3	3	3	3
Ακακία	4	4	4	4
Γαλλική δρυς	5	5	5	5
Καστανιά	6	6	-	-

### Λίγα λόγια για τις ποικιλίες

Όλες οι ποικιλίες έχουν Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη: Κρήτη. Οι οίνοι ΠΓΕ της Ελλάδας («Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης») περιλαμβάνουν την κατηγορία ελληνικών οίνων «Τοπικοί Οίνοι» και κάποιους από τους οίνους με «Όνομασία κατά Παράδοση». Κατά την ευρωπαϊκή και την ελληνική οινική νομοθεσία οι τοπικοί οίνοι αποτελούν υπο-κατηγορία των επιτραπέζιων και έχουν αναπτυχθεί πολύ, τόσο στην Ελλάδα, όσο και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Θεσπίστηκαν για να ενισχυθούν οι έννοιες της αυθεντικότητας και της τυπικότητας και είχαν εξαρχής το δικαίωμα αναγραφής της χρονιάς της εσοδείας και της ποικιλιακής σύνθεσης, ενώ γι' αυτούς καθορίζονται τόσο γεωγραφικά όρια, όσο και ποικιλιακές συνθέσεις. Τη ζώνη του ΠΓΕ Κρήτη, που θεσπίστηκε το 1989 συγκροτούν οι 4 περιφερειακές ενότητες του νησιού: Λασιθί, Ηράκλειο, Ρέθυμνο και Χανιά. Οίνους ΠΓΕ Κρήτη παράγουν 41 οινοποιεία εντός ζώνης και με τις απαραίτητες συνεργασίες άλλα 4 οινοποιεία εκτός αυτής.

### **Μαντηλάρι:**

Ερυθρός ξηρός οίνος από τον αμπελώνα στην τοποθεσία πλακούρα που είναι μια ιδιαίτερος προνομίουχα πλαγιά σε υψόμετρο 500μ, με αμμώδες-πετρώδες έδαφος.

Η κυπελλοειδής διαμόρφωση του αμπελώνα σε συνδυασμό με τον βορειοανατολικό προσανατολισμό και τη μεγάλη ηλιοφάνεια, εξασφαλίζει τη βέλτιστη ωριμότητα του σταφυλιού την εποχή του τρυγητού. Το Μαντηλάρι είναι μια ποικιλία που πιστεύεται ότι έχει μεγάλες προοπτικές, έχοντας ολοκληρώσει ήδη μια 5ετία πειραμάτων στο συγκεκριμένο αμπελοτόπι. Την εσοδεία του 2007 πέτυχαν εξαιρετικά χαμηλές στρεμματικές αποδόσεις, καταφέροντας έτσι να οινοποιήσουν ένα πυκνό αρωματικά κρασί με βαθυκόκκινο χρώμα, εξαιρετική δομή και μεγάλες δυνατότητες παλαίωσης. Ο γήινος και σαρκώδης χαρακτήρας των πλούσιων τανινών του συμπληρώνεται από την έντονη γεύση μαρμελάδας δαμάσκηνου και βατόμουρου.

### **Κοτσιφάλι:**

Ερυθρός ξηρός οίνος με προέλευση από ορεινούς αμπελώνες του νομού Ηρακλείου. Η οινοποίηση γίνεται στις σύγχρονες εγκαταστάσεις του οινοποιείου Λυραράκη στο Αλάγνι Ηρακλείου. Έχει χρώμα λαμπερό ερυθρό, απαλή, πλούσια και βελούδινη γεύση. Επίσης έχει αρώματα σύνθετα που χαρακτηρίζουν τις ποικιλίες του.

### **Βηλάνα:**

Λευκός ξηρός οίνος με προέλευση από ορεινούς αμπελώνες του νομού Ηρακλείου. Η οινοποίηση γίνεται στις ίδιες εγκαταστάσεις με το Κοτσιφάλι στο Αλάγνι Ηρακλείου. Το κρασί έχει χρώμα λευκοκίτρινο και αρώματα εσπεριδοειδών. Η γεύση του είναι πλούσια και ισορροπημένη.

### **Δαφνί:**

Η ποικιλία Δαφνί (λευκός οίνος) είναι μια από τις σπάνιες και αρχαιότερες κρητικές ποικιλίες που φυτεύτηκε στο κτήμα του αμπελουργού Λυραράκη στο Αλάγνι πριν από λίγα χρόνια για να διασωθεί από την εξαφάνιση. Χαρακτηριστικό της ποικιλίας είναι τα θαυμάσια πρωτογενή αρώματα τα οποία βρίσκονται συγκεντρωμένα κυρίως στον φλοιό της ρόγας. Η ποικιλία οφείλει το όνομά της στο ομώνυμο φυτό (τη Δάφνη) λόγω της ομοιότητας που παρουσιάζουν τα αρώματά τους. Ο τρόπος οινοποίησης είναι λευκή οινοποίηση με παραμονή του χυμού από 8 έως 10 ώρες μαζί με τους φλοιούς (μέθοδος skin contact) προκειμένου να γίνει καλύτερη εκχύλιση των αρωμάτων. Η ζύμωση γίνεται σε ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 18°C. Το χρώμα του κρασιού είναι λευκοκίτρινο και έχει αρώματα μεγάλης έντασης και διάρκειας που φανερώνουν καθαρά την ποικιλία από την οποία προέρχεται. Έχει γεύση πλούσια και ισορροπημένη όπως και το Βηλάνα.

## **Προετοιμασία δειγμάτων για την λήψη φασμάτων**

### 1<sup>ο</sup> έκλουσμα

Σε vial τοποθετούνται 2ml δείγματος κρασιού καθώς και 2ml υδατικού διαλύματος HCl 0.01N. Από ειδική στήλη συνδεδεμένη με την συσκευή SPE (Solid Phase Extraction) περνάνε με ροή βαρύτητας 3ml MeOH 100% (HPLC grade) και έπειτα 3ml υδατικό διάλυμα HCl 0.01N για την ενεργοποίησή της στήλης. Στην συνέχεια περνάνε από την στήλη τα 4ml δείγματος και υδατικού διαλύματος HCl 0.01N και αφού γίνεται έκπλυση του vial με άλλα 2ml HCl 0.01N, αυτά περνάνε επίσης από την στήλη ώστε να ληφθούν τυχόν υπολείμματα. Γίνεται έκπλυση της στήλης με μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού ώστε όλες οι ουσίες που πιθανόν υπάρχουν στα τοιχώματα να περάσουν από το φίλτρο της στήλης. Η στήλη αφήνεται να στεγνώσει υπό ισχυρό κενό για 45 λεπτά. Το έκλουσμα που πέρασε από την στήλη περιέχει ουσίες όπως: οργανικά οξέα, σάκχαρα και άλλες μη κατακρατούμενες ουσίες (αιθανόλη, γλυκερόλη) που δεν χρειάζονται για τον σκοπό αυτής της ανάλυσης και έτσι απομακρύνονται.

## 2<sup>ο</sup> έκλουσμα

Στη συνέχεια, αφού στεγνώσει η στήλη, με 40ml διαλύματος Ακετονιτρίλιο:HCl 0.01N (95:5v/v) εκλούνται και παραλαμβάνονται από την στήλη σε σφαιρική φιάλη των 50ml τα εξής: μη πολυμερικά μονομερή συστατικά όπως υδροξυκιναμικά οξέα, φλαβονόλες, flavan-3-ols, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες.

## 3<sup>ο</sup> έκλουσμα

Για την παραλαβή των πολυμερισμένων τανινών, εκλούνται από την στήλη 300ml καθαρό φορμικό οξύ και 3ml διαλύματος υδατικής MeOH 95% σε σφαιρική φιάλη των 25ml.

Κάθε κλάσμα (2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> έκλουσμα) αφήνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα (rotor) με υδρόλουτρο σταθερό σε θερμοκρασία 30°C ώστε να εξατμιστούν τελείως οι διαλύτες (μέχρι ξηρού).

Τέλος σε κάθε έκλουσμα προστίθεται 700ml διαλύματος δευτεριωμένης μεθανόλης (MeOD) και το διάλυμα μεταφέρεται σε NMR tube για την λήψη φασμάτων. Στα δείγματα Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι και Βηλάνια 1,2 και 3 δεν χρησιμοποιήθηκε εσωτερικό πρότυπο. Στα δείγματα Βηλάνια 4,5 και Δαφνί χρησιμοποιήθηκε MeOD με εσωτερικό πρότυπο TMS (Tetramethylsilane) σε ποσότητα 30,849μmol H προκειμένου να γίνει η ποσοτικοποίηση των ενώσεων.

## Λήψη φασμάτων

Το φασματόμετρο NMR που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη όλων των φασμάτων μίας διάστασης <sup>1</sup>H και δύο διαστάσεων <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H και <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C είναι το Bruker Avance III-500MHz και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων είναι το Bruker Topspin 3.1. Στα δείγματα χωρίς πρότυπο έγινε καλιμπράρισμα στην μεσαία κορυφή της πενταπλής κορυφής της μεθανόλης στα 3,31ppm. Στα δείγματα με εσωτερικό πρότυπο TMS, η κορυφή του ρυθμίστηκε στα 0,0ppm. ολοκλήρωση των γνωστών και εμφανών κορυφών για την ποσοτικοποίηση τους με το πρόγραμμα Bruker WINNMR. Παρότι λήφθηκαν τα φάσματα για το έκλουσμα 2 και 3 από κάθε δείγμα, η ανάλυση έγινε μόνο στο 2<sup>ο</sup> έκλουσμα, μιας και τα φάσματα του 3<sup>ου</sup> είναι πολύ περίπλοκα.



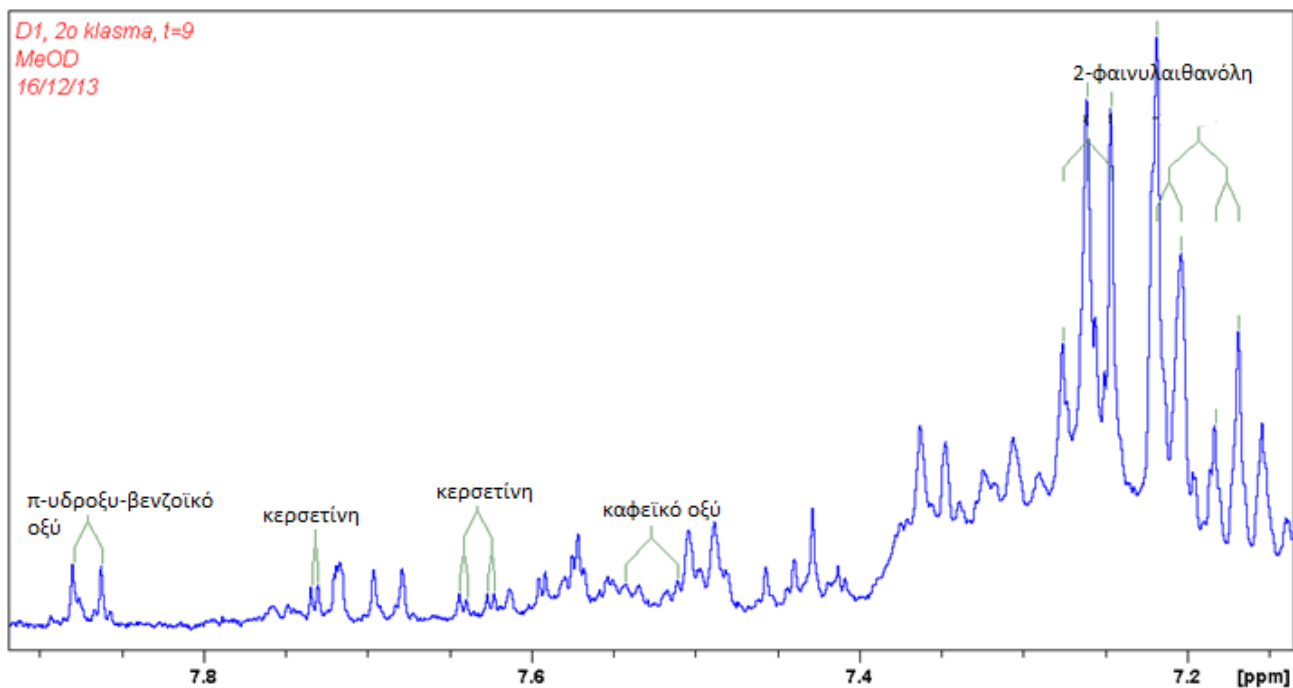
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με την χρήση των φασμάτων μίας διάστασης  $^1\text{H}$  και δύο διαστάσεων  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) και  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) έγινε η ανάθεση 8 φαινολικών ενώσεων στα δείγματα οίνων, οι οποίες φαίνονται στον παρακάτω πίνακα μαζί με τις χημικές μετατοπίσεις που εμφανίζονται οι κορυφές τους. Οι χημικές μετατοπίσεις δ είναι σε ppm και αναφέρονται ως προς το TMS που βρίσκεται στα 0ppm.

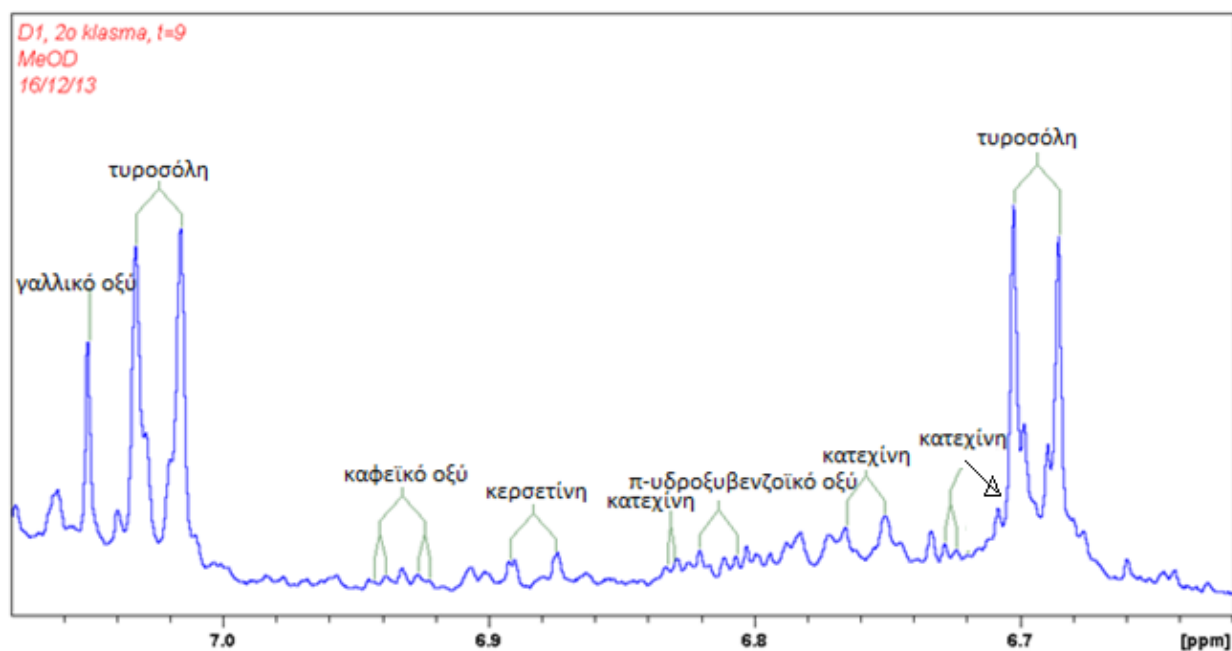
Ένωση	αριθμός κορυφής	είδος κορυφής	$^1\text{H}$ ppm	$^{13}\text{C}$ ppm
<b>p-hydroxybenzoic acid</b>	1	d	7,87	133,99
<b>p-hydroxybenzoic acid</b>	2	d	6,81	117,62
<b>quercetin</b>	3	d	7,73	115,1
<b>quercetin</b>	4	dd	7,64/7,62	121,34
<b>quercetin</b>	5	d	6,88	115,8
<b>quercetin</b>	6	d	6,18	98,92
<b>quercetin</b>	7	d	6,39	94,1
<b>caffeic acid</b>	8	d	7,53	146,7
<b>caffeic acid</b>	9	d	7,03	114,83
<b>caffeic acid</b>	10	dd	6,94/6,92	122,54
<b>caffeic acid</b>	11	d	6,77	116,2
<b>caffeic acid</b>	12	d	6,21	115,22
<b>2-phenylethanol</b>	13	d+dd	7,26-7,21-7,17	129,07-129,74
<b>2-phenylethanol</b>	14	t	3,74	64,0
<b>2-phenylethanol</b>	15	t	2,81	40,0
<b>gallic acid</b>	16	s	7,05/7	110,02
<b>tyrosol</b>	17	d	7,02	130,64
<b>tyrosol</b>	18	d	6,69	116,56
<b>tyrosol</b>	19	t	3,68	64,28
<b>tyrosol</b>	20	t	2,71	39,18
<b>catechin</b>	21	d	6,83	114,95
<b>catechin</b>	22	d	6,76	115,78
<b>catechin</b>	23	dd	6,73/6,71	119,75
<b>catechin</b>	24	d	5,93	95,97
<b>catechin</b>	25	d	5,85	95,1
<b>catechin</b>	26	d	4,56	82,61
<b>catechin</b>	27	dd	2,51/2,48	68,55
<b>vanillic acid</b>	28	dd	7,56	113,53
<b>vanillic acid</b>	29	d	7,55	124,88
<b>vanillic acid</b>	30	d	6,84	115,46

