



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Δ.Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ «ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ»



**ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ
ΓΛΕΥΚΗ ΚΑΙ ΟΙΝΟΥΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ
ΕΠΙ ΤΩΝ ΠΗΤΤΙΚΩΝ ΑΥΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΠΑΣΑΛΕΚΟΥ ΜΑΡΙΑΝΘΗ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ποσοτικός προσδιορισμός μεθοξυπυραζινών σε ελληνικά γλεύκη και οίνους και μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας επί των πτητικών αυτών συστατικών.

Μπασαλέκου Μαριάνθη

Πενταμελής εξεταστική επιτροπή

Γ. Κοτσερίδης (Επιβλέπων), Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γ.Π.Α.

Χ. Συμνής, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής Γ.Π.Α.

Μ. Κωμαΐτης, Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων Γ.Π.Α.

Μ. Πολυσίου, Καθηγητής, Γενικό Τμήμα Γ.Π.Α.

Ν. Καλογερόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας μελέτης κο. Γ. Κοτσερίδη, Επίκουρο Καθηγητή Γ.Π.Α., για τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την εκπόνησή της, για το ενδιαφέρον του και τη συμπαράστασή του στις δυσκολίες που εμφανίστηκαν αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα θέμα που βρήκα πολύ ενδιαφέρον.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, κο. Ν. Καλογερόπουλο Επίκουρο Καθηγητή Τμήματος Διαιτολογίας-Διατροφής τόσο για τη συνεργασία και τον χρόνο που μου αφιέρωσε, όσο και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Επίσης αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την καθηγήτρια του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου κα. Α. Χίου, Επίκουρο Καθηγήτρια Χημείας, για τις συμβουλές της αλλά και την υπομονή της, όπως και την Ε. Καρβέλα, οινολόγο MsC και υποψήφια διδάκτωρ του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, για τη βοήθειά της.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κο. Χ. Συμινή, Επίκουρο Καθηγητή, Τμήματος Φυτικής Παραγωγής Γ.Π.Α., για την καθοδήγησή του κατά την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις συμφοιτήτριές μου Ε. Δρόσσου, Α. Ζαχαριά, Μ. Κυραλεού και Α. Παπαδάκη για την υποστήριξή τους, την Teresa Garde Cerdán για τις πολύτιμες συμβουλές της, την κα. Μ. Γιαλιτάκη, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. για το ενδιαφέρον και τη βοήθειά της, αλλά και την οικογένειά μου για την υπομονή της.

Τέλος ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου στον αέριο χρωματογράφο του οποίου έγιναν όλες οι αναλύσεις, για τη συνεργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ποσοτικός προσδιορισμός μεθοξυπυραζινών σε ελληνικά γλεύκη και οίνους και μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας επί των πτητικών αυτών συστατικών.

Οι μεθοξυπυραζίνες αποτελούν ουσίες που απαντούν φυσικά σε σταφύλια ποικιλιών της *Vitis Vinifera*, όπως Cabernet sauvignon, Sauvignon blanc αλλά και άλλων ποικιλιών, καθώς και στην αιμολέμφο εντόμων της οικογένειας Coccinellidae, όπως η *Harmonia axyridis*. Επίδρουν στο αρωματικό προφίλ των οίνων προσδίδοντάς τους χορτώδη αρώματα ή υποβαθμίζοντάς τους (οσμή πασχαλίτσας), με χαρακτηριστικό το πολύ χαμηλό κατώφλι ανίχνευσής τους (2-15ng/L). Η ανίχνευσή τους στην ελληνική ποικιλία Ξινόμαυρο δίνει νέο ενδιαφέρον στην ανάλυση οίνων από ελληνικές ποικιλίες, για τις οποίες δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, ενώ η αλματώδης εξάπλωση της *Harmonia axyridis* στην Ευρώπη καθιστά πολύ χρήσιμη την ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονης ανίχνευσης και ποσοτικής ανάλυσης και των τεσσάρων μεθοξυπυραζινών στα σταφύλια ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος των επιπέδων τους πριν την οινοποίηση. Η οργανοληπτική υποβάθμιση που προκαλεί η *Harmonia axyridis* αποτελεί ελάττωμα του οίνου γνωστό ως «οσμή πασχαλίτσας». Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά μεθοξυπυραζίνες σε ελληνικά γλεύκη και οίνους με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), με τη βοήθεια στηλών με διαφορετικά υλικά πλήρωσης, μια από τις οποίες (στήλες νέας γενιάς) επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και των τεσσάρων μεθοξυπυραζινών. Από τα κρασιά που αναλύθηκαν μόνο ένα Ξινόμαυρο παρουσίασε μεθοξυπυραζίνες σε υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψης επίπεδα, οι οποίες πιθανότερο είναι να προέρχονται από τη *Harmonia axyridis*. Τέλος, η επίδραση της θερμοκρασίας στις μεθοξυπυραζίνες φάνηκε να μειώνει τα επίπεδα των μεθοξυπυραζινών ως και 87%, οδηγώντας σε εξάτμισή τους, γεγονός που βρίσκει εφαρμογή στην θερμοοινοποίηση, και αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο αντιμετώπισής τους.

ABSTRACT

Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in greek wines and must and the effect of temperature on these volatile compounds.

Methoxypyrazines are substances naturally found in the grape varieties of *Vitis Vinifera*, such as Cabernet sauvignon or Sauvignon blanc and in the hemolymph of insects of the Coccinellidae family, such as *Harmonia axyridis*. They affect the flavor profile of wines by imparting a grassy odour to them or by downgrading them (ladybug taint), with a very low threshold of detection (2-15ng/L). Their detection in the Greek variety of Xinomavro gives new interest to the analysis of Greek wines, for which no data is available, while the rapid spread of *Harmonia axyridis* in Europe urges the development of a method for simultaneous detection of all four methoxypyrazines in order to control their levels before vinification. The sensory degradation caused by *Harmonia axyridis* is a defect known as “ladybug taint”. In the present study methoxypyrazines were detected and quantified in Greek grape juice and wine through the method of solid phase extraction (SPE), where columns with different packings were used, one of which allowed the simultaneous detection of all four methoxypyrazines. Of the wines analyzed, methoxypyrazines above the detection threshold were detected in only one (of the Xinomavro variety), which are very likely to have originated from *Harmonia axyridis*. High levels of temperature appeared to reduce levels of methoxypyrazines up to 87%, thus highlighting thermovinification as a potential method for controlling or even eliminating them.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.....	1
Δ.Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ «ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ – ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ».....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
0.1 ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ.....	8
0.1.1 Χαρακτηριστικά.....	8
0.1.2 Φυσικοχημικές Ιδιότητες.....	10
0.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ.....	12
0.2.1 Βιοσύνθεση.....	12
0.2.2 Πορεία Ωρίμανσης.....	13
0.2.3 Λειτουργία.....	14
0.2.4 Επιδράσεις κλιματολογικών παραγόντων.....	14
0.2.5 Επίδραση Ποτίσματος.....	16
0.2.6 Επίδραση Εδάφους.....	16
0.2.7 Επιδράσεις Καλλιεργητικών Συνθηκών.....	17
0.2.8 CO ₂	18
0.2.9 Επίδραση Ποικιλίας.....	18
0.3 HARMONIA AXYRIDIS.....	19
0.3.1 Ιστορία Εμφάνισης.....	19
0.3.2 Επιπτώσεις Στο Οικοσύστημα.....	19
0.3.3 Οσμή Πασχαλίτσας.....	20
0.3.4 Εξάπλωση.....	21
0.3.5 Τρόποι Καταπολέμησης.....	21
0.3.6 Μεθοξυπυραζίνες Σε Άλλα Είδη Coccinellidae.....	21
0.4 ΟΙΝΟΣ.....	22
0.4.1 Άρωμα.....	22
0.4.1.1 Διαμόρφωση Αρώματος.....	22
0.4.1.2 Ποικιλιακό Άρωμα.....	23
0.4.1.3 Χορτώδης Χαρακτήρας.....	24
0.4.1.4 Ελαττώματα-Οσμή Πασχαλίτσας.....	25
0.4.2 Επίδραση συστατικών του οίνου στις Μεθοξυπυραζίνες.....	25
0.4.2.1 Φαινολικά συστατικά.....	26
0.4.2.2 Αιθανόλη και pH.....	26
0.4.3 Επίδραση Μεθόδου Οινοποίησης.....	26
0.4.4 Άλλες Πηγές Προέλευσης.....	28
0.4.5 Προληπτικές Επεμβάσεις.....	29
0.4.6 Θεραπευτικές Επεμβάσεις.....	29
0.4.6.1 Μέθοδος Οινοποίησης.....	29
0.4.6.2 Κατεργασίες.....	31
1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	34
1.1 ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	34
1.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗΣ.....	34
1.2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (LLE liquid-liquid extraction).....	34
1.2.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE solid phase extraction).....	36

1.2.3 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης Υπερκείμενων Ατμών (HS-SPME head space-solid phase microextraction).....	37
1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	37
1.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	39
1.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	40
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	42
2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	42
2.1.1 Σκοπός Πειράματος.....	42
2.1.2 Επιλογή Δειγμάτων.....	42
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	44
2.2.1 Υλικά Και Παρασκευές Διαλυμάτων.....	44
2.2.2 Απομόνωση και Συμπύκνωση.....	45
2.2.3 κατασκευή καμπυλης βαθμονομησης.....	46
2.2.4 GC-MS.....	47
2.2.5 Επαναληψιμότητα.....	48
2.2.6 έλεγχος επίδρασης θερμοκρασίας.....	48
2.2.7 Μετατροπές της SPE συγκριση C-18.....	49
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
3.1 Καμπύλες βαθμονόμησης.....	51
3.1.1 DMMP.....	51
3.1.2 IPMP.....	52
3.1.3 secBMP.....	52
3.1.4 IBMP.....	53
3.2 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	54
3.2.1 Ταυτοποίηση Κορυφών.....	54
3.2.2 Χρόνοι Συγκράτησης.....	57
3.2.3 Κατώφλι ανίχνευσης.....	58
3.2.4 Επαναληψιμότητα.....	59
3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός μεθοξυπυραζινών σε κρασιά.....	59
3.4 Επίδραση θερμοκρασίας.....	60
3.5 SPE με Στήλες C-18.....	61
3.5.1 Μετατροπές Με τις C-18.....	63
4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	66
5 ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	69
6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	70
7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

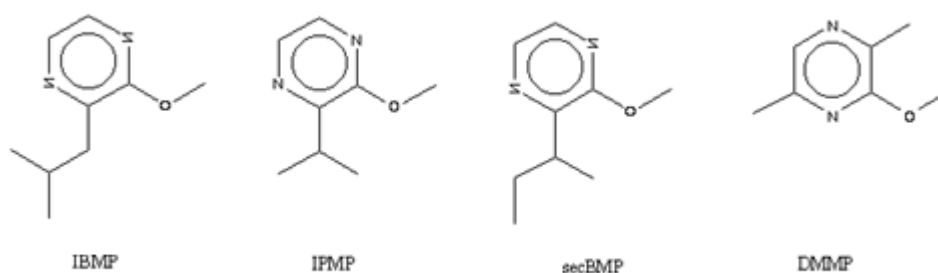
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

0.1 ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ

Η ποιότητα αλλά και η τιμή του οίνου σχετίζονται άμεσα όχι μόνο με την ποιότητα του σταφυλιού, αλλά κυρίως με τα αρώματα που προέρχονται απ' αυτό καθώς το άρωμα μπορεί να αποκαλύψει τυχόν ελαττώματα, αλλά και να συμβάλει στην ανάδειξη του ποικιλιακού χαρακτήρα και της γεωγραφικής προέλευσης του οίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν μια ομάδα αρωματικών ενώσεων, οι μεθοξυπυραζίνες, οι οποίες έχουν συσχετιστεί τόσο με το χαρακτηριστικό άρωμα των ποικιλιών Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Merlot κ.α., αλλά και με χορτώδεις νότες στους οίνους που τις περιέχουν, τόσο σαν θετικό όσο και αρνητικό αποτέλεσμα επί της ποιότητάς τους. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίζονται ποιοτικά και ποσοτικά μεθοξυπυραζίνες σε ελληνικά γλεύκη και οίνους -στους οποίους με εξαίρεση το Ξινόμαυρο δεν έχει αναφερθεί ακόμα η παρουσία τους-, και μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας επί των συστατικών αυτών ως πιθανός τρόπος αποφυγής τους, καθώς η παρουσία τους σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ανεπιθύμητη ή τουλάχιστον ασυμβίβαστη με το ύφος του παραγόμενου οίνου.

0.1.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι πυραζίνες (1,4 διαζίνες) είναι αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις, αρκετά διαδεδομένες στη φύση, τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο. Οι περισσότερες απ' αυτές έχουν έντονη οσμή και αρκετές χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφίμων αλλά και στην αρωματοποιία. Μπορούν να χωριστούν σε 3 κατηγορίες ανάλογα με την προέλευσή τους: 1) σε αυτές που σχηματίζονται μέσω θερμικής επεξεργασίας (αντίδραση Maillard)¹, 2) σε αυτές που σχηματίζονται από μικροοργανισμούς, και 3) σε αυτές που απαντούν φυσικά σε φυτά. Από τις μεθοξυπυραζίνες που ανήκουν στην τελευταία κατηγορία, οι πιο σημαντικές είναι οι 2,5-διμεθυλ-3-μεθοξυπυραζίνη (DMMP), 3-ισοπροπυλ-2-μεθοξυπυραζίνη (IPMP), 3-δευτ.βουτυλ-2-μεθοξυπυραζίνη (sBMP), και 3-ισοβουτυλ-2-μεθοξυπυραζίνη (iBMP).



Οι μεθοξυπυραζίνες, και πιο συγκεκριμένα οι 3-αλκυλ-2-μεθοξυπυραζίνες (MPs) συνήθως έχουν αρώματα χόρτων και λαχανικών, και βρίσκονται περισσότερο σε σταφύλια και οίνους των ποικιλιών Cabernet sauvignon (Bayonove et. al, 1975) Cabernet franc, Sauvignon blanc, και Merlot (Harris et al. 1987, Allen et al. 1994, Hashizume και Umeda 1996, Kotseridis et al. 1998) της *Vitis Vinifera*, αλλά και στην αιμολέμφο ενός είδους πασχαλίτσας (*Harmonia axyridis*)³. Έχουν βρεθεί επίσης σε φρέσκα λαχανικά όπως η πατάτα, η πιπεριά και το σπαράγγι². Όλες παρουσιάζουν πολύ υψηλή αρωματική ένταση, με εξαιρετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης* (ng/L), δεδομένο που υπαινίσσεται τη μεγάλη σημασία τους τουλάχιστον για τον κόσμο του κρασιού, όπου το άρωμα παίζει πολύ μεγάλο ρόλο ως παράγοντας ποιότητας. Ειδικά για την IPMP έχει αναφερθεί σε μελέτη σε Chardonnay κατώφλι αντίληψης της τάξης των pg/L (0,32 ng/L)⁵. Γενικά τα αρώματα πράσινης πιπεριάς θεωρούνται πιο τυπικά της IBMP, ενώ τα αρώματα σπαραγγιού και μπιζελιών είναι τυπικά της IPMP.⁶

*κατώφλι αντίληψης: η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία μια ουσία γίνεται αντιληπτή

MP	Μέσο	Περιγραφή αρώματος	Κατώφλι αντίληψης (ng/L)
IPMP	Λευκό κρασί	Μαγειρεμένο σπαράγγι, πράσινα φασόλια, γη	2
	Αέρας	Γήινο, καβουρδισμένο	0,0005-0,005
	Νερό	Μούχλα, πατάτα, πράσινη πιπεριά, μπαγιάτικο, κελάρι, χαλβάνη (ρητίνη φέρουλα)	1-2
	Olfactometry	Χόρτα, γη	Δεν μετρήθηκε
	Κόκκινο κρασί	Φύλλα	2
	Συνθετικό κρασί	Μούχλα, γη, φύλλα	2
SecBMP	Νερό	Μπιζέλι, πιπεριά, χαλβάνη, κισσός	1-2

	Αέρας	Γη	0,002-0,005
IBMP	Λευκό κρασί	Φρέσκα λαχανικά, πιπεριά	1
	Olfactometry	Βότανα, γη	Δεν μετρήθηκε
	Νερό	Πιπεριά	0,5
	Κόκκινο κρασί	Φύλλα	15
	Συνθετικό κρασί	Μπαγιάτικο, πράσινη πιπεριά	6
DMMP	Τριαιθυλεστέρας του κιτρικού οξέος	-	66 ⁷
	Olfactometry	Χαρακτηριστική, μούχλα, γη	2 ³

Πίνακας 1: Περιγραφή αρωμάτων και κατώφλι αντίληψης για τις MPs της μελέτης⁶

0.1.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Ως αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις οι μεθοξυπυραζίνες αποτελούνται από το δακτύλιο της πυραζίνης, στη θέση 2 του οποίου φέρουν μια μεθοξυ-ομάδα ενώ στη θέση 3 ένα αλκύλιο από το οποίο παίρνουν και το όνομά τους. Έτσι, όταν:

- $R=CH_2CH(CH_3)_2$: 2-μεθόξυ-3-(2-μεθυλπρόπυλ)πυραζίνη (IBMP)
- $R=CH(CH_3)CH_2CH_3$: 2-μεθόξυ-3-(1-μεθυλπρόπυλ)πυραζίνη (secBMP)
- $R=CH(CH_3)_2$: 2-μεθόξυ-3-(1-μεθυλαιθυλ)πυραζίνη (IPMP).⁴

Η DMMP αποτελεί ισομερές μιας 2-μεθοξυ-3-αλκυλπυραζίνης, της 2-μεθοξυ-3,5-διμεθυλπυραζίνης, όπου $R_1, R_2=CH_3$.

Το είδος του αλκυλίου καθορίζει και τις οσφραντικές αποχρώσεις της κάθε μεθοξυπυραζίνης: μικρότερες πλευρικές αλκυλικές αλυσίδες δίνουν αρώματα που περιγράφονται ως «καβουρδισμένο, ξηρός καρπός, γλυκό», ενώ μεγαλύτερες δίνουν περισσότερο «άγουρα» αρώματα.^{6,7} Εκτός αυτού, το μήκος της πλευρικής αλυσίδας φαίνεται να συνδέεται και με την αρωματική ένταση. Στην περίπτωση αυτή, δεν φαίνεται να υπάρχουν διαφορές μεταξύ ισοπροπυλικής και ισοβουτυλικής αλυσίδας, αλλά μεταξύ αυτών και της προπυλικής και αιθυλικής, με την ένταση του αρώματος να μειώνεται όσο μειώνεται το μήκος της αλυσίδας. Πράγματι, η 3-αιθυλ-2-μεθοξυπυραζίνη η οποία επίσης έχει βρεθεί στο σταφύλι⁸, έχει κατώφλι αντίληψης τα 425 ng/l, ενώ αν το αλκύλιο εκλείψει τελείως, το κατώφλι αντίληψης αυξάνεται κατά περίπου $3,5 \times 10^5$ φορές.

Διαφορές στην αρωματική ένταση παρουσιάζονται και μεταξύ ισομερών, με παράδειγμα τις 3-μεθόξυ-2,5-διμεθυλπυραζίνη (DMMP) και 2-μεθόξυ-3,5-διμεθυλπυραζίνη (MDMP). Αν και παρουσιάζουν παρόμοιο άρωμα, η MDMP η οποία έχει συνδεθεί με το ελάττωμα της οσμής φελλού, έχει αρωματική ένταση 56000 φορές μεγαλύτερη από την DMMP⁸⁴.