**Πίνακας 1.** Ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και οι χημικές μετατοπίσεις σε  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .

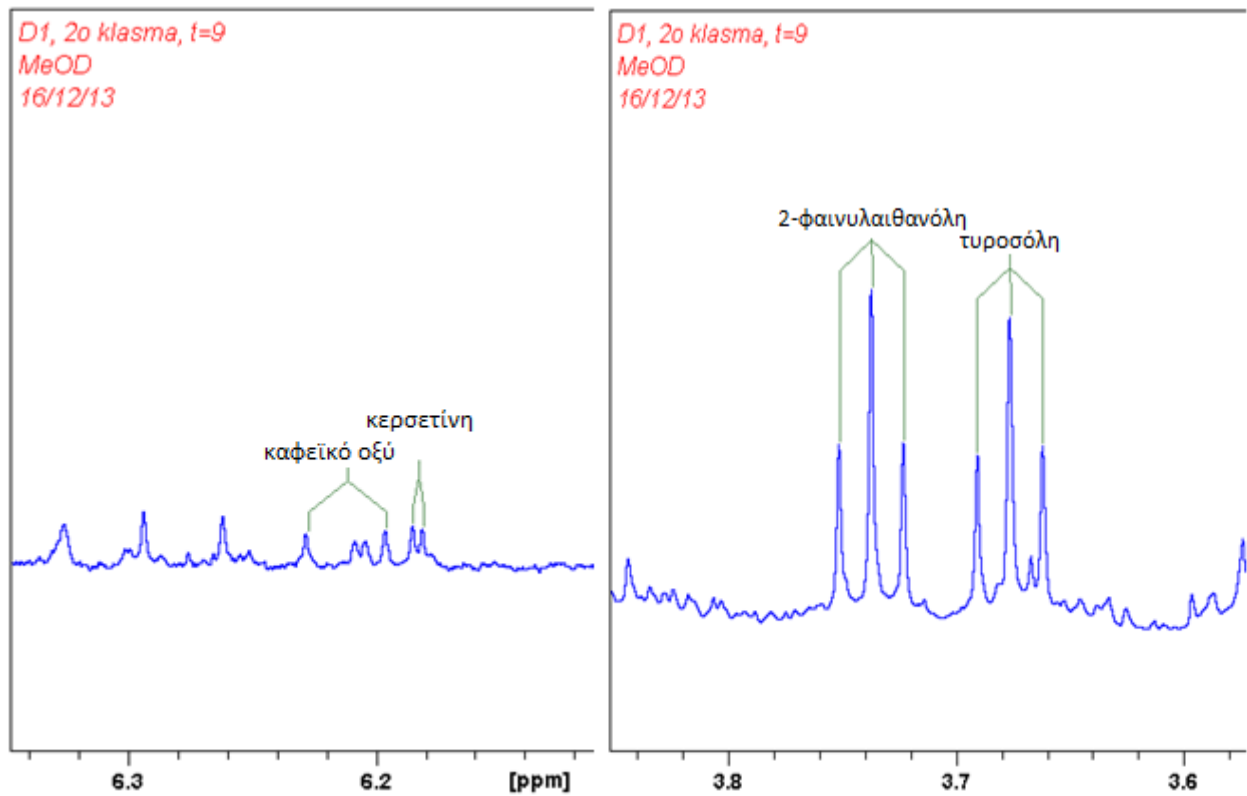
Στις παρακάτω εικόνες του μονοδιάστατου φάσματος του κλάσματος 2 παρουσιάζονται αναλυτικά οι κορυφές των παραπάνω ενώσεων, από τα δείγματα Δαφνί 1 (δεξαμενή inox) και Κοτσιφάλι 2 (βαρέλι chips).



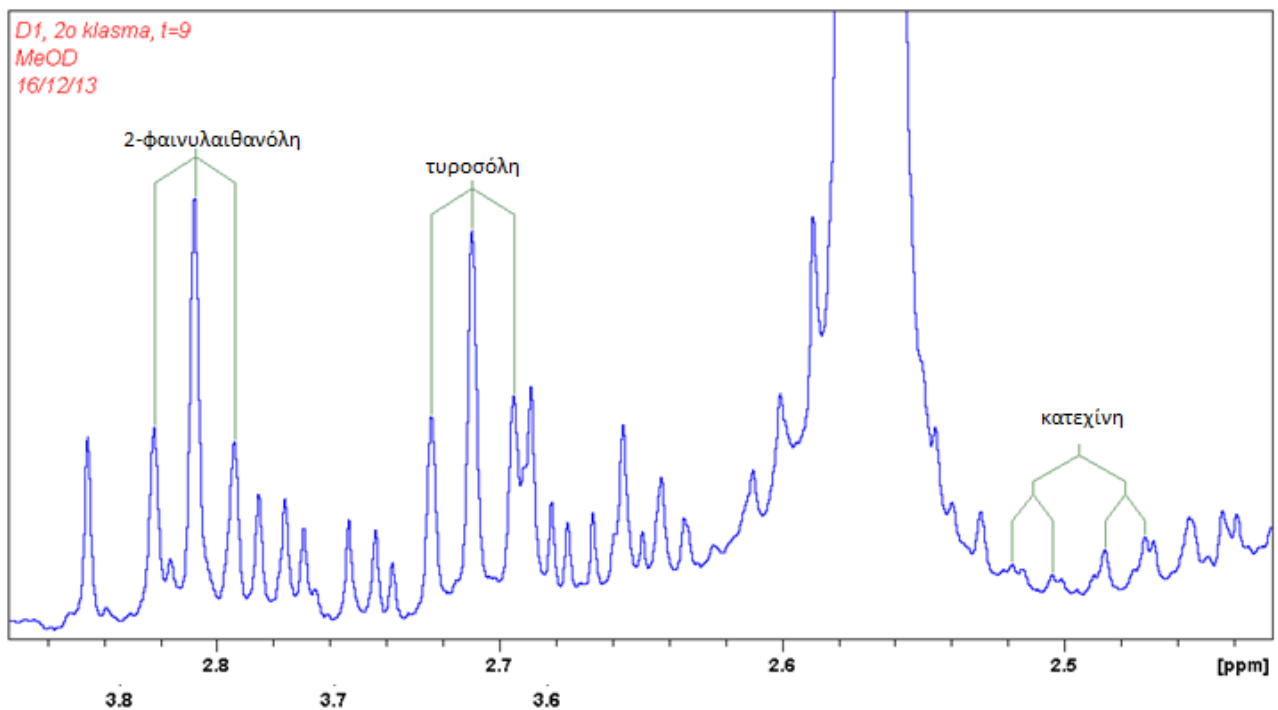
**Εικόνα 1.** Κορυφές των ταυτοποιημένων ενώσεων όπου από αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν στους αριθμούς: 1,3,4,8 και 13 όπως αναφέρεται στον πίνακα 1.



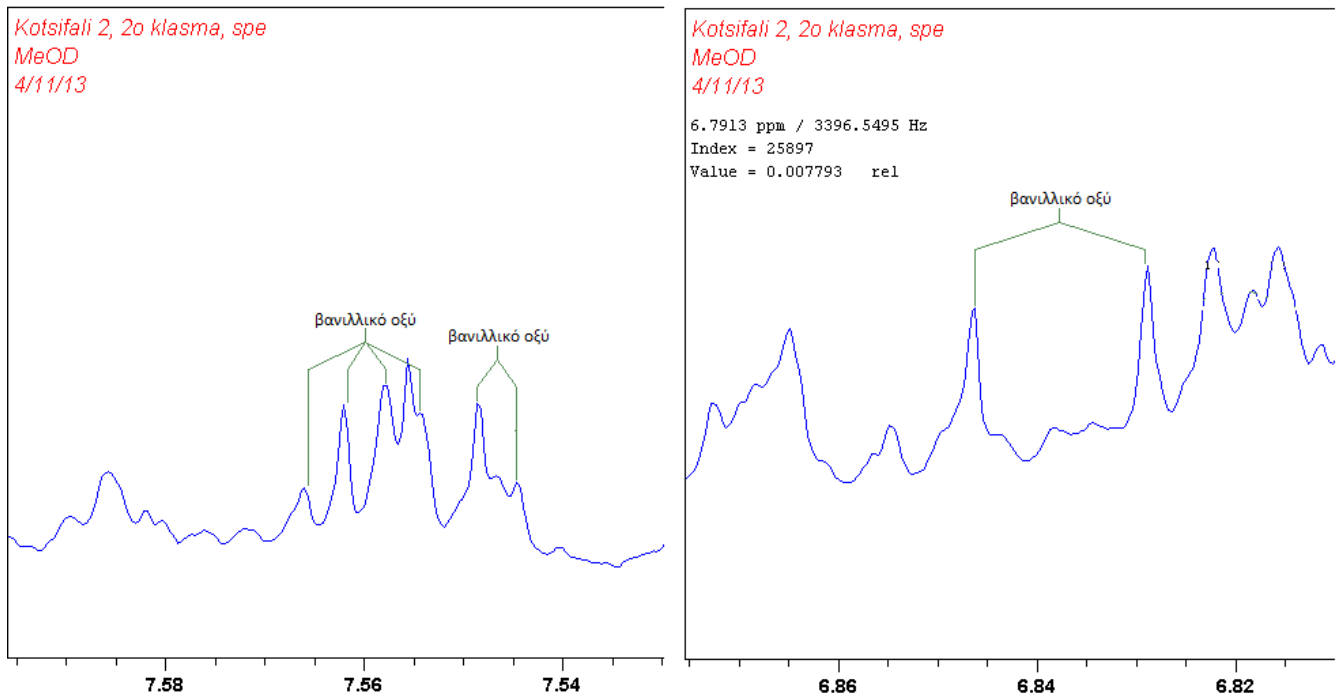
**Εικόνα 2.** Κορυφές των ταυτοποιημένων ενώσεων όπου από αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν στους αριθμούς από τον πίνακα 1: 16, 17, 10, 5, 21, 2, 22, 23 και 18.



**Εικόνα 3.** Κορυφές των ταυτοποιημένων ενώσεων όπου από αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν στους αριθμούς από τον πίνακα 1: 12, 6, 14 και 19.



**Εικόνα 4.** Κορυφές των ταυτοποιημένων ενώσεων όπου από αριστερά προς τα δεξιά αντιστοιχούν στους αριθμούς από τον πίνακα 1: 15, 20, και 27.

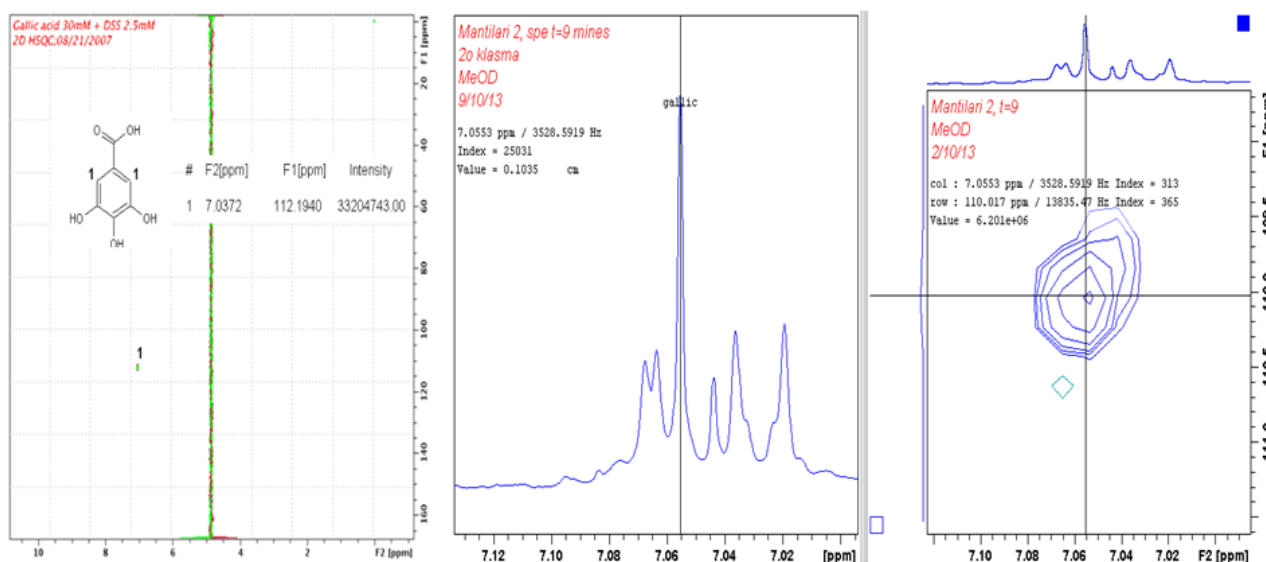


**Εικόνα 5.** Κορυφές των του βανιλλικού οξέος στο δείγμα Κοτσιφάλι 2 αντιστοιχούν από αριστερά προς τα δεξιά στους αριθμούς από τον πίνακα 1: 28, 29 και 30.

## ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η ταυτοποίηση των χημικών ενώσεων που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα οίνων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια είτε πρότυπων ουσιών, είτε με την εύρεση της αντίστοιχης βιβλιογραφίας, είτε από βάση δεδομένων<sup>1</sup>.

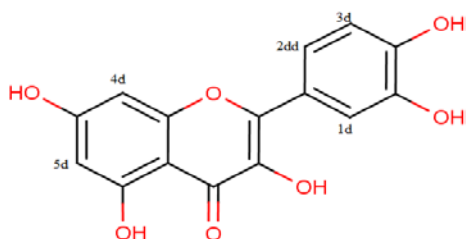
### Γαλλικό οξύ:



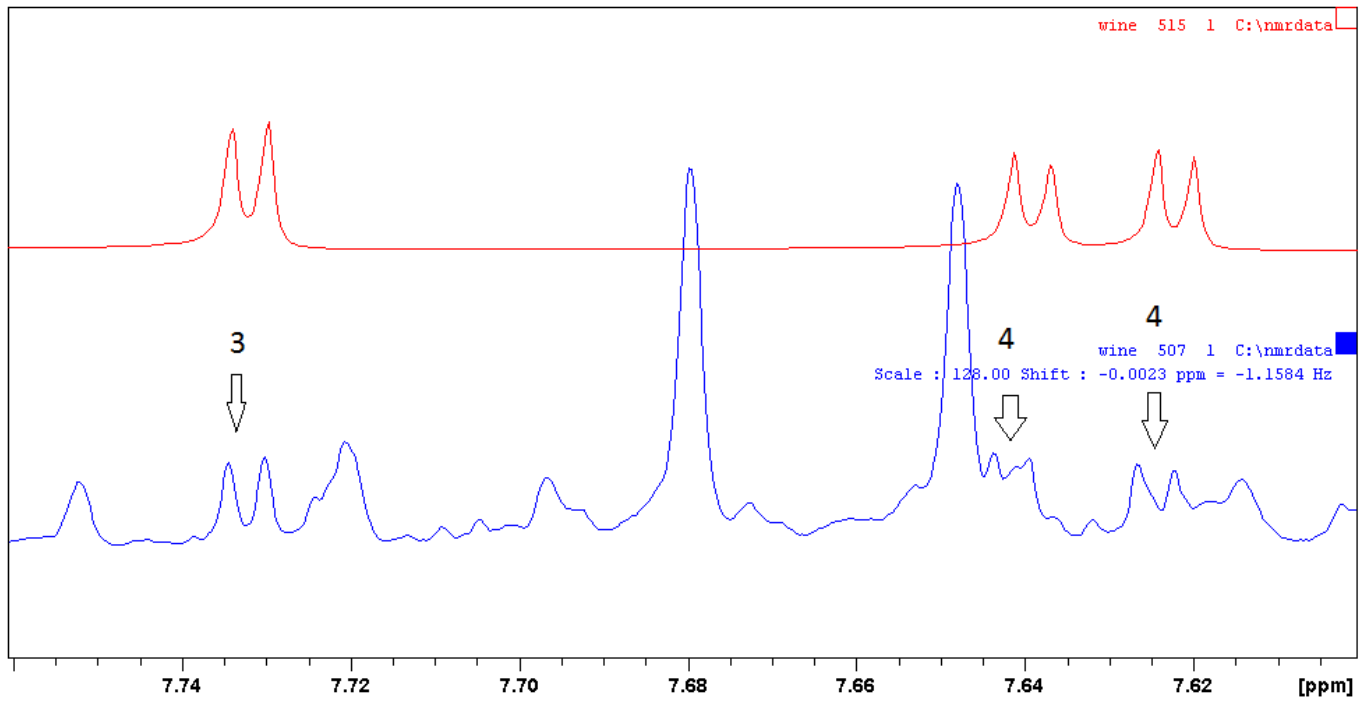
**Εικόνα 6.** Τρόπος ταυτοποίησης γαλλικού οξέος στο δείγμα Μαντηλάρι 2

Όπως φαίνεται από την εικόνα 6 το γαλλικό οξύ εμφανίζει μία απλή κορυφή στα 7,03 ppm του πρωτονίου και 112,19 ppm του άνθρακα σύμφωνα με στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν από βάση δεδομένων. Στο φάσμα του δείγματος εξακριβώθηκε αυτή η κορυφή με την χρήση του μονοδιάστατου φάσματος όπου η κορυφή του πρωτονίου εμφανίζεται στα 7,05 ppm και αντιστοιχεί στον άνθρακα 110,02 ppm όπου φαίνεται στο αντίστοιχο φάσμα HSQC. Οι ελαφρές αποκλίσεις από τις τιμές της βάσης δεδομένων οφείλονται στην διαφορά διαλύτη και άλλων συνθηκών.

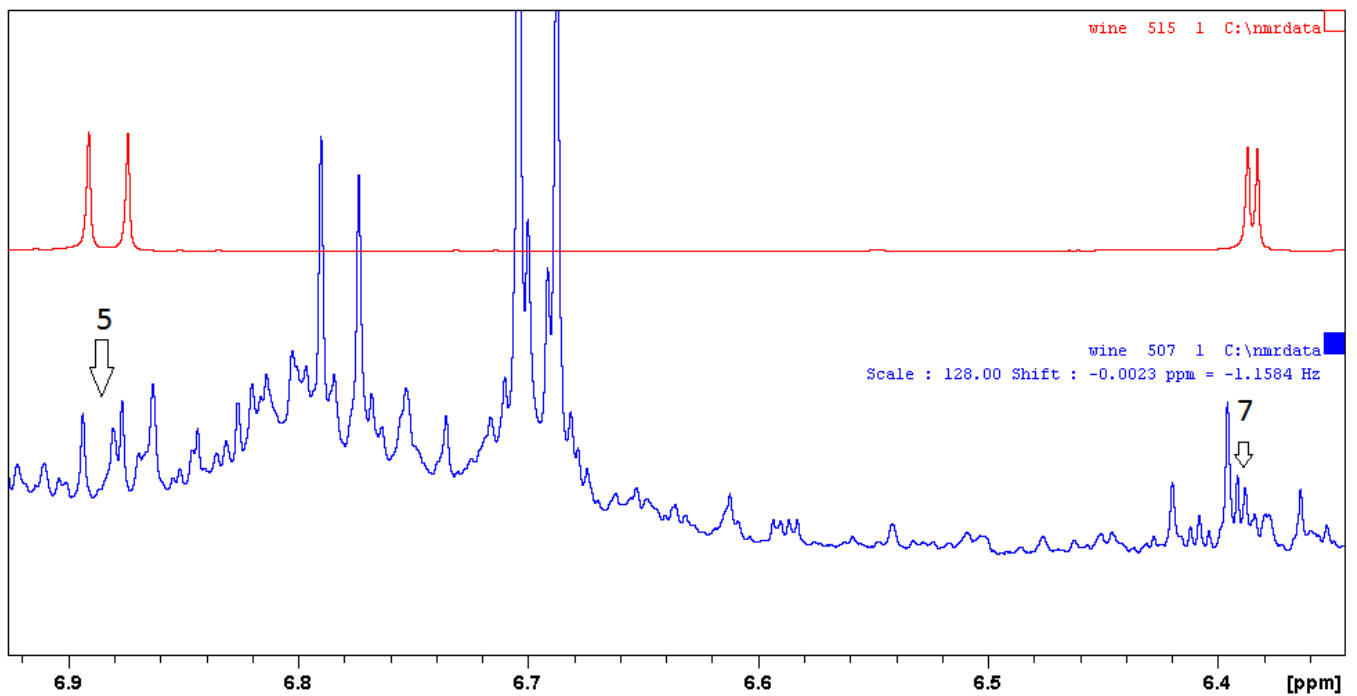
### Κερσετίνη:



Η κερσετίνη εμφανίζει 5 κορυφές, 4 διπλές και μία διπλή της διπλής. Για την ανάθεσή τους χρησιμοποιήθηκε πρότυπη κερσετίνη για την λήψη φάσματος <sup>1</sup>H NMR. Με την χρήση αυτού του φάσματος έγινε σύγκριση των κορυφών της πρότυπης κερσετίνης έναντι του δείγματος Μαντηλάρι 2 και Κοτσιφάλι 1 και διαπιστώθηκε ότι οι αντίστοιχες κορυφές των δειγμάτων είναι της κερσετίνης.

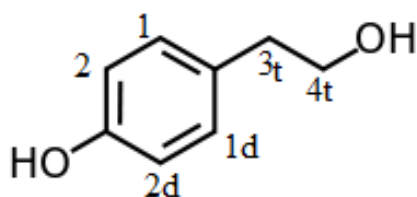


**Εικόνα 7.** Κόκκινο φάσμα: πρότυπη κερσετίνη, μπλε φάσμα: Μαντηλάρι 2. Οι επισημασμένες κορυφές αντιστοιχούν στις κορυφές του πίνακα με αριθμό 3 και 4



**Εικόνα 8.** Κόκκινο φάσμα: πρότυπη κερσετίνη, μπλε φάσμα: Μαντηλάρι 2. Οι επισημασμένες κορυφές αντιστοιχούν στις κορυφές του πίνακα με αριθμό 5 και 7.

## Τυροσόλη:

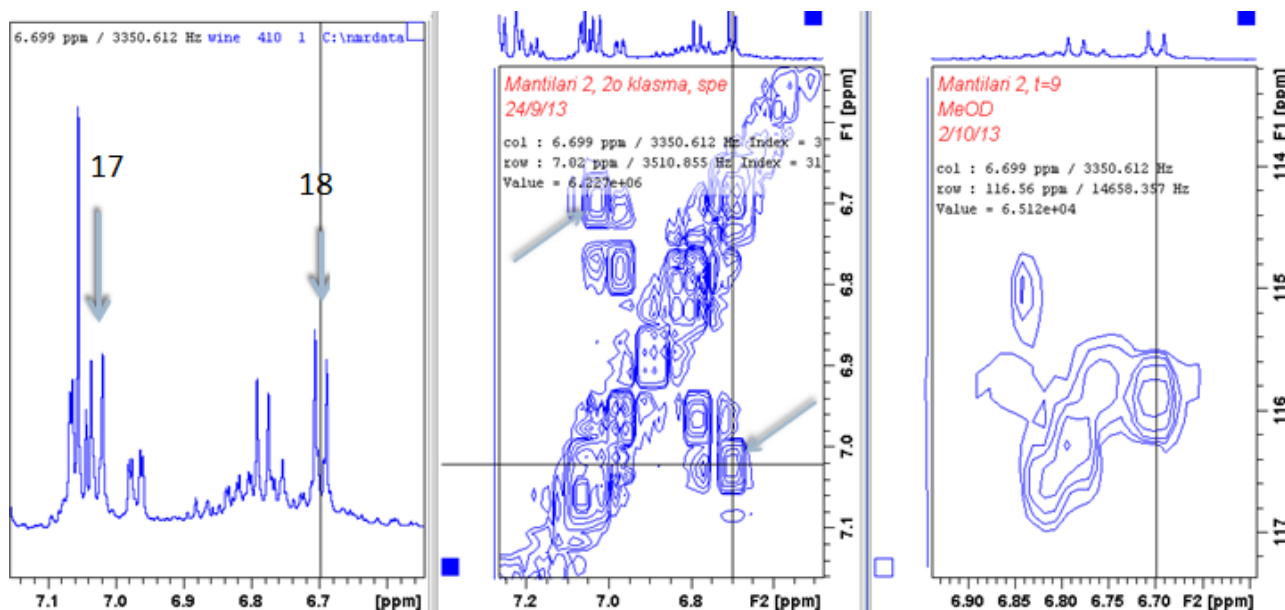


Η τυροσόλη εμφανίζει 4 κορυφές στο μονοδιάστατο φάσμα, 2 διπλές και 2 τριπλές. Για την ταυτοποίηση της στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τιμές από την βιβλιογραφία<sup>2</sup> με τα ακόλουθα στοιχεία:

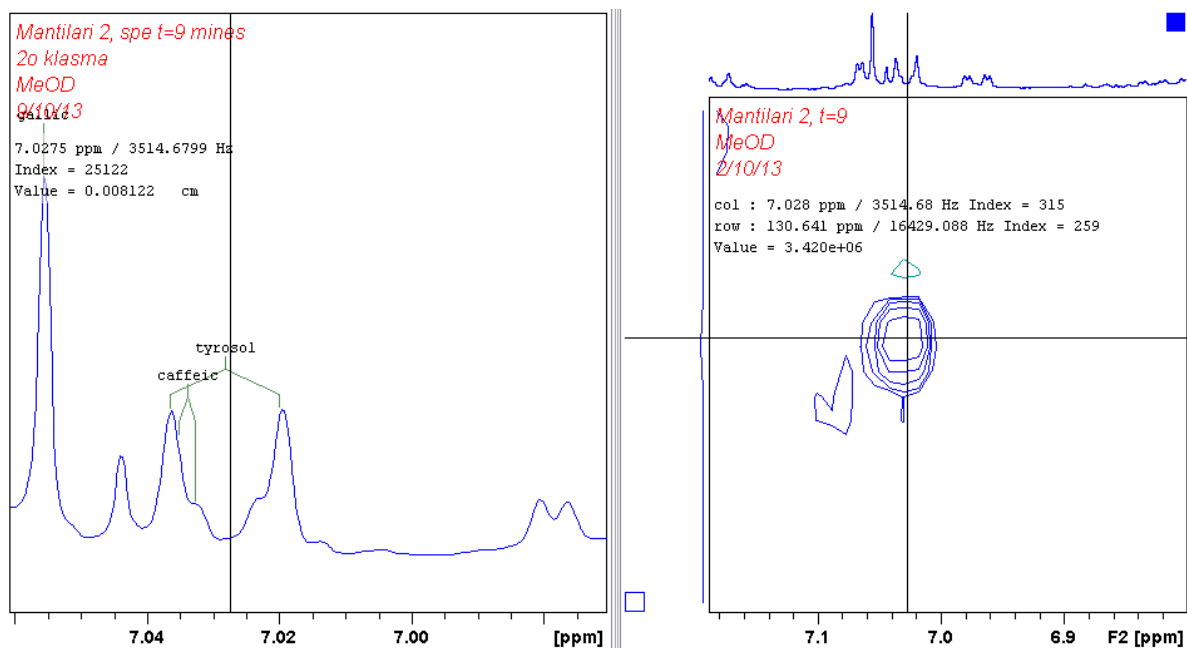
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO, ppm) δ 2.61 (t, 2H, C2-CH<sub>2</sub>, J=7.2 Hz), 3.51 (d, 1H, C1-H, J=7.2 Hz), 3.54 (d, 1H, C1-H, J=6.8 Hz), 4.57 (t, 1H, J=5.2 Hz, OH), 6.66 (d, 2H, J=8.2 Hz), 6.99 (d, 2H, J=8.2 Hz), 9.12 (s, 1H, OH)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO, ppm) δ 38.17 (C1), 62.45 (C4), 62.57 (C2), 114.81(C3), 114.91 (C5), 129.43 (C2), 129.64 (C6), 155.41 (C1)

Οι δύο διπλές κορυφές που εμφανίζονται βιβλιογραφικά στα 6,66 ppm και 6,99 ppm με σταθερά σύζευξης ίση με 8.2Hz και άνθρακες στα 114,81 και 129,43 ppm αντίστοιχα, βρέθηκαν στο φάσμα Μαντηλάρι 2 ως εξής:



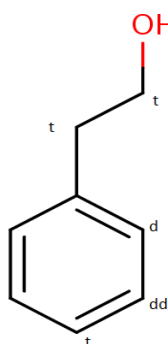
**Εικόνα 9.** Αριστερά: Μονοδιάστατο φάσμα <sup>1</sup>H του δείγματος Μαντηλάρι 2, μέση: COSY φάσμα από το Μαντηλάρι 2 που δείχνει τα γειτονικά πρωτόνια της τυροσόλης, δεξιά: HSQC φάσμα από το Μαντηλάρι 2.



**Εικόνα 10.** Αριστερά: Μονοδιάστατο φάσμα  $^1\text{H}$  του δείγματος Μαντηλάρι 2, δεξιά: HSQC φάσμα από το Μαντηλάρι 2.

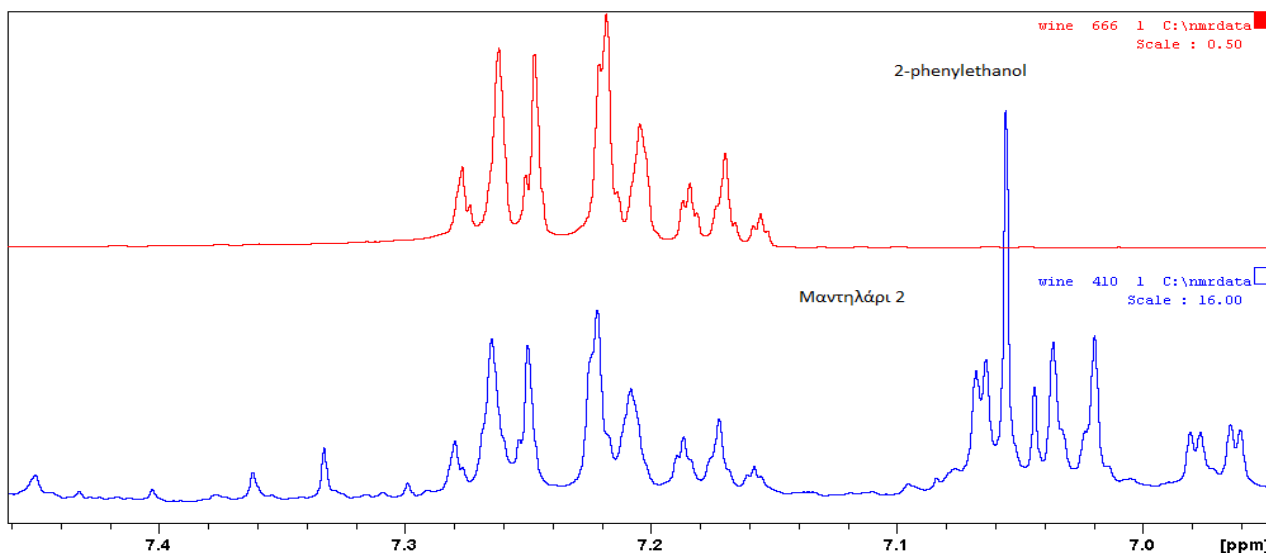
Όπως φαίνεται στην εικόνα 9 από το COSY φάσμα τα πρωτόνια σε χημικές μετατοπίσεις 6,699 ppm και 7,02 ppm είναι γειτονικά (από διπλανούς άνθρακες και σχάζονται μεταξύ τους). Επίσης, από το HSQC φάσμα δεξιά φαίνεται ότι τα πρωτόνια στα 6,699 ppm αντιστοιχούν στον άνθρακα στα 116,56 ppm ενώ από την εικόνα 10 φαίνεται ότι τα πρωτόνια στα 7,02 ppm αντιστοιχούν σε άνθρακα 130,64 ppm. Επιπλέον, από τις πειραματικές μετρήσεις βρέθηκε ότι η σταθερά σύζευξης είναι ίση με 8.54Hz για τις δύο αυτές διπλές κορυφές. Όλες αυτές οι τιμές συμφωνούν με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας άρα συμπεραίνεται ότι πρόκειται για την τυροσόλη.

### 2-φαινυλαιθανόλη:

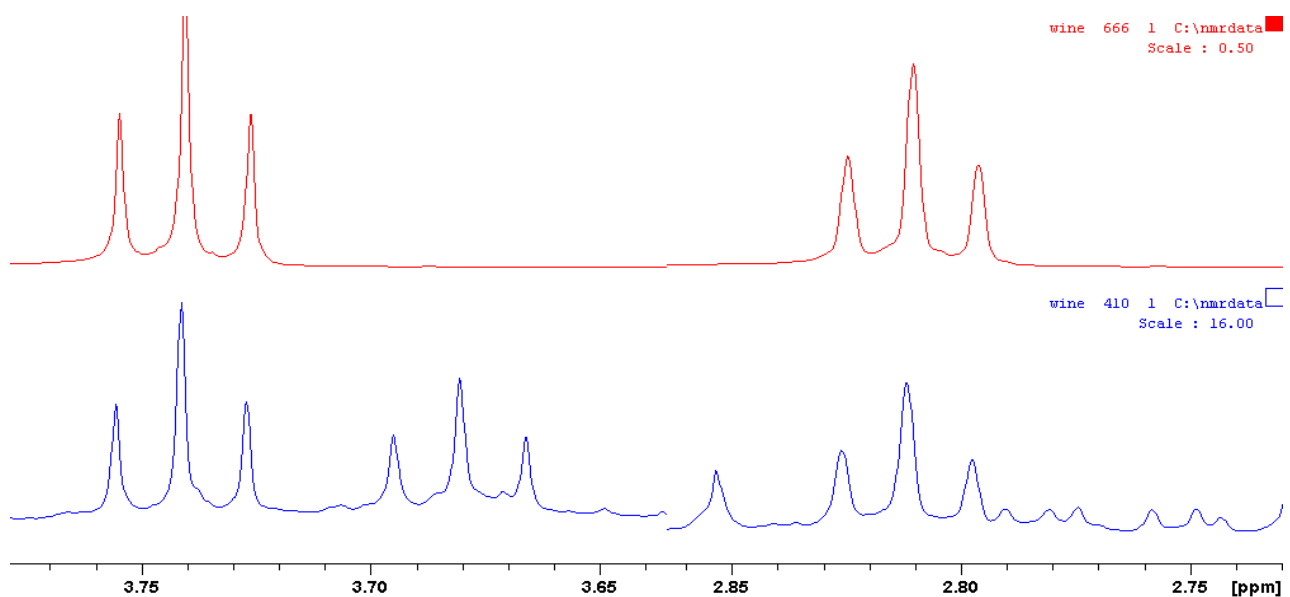


Πρόκειται για μία ένωση που βρέθηκε σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα κρασιά. Εμφανίζει μία διπλή, 3 τριπλές και μία διπλή της διπλής κορυφές. Η ταυτοποίησή της έγινε με την χρήση πρότυπης 2-φαινυλαιθανόλης για την λήψη του μονοδιάστατου φάσματός της. Οι αντίστοιχες κορυφές στα δείγματα δείχνουν ξεκάθαρα ότι πρόκειται για αυτή την ένωση. Οι εικόνες 11 και 12 επαληθεύουν:



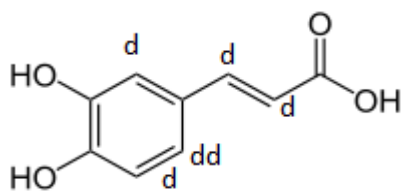


**Εικόνα 11.** Το μπλε φάσμα είναι από το δείγμα Μαντηλάρι 2, ενώ το κόκκινο της πρότυπης 2-φαινυλαιθανόλης και οι κορυφές που φαίνονται είναι από τον πίνακα με αριθμό 13.

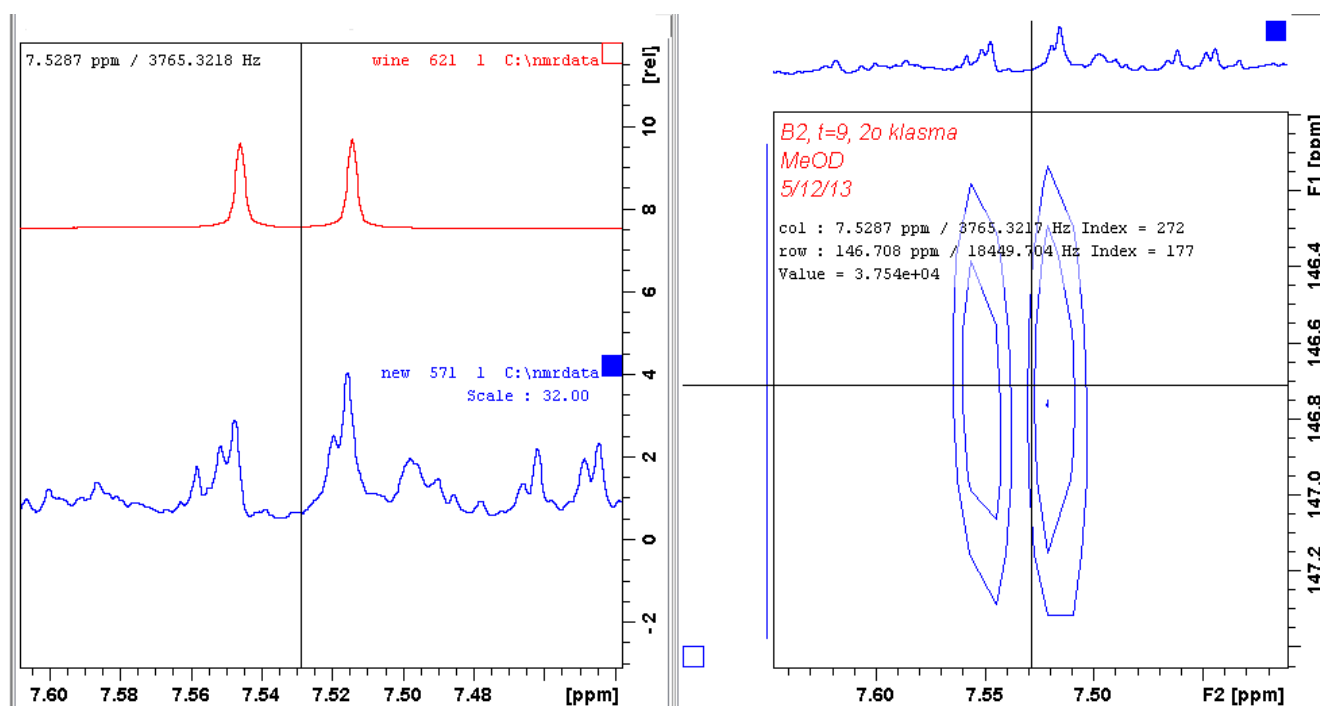


**Εικόνα 12.** Το μπλε φάσμα είναι από το δείγμα Μαντηλάρι 2, ενώ το κόκκινο της πρότυπης 2-φαινυλαιθανόλης και οι κορυφές που φαίνονται είναι από τον πίνακα με αριθμό 14 και 15.

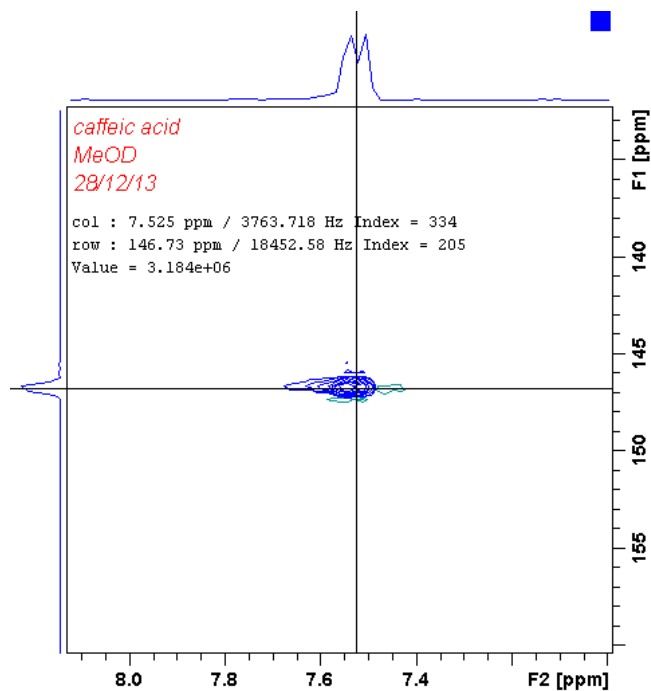
## Καφεϊκό οξύ:



Το καφεϊκό οξύ εμφανίζει 4 διπλές κορυφές και μία διπλή της διπλής. Η ταυτοποίηση του πραγματοποιήθηκε με την χρήση πρότυπου καφεϊκού οξέος και την λήψη των φασμάτων του σε μία διάσταση  $^1\text{H}$  και σε δύο διαστάσεις  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC). Οι κορυφές των φασμάτων συμφωνούν με τις κορυφές στο δείγμα Βηλάνα 2. Ενδεικτικά αναφέρεται η διπλή κορυφή στα 7,534-146,709ppm όπου εμφανίζεται και στο φάσμα  $^1\text{H}$  και HSQC του δείγματος όπως φαίνεται και στην εικόνα 13.



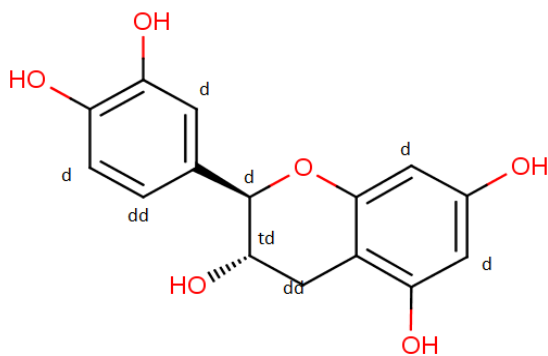
**Εικόνα 13.** Αριστερά: μπλε φάσμα: Δείγμα Βηλάνα 2 και κόκκινο φάσμα: πρότυπο καφεϊκό οξύ. Δεξιά: HSQC φάσμα δείγματος Βηλάνα 2 με την αντίστοιχη κορυφή. Ο αριθμός αυτής της κορυφής από τον πίνακα 1 είναι το 8.