MP	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ	ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ	ΣΗΜΕΙΟ ΒΡΑΣΜΟΥ	CAS No
IPMP	C ₈ H ₁₂ ON ₂	152.19	Αιθανόλη, νερό	189 °C (760 mm Hg)	25773-40-4
secBMP	C ₉ H ₁₄ ON ₂	166.22	Νερό, οργανικοί διαλύτες, έλαια, αναμιγνύεται με αιθανόλη σε θ δωματίου	218 °C (760 mm Hg)	24168-70-5
IBMP	C ₉ H ₁₄ ON ₂	166.22	Νερό, οργανικοί διαλύτες, έλαια, αναμιγνύεται με αιθανόλη σε θ δωματίου	266 °C (760 mm Hg)	24683-00-9
DMMP	C ₇ H ₁₀ ON ₂	138.16			19846-22-1

Πίνακας 2^{10,11,12}

Από τις 4 παραπάνω πυραζίνες, η IBMP που ανιχνεύθηκε και πρώτη (Buttery et al. 1969b) είναι εκείνη για την οποία έχουμε τα περισσότερα στοιχεία. Ωστόσο, ούτε και για αυτήν δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα ασφαλείας (τοξικότητα κ.λ.π.). Το 1981 το Συμβούλιο της Ευρώπης την κατέταξε στη λίστα με τις ουσίες που δεν έχουν αξιολογηθεί πλήρως¹³, το 2002 όμως και οι 4 μεθοξυπυραζίνες συμπεριλήφθηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στα επιτρεπτά πρόσθετα, με μέγιστο επιτρεπτό όριο πρόσληψης τα 540 μg/ημέρα¹⁴ (Παράρτημα πίνακας 3). Γενικά, χαρακτηρίζονται ερεθιστικά για τα μάτια το δέρμα και το αναπνευστικό σύστημα, οπότε πρέπει να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ασφαλείας.¹¹

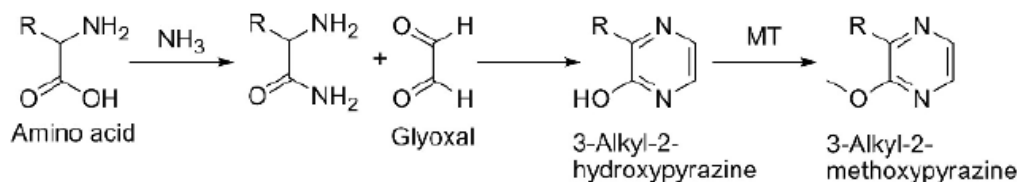
0.2 ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΟ ΣΤΑΦΥΛΙ

Όπως αναφέρθηκε οι μεθοξυπυραζίνες βρίσκονται συχνά σε σταφύλια των ποικιλιών Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, και Merlot, αλλά η παρουσία τους έχει αναφερθεί επίσης και σε άλλες ποικιλίες της Vitis Vinifera, όπως Pinot Noir, Muscat, Semillon, Chardonnay, Riesling, Syrah⁽³³⁾ Zweigeltrebe, Cencibel⁽³³⁾, Fer Servadou⁽²⁹⁾, Uva di Troia⁽³⁰⁾, Primitivo⁽³²⁾ και Ξινόμαυρο. Οι σημαντικότερες είναι οι IPMP, secBMP και IBMP, με την IBMP να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης, ενώ η DMMP μέχρι σήμερα δεν έχει ανιχνευθεί σε σταφύλι. Οι ανώτερες συγκεντρώσεις που έχουν παρατηρηθεί –στο σταφύλι– είναι 307ng/L για την IBMP, 48,7 ng/L για την IPMP, ενώ η secBMP βρίσκεται σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 11,2 ng/L⁶. Ειδικά στο Sauvignon blanc η IBMP θεωρείται η καθοριστική αρωματική ουσία για το χορτώδες ποικιλιακό του άρωμα.

0.2.1 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ

Οι μεθοξυπυραζίνες βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή στο σταφύλι και φαίνεται πως παράγονται κατά το μεταβολισμό των αμινοξέων,¹⁶ αν και η πλήρης μεταβολική οδός που οδηγεί στη σύνθεσή τους όχι μόνο στο σταφύλι αλλά και σε οποιοδήποτε φυτό δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα. Παρ' όλο που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη τυχόν πρόδρομες ενώσεις,

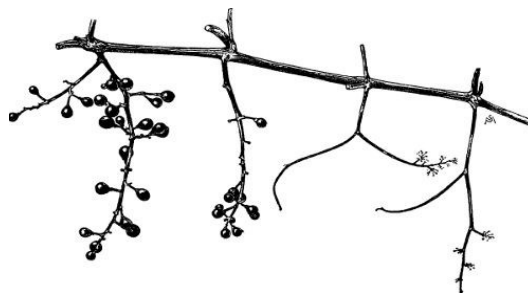
θεωρείται πως τα αμινοξέα βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη αποτελούν πρόδρομες των IPMP, IBMP και secBMP αντίστοιχα, εξαιτίας ομοιοτήτων που παρουσιάζουν στις αλκυλικές πλευρικές αλυσίδες. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία ένα αμινοξύ και μια άγνωστη μέχρι στιγμής 1,2 δικαρβονυλική ένωση οδηγούν στο σχηματισμό μιας 3-αλκυλ-2-υδροξυπυραζίνης (ενδιάμεση ουσία) η οποία μεθυλιώνεται ενζυμικά και σχηματίζει την 3-αλκυλ-2-μεθοξυπυραζίνη^{17,75}



Πίνακας 3: Προτεινόμενη βιοχημική οδός για την βιοσύνθεση Μεθοξυπυραζινών

0.2.2 ΠΟΡΕΙΑ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

Η σύνθεση των μεθοξυπυραζινών λαμβάνει χώρα μετά την καρπόδεση μέχρι και 2-3 εβδομάδες πριν το γυάλισμα των ραγών, ενώ ακριβώς μετά και ενώ τα σταφύλια πλησιάζουν την πλήρη ωρίμανση, τα επίπεδα τους πέφτουν κατακόρυφα (τις τελευταίες 6 εβδομάδες της ωρίμανσης παρατηρείται μείωση στα επίπεδα των μεθοξυπυραζινών ως και 10 φορές). Σε μελέτη που έγινε στο Cabernet Sauvignon, κατά την περίοδο του τρύγου, η IBMP βρέθηκε κατά 53,4% στους βοστρύχους, 31% στα γίγαρτα, 15% στους φλοιούς και μόλις 1% στη σάρκα. Η υψηλή παρουσία της στους βοστρύχους εξηγεί γιατί ο χορτώδης χαρακτήρας στους οίνους μειώνεται με αποβοστρύχωση πριν την αλκοολική ζύμωση. Στην ίδια μελέτη φαίνεται πως ενώ η σάρκα περιέχει μικρά ποσοστά της IBMP καθ' όλα τα στάδια της ωρίμανσης, η περιεκτικότητά της μειώνεται στο βόστρυχο και αυξάνεται στους φλοιούς την περίοδο ανάμεσα στο γυάλισμα των ραγών και την πλήρη ωρίμανση, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και μικρή μείωση των επιπέδων της στα γίγαρτα.¹⁸



Έχει διαπιστωθεί ότι η μείωση της IBMP συμβαίνει ταυτόχρονα με τη διάσπαση του μηλικού οξέος ανεξαρτήτως τύπου εδάφους ή ποικιλίας και μάλιστα η μείωση αυτή δεν οφείλεται σε αραίωση λόγω διόγκωσης της ράγας, αλλά σε διάσπαση²⁰, ίσως εξαιτίας του φωτός⁶. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι το μηλικό μειώνεται γρηγορότερα υπό την επίδραση

χαμηλών νυχτερινών θερμοκρασιών, πράγμα που συμβαίνει και στην περίπτωση της IBMP⁶³. Έτσι, όπως το μηλικό, και η IBMP φαίνεται να αποτελεί δείκτη της ωρίμανσης στο σταφύλι, αλλά και αντίστροφα, τα επίπεδα του μηλικού αποτελούν δείκτη των επιπέδων της IBMP, πράγμα πολύ χρήσιμο δεδομένου της ευκολότερης μέτρησης του μηλικού εργαστηριακά.²⁰

Εκτός της σταφυλής, μεθοξυπυραζίνες (IBMP) έχουν ανιχνευθεί και στα φύλλα, κυρίως στα 3-4 φύλλα της βάσης. Μελέτη που έγινε παρακολούθησε την κατανομή μιας παρόμοιας με την IBMP ουσίας (d-IBMP) η οποία προστέθηκε σε φύλλα του Cabernet Sauvignon, κατά την περίοδο από το στάδιο που οι ράγες είναι σε μέγεθος «πίσσου» ως την έναρξη της ωρίμανσης (γυάλισμα). Πράγματι, η επισημασμένη ουσία d-IBMP φάνηκε να μεταφέρεται μέσω των φύλλων στη σταφυλή, τόσο στο βόστρυχο όσο και στη ράγα, πράγμα που σημαίνει ότι η IBMP μεταναστεύει από τα φύλλα στις ράγες μέσω του ηθμού, χωρίς όμως η διαπίστωση αυτή να αποκλείει τη σύνθεσή της και στη ράγα, καθώς η IBMP κατά την ωρίμανση συνέχιζε να συσσωρεύεται στα φύλλα την ίδια στιγμή που στη ράγα μειωνόταν,¹⁹ ενώ και ο ηθμός κατά την ωρίμανση παρουσιάζει το μέγιστο της λειτουργίας του.⁴⁰

0.2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Εφόσον ο προορισμός του σταφυλιού, όπως και του κάθε φυτού είναι η αναπαραγωγή, τότε κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του η προτεραιότητά του είναι να αναπτύξει βιώσιμο σπόρο (τα γίγαρτα) και να συνθέσει ουσίες που να τον προστατεύουν ώσπου να ολοκληρωθεί η παραγωγή τους. Τέτοιες ουσίες που συντίθενται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της ράγας, είναι οργανικά οξέα, ταννίνες αλλά και οι μεθοξυπυραζίνες. Ίσως λοιπόν και για τις μεθοξυπυραζίνες, αυτός να είναι ο σκοπός εμφάνισής τους στις ράγες: να κάνουν το σταφύλι κάθε άλλο παρά ελκυστικό σε πουλιά και άλλα θηλαστικά, που αργότερα θα χρειαστούν για διασπορά των γιγάρτων, αφού τα γίγαρτα δεν έχουν αποκτήσει ακόμη βλαστική ικανότητα.²¹

0.2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΛΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

▪ ΗΛΙΑΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Ήδη αναφέρθηκε πως η ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση των μεθοξυπυραζινών κατά την ωρίμανση⁶. Ότι οι MPs επηρεάζονται από το φως είναι γνωστό από το 1986 (Heymann). Οι Hashizume και Samuta (1999) βρήκαν ότι η έκθεση στο ηλιακό φως μέχρι και το στάδιο του γυαλίσματος της ράγας οδηγούσε σε αύξηση των συγκεντρώσεων των IPMP και IBMP στα σταφύλια, ενώ κατά την ωρίμανση είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων τους. Η περίεργη αυτή αύξηση πριν την ωρίμανση

μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και γενικότερα σε ένα μικροκλίμα ευνοϊκό για υψηλότερη μεταβολική δραστηριότητα.²² Αν θυμηθούμε μάλιστα ότι και τα φύλλα συνθέτουν MPs η αύξησή τους πριν την ωρίμανση μοιάζει περισσότερο «λογική». Από τα παραπάνω φαίνεται ότι για να μειώσουμε τα επίπεδα των MPs στον αμπελώνα μας το ηλιακό φως θα μας χρειαζόταν μόνο κατά την περίοδο της ωρίμανσης, και οπωσδήποτε όχι μέχρι το στάδιο του γυαλίσματος. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε μελέτη (Sala et al., 2004), όπου παρατηρείται ότι σταφυλές προστατευμένες από το ηλιακό φως κατά το στάδιο του γυαλίσματος της ράγας, έδωσαν χαμηλότερα επίπεδα IBMP.²⁵

Υπάρχουν όμως και αντίθετες απόψεις. Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα (Sacks et al., 2008), οι MPs συντίθενται αποκλειστικά στη ράγα, με τις σκιασμένες ράγες να δίνουν υψηλότερα επίπεδα μεθοξυπυραζινών -και μάλιστα ιδιαίτερα σε πρέμνα με υψηλή ζωηρότητα²⁴-, γι' αυτό οι παραγωγοί ενθαρρύνονται να προχωρούν σε ξεφύλλισμα πριν το γυάλισμα ώστε να αυξηθεί η ηλιακή ακτινοβολία στη ράγα, πράγμα που θα οδηγήσει σε φωτοδιάσπαση των MPs. Αν όμως οι MPs συντίθενται και στα φύλλα, τότε με τον τρόπο αυτό κλείνει ένα μονοπάτι εισροής τους στη ράγα. Περιέργως στην ίδια έρευνα φαίνεται ότι η έκθεση των ραγών στο φως μετά το γυάλισμα, δεν έχει μεγάλη επίδραση στη διάσπαση των MPs²³, συμπέρασμα στο οποίο κατέληξε και έρευνα των Boubee et al. (2003) προκειμένου για το ξεφύλλισμα: πριν το γυάλισμα οδηγεί σε 68% μείωση των MPs, μετά το γυάλισμα μόλις σε 10%. Σύμφωνα με την έρευνα των Sacks et al., (2008), η σκίαση της σταφυλής τελικά φαίνεται να επηρεάζει τη συσσώρευση της IBMP και όχι τη διάσπασή της.²⁴

Από αμπελουργική σκοπιά αξίζει να αναφερθεί ότι ράγες που βρίσκονται υπό σκιά (εκτεθειμένες σε ηλιακό φως μικρής έντασης) είναι μεγαλύτερες και βαρύτερες από εκείνες που είναι εκτεθειμένες στον ήλιο. Έτσι, χωρίς να υπάρχουν διαφορές στα ολικά σάκχαρα, το υψηλότερο ποσό νερού που περιέχεται στις μεγαλύτερες ράγες (της σκιάς) οδηγεί σε χαμηλότερη συγκέντρωση σακχάρων. Οι ράγες που βρίσκονται υπό σκιά, παρουσιάζουν επίσης και υψηλή συγκέντρωση μηλικού οξέως⁷⁰.

▪ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Πολύ νωρίτερα, ερευνητές είχαν συνδέσει την αύξηση στο χορτώδες άρωμα σταφυλιών και κατ' επέκταση του οίνου τόσο με τη σκίαση αλλά και με ψυχρότερες κλιματικές συνθήκες, άρα και με τη θερμοκρασία (Lacey et al., 1991, Allen και Lacey, 1993, Marais et al., 1999). Πράγματι, κρασιά από σταφύλια που παρήχθησαν σε ψυχρές περιοχές παρουσιάζουν εντονότερα χορτώδη αρώματα. Αναλύσεις σε σταφύλια Sauvignon Blanc

ψυχρών περιοχών δίνουν 10 φορές υψηλότερα επίπεδα MPs, και μάλιστα σταφύλια από τα ίδια πρέμνα δίνουν υψηλότερα επίπεδα τις ψυχρότερες χρονιές και για το ίδιο επίπεδο συγκέντρωσης σακχάρων κατά την ωρίμανση.²⁶

Καθώς οι κλιματικές συνθήκες παρουσιάζουν διαφορές ανάλογα με το υψόμετρο, είναι λογικό και το υψόμετρο να επηρεάζει την παρουσία των μεθοξυπυραζινών –άλλωστε επηρεάζει και το χρόνο ωρίμανσης-. Στη νότια Βραζιλία, τα υψόμετρα στα οποία υπάρχουν καλλιεργήσιμοι αμπελώνες μπορεί να διαφέρουν ως και 700m. Έρευνες που έγιναν εκεί στο Cabernet Sauvignon, έδειξαν ότι οι αμπελώνες των υψηλότερων (1350-1415m) και των χαμηλότερων (774-960m) υψομέτρων παρουσίασαν διαφορές στο αρωματικό τους προφίλ, με χορτώδεις νότες να κυριαρχούν στους οίνους από σταφύλια αμπελώνων σε μεγαλύτερα υψόμετρα, ενώ οι οίνοι από τα χαμηλότερα υψόμετρα έδιναν αρώματα κόκκινων φρούτων. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι τα σταφύλια είχαν ωριμάσει πλήρως σε όλους τους αμπελώνες. Τα κλιματικά στοιχεία δείχνουν ότι οι αμπελώνες των μεγαλύτερων υψομέτρων, παρουσίασαν χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με αυτούς των χαμηλότερων, τόσο το καλοκαίρι όσο και το χειμώνα.²⁷ Χαμηλές θερμοκρασίες κατά τα πρώτα στάδια βλάστησης επιβραδύνουν το ρυθμό αύξησης των βλαστών, ενώ η διακύμανση της θερμοκρασίας από την πλήρη άνθιση και μετά επηρεάζει το χρόνο (βιομηχανικής) ωρίμανσης των σταφυλιών⁷⁰.

▪ ΥΓΡΑΣΙΑ

Υψηλά επίπεδα υγρασίας κυρίως πριν το στάδιο του γυαλισματος της ράγας, οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα IBMP στη ράγα κατά τον τρύγο⁶. Χρονιές με μεγαλύτερες περιόδους ηλιοφάνειας και χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας οδηγούν σε χαμηλότερα ποσά IBMP, ενώ χρονιές με μεγαλύτερες βροχοπτώσεις έδιναν υψηλότερα ποσά.²⁸ Η επίδραση της υγρασίας στα επίπεδα των MPs φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από την ταυτόχρονη επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας και θερμοκρασίας, αφού όπως φάνηκε και από αναλύσεις στην περιοχή του Bordeaux σε συγκρίσιμους αμπελώνες (από άποψη εδάφους, και πυκνότητας φύτευσης) ο τρύγος της χρονιάς με τη μεγαλύτερη υγρασία έδινε υψηλότερα ποσοστά IBMP κατά την περίοδο ωρίμανσης, παρά το γεγονός ότι ταυτόχρονα παρατηρήθηκαν τόσο μεγαλύτερη ηλιοφάνεια αλλά και υψηλότερες θερμοκρασίες από την προηγούμενη χρονιά που παρουσίαζε χαμηλότερα επίπεδα υγρασίας.²⁰

0.2.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΤΙΣΜΑΤΟΣ

Το πότισμα από την έναρξη της ωρίμανσης (γυάλισμα) και μετά οδηγεί σε αύξηση τόσο της IBMP όσο και των IPMP και secBMP κατά την ωρίμανση, σε σχέση με σταφύλια από μη ποτιζόμενα πρέμνα. Μάλιστα οι συγκεντρώσεις των MPs σε αρδευόμενους αμπελώνες, έπεσαν μεν κατά την περίοδο της ωρίμανσης, αλλά βραδύτερα από εκείνες σταφυλιών χωρίς

πότισμα, αν και κατά την πλήρη ωρίμανση είχαν ίδια ποσοστά σακχάρων. Αυτό ίσως συμβαίνει γιατί τα πρέμνα που ποτίζονται ωριμάζουν τα σταφύλια τους με ελαφρά μικρότερους ρυθμούς.²⁸

0.2.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΔΑΦΟΥΣ

Διαφορές στην ικανότητα κατακράτησης νερού, στην αποστράγγιση και στην περιεκτικότητα σε θρεπτικά στοιχεία του εδάφους επηρεάζουν τη ζωηρότητα των πρέμνων, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την ηλιακή ακτινοβολία που δέχονται οι ράγες. Πρόκειται δηλαδή για μια έμμεση επίδραση επί των μεθοξυπυραζινών. Μεγαλύτερο ποσοστό MPs δίνουν τα βαθιά, αργιλώδη εδάφη, με υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών στοιχείων και μεγάλη ικανότητα συγκράτησης νερού. Σε μελέτη που έγινε²⁸, το Cabernet Sauvignon φαίνεται να συνθέτει μεγαλύτερα ποσοστά μεθοξυπυραζινών όταν καλλιεργείται σε αμμώδη παρά σε χαλικώδη εδάφη, και μάλιστα τα επίπεδά τους μειώνονταν πολύ πιο αργά σε σχέση με τα χαλικώδη. Βλέπουμε δηλαδή ότι τα χαρακτηριστικά του εδάφους επηρεάζουν έμμεσα τις MPs, αφού μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης νερού και μεγαλύτερη γονιμότητα εδάφους, οδηγεί πρώτα σε μεγαλύτερη ζωηρότητα και υψηλότερο ποσοστό σκίασης στο πρέμνο, και μετά σε μεγαλύτερο ποσοστό μεθοξυπυραζινών, με τρόπους που έχουμε ήδη αναφέρει. Στην περίπτωση της δομής, τα αμμώδη εδάφη θερμαίνονται γρήγορα, και αντανακλούν θερμότητα και φωτεινή ακτινοβολία στα σταφύλια. Αυτό σημαίνει όμως ότι τα επίπεδα των MPs θα έπρεπε να είναι χαμηλότερα απ' ό,τι στα χαλικώδη. Το παράδοξο με το συγκεκριμένο πείραμα που έγινε σε Cabernet Sauvignon εξηγείται λόγω της ταυτόχρονης επίδρασης της πυκνότητας φύτευσης (3500 φυτά/εκτάριο στο αμμώδες και 7500φυτά/εκτάριο στο χαλικώδες), η οποία όσο αυξάνεται, παρατηρήθηκε ότι αυξάνει και τη συγκέντρωση των μεθοξυπυραζινών στο σταφύλι^{6,20,28,16}

Από τα θρεπτικά στοιχεία του εδάφους ιδιαίτερη σημασία παρουσιάζει το άζωτο. Δεδομένου ότι οι μεθοξυπυραζίνες περιλαμβάνουν άζωτο στο μόριο τους είναι πιθανό αύξηση των επιπέδων αζώτου στο πρέμνο να οδηγούν σε αύξηση της σύνθεσής τους. Ακόμη και έμμεσα όμως, το άζωτο επιδρά επί του συνολικού ποσού τους καθώς επιδρά στο μικροκλίμα. Πράγματι, μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε άζωτο οδηγεί σε αύξηση της ευρωστίας των πρέμνων και άρα σε μεγαλύτερο ποσοστό σκίασης λόγω μεγαλύτερου αριθμού βλαστών άρα και μεγαλύτερου πάχους φυλλώματος^{66,69}.