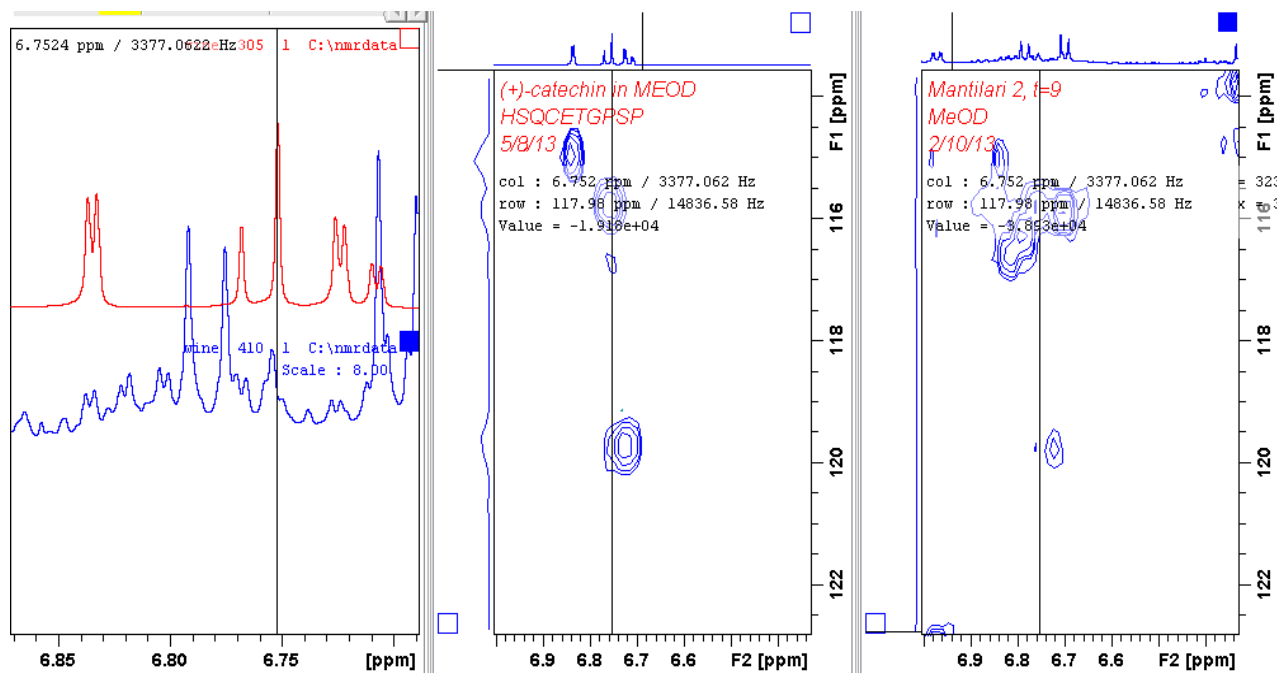
**Εικόνα 14.** HSQC φάσμα του καφεϊκού οξέος με την κορυφή στα 7,534-146,709 ppm.

Με όμοιο τρόπο επαληθεύτηκαν και οι υπόλοιπες κορυφές του καφεϊκού οξέος.

### Κατεχίνη:



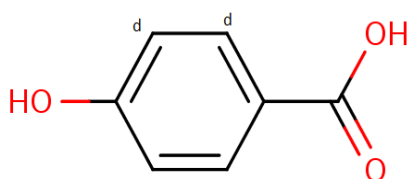
Η κατεχίνη όπως φαίνεται και από την δομή της είναι ένα μεγάλο μόριο που εμφανίζει πολλές κορυφές. Από αυτές βρέθηκαν 5 κορυφές. Η ταυτοποίησή τους έγινε με χρήση πρότυπης κατεχίνης και τα φάσματά της σε μία διάσταση  $^1\text{H}$  και δύο διαστάσεις HSQC.



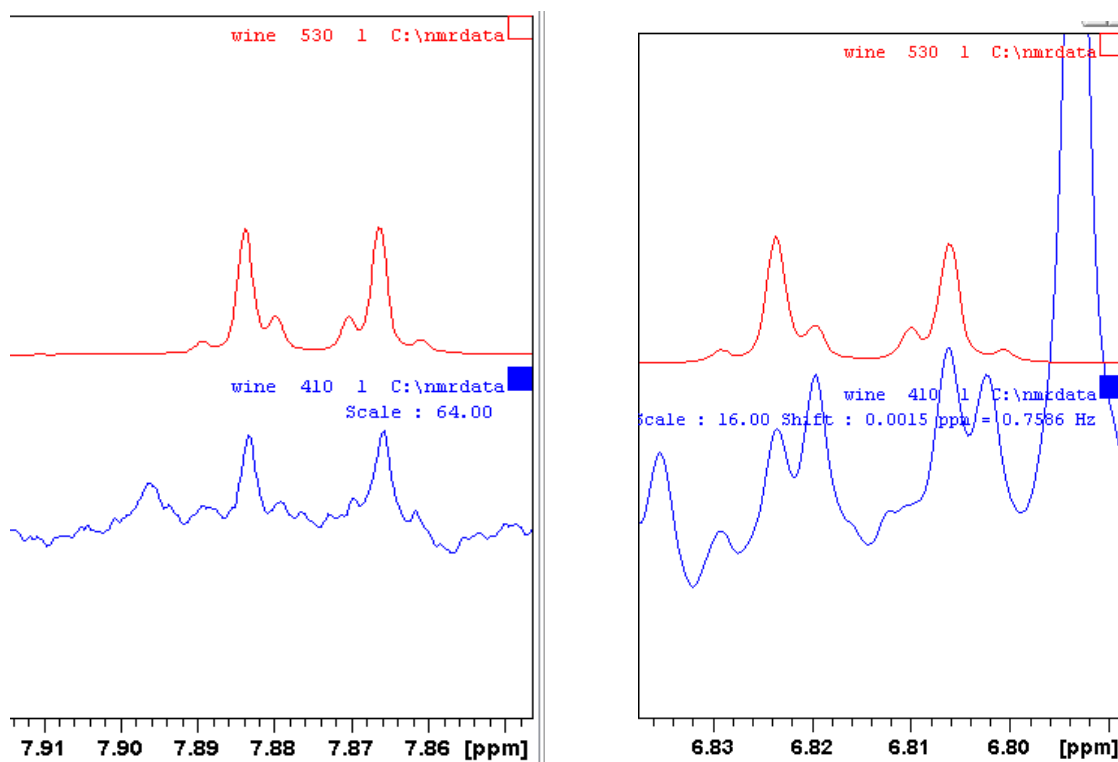
**Εικόνα 15.** Αριστερά: μπλε φάσμα: δείγμα Μαντηλάρι 2, κόκκινο φάσμα: πρότυπη κατεχίνη. Μέση: HSQC φάσμα πρότυπης κατεχίνης με τις αντίστοιχες κορυφές από το μονοδιάστατο φάσμα αριστερά. Δεξιά: HSQC φάσμα του δείγματος Μαντηλάρι 2.

Από την εικόνα 15 φαίνεται ότι οι κορυφές στην πρότυπη κατεχίνη υπάρχουν και στο φάσμα του δείγματος Μαντηλάρι 2. Ομοίως ταυτοποιήθηκαν και οι υπόλοιπες κορυφές της κατεχίνης.

### π-υδροξυβενζοϊκό:

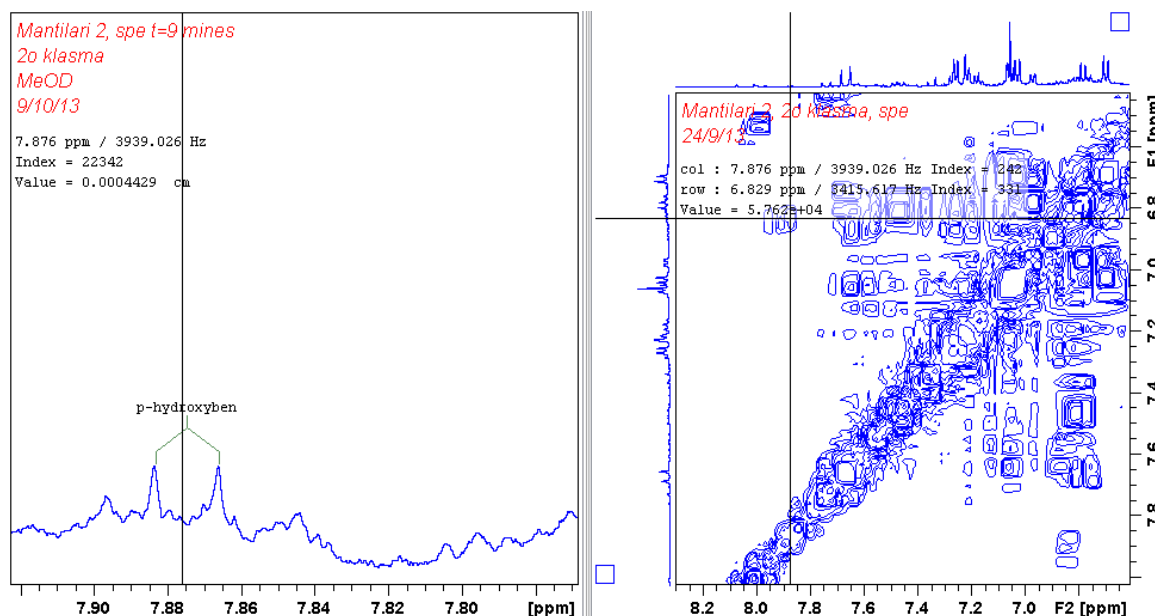


Το π-υδροξυβενζοϊκό εμφανίζει δύο διπλές κορυφές και βρέθηκε στα κρασιά σε μικρές ποσότητες. Η ταυτοποίησή του έγινε με την χρήση του πρότυπου μονοδιάστατου φάσματος του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε σύγκριση με το μονοδιάστατο φάσμα του δείγματος Μαντηλάρι 2.

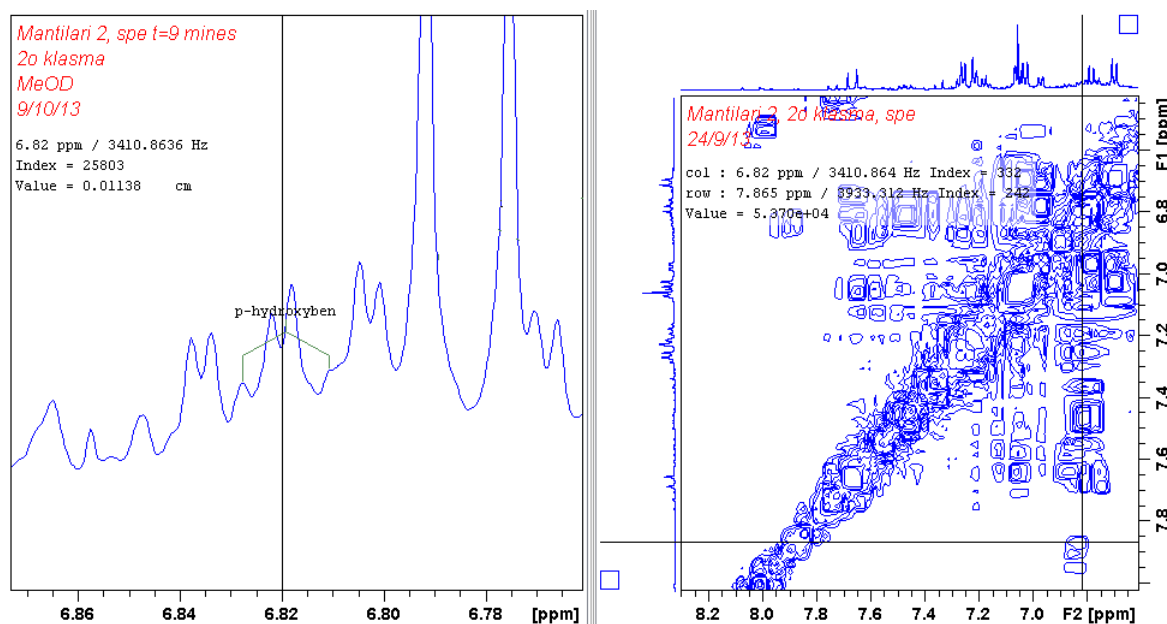


**Εικόνα 16.** μπλε φάσμα: δείγμα Μαντηλάρι 2, κόκκινο φάσμα: πρότυπη ένωση π-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Αριστερά: κορυφή από τον πίνακα 1 με αριθμό 1. Δεξιά: κορυφή από τον πίνακα 1 με αριθμό 2.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το φάσμα COSY του δείγματος (εικόνες 17 και 18) για την επαλήθευση των σχέσεων των γειτονικών πρωτονίων:

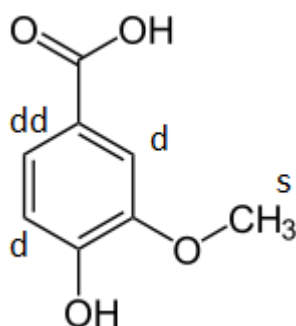


**Εικόνα 17.** Αριστερά: Μονοδιάστατο φάσμα δείγματος Μαντηλάρι 2 με την κορυφή του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος στα 7,876 ppm. Δεξιά: Φάσμα COSY του ίδιου δείγματος με την κορυφή των  $^1\text{H}$  στα 7,876 ppm όπου έχουν γειτονικά  $^1\text{H}$  στα 6,829 ppm.

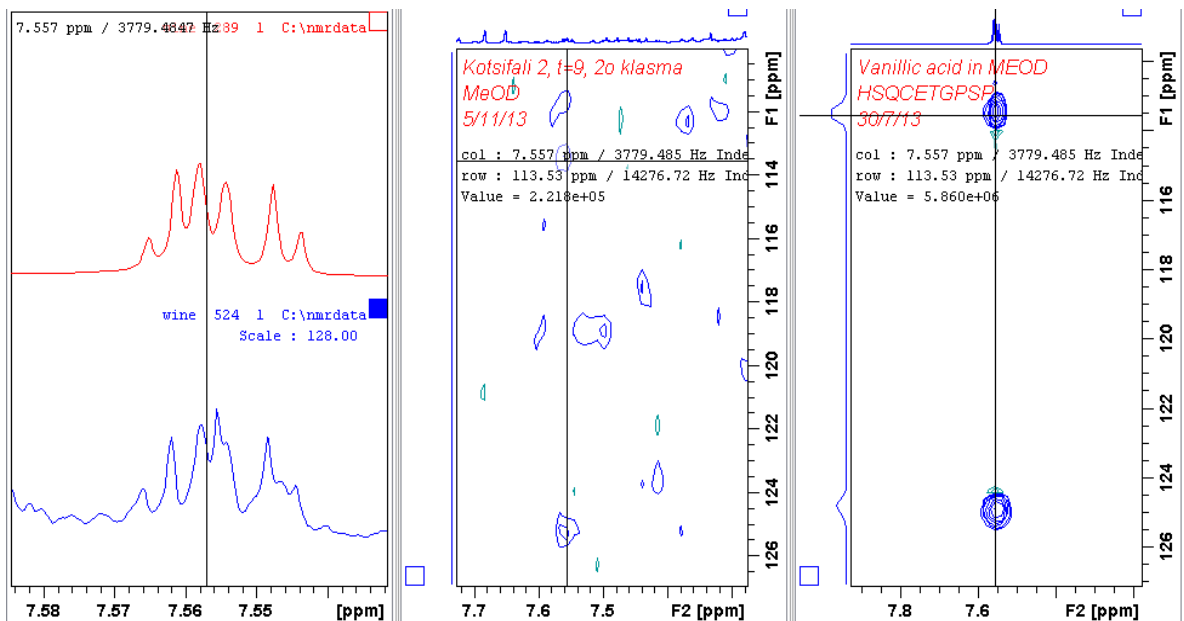


**Εικόνα 18.** Αριστερά: Μονοδιάστατο φάσμα δείγματος Μαντηλάρι 2 με την κορυφή του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος στα 6.82 ppm Δεξιά: Φάσμα COSY του ίδιου δείγματος με την κορυφή των  $^1\text{H}$  στα 6.82 ppm όπου έχουν γειτονικά  $^1\text{H}$  στα 7.865 ppm.

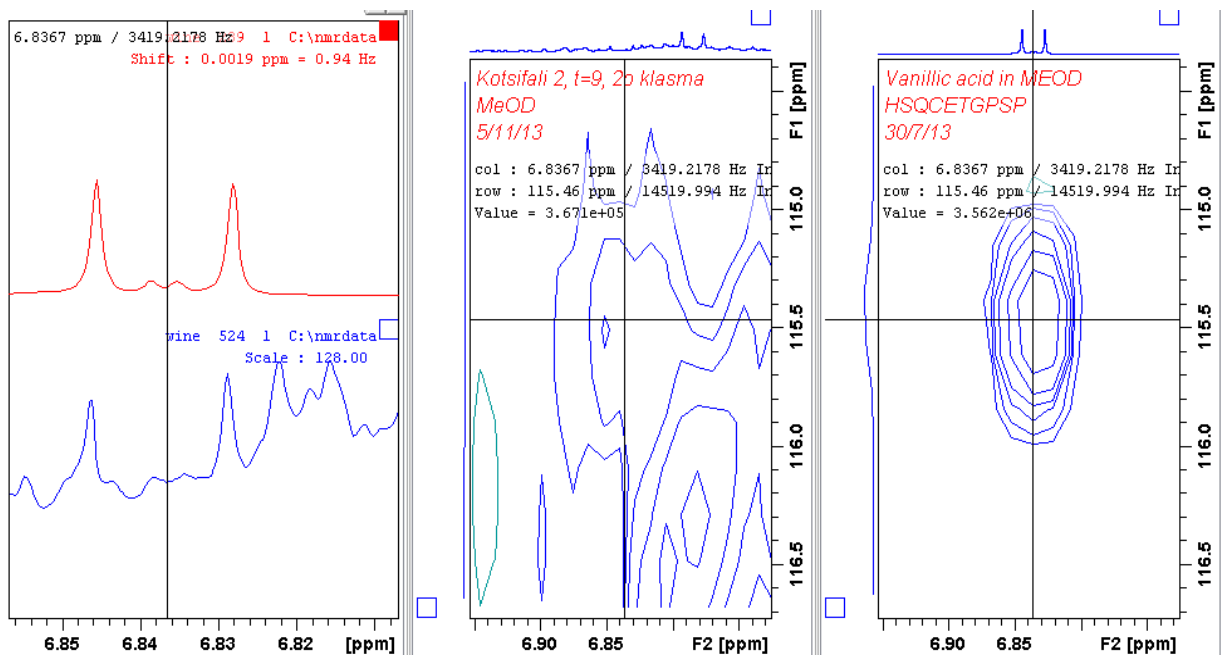
### Βανιλικό οξύ:



Το βανιλικό οξύ, όπως φαίνεται και από την δομή του εμφανίζει 2 διπλές κορυφές, μία διπλή της διπλής και μία απλή κορυφή. Η ανάθεσή τους έγινε στο δείγμα Κοτσιφάλι 2 (βαρέλι chips) και με την χρήση πρότυπου διαλύματος βανιλικού οξέος όπου λήφθηκε το φάσμα  $^1\text{H}$  μίας διάστασης και το φάσμα δύο διαστάσεων HSQC. Από τις εικόνες 19 και 20 επιβεβαιώνεται η ύπαρξη του βανιλικού οξέος στο δείγμα.



**Εικόνα 19.** Αριστερά: μπλε φάσμα: δείγμα Κοτσιφάλι 2, κόκκινο φάσμα: πρότυπο βανιλικό οξύ. Μέση: Φάσμα HSQC του δείγματος Κοτσιφάλι 2 με τις αντίστοιχες σχάσεις  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  των κορυφών από το μονοδιάστατο φάσμα. Δεξιά: Φάσμα HSQC του πρότυπου βανιλικού οξέος με τις αντίστοιχες σχάσεις  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  των κορυφών από το μονοδιάστατο φάσμα.



**Εικόνα 20.** Αριστερά: μπλε φάσμα: δείγμα Κοτσιφάλι 2, κόκκινο φάσμα: πρότυπο βανιλικό οξύ – διπλή κορυφή στα 6,84 ppm. Μέση: Φάσμα HSQC του δείγματος Κοτσιφάλι 2- η κορυφή του  $^1\text{H}$  στα 6,84 ppm αντιστοιχεί στον  $^{13}\text{C}$  στα 115 ppm. Δεξιά: Φάσμα HSQC του πρότυπου βανιλικού οξέος - η κορυφή του  $^1\text{H}$  στα 6,84 ppm αντιστοιχεί στον  $^{13}\text{C}$  στα 115 ppm.

## ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΕΝΩΣΕΩΝ

Μετά την ανάθεση των ενώσεων στα δείγματα των οίνων πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση τους στα δείγματα όπου περιείχαν το εσωτερικό πρότυπο TMS για την δυνατότητα σύγκρισης τους. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την μέθοδο της ολοκλήρωσης των κορυφών μέσω του προγράμματος WINNMR από την εταιρία Bruker. Το πρότυπο TMS ήταν σταθερό σε ποσότητα 47,604 $\mu\text{mol}$   $^1\text{H}$  και χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς κατά την ολοκλήρωση των υπόλοιπων κορυφών ώστε να βρεθεί η τιμή της ποσότητάς τους. Τα υπόλοιπα δείγματα που δεν περιέχουν TMS θα σχολιαστούν παρακάτω ποιοτικά. Οι ποσότητες των ενώσεων παρατίθενται στον πίνακα 2 και προέρχονται από τον μέσο όρο των τιμών από τις βέλτιστες ολοκληρώσεις για κάθε ένωση.

Ένωση	Βηλάνα 5 ( $\mu\text{mol}$ )	Βηλάνα 4 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 1 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 2 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 4 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 3 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 5 ( $\mu\text{mol}$ )
$\pi$ -υδροξυβενζοϊκό οξύ	0,00194	IXNH	0,07622	0,08878	0,2015	0,0486	0,0648
κερσετίνη	0,00648	IXNH	0,0926	0,2541	0,2339	0,1094	0,187
καφεϊκό οξύ	0,2155	1,8845	0,1055	0,1257	0,4083	0,0985	0,1282
2-φαινυλαιθανόλη	0,6474	5,9658	1,818	6,2032	3,6734	3,9877	5,7439
γαλλικό οξύ	0,1186	0,4157	0,2249	0,8331	0,4186	0,6941	1,1924
τυροσόλη	0,56	3,38	1,629	4,516	2,6422	3,7797	4,2537
κατεχίνη	0,0144	0,6526	0,07517	0,7822	0,478	0,6116	0,8045

**Πίνακας 2.** Ποσότητες των ενώσεων στα δείγματα οίνων με TMS σε  $\mu\text{mol}$

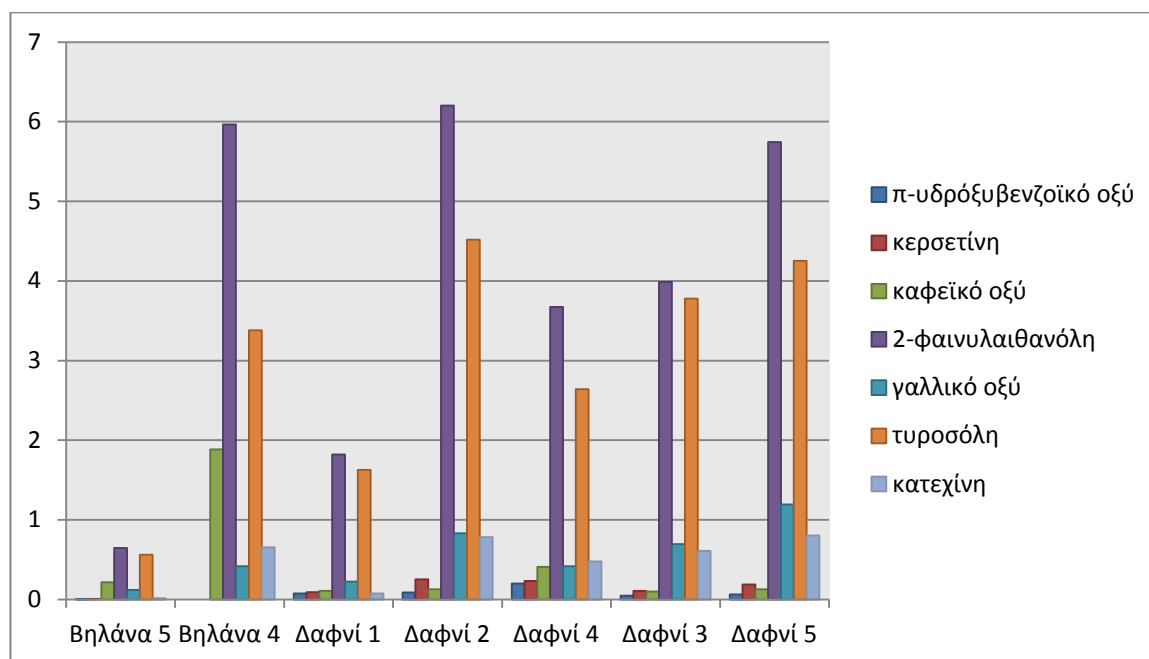
Μερικές από τις ποσότητες των ενώσεων που αναφέρονται παραπάνω προέρχονται από τον μέσο όρο ολοκληρώσεων περισσότερων από μίας κορυφής. Έτσι παρατίθεται και ο πίνακας 3 με τις τυπικές αποκλίσεις για αυτές τις τιμές.

Ένωση	Βηλάνα 5 ( $\mu\text{mol}$ )	Βηλάνα 4 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 1 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 2 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 4 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 3 ( $\mu\text{mol}$ )	Δαφνί 5 ( $\mu\text{mol}$ )
κερσετίνη	0,003668		0,000933	0,092424			
καφεϊκό οξύ	0,037541	0,689145	0,030076				
2-φαινυλαιθανόλη	0,082866	1,373463	0,439051	1,797674	0,860391	0,891737	1,37354
γαλλικό οξύ							
τυροσόλη	0,102566	0,184142	0,366671	1,734761	0,969671	1,757864	1,67367
κατεχίνη	0,003875	0	0,010058	0,060489	0,066613	0,080375	0,140678

**Πίνακας 3.** Τυπική απόκλιση των ποσοτήτων των ενώσεων που βρέθηκαν στα δείγματα με TMS



Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι ποσότητες των ενώσεων στα δείγματα, όπου φαίνονται οι διαφορές στις τιμές μεταξύ των ενώσεων αλλά και μεταξύ των δειγμάτων.



**Διάγραμμα 1.** Ποσότητες των ενώσεων που έγινε η ανάθεσή τους στα διαφορετικά δείγματα οίνων που περιείχαν TMS

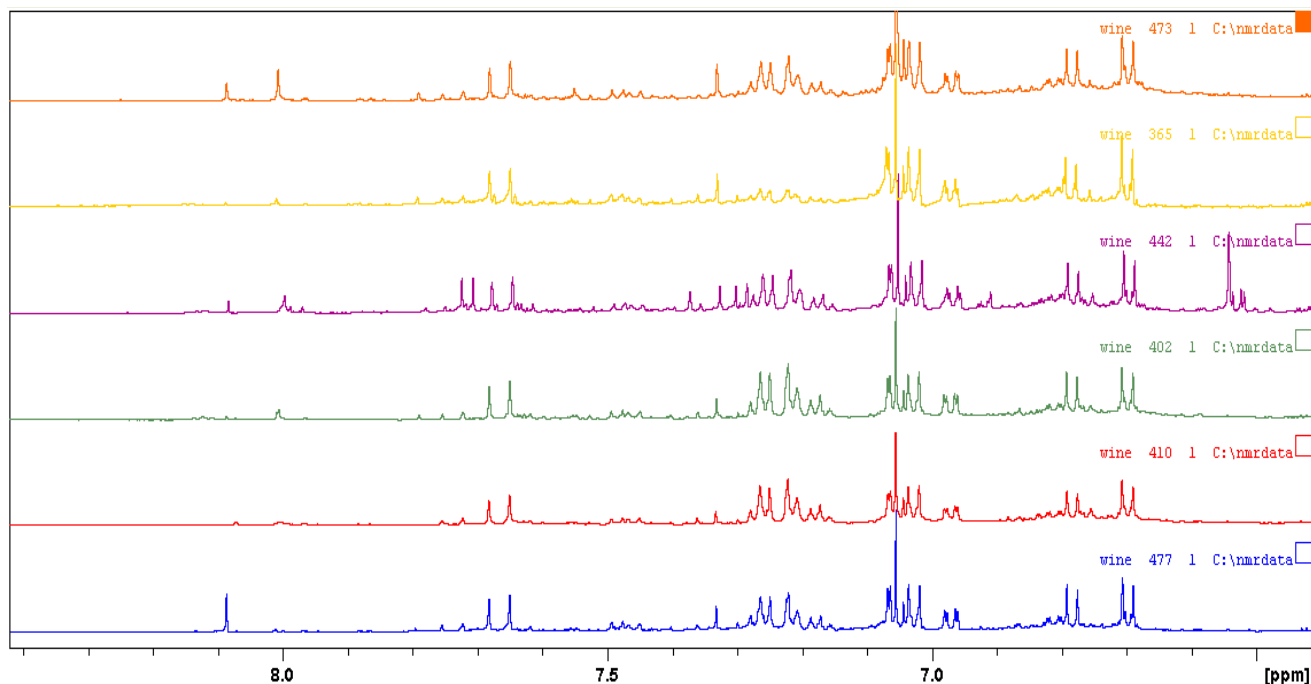
## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### Ποσότητες στα δείγματα με το TMS

Όπως φαίνεται και από το συνοπτικό διάγραμμα σε όλα τα δείγματα παρατηρούνται κάποια κοινά χαρακτηριστικά αλλά και διαφορές. Αρχικά, το π-υδρόξυβενζοϊκό οξύ και η κερσετίνη υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες ή ίχνη. Παρόλα αυτά στο Βηλάνα 4 (βαρέλι ακακίας) οι συγκεκριμένες ενώσεις είναι σε ίχνη γεγονός που τις καθιστά αδύνατον να ποσοτικοποιηθούν. Επίσης, στην ποικιλία Δαφνί οι ποσότητές τους είναι μεγαλύτερες από την ποικιλία Βηλάνα. Το καφεϊκό οξύ εμφανίζεται σε μικρές σχετικά συγκεντρώσεις στα δείγματα εκτός από το δείγμα Βηλάνα 4 (βαρέλι ακακίας) όπου έχει μεγάλη τιμή με διαφορά. Η 2-φαινυλαιθανόλη και η τυροσόλη βρίσκονται στις μεγαλύτερες ποσότητες από τις υπόλοιπες ενώσεις σε όλα τα δείγματα, όμως στα δείγματα Βηλάνα 5 (βαρέλι γαλλικής δρυός) και Δαφνί 1 (δεξαμενή inox) υπάρχουν σε σχετικά μικρές ποσότητες. Το γαλλικό οξύ και η κατεχίνη διατηρούνται σε μεσαία επίπεδα στα δείγματα, ενώ στο Βηλάνα 5 και Δαφνί 1 είναι σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Γενική παρατήρηση είναι ότι το Δαφνί 1 αλλά κυρίως και το Βηλάνα 5 εμφανίζουν τις μικρότερες συγκεντρώσεις στις φαινολικές ενώσεις που έγινε η ανάθεση.