0.2.7 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι εμφανές ότι οι καλλιεργητικές τεχνικές που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των μεθοξυπυραζινών στο σταφύλι, είναι αυτές που επηρεάζουν την ηλιακή ακτινοβολία, τη θερμότητα και το ποσό υγρασίας που θα λάβει το σταφύλι.

- Κλάδεμα : επηρεάζει το ποσό της ακτινοβολίας που δέχεται η σταφυλή. Για παράδειγμα το ξεφύλλισμα (χλωρά κλαδέματα) αυξάνει το ποσό της ηλιακής ακτινοβολίας που δέχεται η σταφυλή. Αν γίνει πριν το γυάλισμα οδηγεί σε μείωση των MPs στο σταφύλι κατά την πλήρη ωρίμανση -αργότερα έχει πολύ μικρή επίδραση-, ενώ σημασία έχει και το πόσα και ποια φύλλα θα αφαιρεθούν, αφού τα φύλλα της βάσης παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά μεθοξυπυραζινών. Στο Sauvignon Blanc παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση στις MPs όσο περισσότερα φύλλα αφαιρούνταν. Πρώιμο ξεφύλλισμα (πριν από το τέλος της περιόδου αύξησης των βλαστών), έχει αρνητική επίδραση στην ποιότητα και ποσότητα του φορτίου ανεξαρτήτως βαθμού αυστηρότητας⁶⁹. Έχει βρεθεί ότι αύξηση του φορτίου οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης της IBMP⁶⁷, έτσι, επίσης από τα χλωρά κλαδέματα, το αραίωμα φορτίου αλλά και το χειμερινό κλάδεμα καρποφορίας, θα οδηγεί σε αύξησή της⁶⁸. Το κλάδεμα μόρφωσης επηρεάζει το γεωμετρικό σχήμα του φυλλώματος, άρα και το ποσό ακτινοβολίας που θα δεχτεί η σταφυλή.
- Επιλογή χρόνου τρυγητού : καθυστέρηση του τρύγου κατά 15 ημέρες, οδηγεί σε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της IBMP⁶.
- Πότισμα : πότισμα από την έναρξη της ωρίμανσης (γυάλισμα) και μετά , οδηγεί σε αύξηση τόσο της IBMP όσο και των IPMP και secBMP κατά την ωρίμανση.
- Σύστημα μόρφωσης : τα γραμμικά σχήματα και οι κρεβατίνες εξασφαλίζουν καλύτερες συνθήκες φωτισμού και αερισμού, άρα δίνουν σταφυλές με χαμηλότερα επίπεδα μεθοξυπυραζινών σε σχέση με κυπελλοειδή κ.λ.π.⁶⁹.
- Κατεύθυνση των γραμμών φύτευσης : επηρεάζει έμμεσα το ποσό των MPs αφού και από αυτήν εξαρτάται η πρόσληψη της ηλιακής ακτινοβολίας από τον αμπελώνα⁷⁰.

0.2.8 CO₂

Από εργαστηριακές μελέτες το CO₂ έχει συσχετισθεί με την ένταση της φωτοσύνθεσης⁷⁰, αύξηση της οποίας ως γνωστό οδηγεί σε αύξηση της φυλλικής επιφάνειας, άρα και του ποσοστού σκίασης. Δεδομένης της αύξησης του CO₂ στην ατμόσφαιρα ίσως σε μερικές ποικιλίες το ποσοστό των μεθοξυπυραζινών παρουσιάσει αύξηση⁴⁸.

0.2.9 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ

Οι ποικιλίες στις οποίες έχει αναφερθεί η παρουσία μεθοξυπυραζινών είναι συχνότερα οι Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, και Merlot, αλλά και Pinot Noir, Muscat, Semillon, Chardonnay, Riesling, Syrah, Zweigeltrebe, Cencibel, Fer Servadou, Uva di Troia, Primitivo και Ξινόμαυρο με μικρότερη συχνότητα. Φαίνεται λοιπόν ότι εμφανίζεται συνήθως σε συγγενικές ποικιλίες, όπως είναι οι Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Merlot, Fer Servadou, αλλά και σε κλώνους αυτών³⁸, πιθανότατα λόγω εμπλοκής κάποιου γονιδίου (Boss et al., 2008). Στο μονοπάτι που έχει προταθεί για τη βιοσύνθεση των MPs το τελικό στάδιο, δηλαδή η μεθυλίωση των 3-αλκυλ-2-υδροξυπυραζινών σε 2-αλκυλ-μεθοξυπυραζίνες γίνεται όπως είδαμε ενζυμικά, και πιο συγκεκριμένα με τη βοήθεια μιας μεθυλτρανσφεράσης η οποία σύμφωνα με μελέτη των Hashizume et.al., (2001b) πράγματι ελέγχεται από ένα γονίδιο στο σταφύλι, το οποίο μάλιστα εκφράζεται περισσότερο σε ψυχρά απ' ό,τι σε θερμά κλίματα (Boss et al., 2008).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ιδιαίτερος το Cabernet Sauvignon καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του κόσμου όπως Ισπανία, Κίνα, Ιαπωνία, Βραζιλία, Νέα Ζηλανδία, με πολύ διαφορετικές, όπως είναι λογικό κλιματολογικές συνθήκες, αλλά συνεχίζει να εμφανίζει υψηλές συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζινών -ανάλογα βέβαια και με τις αμπελουργικές συνθήκες- και ιδιαίτερα IBMP.^{34,35,36,39}

Η κάθε ποικιλία παρουσιάζει διαφορετικά επίπεδα μεθοξυπυραζινών, με τις Cabernet Sauvignon και Sauvignon Blanc να κατέχουν τα πρωτεία τόσο σε συχνότητα εμφάνισης όσο και σε συγκεντρώσεις. Σε έρευνα που έγινε στις ποικιλίες Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah και Cencibel στην Ισπανία και με ίδιες καλλιεργητικές συνθήκες παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της IBMP ακολουθούσε τη σειρά Cabernet > Merlot > Syrah > Cencibel³³. Η καλλιεργητική συμπεριφορά κάθε ποικιλίας παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση των μεθοξυπυραζινών, για παράδειγμα πρέμνα από Cabernet Sauvignon παρουσιάζουν γρήγορη ανάπτυξη, που τελικά μεταφράζεται σε μεγάλο πάχος φυλλώματος (λόγω αύξησης και των βλαστών), άρα και σε αυξημένες MPs³¹.

Από τις μη Vinifera ποικιλίες, μεθοξυπυραζίνες, και πιο συγκεκριμένα η IPMP, ανιχνεύθηκε σε χυμό από τις ποικιλίες Concord και Niagara. Η προέλευσή της όμως δεν ήταν το σταφύλι, αλλά μια πασχαλίτσα, η *Harmonia axyridis*.

0.3 HARMONIA AXYRIDIS



Η *Harmonia axyridis* (οικ. Coccinellidae) είναι μια πολύχρωμη πασχαλίτσα, ενδημική στην Ασία. Λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους της (~7cm), της ακόρεστης όρεξής της για αφίδες και της ευκολίας της στο να προσαρμόζεται σε διάφορα περιβάλλοντα και να δημιουργεί αποικίες, προτάθηκε η χρήση της στη βιολογική καταπολέμηση των αφίδων, σε διάφορα μέρη του κόσμου.

0.3.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ

Η εισαγωγή της, αρχικά στη Β.Αμερική, αν και επιχειρήθηκε ήδη από το 1916 χωρίς επιτυχημένη εγκαθίδρυσή της, έγινε τελικά το 1980. Μέχρι το 1988 είχε εξαπλωθεί σε διάφορες πολιτείες των Η.Π.Α., ως και τον Καναδά, ενώ αυξήθηκε τόσο σε πληθυσμό που έφτασε να είναι η κυρίαρχη αφιδοφάγος πασχαλίτσα της Β. Αμερικής τουλάχιστον.

0.3.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ

Σαν μέσο βιολογικής καταπολέμησης είχε επιτυχία. Μείωσε τις ζημιές από αφίδες και κοκκοειδή σε διάφορες καλλιέργειες (καλαμπόκι, μηδική, μήλα, βαμβάκι, καπνά, σόγια, φράουλα), ωστόσο, σιγά σιγά φάνηκε ότι ταυτόχρονα δημιουργούσε πολλά προβλήματα. Εκτός του ότι άρχισε να στρέφεται σε νέα θηράματα, ακόμη και σε επωφελή αφιδοφάγα έντομα (Koch et al., 2003),⁹⁰ ο πληθυσμός της αυξήθηκε, ίσως και εξαιτίας της περίπου ταυτόχρονης εξάπλωσης μιας αφίδας της σόγιας που αποτελεί τροφή για τη *Harmonia axyridis* ⁽⁴⁴⁾, τόσο που τα σπίτια στην Αμερική το φθινόπωρο ήταν γεμάτα πασχαλίτσες που ξεχειμώνιαζαν σε ομάδες, οι οποίες μάλιστα, αν ενοχλούνταν ελευθέρωναν ανακλαστικά μια ουσία κίτρινου χρώματος και δριμύας οσμής, η οποία σε ορισμένα άτομα προκαλούσε αλλεργία. Κατά τα τέλη καλοκαιριού προς τις αρχές φθινοπώρου που ετοιμάζονται να βρουν μέρος να διαχειμάσουν, και έπρεπε να τραφούν, καταγράφονταν ακόμη και επιθέσεις τους σε ανθρώπους.

0.3.3 ΟΣΜΗ ΠΑΣΧΑΛΙΤΣΑΣ



Ψάχνοντας για ένα μέρος να περάσουν το χειμώνα, και ταυτόχρονα τροφή, οι πασχαλίτσες έλκονται από τα σταφύλια τα οποία την περίοδο εκείνη είναι περίπου στο στάδιο της ωριμότητας. Έτσι, εκτός από το ότι προκαλούν ζημιές – οικονομικής σημασίας– στις ράγες αφού ρουφούν το χυμό τους, συλλέγονται μαζί με τα σταφύλια κατά τον τρύγο, και οδηγούνται για οινοποίηση μαζί με

αυτά, με αποτέλεσμα να ελευθερώνουν στο μούστο ουσίες μέσω της αιμολέμφου τους που αλλοιώνουν το άρωμα αλλά και τη γεύση των παραγόμενων οίνων, δίνοντάς του νότες φυστικοβούτυρου και μούχλας.

Οι ουσίες αυτές παράγονται από τις ενήλικες πασχαλίτσες και δρουν τόσο ως φερομόνες έλξης, αλλά και σαν σήμα συναγερμού για πιθανά αρπακτικά (Al Abassi et al., 1998)^{43,89}. Βρίσκονται στην αιμολέμφο τους απ' όπου ελευθερώνονται με αντανακλαστική αιμορραγία και περιέχουν εκτός από αλκαλοειδή με τοξική δράση, και κάποιες πτητικές απωθητικές ουσίες⁴⁴. Για τη χαρακτηριστική, δριμεία οσμή της αιμολέμφου, είναι υπεύθυνες οι μεθοξυπυραζίνες IBMP, IPMP και secBMP αλλά πρόσφατα και για πρώτη φορά, ανιχνεύθηκε και η DMMP η οποία φάνηκε ότι επίσης συμβάλλει στο χαρακτηριστικό αυτό άρωμα³. Η κυρίαρχη μεθοξυπυραζίνη της *H.axyridis* είναι η IPMP, σε αντίθεση με το σταφύλι όπου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκεται η IBMP. Το κατώφλι αντίληψης της «οσμής πασχαλίτσας» σε χυμό σταφυλιού αντιστοιχεί σύμφωνα με τους Ross et al., σε 1,8 πασχαλίτσες/L χυμού⁴³. Η αλλαγή που παρατηρείται στη γεύση οίνων από πασχαλίτσες οφείλεται στα αλκαλοειδή της αιμολέμφου και χαρακτηρίζεται περισσότερο πικρή⁸⁵.

0.3.4 ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Από το 1982 και μετά η *Harmonia axyridis* έγινε διαθέσιμη εμπορικά και στην Ευρώπη, ως μέσο βιολογικής καταπολέμησης (Katsoyannos et al., 1997, Iperiti και Bertand, 2001), ενώ ελευθερώθηκε σε διάφορες χώρες της Ευρώπης και της Νότιας Αφρικής. Από το 2000 τη βρίσκουμε σε Βέλγιο, βόρεια Γαλλία, Ολλανδία, Γερμανία, Λουξεμβούργο και Σουηδία. Γνωρίζοντας την ιστορία αλλά κυρίως τα προβλήματα που μπορεί να δημιουργήσει, η εμφάνισή της το 2004 στο Έσσεξ της Αγγλίας καλύφθηκε από την τηλεόραση, το ραδιόφωνο αλλά και από 5 εφημερίδες.⁴¹ Αξίζει να παρατηρηθεί ότι από το 2007 καταγράφηκε η παρουσία της και στη γειτονική μας Ιταλία (Soares 2007)⁷¹.



0.3.5 ΤΡΟΠΟΙ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗΣ

Έρευνες στη Βόρεια Καρολίνα έδειξαν ότι παράσιτα της *Harmonia axyridis* μπορεί να είναι μια μύγα της οικογένειας Tachinidae και μια σφήκα της οικογένειας Braconidae, όπως και πασχαλίτσες του γένους *Hippodamia*⁹¹, εκτός αυτών όμως φαίνεται να έχει λίγους φυσικούς εχθρούς. Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει ότι τις απωθεί το άρωμα μέντας και η καμφορά, καθώς προκαλούν ερεθισμό στα χημειοαισθητήρια όργανά τους. Οι αμπελοπαραγωγοί φαίνεται μέχρι στιγμής να προτιμούν την καταπολέμηση με χημικά μέσα, ψεκάζοντας τις καλλιέργειες, ή στην καλύτερη περίπτωση μηχανικά, εφαρμόζοντας αέρα

υψηλής πίεσης⁴⁶. Η καταπολέμησή τους για τον κλάδο της οινοποιίας έχει μεγάλη σημασία, εφόσον όπως αναφέρθηκε, αρκεί μόλις 1 περίπου πασχαλίτσα/kg σταφυλιών για να αλλοιώσει το άρωμα του παραγόμενου οίνου.

0.3.6 ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ ΣΕ ΆΛΛΑ ΕΙΔΗ COCCINELLIDAE



Harmonia axyridis



Hippodamia convergens



Coccinella septempunctata

Μεθοξυπυραζίνες έχουν αναφερθεί και σε άλλα είδη της οικ. Coccinellidae (τάξη Coleoptera) εκτός της *Harmonia axyridis*. Μελέτη που έγινε στις *Harmonia axyridis*, *Hippodamia convergens* και *Coccinella septempunctata* έδειξε πως η IPMP ανιχνεύεται και στα τρία είδη, ενώ οι secBMP και IBMP μόνο στις *Harmonia axyridis* και *Hippodamia convergens*. Ανάλογα με το σωματικό βάρος, τα μεγαλύτερα επίπεδα μεθοξυπυραζινών έχει η *Hippodamia convergens* ενώ τα μικρότερα η *Coccinella septempunctata*⁴⁵.

Επίπεδα (μg/mg) μεθοξυπυραζινών σε είδη Coccinellidae			
Μεθοξυπυραζίνη	Είδος Coccinellidae		
	<i>Harmonia axyridis</i>	<i>Hippodamia convergens</i>	<i>Coccinella septempunctata</i>
IPMP	27,5	90,8	0,4
secBMP	2,6	5,6	Δεν ανιχνεύθηκε
IBMP	3,2	17,3	Δεν ανιχνεύθηκε

Εκτός από την οικογένεια των Coccinellidae, μεθοξυπυραζίνες έχουν ανιχνευθεί και στην οικογένεια των Lygaeidae (*Oncopeltus fasciatus*) και Pentatomidae (*Murgantia histrionica*). Και οι δύο οικογένειες ανήκουν στην τάξη Hemiptera, υποτάξη Heteroptera^{86,87,88}.

0.4 ΟΙΝΟΣ

0.4.1 ΑΡΩΜΑ

Χαρακτηριστικό γνώρισμα του κρασιού αποτελεί ο πλούτος των αρωμάτων του, σε σημείο που οι περισσότεροι έχουμε συνδέσει την τέχνη της γευσιγνωσίας αποκλειστικά με τη γευσιγνωσία του οίνου. Η πολυπλοκότητα αυτή προκύπτει τόσο από την πρώτη ύλη, δηλαδή το σταφύλι, όσο και από τη μέθοδο οινοποίησης και την παλαίωση. Εκατοντάδες διαφορετικών ποικιλιών καλλιεργούνται σε ένα μεγάλο γεωγραφικό εύρος, σε διαφορετικά κλίματα και υψόμετρα, (ενώ επιπρόσθετα) στην οινοποίηση εμπλέκονται πλήθος

διαφορετικών στελεχών ζυμών και ειδών μηλογαλακτικών βακτηρίων, και η διαδικασία της παλαιώσης ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης, το μέγεθος και το υλικό του περιέκτη, αλλά και την προέλευση του σε περίπτωση που ο περιέκτης είναι δρύινο βαρέλι.