## Ποιοτικός σχολιασμός ενώσεων μεταξύ βαρελιών:

Για την ποιοτική σύγκριση των αρωματικών ενώσεων μεταξύ βαρελιών χρησιμοποιήθηκε η ποικιλία του ερυθρού ξηρού οίνου Μαντηλάρι στα μονοδιάστατα φάσματα κάθε δείγματος.

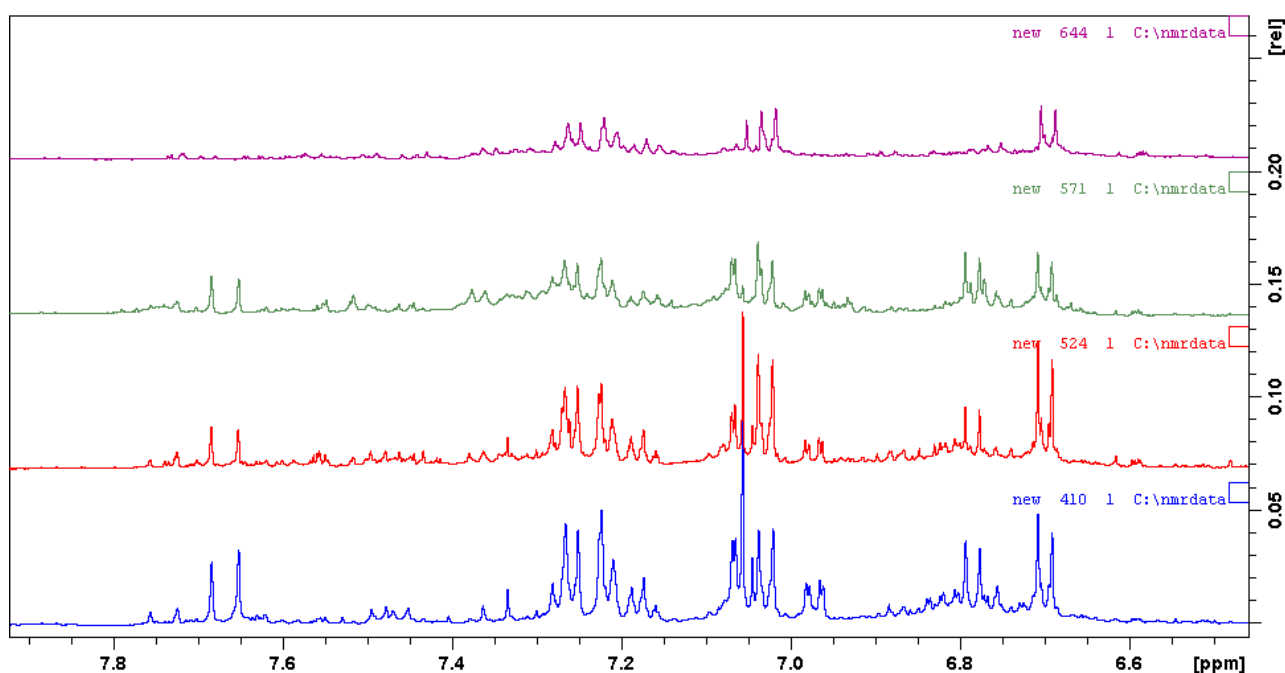


**Εικόνα 21.** Φάσματα μίας διάστασης <sup>1</sup>H της ποικιλίας Μαντηλάρι σε διαφορετικά βαρέλια ωρίμανσης. Χρώματα φασμάτων και αντίστοιχα βαρέλια: μπλε: δεξαμενή inox, κόκκινο: chips, πράσινο: αμερικάνικη δρυς, μωβ: ακακία, κίτρινο: γαλλική δρυς, πορτοκαλί: καστανιά.

Η βασικότερη παρατήρηση μεταξύ των βαρελιών στην ίδια ποικιλία είναι ότι το βαρέλι ακακίας προσδίδει τις μεγαλύτερες διαφορές σε φαινολικές ενώσεις αλλά και σε άλλες ουσίες. Πολλές επιπλέον κορυφές εμφανίζονται στις ποικιλίες που ωρίμασαν σε αυτό το βαρέλι. Επίσης, στην ποικιλία Μαντηλάρι παρατηρήθηκαν αρκετές ομοιότητες μεταξύ των βαρελιών στην αρωματική περιοχή (6,5-8ppm) αλλά και στις υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις παρατηρήθηκαν τα εξής: μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ των βαρελιών chips και αμερικάνικης δρυός, και μεταξύ της δεξαμενής inox, γαλλικής δρυός και καστανιάς.

## Ποιοτικός σχολιασμός ενώσεων μεταξύ ποικιλιών

Το π-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ παρατηρείται σε μικρότερες ποσότητες στην ποικιλία Βηλάνα από ότι στις υπόλοιπες ποικιλίες όπου φαίνεται να κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα. Επίσης, το βανιλλικό οξύ παρουσιάζεται μόνο στην ποικιλία Κοτσιφάλι. Επιπλέον, στην ποικιλία Βηλάνα υπάρχει μεγάλη ποσότητα καφεϊκού οξέος, ενώ το γαλλικό οξύ εμφανίζει μικρότερες κορυφές σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες. Στην ποικιλία Δαφνί παρατηρήθηκαν μεγάλες κορυφές κερσετίνης αλλά και κατεχίνης. Μία ακόμη παρατήρηση είναι ότι στην ποικιλία Κοτσιφάλι υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα κερσετίνης σε σχέση με την ποικιλία Μαντηλάρι. Τέλος, σε όλες τις ποικιλίες εμφανίζονται σε μεγάλες ποσότητες η 2-φαινυλαιθανόλη, η τυροσόλη και το γαλλικό οξύ με την διαφορά ότι στα κόκκινα κρασιά βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα λευκά που εμφανίζουν λίγο χαμηλότερες κορυφές.

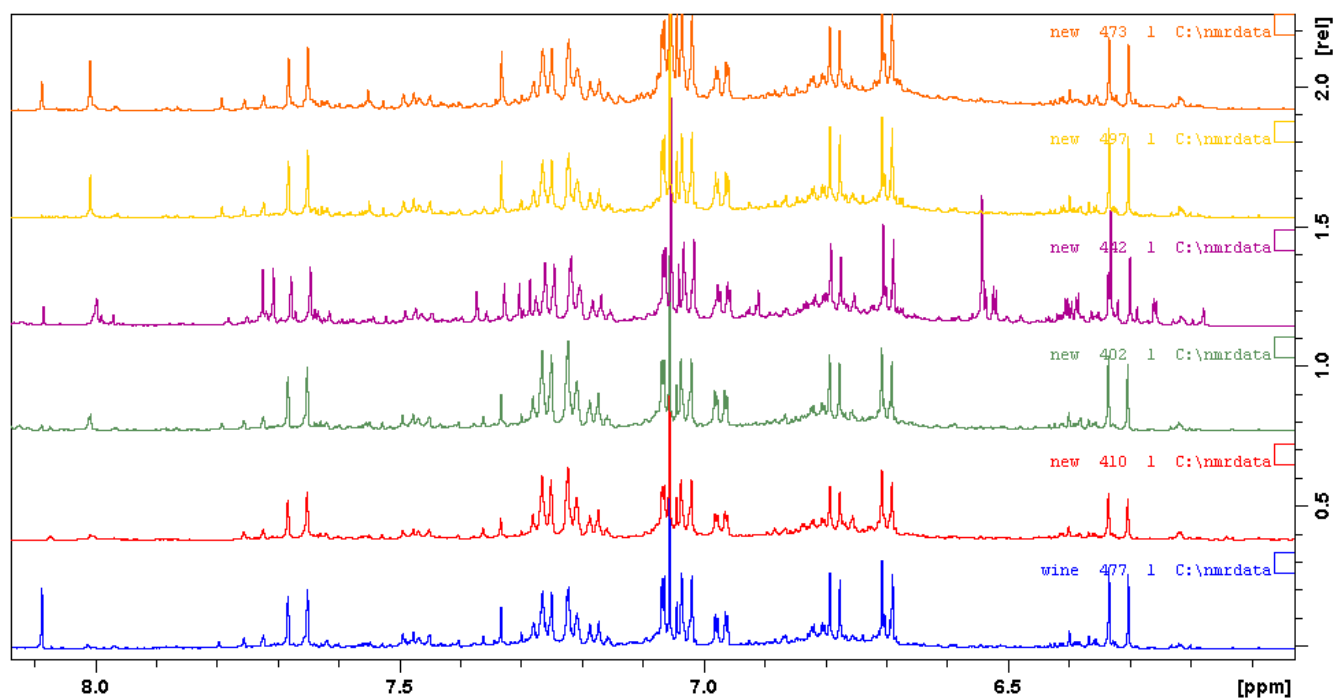


**Εικόνα 22.** Μπλε φάσμα: Μαντηλάρι 2, κόκκινο φάσμα: Κοτσιφάλι 2, πράσινο φάσμα: Βηλάνα 2 και μωβ φάσμα: Δαφνί 2.

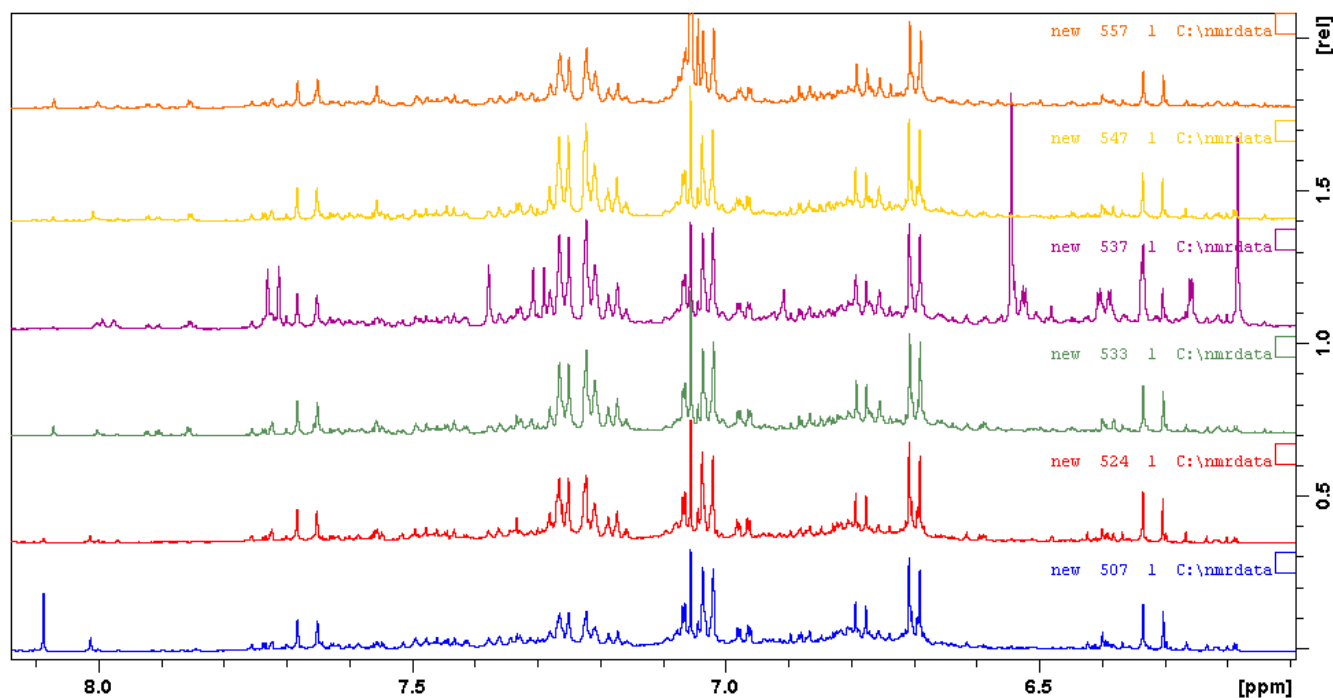
## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η χρήση της φασματοσκοπίας NMR ως τεχνική ανάλυσης για τους οίνους αποδείχθηκε επιτυχής και αποτελεσματική σε ποιοτικό αλλά και ποσοτικό επίπεδο. Επιπλέον, σε συνδυασμό με την τεχνική solid phase extraction ήταν δυνατόν να παραληφθούν από τους οίνους οι επιθυμητές προς ανάλυση ουσίες που είναι οι πολυφαινόλες και να απομακρυνθούν αρκετές ανεπιθύμητες που θα δημιουργούσαν τυχών παρεμποδίσεις. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε λήψη μονοδιάστατων φασμάτων  $^1\text{H}$  αλλά και δύο διαστάσεων (COSY-HSQC) για 22 δείγματα οίνων από 4 διαφορετικές ποικιλίες (Μαντηλάρι, Κοτσιφάλι, Βηλάνα, Δαφνί), ωρίμανσης 9 μηνών σε 6 διαφορετικά βαρέλια. Με την χρήση πρότυπων ενώσεων, βιβλιογραφίας και βάσης δεδομένων ήταν δυνατόν να γίνει η ανάθεση ουσιών που ανήκουν στην κατηγορία των πολυφαινολών και περιέχονται στα δείγματα. Οι ουσίες που βρέθηκαν ήταν οι εξής: π-υδροξυβενζοϊκό οξύ, κερσετίνη, βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, τυροσόλη, γαλλικό οξύ, 2-φαινυλαιθανόλη και κατεχίνη. Σε 7 από τα δείγματα των ποικιλιών χρησιμοποιήθηκε διαλύτης που περιέχει πρότυπη ένωση TMS (τετραμέθυλοσιλάνιο) και σε αυτά έγινε ποσοτικοποίηση των ενώσεων μέσω της ολοκλήρωσης των κορυφών. Με την επεξεργασία των φασμάτων και των ποσοτήτων που βρέθηκαν έγινε τελικά η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών κρασιού και μεταξύ των διαφορετικών βαρελιών που ωρίμασαν. Το τελικό αποτέλεσμα έδειξε ότι μεταξύ ποικιλιών υπάρχουν διαφορές στις ποσότητες των φαινολικών ενώσεων, ενώ μεταξύ βαρελιών η μεγαλύτερη διαφορά που διαπιστώθηκε ήταν στο βαρέλι ακακίας όπου φαίνεται να παρέχει πολλές επιπλέον ενώσεις στους οίνους κατά την ωρίμανση τους. Έτσι, το συμπέρασμα είναι ότι οι οίνοι παρά την μεγάλη ποικιλία τους σε πολυφαινόλες, με την φασματοσκοπία NMR μπορούν να διαχωριστούν και να συγκριθούν με βάση το περιεχόμενό τους. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να φανούν χρήσιμα σε περαιτέρω μελέτες, όπου θα μπορούν να προσδιορίσουν τον κατάλληλο συνδυασμό βαρελιού και ποικιλίας που θα περιέχει τις επιθυμητές ουσίες σε μία οινοπαραγωγική διαδικασία.

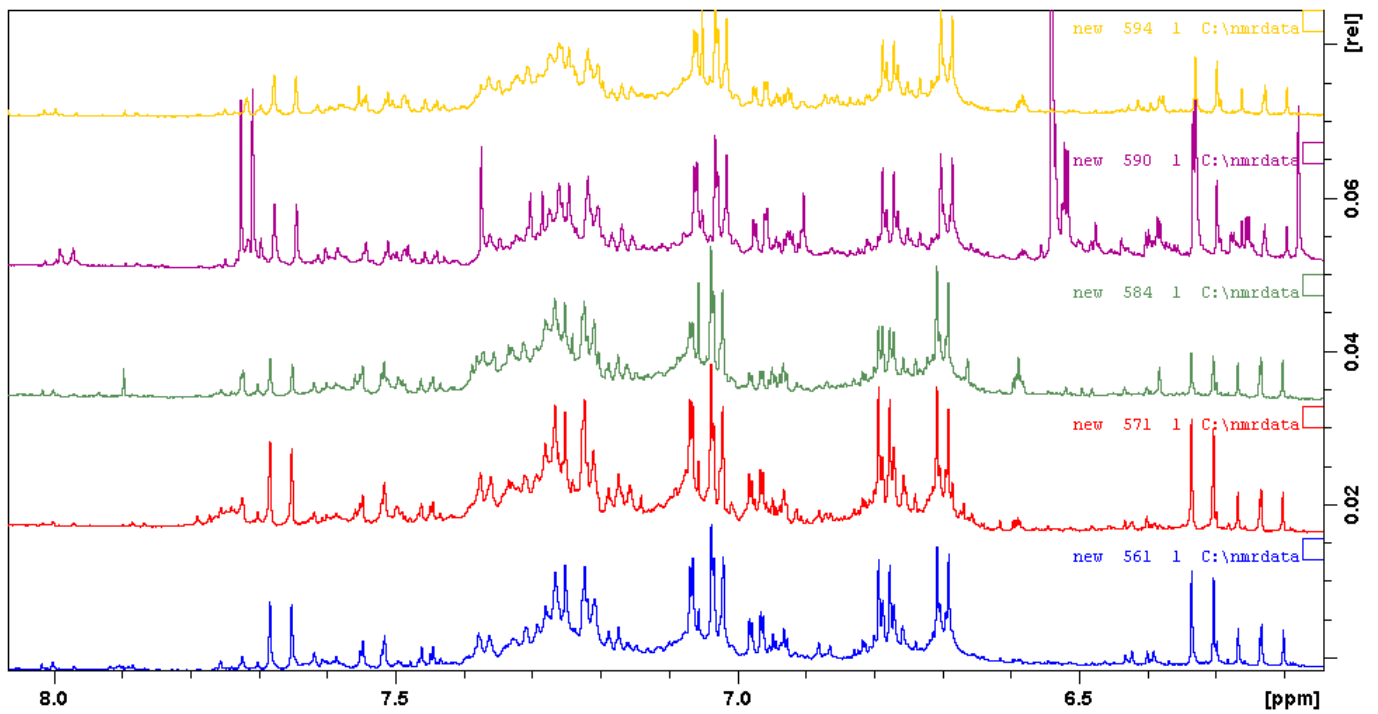
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



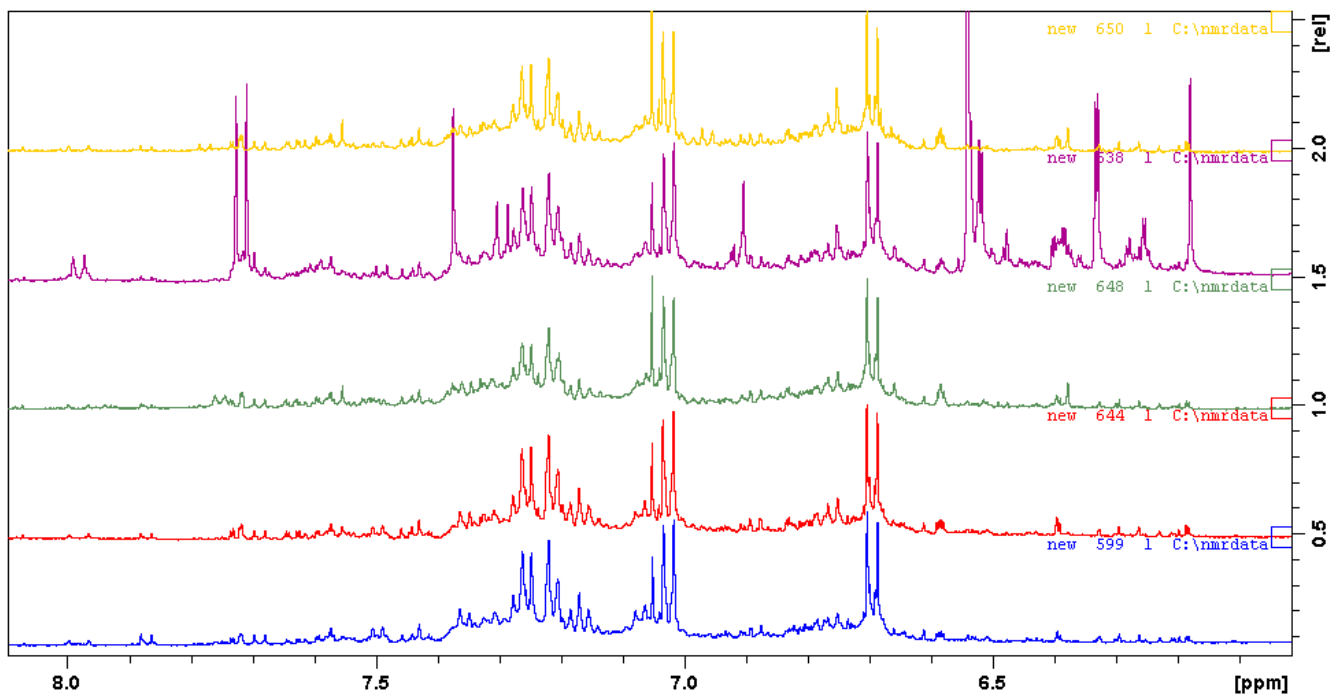
**Εικόνα 23.** Φάσματα μίας διάστασης  $^1\text{H}$  των δειγμάτων της ποικιλίας Μαντηλάρι στα βαρέλια (από κάτω προς τα πάνω): δεξαμενή inox, chips, αμερικάνικη δρυς, ακακία, γαλλική δρυς και καστανιά.



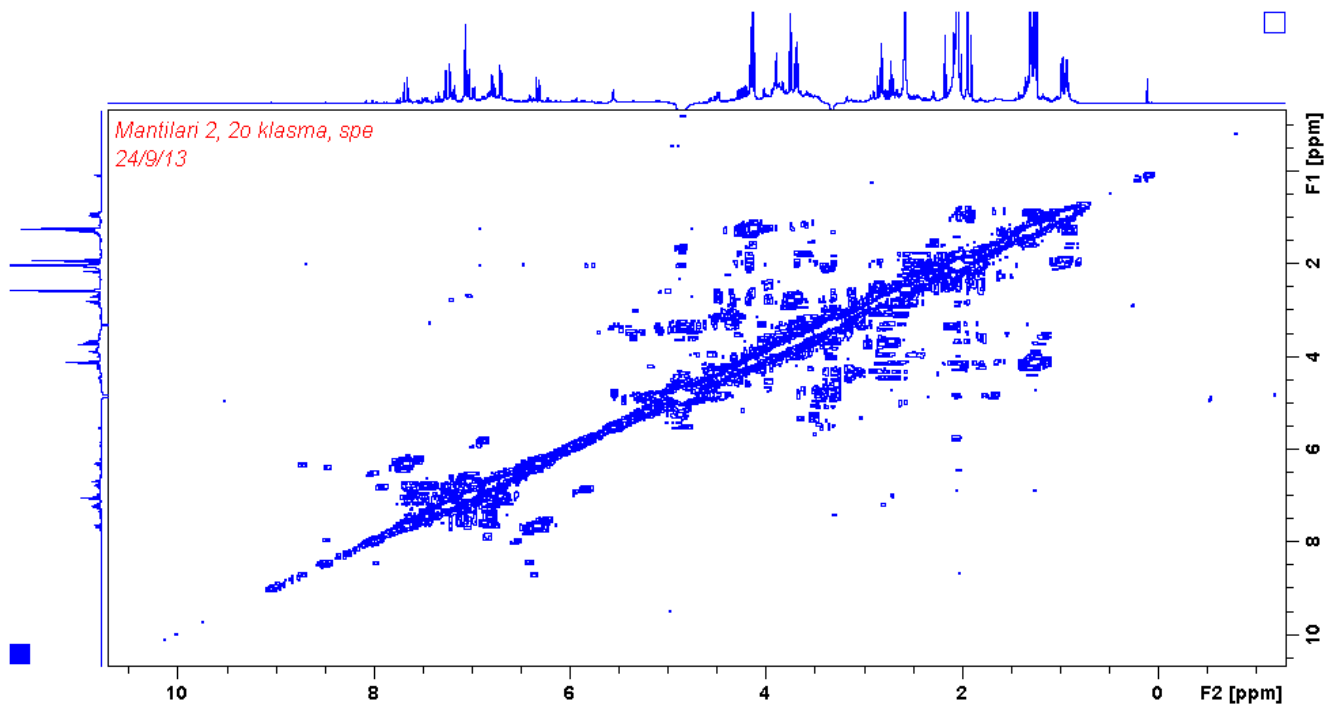
**Εικόνα 24.** Φάσματα μίας διάστασης  $^1\text{H}$  των δειγμάτων της ποικιλίας Κοτσιφάλι στα βαρέλια (από κάτω προς τα πάνω): δεξαμενή inox, chips, αμερικάνικη δρυς, ακακία, γαλλική δρυς και καστανιά.



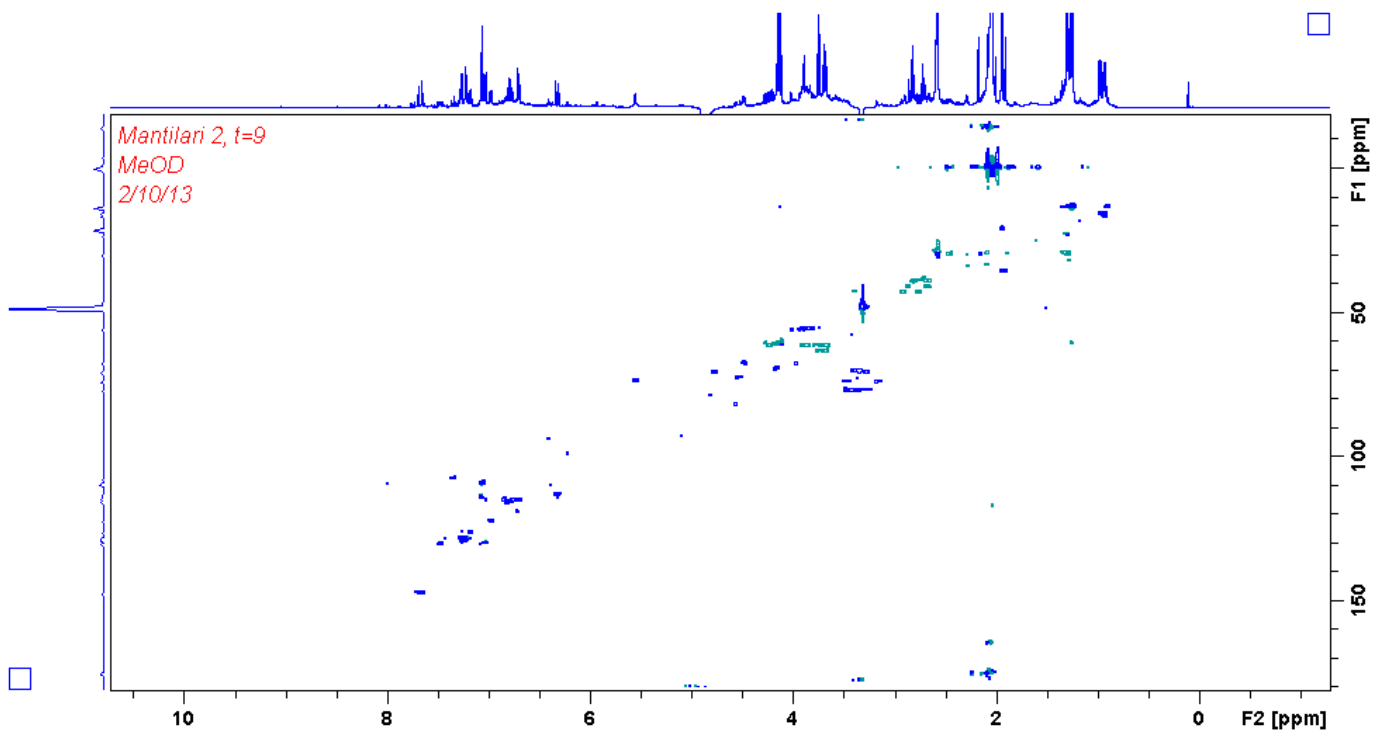
**Εικόνα 24.** Φάσματα μίας διάστασης  $^1\text{H}$  των δειγμάτων της ποικιλίας Βηλάνα στα βαρέλια (από κάτω προς τα πάνω): δεξαμενή ίnox, chips, αμερικάνικη δρυς, ακακία και γαλλική δρυς.



**Εικόνα 25.** Φάσματα μίας διάστασης  $^1\text{H}$  των δειγμάτων της ποικιλίας Δαφνί στα βαρέλια (από κάτω προς τα πάνω): δεξαμενή ίnox, chips, αμερικάνικη δρυς, ακακία και γαλλική δρυς.



Εικόνα 26. Φάσμα COSY του δείγματος Μαντηλάρι 2.



Εικόνα 27. Φάσμα HSQC του δείγματος Μαντηλάρι 2.

## **BIBΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Βάση δεδομένων: hmdb.ca
2. A. Dascalu, T. Calugaru-Spatatu, A. Ciocarlan, M. Costica, N. Costica, A. Krajewska-Patan, M. Dreger, A. Mścisz, M. Furmanowa (2008), “Chemical composition of golden root (*Rhodiola rosea* L.) rhizomes of Carpathian origin”, *Herba Polonica*, vol. 5 no. 4 σελ. 17-27
3. A. de Villiers, F. Lynen, A. Crouch, P. Sandra (2004), «Development of a Solid-Phase Extraction Procedure for the Simultaneous Determination of Polyphenols, Organic Acids and Sugars in Wine», *Chromatographia*, 59, σελ. 403-409
4. Jorge Garrido, Fernanda Borges (2013), “Wine and grape polyphenols- A chemical perspective”, *Food Research International*, 54, σελ. 1844-1858
5. Yinrong Lu, L. Yeap Foo (1999), “The polyphenol constituents of grape pomace”, *Food Chemistry*, 65, σελ. 1-8
6. <http://www.newwinesofgreece.com>
7. <http://www.lyrarakis.gr>
8. <http://www.wines2u.gr>
9. <http://www.food-info.net>
10. <http://e-oinos.blogspot.gr>
11. <http://www.foodbites.eu>