0.4.1.1 ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΑΡΩΜΑΤΟΣ

Η μελέτη του αρώματος βασίζεται στην κατανόηση των ιδιοτήτων των αρωματικών ουσιών που συμβάλλουν στη διαμόρφωσή του. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος που αλληλεπιδρούν οι διάφορες αυτές ουσίες μεταξύ τους. Ένα άρωμα μπορεί να υπερισχύει ενός άλλου ακόμη κι αν η ουσία που είναι υπεύθυνη γι' αυτό βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση, πράγμα λογικό αφού αυτό που παίζει ρόλο είναι το κατώφλι αντίληψης της κάθε ουσίας⁴⁹, αλλά ακόμη και αυτό δεν αποτελεί πάντα δείκτη της επίδρασής του στο συνολικό άρωμα⁵⁰. Σχετική μελέτη⁴⁹ έδειξε ότι 10 ng/L secBMP επιδρούν στο άρωμα του οίνου αν η συγκέντρωση μιας άλλης ουσίας, της 3-mercaptohexyl acetate είναι περίπου 58 ng/L, ενώ όταν η συγκέντρωση της secBMP είναι 40 ng/L επιδρά στο άρωμα ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της θειόλης αυτής (άρωμα τροπικού φρούτου), ακόμη και όταν η συγκέντρωση της τελευταίας είναι 500 ng/L. Στο ίδιο πείραμα, αν χρησιμοποιηθεί μίγμα μεθοξυπυραζινών, σε συγκεντρώσεις που συνήθως βρίσκονται και σε ένα κρασί δηλαδή 4, 3 και 18 ng/L για τις secBMP, IPMP και IBMP αντίστοιχα, η επίδρασή τους είναι εμφανής όταν η συγκέντρωση της θειόλης είναι χαμηλή (58ng/L), χωρίς όμως να παρατηρείται το χαρακτηριστικό άρωμα πιπεριάς, ενώ για να φανεί καθαρά η επίδρασή τους επί του αρώματος, η συγκέντρωσή τους -ή πιο σωστά το άθροισμα των συγκεντρώσεών τους- πρέπει να είναι 40ng/L.⁴⁹ Το ίδιο φαινόμενο δεν παρατηρείται πάντα. Μπορεί όταν δύο αρωματικές ουσίες μέτριας έντασης η καθεμία ξεχωριστά, βρεθούν μαζί να μη δίνουν ένα έντονο άρωμα (mixture suppression). Εκτός αυτού, ακόμη και το κατώφλι αντίληψης μιας ουσίας του οίνου μπορεί να μην εκφράζει πλήρως την επιρροή της στο συνολικό άρωμα, αφού σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, ακόμη και οι ουσίες που βρίσκονται κάτω από το κατώφλι αντίληψής τους επιδρούν σημαντικά στο συνολικό άρωμα. Δεν λείπουν βέβαια και περιπτώσεις συνέργειας. Για παράδειγμα όταν σε κάποια μελέτη⁵⁰ προστέθηκε η IPMP σε οίνο από τον οποίο είχαν αφαιρεθεί τα αρώματα, σε συγκέντρωση στην οποία συνήθως βρίσκεται σε κρασιά του εμπορίου, το άρωμα του οίνου χαρακτηρίστηκε άρωμα «γης». Όταν προστέθηκαν και οι (Z)-3-εξανόλη και 1-εξανόλη, σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από το κατώφλι αντίληψής τους, το άρωμα που περιγράφηκε ήταν «πιπεριά». Σημαντική είναι και η επίδραση της αιθανόλης επί των αρωμάτων. Σε υδατικά διαλύματα με αρώματα ξύλου και φρούτων, εμφανιζόταν συνεργιστική δράση του αρώματος ξύλου επί του αρώματος φρούτου, πράγμα που δεν συνέβη σε αλκοολικά διαλύματα. Επίσης το άρωμα ξύλου καλυπτόταν από το

φρουτώδες άρωμα και στα δύο διαλύματα, ενώ και τα δύο κάλυπταν το άρωμα της αιθανόλης⁵⁰.

0.4.1.2 ΠΟΙΚΙΛΙΑΚΟ ΑΡΩΜΑ

Παρά το γεγονός ότι σε πολλές αμπελουργικές περιοχές τα κρασιά διαχωρίζονται με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση, υπάρχουν ποικιλίες όπως το Cabernet Sauvignon και το Merlot στο Μπορντώ, το Pinot Noir ή το Chardonnay στη Βουργουνδία, το Tempranillo στη Ριόχα, το Sangiovese στην περιοχή Κιάντι στην Τοσκάνη ή το Ξινόμαυρο στη Νάουσα που κυριαρχούν στον οργανοληπτικό τους χαρακτήρα.⁴⁸ Λέμε τότε ότι τα κρασιά αυτά εμφανίζουν τυπικά “ποικιλιακά αρώματα”, όπως είναι για παράδειγμα η ντομάτα και η ελιά για το Ξινόμαυρο, ή η πράσινη πιπεριά για το Cabernet Sauvignon και το Sauvignon Blanc ή ακόμη ότι είναι κρασιά με “αίσθηση terroir”, υπονοώντας έτσι ότι οι ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργήθηκαν σε αμπελοτόπια που ανέδειξαν τα χαρακτηριστικά τους, ή ότι πολλές φορές το αμπελοτόπι υπερισχύει της ποικιλίας στην έκφραση των αρωμάτων.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, το χαρακτηριστικό άρωμα μιας ποικιλίας, δεν είναι αποτέλεσμα μιας μόνο χημικής ουσίας, αλλά ενός συνδυασμού πτητικών ουσιών, όπως συμβαίνει για παράδειγμα σε ένα άρωμα επίσης χαρακτηριστικό για το Sauvignon Blanc, αυτό του γκρέιπφρουτ⁴⁸. Για το άρωμα πιπεριάς αντιθέτως είναι υπεύθυνες αποκλειστικά οι μεθοξυπυραζίνες.

0.4.1.3 ΧΟΡΤΩΔΗΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΑΣ

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζινών που έχουν βρεθεί στους οίνους είναι 56,3 ng/L για την IBMP, 4,5 ng/L για την IPMP, και 11,2 ng/L για τη secBMP. Στους πίνακες 1 και 2 του παραρτήματος φαίνονται συγκεντρωτικά οι συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζινών σε σταφύλια, μούστους και οίνους, μαζί με στοιχεία για γεωγραφική προέλευση, χρονιά, κλιματολογικές συνθήκες, και βαθμό ωρίμανσης. Η IBMP σε σχέση με τις IPMP και secBMP συναντάται πολύ πιο συχνά, ενώ για την DMMP δεν υπάρχουν στοιχεία. Η IBMP αποτελεί επίσης την ουσία που είναι πιο πιθανό να επηρεάσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου αφού ανιχνεύεται σε συγκεντρώσεις συνήθως μεγαλύτερες από το κατώφλι αντίληψής της. Ωστόσο, ακόμα και όταν το ξεπερνά κατά πολύ, η παρουσία της σε υψηλής ποιότητας οίνους από Cabernet Sauvignon και Merlot δε θεωρείται παραφωνία, κυρίως εξαιτίας της αρωματικής πολυπλοκότητας των ποικιλιών αυτών. Η παρουσία της είναι πολύ σημαντική και στο Sauvignon Blanc, του οποίου αποτελεί όπως είδαμε ένα από τα χαρακτηριστικά

αρώματα. Εδώ τα πράγματα όμως είναι λίγο διαφορετικά, γιατί για να θεωρηθεί ένα κρασί που την περιέχει ποιοτικό, πρέπει να είναι σε ισορροπία και με άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Έτσι, η IBMP μπορεί να προσδώσει πολυπλοκότητα και χαρακτήρα σε ένα Sauvignon Blanc, αρκεί να μην κυριαρχεί επί των υπολοίπων αρωμάτων, και να είναι σε ισορροπία με αυτά⁶. Ιδανικές συγκεντρώσεις θεωρείται ότι είναι μεταξύ 8-15ng/L, ενώ πάνω από 30 ng/L η παρουσία της είναι δυσαρμονική με τα άλλα αρώματα του οίνου.

Το επιθυμητό αρωματικό προφίλ για έναν οίνο, είναι συνισταμένη πολλών παραγόντων. Μια από τις συνιστώσες φυσικά είναι η προτίμηση του καταναλωτικού κοινού. Στη Νέα Ζηλανδία εκτιμούν τα ισχυρά πράσινα αρώματα στο Sauvignon Blanc, ενώ στο Μπορντώ κάτι τέτοιο θεωρείται δείκτης ότι τα σταφύλια από τα οποία προέκυψε δεν είχαν ωριμάσει πλήρως ειδικά αν πρόκειται για Cabernet Sauvignon ή Merlot. Άλλωστε τα χορτώδη αρώματα είναι περισσότερο συμβατά με λευκά κρασιά παρά με κόκκινα, στα οποία είναι μάλλον ανεπιθύμητα²⁸. Στη νότιο Αφρική προφανώς εκτιμούν ιδιαιτέρως το άρωμα της πράσινης πιπεριάς, αφού χαμηλά επίπεδα μεθοξυπυραζινών στο Sauvignon Blanc τους, οδήγησε τους οινοποιούς σε παράνομη προσθήκη IBMP, η οποία έφτανε μάλιστα τα 173 ng/L, δηλαδή 5 φορές υψηλότερα επίπεδα από τα συνηθισμένα^{48,51}.

0.4.1.4 ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΑ-ΟΣΜΗ ΠΑΣΧΑΛΙΤΣΑΣ



Chronicle / Dan Hubig

Όπως φαίνεται μέχρι στιγμής η επίδραση που ασκούν οι μεθοξυπυραζίνες επί του αρώματος του οίνου είναι – μέχρι κάποιας συγκέντρωσης- θετική. Αυτό ισχύει στην περίπτωση που οι μεθοξυπυραζίνες προέρχονται από το σταφύλι, οπότε κυρίαρχη είναι η IBMP. Στην περίπτωση όμως που προέρχονται από την *Harmonia axyridis*, στην οποία κυριαρχεί η IPMP, τα πράγματα είναι διαφορετικά. Η συγκεκριμένη πασχαλίτσα έχει συνδέσει το όνομά της με ένα οργανοληπτικό ελάττωμα του οίνου, γνωστό ως Lady bug taint (LBT), το οποίο στα ελληνικά μεταφράζεται ελεύθερα ως «ελάττωμα οσμής πασχαλίτσας». Αναλύσεις που έγιναν στο

χαρακτηριστικό άρωμα που αναδίδεται από ζωντανές πασχαλίτσες και του οποίου πηγή είναι η αιμολέμφος όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, αναφέρουν ότι αποτελείται από αρώματα όπως ‘μούγλα’, ‘γη’, ‘πράσινη πιπεριά’, ‘πατάτα’, ‘ξηροί καρποί’. Οι μεθοξυπυραζίνες ανάλογα με την ένταση με την οποία συμβάλουν στο άρωμα κατατάσσονται στην εξής σειρά: IPMP (71%)>IBMP(59%)>DMMP(58%)>secBMP (36%). Η συγκέντρωσή τους είναι της τάξεως

των ng/L όπως και στην περίπτωση που οι MPs προέρχονται από το σταφύλι, ενώ η κάθε πασχαλίτσα έχει «αρωματικό φορτίο» της τάξης των pg/L³.

Σε ερυθρούς οίνους η συγκεντρώσεις στις οποίες βρίσκεται η IBMP είναι 3,6-56,3 ng/l ενώ στους λευκούς 4,7-18 ng/L. Η συγκέντρωσή της μάλιστα είναι γενικά σε υψηλότερα επίπεδα από την secBMP και IPMP.²⁸ Διαφορά επίσης παρουσιάζει και το κατώφλι αντίληψης των μεθοξυπυραζινών σε λευκούς και σε ερυθρούς οίνους. Για παράδειγμα το κατώφλι αντίληψης της IBMP στους λευκούς οίνους είναι 1-2 ng/L ενώ στους ερυθρούς 10-15 ng/L⁵¹. Η διαφορά αυτή οφείλεται κυρίως στα διαφορετικά αρώματα που παρουσιάζουν τα λευκά και τα κόκκινα κρασιά, αλλά και στο ότι τα κόκκινα χαρακτηρίζονται από την αυξημένη παρουσία φαινολικών συστατικών.

0.4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΟΪΝΟΥ ΣΤΙΣ ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το οργανοληπτικό προφίλ των οίνων, χαρακτηρίζεται από την πολυπλοκότητά του, αλλά και από την αλληλεπίδραση των αρωματικών του συστατικών, με αποτέλεσμα το άρωμα των οίνων να μην είναι ανάλογο των συγκεντρώσεων των επιμέρους αρωματικών συστατικών ή της έντασής τους. Εκτός αυτού, στο άρωμα του οίνου επιδρούν και μη πτητικές ουσίες, οι οποίες επηρεάζουν την πτητικότητα και την ένταση των διάφορων αρωματικών του συστατικών. Για παράδειγμα τα λιπίδια γενικά μειώνουν την πτητικότητα των αρωμάτων σύμφωνα με το νόμο της κατανομής. Πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και τα κόμμεα επίσης μειώνουν την πτητικότητα και την ένταση, με το σχηματισμό συμπλόκων ή τον εγκλωβισμό των αρωματικών συστατικών. Η παρουσία πρωτεϊνών έχει τα ίδια αποτελέσματα, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μη πολικών αρωματικών συστατικών και των υδρόφοβων τμημάτων των πρωτεϊνών.

0.4.2.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Οι πολυφαινόλες, σημαντικά –μη πτητικά- συστατικά των οίνων έχει φανεί ότι παίζουν επίσης κάποιο ρόλο, όμως ο τρόπος που επιδρούν επί των αρωματικών ουσιών δεν έχει εξερευνηθεί πλήρως. Παλαιότερες έρευνες έδειξαν ότι μονομερείς φαινόλες όπως η ναρινγκίνη αυξάνουν τη διαλυτότητα και μειώνουν την πτητικότητα ουσιών όπως η 2,3-δισουλφυραζίνη σε υδατικά διαλύματα. Το γαλλικό οξύ επίσης φάνηκε να μειώνει την πτητικότητα της 2-μεθυλπυραζίνης (βέβαια το ότι επιδρούν σε πυραζίνες δεν σημαίνει ότι σίγουρα θα επιδρούσαν και επί των μεθοξυπυραζινών λόγω διαφορετικής χημικής δομής). Οι ταννίνες φαίνεται να επηρεάζουν πτητικές ουσίες με μεγάλα μοριακά βάρη⁵². Συγκεκριμένα για τις μεθοξυπυραζίνες, φαινολικές ουσίες όπως το γαλλικό οξύ και η επικατεχίνη που

περιέχουν πολλά υδροξύλια στο μόριό τους, θα μπορούσαν θεωρητικά να τις δεσμεύσουν⁵³. Η τάση να παρατηρείται υψηλότερη συγκέντρωση MP σε λευκούς οίνους τουλάχιστον για την περίπτωση που η προέλευσή τους είναι η *Harmonia axyridis* (εφόσον όπως αναφέρθηκε η συγκέντρωσή τους συνήθως είναι μικρότερη στα λευκά), ίσως οφείλεται σε δέσμευση της από τις πολυφαινόλες στους ερυθρούς, και πιθανή καθίζησή τους⁵⁴.

0.4.2.2 ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΚΑΙ PH

Το pH του οίνου είναι συνήθως κοντά στο 3,5 (3-3,8). Οι μεθοξυπυραζίνες, ουσίες ελαφρά βασικές, σε αυτό το pH είναι σταθερές. Θεωρητικά πρωτονιώνονται σε $\text{pH} < 2$ (χαμηλότερο από αυτό του οίνου) και σχηματίζουν μη πτητικά τεταρτογενή αμμωνιακά ιόντα. Η αλκοόλη αυξάνει τη διαλυτότητα των μεθοξυπυραζινών στην υδατική φάση, ενώ προηγουμένως είδαμε πώς μπορεί να επηρεάσει και τον αντίκτυπο που θα έχει ένα άρωμα⁵³. Σύμφωνα με τον Guth (1997) η παρουσία της αιθανόλης μπορεί να προκαλέσει αύξηση στο κατώφλι αντίληψης μερικών πτητικών συστατικών³⁷. Τα συνήθη επίπεδα αιθανόλης σε οίνους είναι 9-15% (ξηροί οίνοι).⁵³

0.4.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΘΟΛΟΥ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η μέθοδος οινοποίησης συμβάλει όπως αναφέρθηκε στην πολυπλοκότητα των αρωμάτων του κρασιού, και μάλιστα είναι η κύρια υπεύθυνη για τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου κυρίως γιατί μπορεί να αναδείξει ή να καλύψει τα πρωτογενή αρώματα, αυτά δηλαδή του σταφυλιού, αλλά και να συνεισφέρει στη σύνθεση νέων (υποπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης). Ο τρόπος που γίνεται αυτό αποτελεί ξεχωριστό κεφάλαιο, όχι όμως της παρούσας εργασίας. Η παλαίωση επίσης συνεισφέρει στην παραγωγή αρωμάτων όπως για παράδειγμα αυτού της βανίλιας σε περίπτωση που η παλαίωση γίνει σε δρύινα βαρέλια.

- ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι τα σταφύλια (φλοιοί, σάρκα και βόστρυχες) περιέχουν μεγαλύτερα ποσά μεθοξυπυραζινών από τους αντίστοιχους χυμούς σταφυλιού. Συνεπώς η πίεση που θα ασκηθεί για να απελευθερωθεί ο χυμός επηρεάζει σημαντικά το ποσό των MPs που θα βρεθούν τελικά στον οίνο, όπως και η διάρκεια συμπαράμονής με τα στέμφυλα αφού επηρεάζει το βαθμό εκχύλισής τους. Η πλειοψηφία των MPs περνά από το σταφύλι στο χυμό κατά τις 24 πρώτες ώρες της εκχύλισης, πριν ξεκινήσει η ζύμωση, ενώ η μηλογαλακτική ζύμωση επηρεάζει ελάχιστα την τελική τους συγκέντρωση⁵⁵ (Sala et al. 2002, Roujou de Boubee et al. 2002). Υψηλή θερμοκρασία κατά την εκχύλιση οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης της IPMP από τις πασχαλίτσες, ίσως γιατί δεν περνούν από την αιμολέμφο

στο χυμό, είτε λόγω εξάτμισης ή διάσπασης³⁷. Έρευνα έδειξε ότι πιθανόν και τα διάφορα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση χρώματος να επηρεάζουν τη συγκέντρωση των MPs, όμως τα αποτελέσματά της στατιστικά δεν ήταν σημαντικά, ενώ παρουσιάστηκε και μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων⁵⁷.

- ΠΙΕΣΗ

Οίνοι πίεσης (0,8-2 bar¹⁸) παρουσιάζουν χορτώδη αρώματα μεγαλύτερης έντασης, (περιέχουν μεγαλύτερο όγκο μεθοξυπυραζινών από τον πρόδρογο, σε περιπτώσεις ερυθρών οίνων¹⁸) πράγμα που συμβαίνει και όταν η οινοποίηση γίνει χωρίς αποβοστρύχωση.

- ΑΠΟΛΑΣΠΩΣΗ

Σε λευκούς οίνους, η απολάσπωση μειώνει τη συγκέντρωση των μεθοξυπυραζινών κατά 50% περίπου (για θολερότητα 200NTU), πράγμα που υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση με τις ζύμες ή με στερεά συστατικά του μούστου¹⁸.

- ΖΥΜΩΣΗ

Για την αύξηση που παρατηρείται κατά τις πρώτες μέρες της ζύμωσης υπεύθυνο είναι το 1% των MPs που περιέχει η σάρκα⁶. Αυτό μάλλον εξηγεί γιατί ο χυμός που προκύπτει με την τεχνική της αφαιμάξης (χυμός αφαιρείται από δεξαμενές όπου θα παραχθούν ερυθροί οίνοι κατά τη φάση της προζυμωτικής εκχύλισης για να αυξηθεί η αναλογία φλοιών-χυμού ώστε οι οίνοι να έχουν υψηλότερο ποσό ταννινών και εντονότερο χρώμα) έχει τόσο ψηλά ποσοστά μεθοξυπυραζινών, ώστε χρησιμοποιείται σαν «αποθήκη» για περιπτώσεις που ένας οίνος χρειαστεί ενίσχυση του χορτώδους αρώματος⁴⁸.

- ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΖΥΜΗΣ

Έρευνες με διάφορα είδη ζυμών, έδειξαν ότι τόσο το είδος όσο και το στέλεχος επιδρούν άμεσα στην τελική συγκέντρωση της IBMP⁵⁵, ή και έμμεσα στο βαθμό που θα γίνει αντιληπτή οργανοληπτικά, αφού υπάρχουν ζύμες που παράγουν αρωματικές ενώσεις όπως θειόλες, οι οποίες μπορεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις να καλύψουν τις MPs⁵⁶. Το είδος των γαλακτικών βακτηρίων δε φαίνεται να έχουν -στατιστικά τουλάχιστον- κάποια σημαντική επίδραση⁵⁵.

- ΠΑΛΑΙΩΣΗ

Η αναγωγική τουλάχιστον παλαιώση, δηλαδή στη φιάλη δε φαίνεται να επιφέρει κάποιο αποτέλεσμα τόσο στη συγκέντρωση όσο και στην ένταση του αρώματος μεθοξυπυραζινών που προέρχονται από τη *Harmonia axyridis*⁵⁴, ενώ η παλαιώση σε δρύινο βαρέλι οδηγεί σε μείωση της έντασης της «οσμής πασχαλίτσας» (Pickering et al., 2006b), μάλλον λόγω επικάλυψης των ΜΡ από αρώματα του ξύλου (βανιλίνη κ.λ.π.)⁵.

0.4.4 ΑΛΛΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Οι μεθοξυπυραζίνες συντίθενται και από διάφορους μικροοργανισμούς. Η IBMP παράγεται ως υποπροϊόν από διάφορα βακτήρια και μύκητες⁵⁷, όπως και η IPMP, η οποία έχει παρατηρηθεί σε υψηλή συγκέντρωση (9,7 ng/L) σε φιάλη με μικροβιακή επιμόλυνση πιθανώς προερχόμενη από το φελλό. Σταφύλια προσβεβλημένα από βοτρυτή (*Botrytis cinerea*) έχουν δώσει επίσης υψηλές συγκεντρώσεις IBMP, αλλά η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι τα σταφύλια «συρρικνώνονταν» λόγω της προσβολής, οι φλοιοί τους γίνονταν πιο εύθραυστοι οπότε αυξανόταν και ο βαθμός εκχύλισής τους κατά την αλκοολική ζύμωση⁹². Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό μεθοξυπυραζινών δεν είναι σχετικοί με την οινοποίηση, και επομένως δεν αποτελούν μεγάλο πρόβλημα⁵⁷.

0.4.5 ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ

Εκτός από την περίπτωση εμφάνισης της «οσμής πασχαλίτσας» που υποβαθμίζει την ποιότητα αλλά και την οικονομική αξία ενός οίνου, το επιθυμητό οργανοληπτικό προφίλ ενός οίνου σύμφωνα με τις επιδιώξεις του οινολόγου ή τις επιθυμίες του καταναλωτικού κοινού, μπορεί να μην περιλαμβάνει το χαρακτηρισμό «χορτώδες». Εφόσον κύρια πηγή προέλευσης των μεθοξυπυραζινών είναι το σταφύλι, αλλά και εξαιτίας της εύκολης εκχύλισής τους κατά την οινοποίηση, η προσπάθεια μείωσής τους θα πρέπει να ξεκινά στον αμπελώνα. Επειδή αναφέρθηκε αναλυτικά η επίδραση των καλλιεργητικών συνθηκών, παρακάτω απλά δίνονται οι χρόνοι εφαρμογής τους. Έτσι, το ξεφύλλισμα και το πότισμα για να συντελέσουν στη μείωση των μεθοξυπυραζινών πρέπει να γίνονται κατά το στάδιο του γυαλίσματος των ραγών και όχι αργότερα, ενώ το αραίωμα φορτίου καλύτερα να αποφεύγεται. Εκτός των καλλιεργητικών αυτών τεχνικών, έχει προταθεί επίσης η χρήση κατόπτρων ή τουλάχιστον υλικών με μεγάλη ικανότητα ανάκλασης ως τάπητες στο έδαφος του αμπελώνα ώστε να αυξηθεί η ακτινοβολία και η θερμοκρασία²⁹.

Η σημαντικότερη αλλά και πολυπλοκότερη απόφαση στον αμπελώνα είναι ο χρόνος τρυγητού καθώς εκτός του ότι επηρεάζει άμεσα την τελική συγκέντρωση των σακχάρων στη ράγα άρα και τον αλκοολικό τίτλο του παραγόμενου οίνου, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να καταλήξει σε ρίσκο ανάλογα και με τις καιρικές συνθήκες. Οι μεθοξυπυραζίνες είναι γνωστό ότι μειώνονται κατά την ωρίμανση, αλλά μέχρι πόσο μπορεί να περιμένει κανείς; Στη νότιο

Αφρική μάλλον πολύ, αφού οι παραγωγοί αφήνουν τα σταφύλια πάνω στα πρέμνα τόσο πολύ που καταλήγουν σε οίνους με αλκοολικό τίτλο κοντά στα 17%vol ή v/v.⁵⁸ Έτσι ίσως πρέπει να προστεθεί άλλος ένας βαθμός τεχνολογικής ωριμότητας εκτός της πολυφαινολικής και αρωματικής⁸³.

0.4.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ

Ακόμη και αν ελεγχθούν οι μεθοξυπυραζίνες στο αμπέλι, υπάρχει πάντα η πιθανότητα ενός απρόσκλητου επισκέπτη στις δεξαμενές οινοποίησης, της *Harmonia axyridis*.

0.4.6.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η αποβοστρύχωση αναφέρθηκε νωρίτερα ότι βοηθά στη μείωση των MPs. Όμως, επειδή οι βόστρυχοι είναι πλούσιοι σε ταννίνες η παρουσία τους κατά τη ζύμωση είναι επιθυμητή ειδικά σε περιπτώσεις σταφυλιών από νέα αμπέλια ή σε οίνους με ανεπαρκή συγκέντρωση ταννινών⁸³. Έτσι έγιναν προσπάθειες να αφαιρεθούν οι MPs από τους βόστρυχους με θερμική επεξεργασία. Η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών (80-90°C) για μικρό χρονικό διάστημα, χρησιμοποιείται σε χυμό σταφυλιού και μούστου κυρίως για τη θανάτωση μυκήτων ή την αδρανοποίηση ανεπιθύμητων ενζύμων. Η εφαρμογή χαμηλότερων θερμοκρασιών (50-60°C) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (10-30 λεπτά) χρησιμοποιήθηκε για να προάγει τη εκχύλιση χρώματος από σταφύλια φτωχά σε ανθοκυάνες⁵⁹. Πράγματι, κατεργασία με ατμό 100°C για 60 λεπτά οδηγεί σε μείωση της εκχυλίσιμης IBMP κατά 95%, ενώ η IPMP δεν ανιχνεύεται πια. Για τη συγκεκριμένη μέθοδο πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι αυξάνει την ένταση (σε σχέση με προσθήκη βοστρύχων που δεν είχαν υποστεί θέρμανση με ατμό), αλλά ταυτόχρονα οδηγεί σε απώλεια χρώματος⁵⁹.

Η τεχνική της θερμοοινοποίησης (50-60°C για 10-30 λεπτά) που χρησιμοποιείται κυρίως για καταστροφή οξειδασών⁷⁴ (αποδόμηση?) ή σε ποικιλίες φτωχές σε χρώμα (Boulton et al., 1995a)⁵⁹ για καλύτερη εκχύλιση φαινολικών, παρατηρήθηκε ότι οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης της IBMP λόγω εξάτμισης (η IBMP ατμοποιείται στους 50°C^{72,74})⁷³. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά το πείραμα αυτό ήταν υψηλότερες (60-80°C) από τις συνήθως χρησιμοποιούμενες, κάτι που ίσως έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα των παραγόμενων οίνων.

Ο χρόνος παραμονής με τα στέμφυλα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο ποσό των μεθοξυπυραζινών που θα εκχυλιστούν από τα σταφύλια⁶ αν και υπάρχουν και αντίθετες απόψεις οι οποίες βασίζονται κυρίως στο γεγονός ότι οι MPs είναι εύκολα διαλυτές στο νερό, άρα δεν χρειάζεται η παρουσία αλκοόλης για να περάσουν στον οίνο (BOUBEE). Η ζύμωση

υπό πίεση –σε σχέση με την κλασική μέθοδο- οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της IBMP σε ερυθρούς οίνους⁶.

Παρόλο που το οξυγόνο αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους εχθρούς του κρασιού, χρησιμοποιείται ελεγχόμενα σε διάφορα στάδια της οινοποίησης. Η μικροοξυγόνωση είναι μια τεχνική ελεγχόμενης χρήσης οξυγόνου και έχει παρόμοια λογική με την εισχώρηση οξυγόνου από τους πόρους του βαρελιού κατά την παλαίωση. Σκοπός είναι η βελτίωση της χρωματικής σταθερότητας του οίνου αλλά και της αρωματικής και γευστικής του εικόνας. Ο τρόπος που δρα επί του χορτώδους αρώματος των MPs (καθώς δεν φαίνεται να προκαλεί μείωση της συγκέντρωσής τους) είναι πολύπλοκος, αλλά το πιθανότερο είναι ότι θειούχες ενώσεις που συμβάλουν επίσης στο χορτώδες άρωμα οξειδώνονται σε δισουλφίδια, οπότε επηρεάζεται και η αντίληψή μας επί των MPs (φαινόμενα συνέργειας και ανταγωνισμού)⁶³. Τα ίδια αποτελέσματα έχει και η διαβροχή των στεμφύλων.

Η θερμοκρασία ζύμωσης αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα επηρεασμού της ποιότητας των παραγόμενων οίνων. Χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης οδηγούν σε παραγωγή αρωμάτων⁸³, ενώ υψηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται συνήθως για καλύτερη εκχύλιση χρώματος και ταννινών⁶⁴.

0.4.6.2 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΕΣ

Διάφορα προϊόντα διαύγασης όπως μπεντονίτης, ζελατίνη, ιχθυόκολλα και ενεργός άνθρακας χρησιμοποιούνται συχνά προκειμένου να ρυθμίσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου με το να προλάβουν ή να απομακρύνουν διάφορα οπτικά, αρωματικά ή γευστικά ελαττώματα. Ο ενεργός άνθρακας βρέθηκε ότι σε λευκούς οίνους (επειδή προκαλεί και αποχρωματισμό δεν χρησιμοποιείται συχνά στους ερυθρούς) μειώνει τη συγκέντρωση της IPMP κατά 34% μέσω προσρόφησής της, χωρίς όμως να μειώνει και την αρωματική της απόδοση⁸³. Τα chips (πριονίδι) δρυός έχουν τα ίδια αποτελέσματα με την παλαίωση σε δρύινο βαρέλι που αναφέρθηκαν νωρίτερα, καλύπτουν δηλαδή τον ελαττωματικό χαρακτήρα των οίνων με αρωματικές ουσίες όπως η βανιλίνη και η cis-λακτόνη. Υπήρξε μια θεωρία σύμφωνα με την οποία η IPMP δεσμεύεται στη μεγάλη επιφάνεια των chips που περιλαμβάνει πολικές υδροξυλιωμένες ομάδες και αρωματικές δομές λιγνίνης, αλλά οι Hartmann et al., (2002) συμπέραναν ότι η δρυς δεν παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με τις αλκυλ-μεθοξυπυραζίνες. Ο ενεργός άνθρακας παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα από άποψη χρώματος⁸³ με τα οποία πρέπει να συμβιβαστεί ο οινοποιός, ενώ η δρυς συνήθως δε χρησιμοποιείται σε αρωματικές και «ντελικάτες» ποικιλίες όπως τα Μοσχάτα, οπότε και σε αυτήν την περίπτωση θα πρέπει να αναζητήσει κάποια άλλη λύση. Η χρήση μπεντονίτη δε δίνει αξιολογικά αποτελέσματα⁶¹.

1. ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Η ακτινοβολία βελτιώνει δραματικά το οργανοληπτικό προφίλ οίνων που έχουν παρουσιάσει την «οσμή πασχαλίτσας», αφού την αφαιρεί εντελώς. Η εφαρμογή της οδηγεί σε υδρόλυση των μορίων του νερού οπότε παράγονται ελεύθερες ρίζες οι οποίες οξειδώνουν διάφορα συστατικά του οίνου, μειώνοντας έτσι όμως και το SO₂ κατά 40-70%. Αν και είναι ασφαλής ως τεχνική, το ποιά θα είναι η αντίδραση του καταναλωτικού κοινού σε ένα ακτινοβολημένο κρασί είναι υπό συζήτηση.⁶⁰

Εκτός της ακτινοβολίας γ μελέτες έγιναν και για την επίδραση του υπεριώδους αλλά και του ορατού φωτός στις μεθοξυπυραζίνες, βασιζόμενες στην πιθανή φωτοδιάσπασή τους, χωρίς όμως ενδιαφέροντα αποτελέσματα ⁶¹ αν και έχει παρατηρηθεί ότι οι MPs φωτοδιασπώνται σε υδατικά διαλύματα (Heymann, Noble & Boulton, 1986).

2. ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ και ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Έχει παρατηρηθεί ότι τα διάφορα υλικά συσκευασίας είναι ικανά να απομακρύνουν πτητικές ουσίες μέσω προσροφητικών διαδικασιών, (ειδικά προκειμένου για πολυμερή υλικά και μη πολικά αρωματικά συστατικά). Πράγματι, αυτό ισχύει και στην περίπτωση των μεθοξυπυραζινών αφού βρέθηκε ότι το ποσοστό τους μειώνεται σε συσκευασίες τύπου Tetrapak μετά από 18 μήνες (ποσοστό μείωσης: IBMP 45%, IPMP 32%, secBMP 26%). Το πρόβλημα βέβαια είναι πως αυτό το είδος συσκευασίας έχει συνδεθεί με δεύτερης ποιότητας κρασιά, αφενός γιατί χρησιμοποιείται συνήθως για το χύμα, αλλά και γιατί εκτός από τις MPs απογυμνώνουν το κρασί και από επιθυμητά αρωματικά συστατικά, ενώ το οξυγόνο που περνά μέσα στη συσκευασία οδηγεί και σε άλλα προβλήματα (μείωση του SO₂, A_{420nm}, κ.λ.π.)⁶². Παλιότερα είχε συνδεθεί η μείωση των MPs με την επίδραση του φωτός, καθώς είχε παρατηρηθεί ότι το χρώμα της γυάλινης φιάλης αλλά και η αποθήκευση ή μη σε χώρο προφυλαγμένο από φως έδιναν οίνους με χαμηλότερες συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζινών⁶, όμως πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τόσο το φως όσο και η θερμοκρασία αποθήκευσης των φιαλών δεν επιδρούν σημαντικά επί του ποσού των μεθοξυπυραζινών⁷¹.

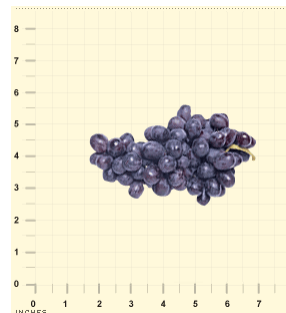
Το υλικό που χρησιμοποιείται για το κλείσιμο των φιαλών φάνηκε επίσης να επηρεάζει το ποσοστό των MPs. Έτσι η χρήση συνθετικών φελλών οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση (των ποσοστών τους) σε σχέση με τους κοινούς φελλούς ή τα βιδωτά καπάκια⁶². Κατά την παλαίωση οίνων σε φιάλες κλεισμένες με φυσικό φελλό έχει παρατηρηθεί αύξηση του ποσοστού των IBMP και secBMP. Παλαιότερες μελέτες απέδιδαν την αύξηση αυτή σε επιμόλυνση από κάποιο μικροοργανισμό που παράγει MPs ⁶, αλλά νεότερες μελέτες (Simpson, Capone & Sefton, 2004, Blake et al., 2009) τη συνδέουν με μεταφορά

μεθοξυπυραζινών από το φελλό⁷¹. Όπως και στην περίπτωση του υλικού συσκευασίας, έτσι και στο υλικό για το κλείσιμο των φιαλών, εκτός από τα φαινόμενα προσρόφησης ή μεταφοράς διαφόρων ουσιών, σημαντικό ρόλο παίζει και το οξυγόνο το οποίο τα διάφορα υλικά αφήνουν να έρθει σε επαφή με τον οίνο, και το οποίο μπορεί να επηρεάσει έμμεσα την αντίληψή μας επί του χορτώδους χαρακτήρα έμμεσα⁶².

1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1.1 ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στις οποίες συναντώνται οι μεθοξυπυραζίνες, δεν μειώνουν την επίδρασή τους στο αρωματικό προφίλ των οίνων, δυσκολεύουν όμως τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Εφόσον το κατώφλι αντίληψής τους έχει βρεθεί ότι είναι της τάξης του 1-2 ng/L, θα πρέπει και η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί να παρουσιάζει ακρίβεια σε αυτές τις συγκεντρώσεις, πράγμα που σημαίνει όμως ότι το όριο ανίχνευσής της πρέπει να είναι της τάξης των pg/L, για ένα μεσαίο (λογικό) όγκο δείγματος και λαμβάνοντας υπ'όψιν τις απώλειες κατά τον καθαρισμό του δείγματος⁸. Η δυσκολία στον προσδιορισμό των MPs φαίνεται και από το γεγονός πως αν και η IBMP ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το 1975 σε σταφύλια της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, η πρώτη αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού της δημοσιεύτηκε 10 χρόνια αργότερα. Από τότε, έχει υπάρξει μεγάλη πρόοδος στην ανίχνευση αλλά και στον προσδιορισμό των MPs.



1.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗΣ

Οι συνήθειες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των μεθοξυπυραζινών αλλά και για τη συμπύκνωση των δειγμάτων είναι οι ακόλουθες.

1.2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (LLE LIQUID-LIQUID EXTRACTION)

Η LLE αποτελεί την ευκολότερη και πιο συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο προσδιορισμού αρωματικών ουσιών σε τρόφιμα. Με την τεχνική αυτή ορισμένος όγκος του προς εκχύλιση διαλύματος φέρεται σε επαφή με ορισμένο όγκο διαλύτη μέσα σε διαχωριστική χοάνη και αναταράσσεται για να αναμειχθούν οι δύο φάσεις. Αφού αποκατασταθεί η ισορροπία, οι δύο φάσεις παραλαμβάνονται χωριστά, συνήθως με εκροή της κάτω στοιβάδας από το κάτω μέρος της διαχωριστικής χοάνης⁷⁷. Το μεγαλύτερο πρόβλημα της μεθόδου είναι ότι απαιτείται μεγάλη συμπύκνωση του δείγματος, ενώ λόγω ελλιπούς καθαρισμού οι υπόλοιπες ουσίες του δείγματος εμφανίζονται σαν ακαθαρσίες-παρεμβολές. Έτσι πρέπει να χρησιμοποιούνται περαιτέρω τεχνικές καθαρισμού του δείγματος αλλά και πολύ ευαίσθητοι ανιχνευτές (ευαίσθητες μέθοδοι ανάλυσης). Οι διαλύτες που

χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση των μεθοξυπυραζινών είναι το φρέον 11, το διχλωρομεθάνιο, ο διαιθυλαιθέρας και ένα μείγμα διαιθυλαιθέρα και εξάνιου.

Φρέον 11

Αν και δε χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την ανάλυση μεθοξυπυραζινών, με αυτή την τεχνική ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά οι IBMP και EtBMP (και με μικρότερη αξιοπιστία η IPMP) σε σταφύλια της ποικιλίας Sauvignon Blanc, ενώ με το συνδυασμό συμπίκνωσης σε χαμηλή θερμοκρασία και υπό κενό επιτεύχθηκε και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Τα ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα IBMP που βρέθηκαν σε ένα κρασί από την περιοχή του Μπορντώ (500ng/L), και τα οποία αποτελούν τα υψηλότερα επίπεδα που έχουν ποτέ καταγραφεί στη βιβλιογραφία, έχουν δημιουργήσει ερωτήματα σχετικά με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος ξαναχρησιμοποιήθηκε αργότερα (Lopez et al., 1999) με διαφορετική τεχνική συμπίκνωσης και ανάλυση με GC-MS και GCO (Olfactometry), οπότε ήταν δυνατή και η ανίχνευση των IPMP και IBMP.

Διχλωρομεθάνιο

Το διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση ενός πολύ μεγάλου όγκου (170 L) οίνου με 12 διαδοχικές εκχυλίσεις. Ήταν η πρώτη προσπάθεια (1980) απομόνωσης και ταυτοποίησης της IBMP σε ένα Cabernet Sauvignon που παρουσίαζε έντονο χορτώδη χαρακτήρα. Ωστόσο δεν είχε επιτυχία, ίσως επειδή η IBMP χάθηκε κατά την πολύπλοκη διαδικασία εκχύλισης και συμπίκνωσης.

Διαιθυλαιθέρας

Η χρήση του διαιθυλαιθέρα κατά την εκχύλιση, σε συνδυασμό με τη συμπίκνωση του δείγματος με τη βοήθεια ρεύματος αζώτου συντέλεσε στη βελτίωση της μεθόδου από άποψη ταχύτητας αλλά και ευκολίας. Η απόδοσή της βασίζεται στη χρήση δευτεριωμένου ισότοπου της IBMP σαν εσωτερικό πρότυπο.

Διαιθυλαιθέρας/Εξάνιο

Αν και δεν παρουσιάζει τόσο υψηλές ανακτήσεις όσο το διχλωρομεθάνιο και ο διαιθυλαιθέρας, χρησιμοποιήθηκε λόγω της μικρότερης συγγένειας που παρουσιάζει με ουσίες που προκαλούν παρεμβολές⁶⁵.

1.2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (SPE SOLID PHASE EXTRACTION)

Στην τεχνική αυτή που αποτελεί σήμερα μια από τις καλύτερες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων, χρησιμοποιείται στερεό προσροφητικό υλικό, συνήθως διοξείδιο του πυριτίου με χημικά συνδεδεμένες ομάδες, ώστε να αποκτά διάφορες προσροφητικές ιδιότητες. Ανάλογα με τις δραστικές ομάδες που φέρει το προσροφητικό υλικό, μπορούν να γίνουν διάφορα είδη εκχυλίσεων, όπως πολικές, μη πολικές (Si), ομοιοπολικές (C-18), κατιονανταλλακτικές και ανιονανταλλακτικές εκχυλίσεις (SCX $C_6H_5SO_3H$)^{65,77}. Το προσροφητικό υλικό βρίσκεται μέσα σε κλειστές προσυσκευασμένες μικροφύσιγγες μιας χρήσης (sep-pak) ή είναι στερεωμένα σε πλαστικές θήκες συρίγγων (bon elut)⁷⁷.

Πυρίτιο (Si)

Στερεή φάση με Si χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση της IBMP σε σταφύλια της ποικιλίας Cabernet Sauvignon. Η μέθοδος ήταν αρκετά πολύπλοκη και περιλάμβανε απόσταξη υπό κενό των ραγών, εκχύλιση με πεντάνιο με τη μέθοδο LLE και τέλος δέσμευση στο Si, συμπύκνωση και ανάλυση.

C-18

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των IBMP και IPMP σε οίνους με στήλες SPE όπου η στερεή φάση είναι από C-18, περιλαμβάνει απόσταξη του οίνου σε pH 5, συλλογή του αποστάγματος σε όξινο διάλυμα και εκχύλιση με τις C-18. Τα αρκετά υψηλά όρια ανίχνευσης της μεθόδου (της τάξης των $\mu\text{g/L}$) και η ταυτόχρονη εκχύλιση πτητικών φαινολών μαζί με την IBMP κάνουν τη μέθοδο κατάλληλη για χρήση μόνο σε λευκά κρασιά. Τελευταία υπήρξε πρόοδος, με τη βοήθεια της GC-MS, οπότε το κατώφλι ανίχνευσης κατέβηκε στα 5ng/L ⁵⁴.

SCX (Strong Cation Exchange)

Η στερεή αυτή φάση έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μεθόδους καθώς εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες των μεθοξυπυραζινών (πτητικές και ελαφρά βασικές). Βάση των μεθόδων αποτελεί η χρήση της ισχυρά όξινης αυτής ρητίνης (SCX-πολυμερές με βάση το διοξείδιο του πυριτίου) η οποία δεσμεύει τις ουσίες μετά από απόσταξη. Τα κυριότερα μειονεκτήματά τους είναι η πολυπλοκότητα, και τα χαμηλά ποσοστά ανάκτησης, αν και έχουν γίνει προσπάθειες – αρκετές με επιτυχία– για τη βελτίωσή τους⁶⁵.

Στήλες νέας γενιάς (Lichrolut-EN, Porapak-Q)

Οι στήλες νέας γενιάς με υλικό πλήρωσης το αιθυλβινυλβενζένιο-διβινυλβενζένιο χρησιμοποιήθηκαν πολύ πρόσφατα για τον προσδιορισμό μεθοξυπυραζινών. Δίνουν πολύ καλά ποσοστά επαναληψιμότητας και ανάκτησης⁸⁰.

1.2.3 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΩΝ ΑΤΜΩΝ (HS-SPME HEAD SPACE-SOLID PHASE MICROEXTRACTION)

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης αναπτύχθηκε (Pawliszyn, 1990) προκειμένου να αντιμετωπιστεί η ανάγκη για γρήγορη προετοιμασία των δειγμάτων. Αφορά στην απορρόφηση των ουσιών που πρόκειται να αναλυθούν από ένα επικαλυμμένη με κατάλληλο προσροφητικό υλικό, η οποία βυθίζεται μέσα στο δείγμα (συνήθως στην αέρια φάση – headspace–) πάνω από αυτό. Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας, η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα και το περιεχόμενό της εισάγεται με σύριγγα σε αέριο χρωματογράφο⁷⁷. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί γενικά και για την ανάλυση αρωματικών συστατικών σε οίνους. Η δυνατότητα υψηλής συμπίκνωσης του δείγματος σε συνδυασμό με την εκλεκτικότητα του ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου που χρησιμοποιείται οδηγεί σε αξιόπιστα αποτελέσματα κατά τον προσδιορισμό μεθοξυπυραζινών σε επίπεδα ίδια με αυτά στα οποία τις συναντάμε συνήθως. Το μοναδικό προκαταρκτικό βήμα καθαρισμού περιλαμβάνει την απομάκρυνση της αιθανόλης με ήπια θέρμανση υπό ανάδευση του δείγματος, το οποίο υφίσταται οξίνιση καθώς έχει παρατηρηθεί ότι οι MPs πρωτονιώνονται σε $\text{pH} < 2$, πράγμα που οδηγεί σε μείωση της πτητικότητάς τους. Έτσι και η αιθανόλη απομακρύνεται ώστε να μη δημιουργεί παρεμβολές, αλλά και οι MPs παραμένουν στο διάλυμα. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η ταχύτητα και η ευκολία της⁶⁵.

1.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Εξαιτίας της φύσης των μεθοξυπυραζινών, για τον προσδιορισμό τους συνήθως χρησιμοποιείται αέριος χρωματογράφος, αν και παλαιότερα είχε χρησιμοποιηθεί και η HPLC (Heymann, 1986). Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας είναι η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα και η απλότητα⁷⁷.

- Εισαγωγή δείγματος

Συνήθως η ένεση γίνεται σε εισαγωγέα μη διαμοιρασμού ⁷⁹(splitless), τόσο σε περιπτώσεις ανάλυσης οίνων όσο και σε μούστο ή σε σταφύλια. Για την αύξηση της ευαισθησίας έχουν δοκιμαστεί τα εξής : σύστημα έγχυσης προγραμματισμένης θερμοκρασίας

εξάτμισης (PTV), χρήση στήλης κατακράτησης (προστήλης) (eur-lex.europa), εισαγωγή απευθείας στην κορυφή της στήλης αλλά και διάφοροι διαλύτες.

- Είδος στήλης

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανάλυση των MPs είναι στήλες πολυαιθυλενογλυκόλης, και PDMS (poly(5%-diphenyl-95%dimethylsiloxane)) επειδή είναι χημικά παρόμοιες με τις MPs, ίδιας πολικότητας⁷⁷. Η σύγκριση των χρόνων κατακράτησης από πληρωμένες στήλες, με διαφορετικές στατικές φάσεις έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των μεθοξυπυραζινών, με τη βοήθεια της GC-NPD. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά η IBMP σε σταφύλια της ποικιλίας Cabernet Sauvignon (Bayonove et al., 1972).

- Ανιχνευτές

FID (Flame Ionisation Detector)

Εξαιτίας της περιορισμένης εκλεκτικότητάς τους οι ανιχνευτές FID δεν παρουσιάζουν μεγάλη επιτυχία στην ανάλυση μεθοξυπυραζινών. Η κορυφή της IBMP που δίνει ένας τέτοιος ανιχνευτής από 35 kg δείγματος μούστου που έχει συμπυκνωθεί δεν είναι αρκετά μεγάλη ώστε να προσδιοριστεί ποσοτικά. Η κύρια χρήση του FID είναι ως συμπλήρωμα της GCO.

NPD (Nitrogen Phosphorus Detector)

Ο NPD (ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου) αν και παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία δε δίνει αρκετά χαμηλά όρια ανίχνευσης σε περίπτωση απευθείας έγχυσης του δείγματος, επομένως απαιτείται και ένα προκαταρκτικό βήμα συμπύκνωσής του. Εκτός αυτού παρουσιάζει δυσκολία στην ανίχνευση των MPs όταν συνυπάρχουν στο ίδιο δείγμα άλλες ουσίες σε υψηλές συγκεντρώσεις. Όταν όμως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την SPME δίνει πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης ο NPD χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα, αντί του FID, στην ολφακτομετρία αφού επιτρέπει και την ταυτοποίηση των κορυφών.

MSD (Mass Selective Detector)

Η χρήση του φασματογράφου μάζας ως ανιχνευτή απαιτεί επίσης μεγάλη συμπύκνωση του δείγματος. Εξαιτίας της μικρής συμπύκνωσης δεν ήταν δυνατή η ταυτοποίηση της IBMP για πρώτη φορά, σε σταφύλια της ποικιλίας Cabernet Sauvignon, ενώ στην περίπτωση του Sauvignon Blanc όπου το δείγμα είχε συμπυκνωθεί αρκετά, οι MPs δεν ανιχνεύθηκαν γιατί ήταν σε συγκεντρώσεις πολύ κοντά στο όριο ανίχνευσης του MSD. Τα προβλήματα αυτά σήμερα επιλύονται με την εφαρμογή της εκλεκτικής σάρωσης ιόντων (Selective Ion

Monitoring, SIM), αντί της πλήρους σάρωσης (Total Ion Chromatogram, TIC) που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της ευαισθησίας. Η IBMP τελικά προσδιορίστηκε για πρώτη φορά και με αξιοπιστία με συνδυασμό της MSD σε SIM και δύο μεθόδων παραγωγής ιόντων, του ιονισμού με ηλεκτρόνια (EI) και του χημικού ιονισμού (CI). Οι EI και CI μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ξεχωριστά. Η ευαισθησία του GC-MS όταν το σύστημα είναι σε total scan είναι ίδια με του GC-FID⁷⁷

Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε επίσης δίδυμη χρωματογραφία, η οποία σε συνδυασμό με τη μέθοδο εκχύλισης στερεάς φάσης επέτρεψε την ανίχνευση μεθοξυπυραζινών σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1ng/L.⁸⁰

1.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Εσωτερικό πρότυπο

Ακετοφαινόνη

Δεν παρουσιάζει χημική συγγένεια με τις MPs, και σε αυτό αποδόθηκαν τα προβλήματα κατά τον προσδιορισμό της IBMP σε κρασιά του Μπορντώ.

Αλκυλ-πυραζίνες

Τετραμεθυλπυραζίνη: η τελευταία φορά που ανιχνεύθηκε η παρουσία της ήταν το 1971 σε κρασιά από την Ιαπωνία σε αρκετά υψηλά επίπεδα (500ng/kg) κι έτσι θεωρήθηκε ασφαλής η χρήση της σαν εσωτερικό πρότυπο. Δεν είναι σταθερή σε συνθήκες απόσταξης.

2-μεθυλ-3-n-προπυλπυραζίνη: χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά του σταθερού ισοτόπου, αν και δεν παρουσιάζει χημική συγγένεια με τις MPs

3-αλκυλ-2-αλκοξυπυραζίνες

Λόγω ομοιότητας με τις MPs, χρησιμοποιήθηκαν οι: 3-μεθυλ-2-μεθοξυπυραζίνη, 3-αιθυλ-2-αιθοξυπυραζίνη και 3-ισοπροπυλ-2-αιθοξυπυραζίνη.

Σταθερές ραδιοεπισημασμένες μορφές των υπό ανάλυση ουσιών

Τα σταθερά ισότοπα χρησιμοποιούνται με μεγάλη επιτυχία καθώς είναι πανομοιότυπες χημικά ουσίες με τις MPs. Η πιθανή παρεμβολή φυσικών ισοτόπων του δείγματος επιλύεται

με τη χρήση των δι- και τρι-δευτεριωμένων ισοτόπων. Η χρήση της 3-ισοβουτυλ-2-[²H₃]-μεθοξυπυραζίνης ήταν το κλειδί της πρώτης αξιόπιστης μεθόδου προσδιορισμού της IBMP σε χυμό από σταφύλια και σε οίνους ενώ αργότερα δοκιμάστηκε με επιτυχία και η ταυτόχρονη χρήση δευτεριωμένων ισοτόπων των μεθοξυπυραζινών.

▪ ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Λίγες μελέτες αναφέρουν στοιχεία για την ανάκτηση. Η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της IBMP έδινε ανάκτηση 5-10%, ενώ βελτιώσεις ανέβασαν το ποσό αυτό στο 86-103%. Μια μέθοδος βασισμένη στην LLE με διαλύτη αιθέρα-εξάνιο, είχε πολύ καλά αποτελέσματα, με ποσοστό ανάκτησης 90%. Η HS-SPME έχει πολύ καλή απόδοση επίσης τόσο για την IBMP όσο και για τις secBMP και IPMP (78-109%). Τα ποσοστά ανάκτησής της όμως δεν μπορούν να συγκριθούν με εκείνα της LLE, εφόσον δεν επιτρέπει υπολογισμό της συμπύκνωσης του δείγματος. Η SPE με στήλες EN δίνει 94% για την IBMP, 97% για τη secBMP και 102% για την IPMP.

▪ ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Στην περίπτωση των μεθοξυπυραζινών, που συνήθως απαντούν σε σταφύλια και οίνους σε συγκεντρώσεις κοντά στα 10ng/L, τα όρια ανίχνευσης πρέπει να είναι χαμηλά. Με τη βοήθεια ενός πολύ ευαίσθητου ανιχνευτή, ερευνητές έχουν φτάσει σε όριο ανίχνευσης κοντά στα 2 ng/L, και με σχετικά μικρό βαθμό συμπύκνωσης δείγματος. Για να κατέβει το όριο ανίχνευσης στο 1 ng/L, χρειάζεται συμπύκνωση πάνω από 10.000 φορές⁶⁵. Πολύ πρόσφατα, το πρόβλημα αυτό ξεπεράστηκε με τη βοήθεια της SPE και της MDGC-MS οπότε το όριο ανίχνευσης έφτασε στα 0,09 ng/L ή 90 pg/L⁸⁰.

1.5 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η σύνδεση GC-MS δίνει πολύ καλά αποτελέσματα. Η GC χρησιμοποιείται για διαχωρισμό των ουσιών και το MS για την απόλυτη ταυτοποίησή τους⁷⁷. Επίσης, επειδή είναι ουσιαστικά αδύνατη η εισαγωγή ακριβούς όγκου δείγματος στην πηγή ιόντων του MS, ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεθοξυπυραζινών απαιτεί τη χρήση εσωτερικού προτύπου, το οποίο προστίθεται στο δείγμα πριν την ανάλυσή του.

Επειδή η προς ανάλυση ουσία και το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να συμπεριφέρονται όσο το δυνατό πανομοιότυπα απέναντι στους διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την

ανάκτηση του δείγματος (απώλειες κατά την προετοιμασία, εξάτμιση και δημιουργία παραγώγων της υπό ανάλυση ουσίας, προσρόφηση σε γυάλινα σκεύη, διάσπαση (αποσύνθεση) κατά τη χρωματογραφική ανάλυση, προσρόφηση σε ενεργά μέρη της στήλης, παραλλακτικότητα των χρωματογραφικών συνθηκών), ιδανική επιλογή είναι ένα σταθερό ισοτοπικό ανάλογο της προς ανάλυσης ουσίας, το οποίο δεν απαντά φυσικά στα δείγματα. Ένας (ακόμη) τρόπος βελτίωσης της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητας είναι η μέθοδος της επιλεκτικής σάρωσης ιόντων SIM (selective ion monitoring), με την οποία ανιχνεύονται μόνο συγκεκριμένα ιόντα της ουσίας και του επισημασμένου ισοτόπου, αλλά και η παραγωγή ιόντων (στο MS) με χημικό ιονισμό (CI) -οπότε στο φάσμα της μάζας εμφανίζεται καθαρά το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν $(M+1)^+$ -^{76,78}.

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε τόσο στο εργαστήριο Οινολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (προετοιμασία δειγμάτων) όσο και στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών (ανάλυση δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας).

2.1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Οι μεθοξυπυραζίνες αποτελούν ένα σημαντικό κεφάλαιο για την ποιότητα του οίνου. Η βιοσύνθεσή τους στο σταφύλι δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή, και παρά το γεγονός ότι θεωρούνται χαρακτηριστικές της οικογένειας των Sauvignon η παρουσία τους έχει καταγραφεί και σε πολλές άλλες ποικιλίες, ακόμη και σε ελληνικές. Εκτός αυτού, η αλματώδης εξάπλωση της *Harmonia axyridis*, αλλά και η εμφάνισή της στη γειτονική μας Ιταλία, κάνει επιτακτική την ανάγκη εύρεσης μιας μεθόδου απομάκρυνσης των MPs από τους οίνους. Έτσι, στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η ανάπτυξη εργαστηριακής μεθόδου για την ανάλυση και έλεγχο της παρουσίας μεθοξυπυραζινών σε ελληνικά γλεύκη και οίνους, αλλά και η επίδραση της θερμοκρασίας στις συγκεντρώσεις των MPs, ως πιθανός τρόπος απομάκρυνσής τους. Οι αναλύσεις αφορούν τις τρεις μεθοξυπυραζίνες που συνήθως εμφανίζονται στο κρασί (IBMP, IPMP και secBMP), αλλά και την DMMP που αν και πρόσφατα συνδέθηκε με τη *Harmonia axyridis*.

2.1.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Εφόσον οι μεθοξυπυραζίνες έχει βρεθεί ότι μειώνονται κατά την ωρίμανση και γενικά έχουν συνδεθεί με άγουρες νέτες, επιλέχθηκαν οίνοι από σταφύλια που είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν συλλεγεί πριν την πλήρη ωρίμανση. Έτσι επιλέχθηκαν κρασιά από περιοχές της βόρειας Ελλάδας, όπου τα σταφύλια δεν προλαβαίνουν πολλές φορές να ωριμάσουν αφού ο τρύγος γίνεται νωρίτερα λόγω δυσμενών καιρικών συνθηκών που μπορεί να πλήξουν την παραγωγή, ή και υπό το φόβο εμφάνισης ασθενειών όπως βοτρυτής. Από άποψη ποικιλιών επιλέχθηκε το Ξινόμαυρο στο οποίο ήδη έχει αναφερθεί η παρουσία μεθοξυπυραζινών, αλλά και γηγενείς ποικιλίες της βόρειας Ελλάδας όπως το Βλάχικο. Αναλύθηκαν επίσης κρασιά από Ροδίτη, Μαυρούδι, Ντεμπίνα αλλά και κρασιά από Sauvignon blanc του εξωτερικού. Το γλεύκος είναι από ερυθρές ποικιλίες που καλλιεργούνται στα Μεσόγεια Αττικής, βιολογικής καλλιέργειας, συσκευασμένο.

Όινος		Περιγραφή (οπίσθια ετικέτα)
Ροδίτης, Τετράμυθος 2008 Ο.Π.Α.Π. Πάτρα		Λευκό κρασί από σταφύλια βιολογικής γεωργίας της ποικιλίας Ροδίτης. Πλούσιο σε αρώματα φρούτων και λεπτό στη γεύση.
Μαυρούδι, Τσάνταλης 2005 Θράκη		Κόκκινο κρασί από αμπελώνες στη Μαρώνεια, παλαιωμένο για 6 μήνες σε μικρά βαρέλια. Αρώματα φρούτων με λεπτές νότες βανίλιας.
Αρκτούρος, Ηπειρώτικος Τοπικός Όινος 2006		Cabernet Sauvignon 60%, Βλάχικο και Μπεκάρι 40%. Το γλεύκος ζυμώνεται με τα στέμφυλα για 17 – 20 ημέρες στους 25 οC. Εν συνεχεία το ζυμούμενο νέο κρασί διαχωρίζεται και περατώνει την ζύμωση στους 18 οC. Το κρασί μετά τον καθαρισμό και την ωρίμανση παλαιώνει για ένα χρόνο σε βαρέλια από αμερικάνικη και γαλλική δρυ. Μετά την εμφιάλωση παραμένει για τουλάχιστον έξη μήνες στην κάβα πριν βγει στην κυκλοφορία. Αρώματα βανίλιας, πιπεριού και κανέλλας
Ντεμπίνα, Άπειρος Χώρα, Γκλίναβος Ιωάννινα 2008		Κυρίαρχη ποικιλία η Ντεμπίνα. Η οινοποίηση γίνεται με προζυμωτική κρουοεκχύλιση στους 8- 10° C. Η ζύμωση μετά από στατική απολάσπωση και προσθήκη στο γλεύκος επιλεγμένων μυκήτων, γίνεται στους 15-17° C. Αρώματα

		μήλου, ανανά, ροδάκινου και με άνθη εσπεριδοειδών.
Ξινόμαυρο, Καρυδάς, Ο.Π.Α.Π. Νάουσα 1997		Ερυθρός ξηρός οίνος, με αρώματα ώριμων κόκκινων φρούτων και νύξεις ντομάτας.
Ξινόμαυρο, Ναουσαία, Κτήμα Φουντή, Νάουσα 2006		Παράγεται από ένα μόνο αμπελώνα 6 στρεμμάτων με υψόμετρο 200μ στη Νάουσα. Το έδαφος του είναι "αμμούδα" που ευνοεί την ανάπτυξη των αρωμάτων του Ξινόμαυρου. Παλαιώνει σε δρύινα γαλλικά βαρέλια ένα έτος και ακολουθεί η ωρίμανση του οίνου στη φιάλη για 12 μήνες τουλάχιστον. Αρώματα κόκκινων φρούτων, μπαχαρικών και ξύλου.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μεθοξυπυραζινών σε οίνους και χυμό σταφυλής χρησιμοποιήθηκε η SPE για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση των δειγμάτων, ενώ οι αναλύσεις έγιναν σε αέριο χρωματογράφο με φασματογράφο μάζας ως ανιχνευτή. Ως εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν τα δευτεριωμένα ισότοπα των τεσσάρων μεθοξυπυραζινών, $[^2\text{H}_2]$ 2-μεθοξυ-3-ισοβουτυλ-πυραζίνη (d-IBMP), $[^2\text{H}_2]$ 2-μεθοξυ-3-ισοπροπυλ-πυραζίνη (d-IPMP), $[^2\text{H}_2]$ 2-μεθοξυ-3-(1-μεθυλπρόπυλ)πυραζίνη (d-secBMP), και $[^2\text{H}_2]$ 2-μεθοξυ-3,6-διμεθυλπυραζίνη (d-DMMP)⁸¹.

2.2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Όλα τα αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από τις Sigma-Aldrich και Fluca, και ήταν καθαρότητας 99%.

Διαλύτες σε υγρή μορφή:

Αιθανόλη, διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης απεσταγμένο νερό και νερό καθαρότητας HPLC.

Σε μορφή σκόνης ή σφαιριδίων:

NaOH 1N σε pellets, διττανθρακικό νάτριο NaHCO₃, τρυγικό οξύ C₄H₆O₆, μεταμπισουλφίτ (μεταδιθειώδες νάτριο), θειϊκό νάτριο Na₂SO₄.

Καθαρές ουσίες:

2-μεθόξυ-3-ισοβουτυλπυραζίνη (IBMP), 2-μεθόξυ-3-ισοπρόπυλπυραζίνη (IPMP), 2-μεθόξυ-3-(1-μεθυλπρόπυλ)πυραζίνη (secBMP) (Sigma-Aldrich).

Αναλώσιμα και είδη εργαστηρίου:

Στήλες Isolute της Biotage και Lichrolut-EN των 200mg σε φυσίγγια των 3ml της Merck, διηθητικό χαρτί Whatman, μικροπιπέτες 10-100μl και 100-1000μl, ογκομετρικές φιάλες 50, 100, 200 και 1000ml, ζυγός ακριβείας με 1 και 3 δεκαδικά ψηφία.

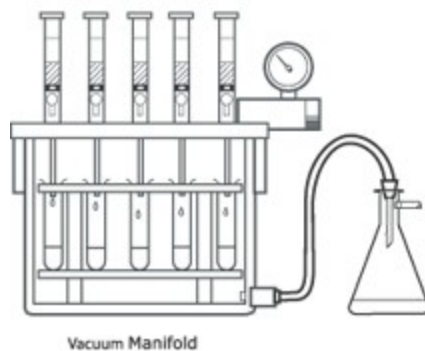
Προετοιμασία διαλυμάτων:

Model wine: Σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml τοποθετούνται 120ml αιθανόλη, 700ml νερό και 4 gr τρυγικού οξέως. Το pH ρυθμίζεται στο 3,5 με την προσθήκη NaOH 1N και η ογκομετρική συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με νερό.

Διάλυμα 50% μεθανόλη, 1% NaHCO₃: Σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml τοποθετούνται 500ml νερό στα οποία διαλύονται 10gr στερεού NaHCO₃. Η ογκομετρική συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη.

2.2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ

Για τον καθαρισμό και τη συμπύκνωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) η οποία βασίστηκε στη μέθοδο των Ferreira et al. (2009)⁸⁰. Αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί στήλες C-18 σύμφωνα με τη μέθοδο των Pickering et al., (2005)⁵⁴ η οποία όμως παρουσίαζε προβλήματα κατά την διάρκεια των πειραμάτων μας στην ανίχνευση των DMMP και secBMP, γεγονός που οδήγησε στην αναζήτηση στηλών με μεγαλύτερη ικανότητα καθαρισμού των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζεται αναλυτικά σε ακόλουθο κεφάλαιο.



Στήλες Lichrolut-En των 200mg σε φουσίγγια των 3ml. Υλικό πλήρωσης: αιθυλβινυλβενζένιο-διβινυλβενζένιο.

Ενεργοποίηση

10ml διχλωρομεθάνιο

10ml μεθανόλη

10ml αιθανόλη 15%

Εισαγωγή 100ml φιλτραρισμένου δείγματος το οποίο περιέχει εσωτερικά πρότυπα σε συγκεντρώσεις d-DMMP 700ng/lt, d-IPMP 100ng/lt, d-secBMP 300ng/lt και d-IBMP 200ng/lt.

Καθαρισμός με 50ml υδατικού διαλύματος 50% μεθανόλη, 1% NaHCO₃

Αναμονή 10 λεπτά για να στεγνώσει η στήλη

Έκλουση με 1,5ml διχλωρομεθάνιο

Συμπύκνωση με ρεύμα N₂ σε τελικό όγκο 100μl

2.2.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

- Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων μεθοξυπυραζινών.

Οι τέσσερις μεθοξυπυραζίνες προμηθεύτηκαν σε καθαρή μορφή (99%) από τη Sigma Aldrich, εκτός από τη DMMP η οποία παρασκευάστηκε με τη μέθοδο των Seifert et al., (1970)⁹ στα εργαστήρια του COOL CLIMATE OENOLOGIE AND VITICULTURE INSTITUT, ONTARIO CANADA και μας χορηγήθηκε. Από τις καθαρές ουσίες παρασκευάστηκαν με αραιώση 4 μητρικά διαλύματα του 1g/l σε αιθανόλη, και απ'αυτά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα που περιείχε και τις τέσσερις μεθοξυπυραζίνες σε οξικό αιθυλεστέρα σε συγκέντρωση 1mg/l η κάθε μία (1ml από κάθε μητρικό διάλυμα σε τελικό όγκο 100ml οξικού αιθυλεστέρα). Από το διάλυμα αυτό με αραιώση (1ml σε 10ml EtAc) παρασκευάζεται το διάλυμα Α με συγκέντρωση 100μg/l για κάθε ΜΡ. Με τον ίδιο τρόπο, από τα πρότυπα διαλύματα των δευτεριωμένων μεθοξυπυραζινών που ετοιμάστηκαν με τη μέθοδο των Kotseridis et al.⁸¹, παρασκευάστηκε τελικά ένα διάλυμα Β που περιείχε και τις τέσσερις d-MPs σε οξικό αιθυλεστέρα, σε συγκεντρώσεις: d-DMMP 700μg/l, d-IPMP 100μg/l, d-secBMP 300μg/l και d-IBMP 200μg/l. Επίσης παρασκευάστηκε και ένα διάλυμα ΑΒ με διάλυση 1ml δ/τος Α και 1ml δ/τος Β σε 100ml οξικού αιθυλεστέρα, ώστε η συγκέντρωση να είναι δέκα φορές μικρότερη των Α και Β (10μg/l για τις ΜΡ και αντίστοιχα 70,10,30 και 20μg/l για κάθε μια από τις d-MPs).

- Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

Η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης έγινε με την ανάλυση διαλυμάτων οίνου επιφορτισμένου με γνωστές συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζινών (60, 30 και 15ng/l). Το κάθε δείγμα περιείχε σταθερή συγκέντρωση εσωτερικών προτύπων (700ng/l d-DMMP, 100ng/l d-IPMP, 300ng/l d-secBMP και 200ng/l d-IBMP η οποία αντιστοιχεί σε προσθήκη 100μl από το διάλυμα Β). Έτσι, ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με βάση το λόγο των επιφανειών των κορυφών των ΜΡs προς τις d-MPs.

2.2.4 GC-MS

Ο αέριος χρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο 6890N GC - 5973N MSD (Agilent) του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, με τριχοειδή στήλη HP-5MS (5% φαινυλ-μεθυλοσιλοξάνη, μήκος 30m, εσωτερική διάμετρος 0,25mm, πάχος 0,25mm). Φέρον αέριο ήταν το ήλιο, με ροή 1ml/min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε ως εξής: αρχική θερμοκρασία 40°C για 3 λεπτά, 115°C για 2 λεπτά, 240°C για 1 λεπτά. Οι θερμοκρασίες στον εισαγωγέα και τον ανιχνευτή ήταν 250°C και 300°C αντίστοιχα. Η εισαγωγή του δείγματος ήταν 3μl splitless (χωρίς διαμοιρασμό) για 30 sec. Η ανίχνευση από το MS έγινε με επιλεκτική σάρωση ιόντων

(SIM), και κάθε ουσία προσδιορίστηκε με βάση την επιφάνεια της κορυφής που έδινε το κάθε ιόν. Για την αποφυγή σφαλμάτων στο τέλος κάθε σειράς δειγμάτων προστέθηκε και δείγμα από το διάλυμα AB ώστε να ελέγχονται οι κορυφές των MPs. Τα ιόντα που επιλέχθηκαν για τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση των MPs φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

	d-DMMP	DMMP	d-IPMP	IPMP	d-secBMP	secBMP	d-IBMP	IBMP
Ιόντα ποσοτικοποίησης	145	138	140	137	141	138	127	124
Ιόντα ταυτοποίησης	144	123,137	155	152	127,154	151,124	155	151

2.2.5 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου, ετοιμάστηκαν 3 δείγματα οίνου επιφορτισμένου με μεθοξυπυραζίνες σε συγκέντρωση 40ng/L για τις Lichrolut-EN και 30ng/L για τις C-18.

2.2.6 ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Ως δείγμα χρησιμοποιήθηκε 100% χυμός κόκκινου σταφυλιού από σταφύλια βιολογικής γεωργίας (χωρίς συντηρητικά, ζάχαρη ή χρωστικές) της οικογένειας Γεώργια.

Προετοιμασία

Σε ποτήρι ζέσεως του 1lt προστίθεται 1lt χυμού σταφυλιού και 0,08gr Metabisulfit διαλυμένα σε 0,8gr νερό. Σε ένα δεύτερο ποτήρι ζέσεως των 500ml προστίθενται 500ml χυμού και 0,04gr Metabisulfit διαλυμένα σε 0,4ml νερό. Μετά από ανάδευση, και τα δύο διαλύματα φιλτράρονται με χαρτί Whatman.

Ένα λίτρο φιλτραρισμένου χυμού μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη όπου προστίθενται οι 4 μεθοξυπυραζίνες από πρότυπο διάλυμα, ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι 40ng/lt. Το διάλυμα μοιράζεται σε 9 κωνικές των 100ml (μεταφέρονται λίγο παραπάνω από 100ml ώστε σε περίπτωση εξάτμισης να απομείνουν τουλάχιστον 100ml)

- 3 κωνικές παραμένουν για 6 ώρες σε φούρνο στους 60°C χωρίς καπάκι. (Δείγματα S1,S2,S3).
- 3 κωνικές παραμένουν για 6 ώρες σε φούρνο στους 60°C με καπάκι. (Δείγματα K1,K2,K3).

- 3 κωνικές παραμένουν χωρίς καπάκι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. (Δείγματα P1,P2,P3).

Από το διάλυμα του φιλτραρισμένου χυμού, 400ml μοιράζονται σε 3 ογκομετρικές των 100ml. (Δείγματα M1,M2,M3).

Μετά το πέρας των 6 ωρών, τα δείγματα από τις κωνικές μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 100ml. Και στα 12 δείγματα προστίθενται από 100μl από το διάλυμα B με τις δευτεριωμένες μεθοξυπυραζίνες. Για την ανάλυση των δειγμάτων με τη βοήθεια της GC-MS χρησιμοποιείται η μέθοδος που περιγράφηκε νωρίτερα.

2.2.7 ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ ΤΗΣ SPE ΣΥΓΚΡΙΣΗ C-18

Για την απομόνωση και συμπύκνωση των μεθοξυπυραζινών με την SPE οι προσπάθειες που έγιναν βασίστηκαν τόσο στη μέθοδο των Ferreira et al (2009)⁸⁰, όσο και στη μέθοδο των Pickering et al⁵⁴ όπου οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι οι C-18. Αναλύσεις έγιναν σε κρασί (κόκκινο και λευκό), χυμό σταφυλιού και σε model wine (υδραλκοολικό διάλυμα 12%vol, pH=3,5 με τρυγικό 4gr/l). Οι μετατροπές στην κάθε μέθοδο δίνονται παρακάτω.

Με βάση τη μέθοδο Pickering et al⁵⁴ (προσαρμογή).

Στήλες C-18 των 100mg σε φυσίγγια των 3ml

Ενεργοποίηση

1ml οξικός αιθυλεστέρας

1ml αιθανόλη 95%

1ml αιθανόλη 10%

Εισαγωγή 50ml φιλτραρισμένου δείγματος το οποίο περιέχει εσωτερικά πρότυπα σε συγκεντρώσεις d-DMMP 700ng/l, d-IPMP 100ng/l, d-secBMP 300ng/l και d-IBMP 200ng/l.

Αναμονή 10 λεπτά για να στεγνώσει η στήλη (πίεση 20mm Hg max)

Έκλυση με 1ml διχλωρομεθάνιο

Παρακάτω δίνονται οι μετατροπές επί της μεθόδου.

- Ενεργοποίηση

Κατά την ενεργοποίηση χρησιμοποιήθηκαν επίσης πολλαπλάσιοι όγκοι διαλυτών, αλλά και διχλωρομεθάνιο, μεθανόλη και αιθανόλη 15%.

- Όγκος, pH και περιεκτικότητα σε αλκοόλη του δείγματος

Για μεγαλύτερη συμπύκνωση χρησιμοποιήθηκαν 100ml δείγματος, ενώ για καλύτερη απόδοση της SPE αναλύθηκαν δείγματα με pH 6 και 8, αλλά και με μικρότερο ποσοστό αλκοόλης (6%vol).

- Καθαρισμός

Για τον καθαρισμό της στήλης μετά την εισαγωγή του δείγματος χρησιμοποιήθηκε νερό διάφορων όγκων και σε διάφορα pH και διάλυμα 50% μεθανόλη με 1% NaHCO₃.

- Έκλουση

Εκτός από το διχλωρομεθάνιο που χρησιμοποιήθηκε σε όγκους 1 και 1,5ml, χρησιμοποιήθηκε και ο οξικός αιθυλεστέρας επίσης στους ίδιους όγκους.

- Συμπύκνωση

Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιήθηκε εκτός από το ρεύμα N₂ θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄), αλλά και ξήρανση επί ξηρού με επαναδιάλυση με προσθήκη 100ml διαλύτη έκλουσης.

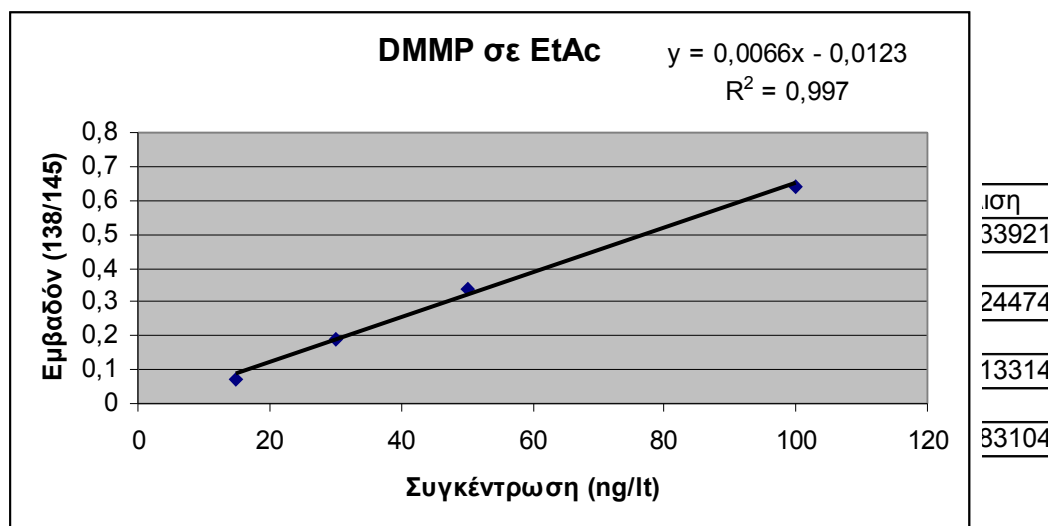
Με βάση τη μέθοδο Ferreira η μόνη αλλαγή που έγινε ήταν η αύξηση του όγκου του διαλύτη καθαρισμού, και η συμπύκνωση σε ρεύμα αζώτου.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

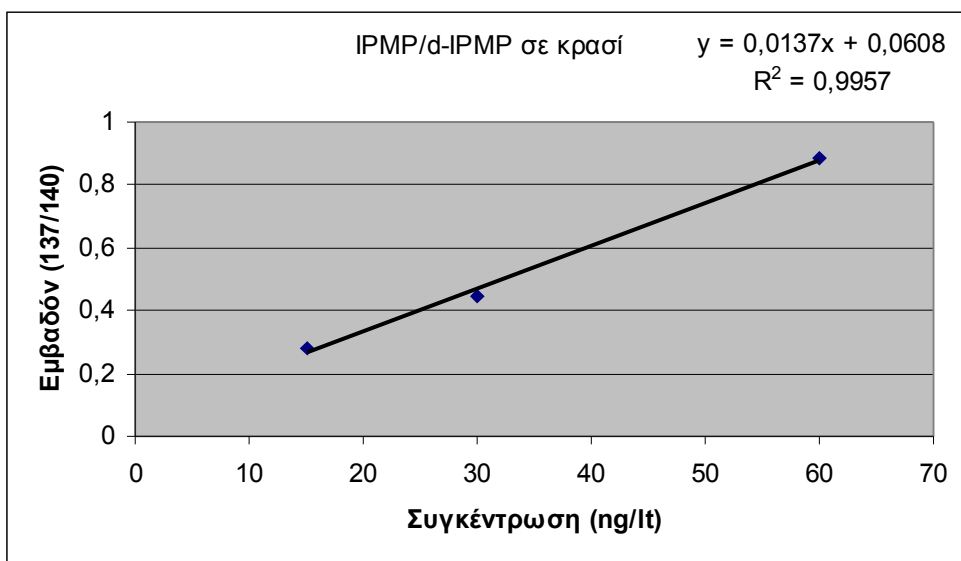
3.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Παρακάτω δίνονται οι καμπύλες βαθμονόμησης και οι εξισώσεις για την κάθε μεθοξυπυραζίνη ξεχωριστά. Η καμπύλη αναφοράς της DMMP ετοιμάστηκε με προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων μεθοξυπυραζινών σε οξικό αιθυλεστέρα καθώς ο καθαρισμός με την SPE δεν ήταν αρκετός, με αποτέλεσμα ταυτόχρονα με την DMMP να εκλούεται κι άλλη ουσία. Ο συντελεστή απόκρισης του ανιχνευτή σύμφωνα με την εξίσωση $A/[X]=F(Ais/[S])$, όπου A:το εμβαδόν της κορυφής της ουσίας για τη συγκέντρωση [X], F:ο συντελεστή απόκρισης και Ais:το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου για τη συγκέντρωση [S], είναι 3,99 για την DMMP, 1,25 για την IPMP, 1,01 για τη secBMP και 1,40 για την IBMP.

3.1.1 DMMP



3.1.2 IPMP

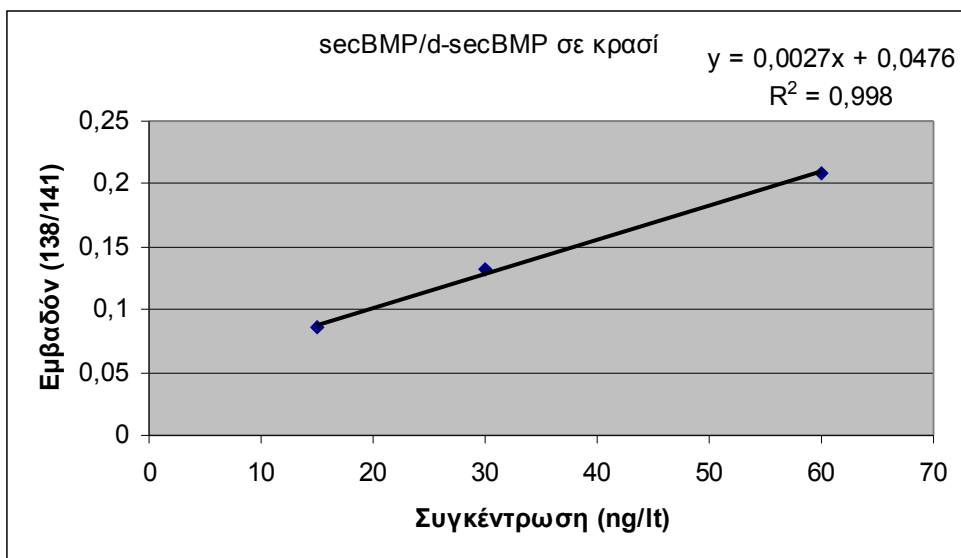


d-MPs=100ng/lit

Σε κρασί

C (ng/lit)	IPMP/d-IPMP	ΜΟ εμβαδού	τυπική απόκλιση	σχ τυπική απόκλιση
60	0,887860354 0,821730644	0,854795499	0,046760767	5,47040393
30	0,447047497 0,467255335	0,457151416	0,014289099	3,125681951
15	0,281171928 0,305849582	0,293510755	0,017449736	5,945177864

3.1.3 SEC BMP

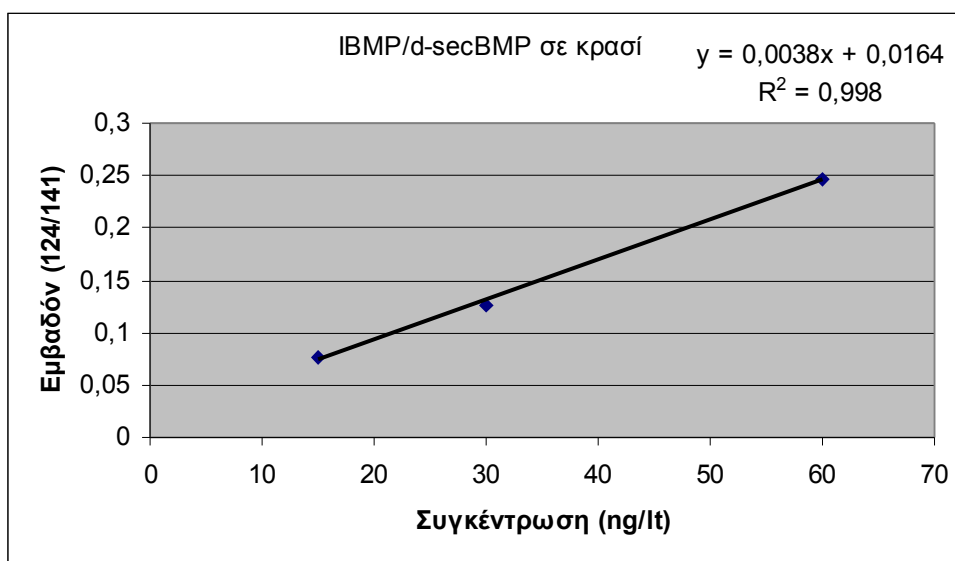


d-MPs=100ng/Lt

Σε κρασί

C (ng/l)	secBMP/d-secBMP	ΜΟ εμβαδού	τυπική απόκλιση	σχ τυπική απόκλιση
60	0,208705245 0,213202498	0,210953871	0,003180038	1,507456468
30	0,131779935 0,132910175	0,132345055	0,0007992	0,60387613
15	0,086062387 0,076342557	0,081202472	0,006872957	8,463975483

3.1.4 IBMP



d-MPs=100ng/l

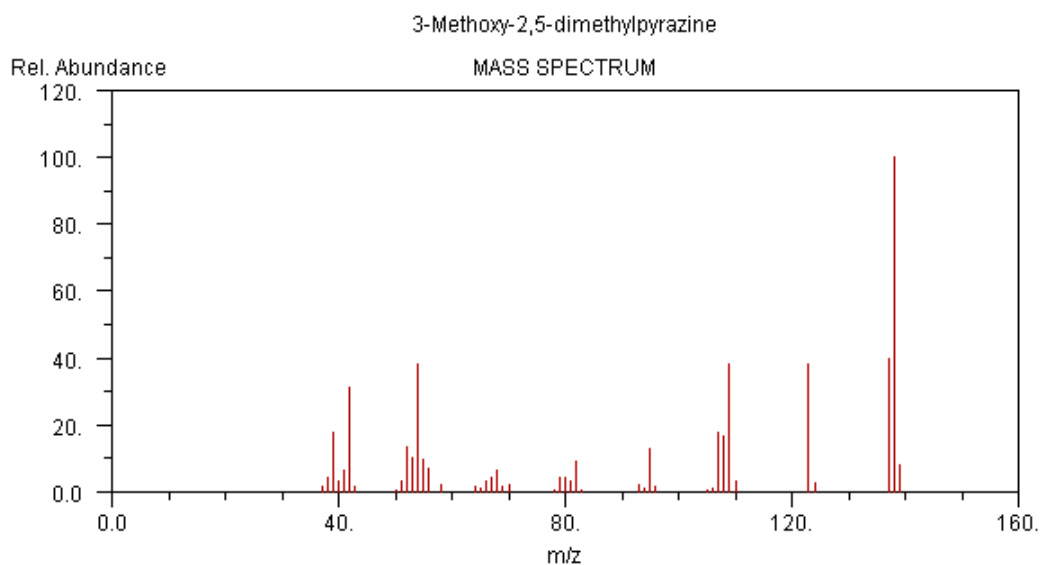
Σε κρασί

C (ng/l)	IBMP/d-secBMP	ΜΟ εμβαδού	τυπική απόκλιση	σχ τυπική απόκλιση
60	0,24731722 0,246591054	0,246954137	0,000513477	0,207924002
30	0,126601942 0,123485286	0,125043614	0,002203809	1,76243201
15	0,076730321 0,067373947	0,072052134	0,006615955	9,182177739

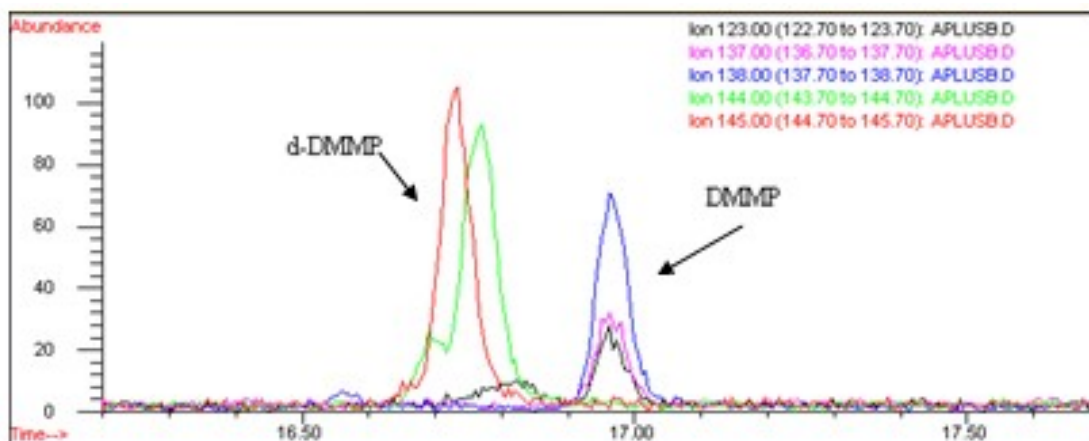
3.2 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

3.2.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΟΡΥΦΩΝ

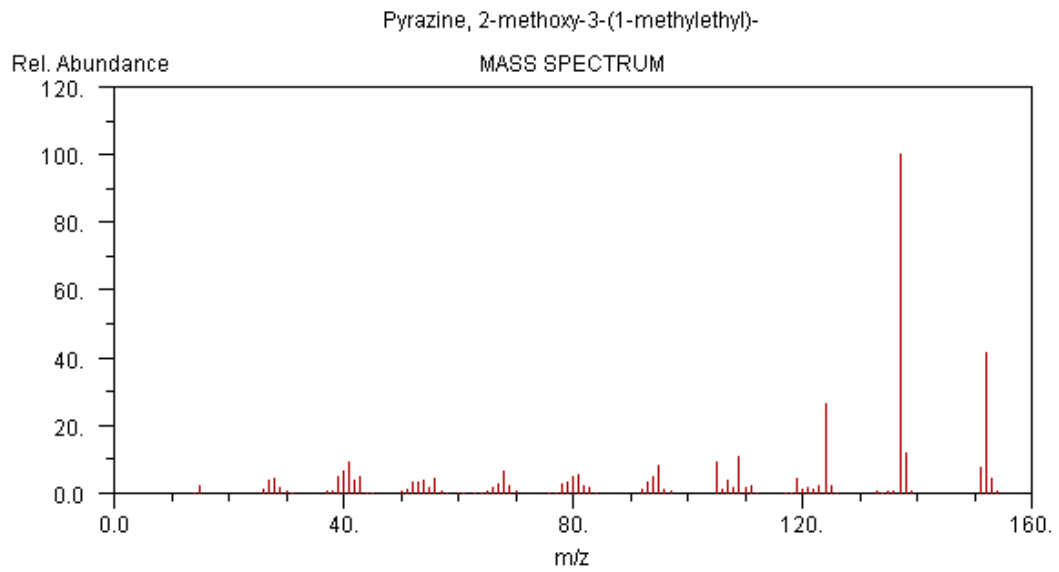
Η ταυτοποίηση των μεθοξυπυραζινών μεταξύ των κορυφών των χρωματογραφημάτων γίνεται με βάση το χρόνο έκλουσης και την παρουσία των ιόντων προσδιορισμού, τα οποία επιλέχθηκαν με βάση το φάσμα μάζας της κάθε ουσίας.



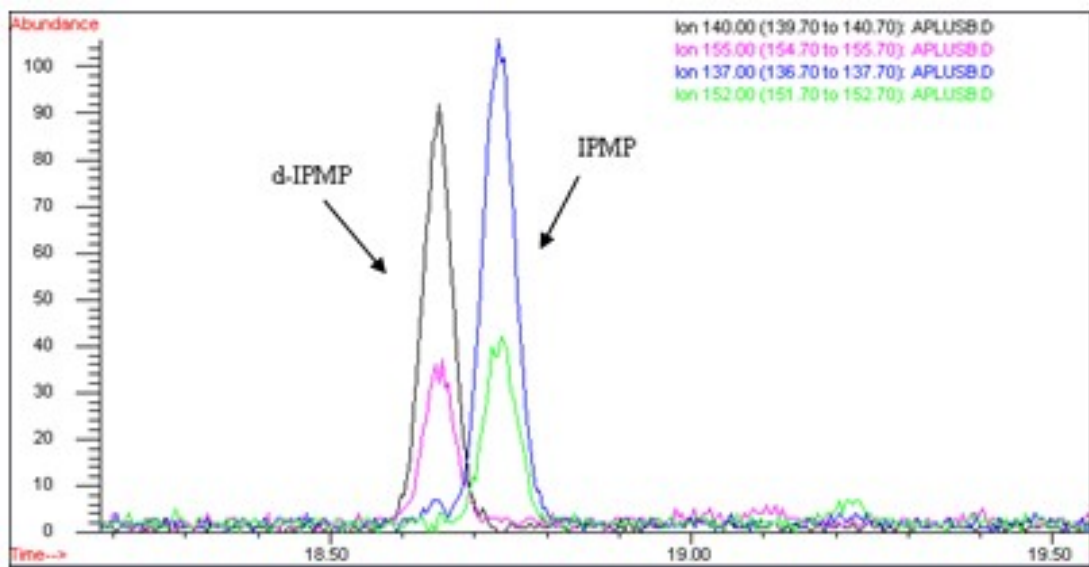
Φάσμα μάζας της DMMP



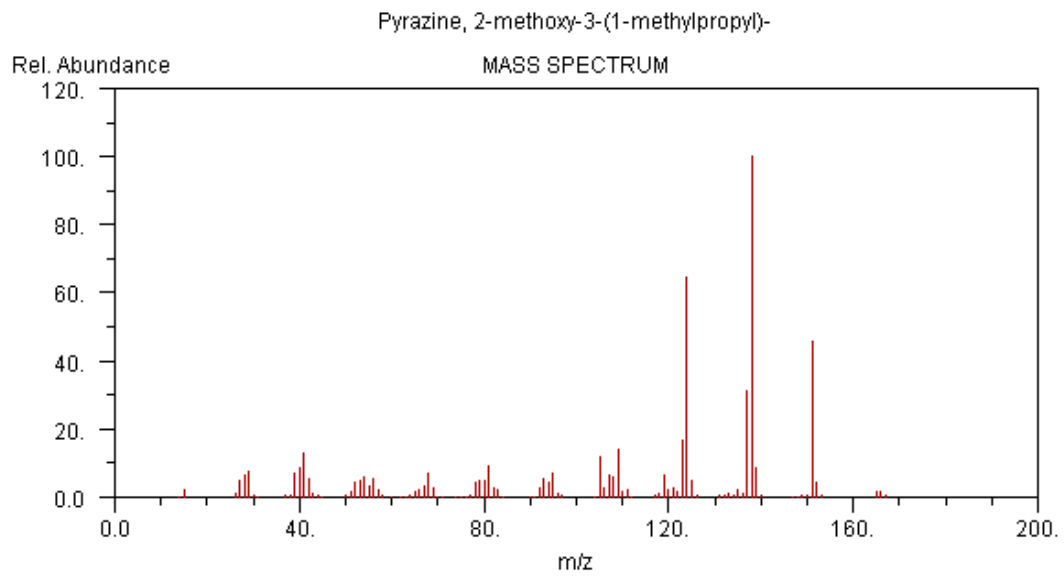
Ιόντα προσδιορισμού DMMP και d3-DMMP.



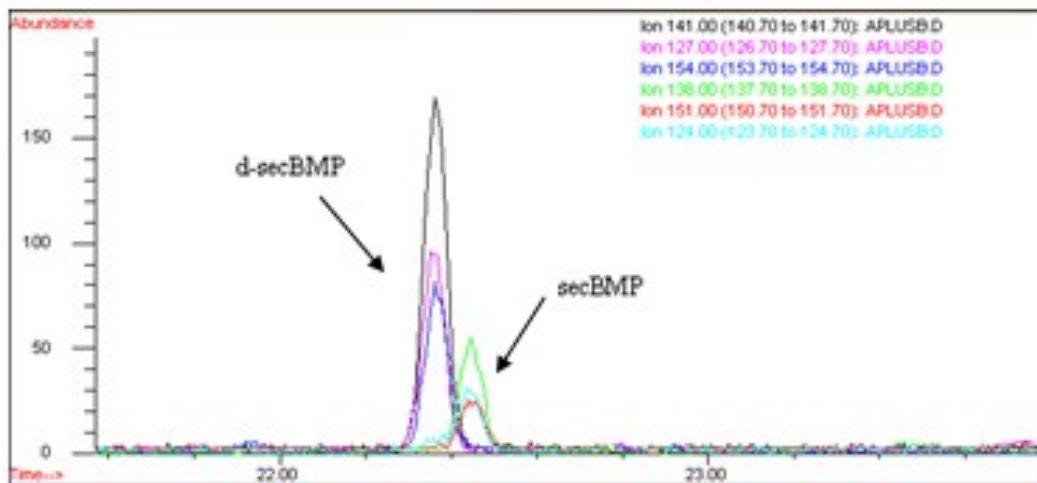
Φάσμα μάζας της IPMP.



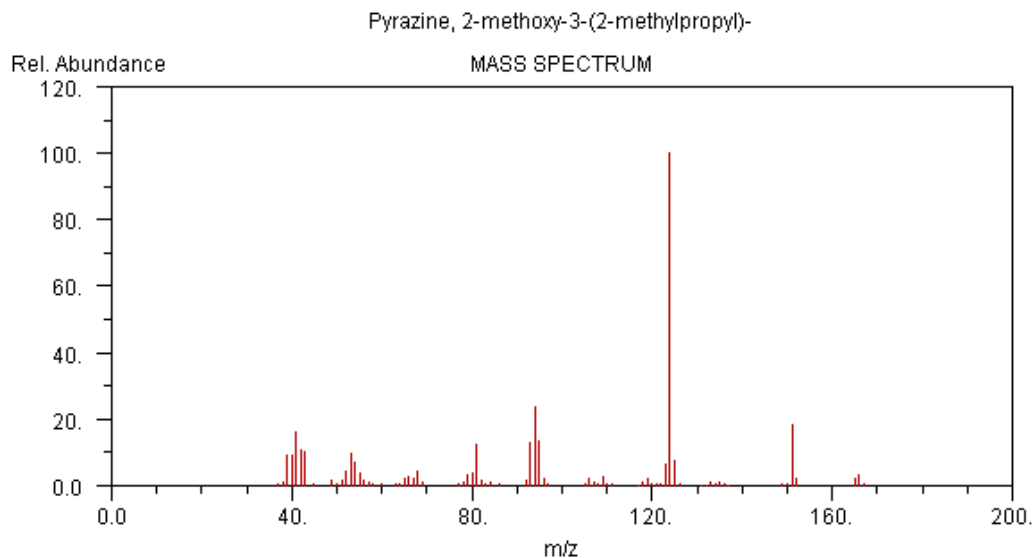
Ιόντα προσδιορισμού IPMP και d3-IPMP.



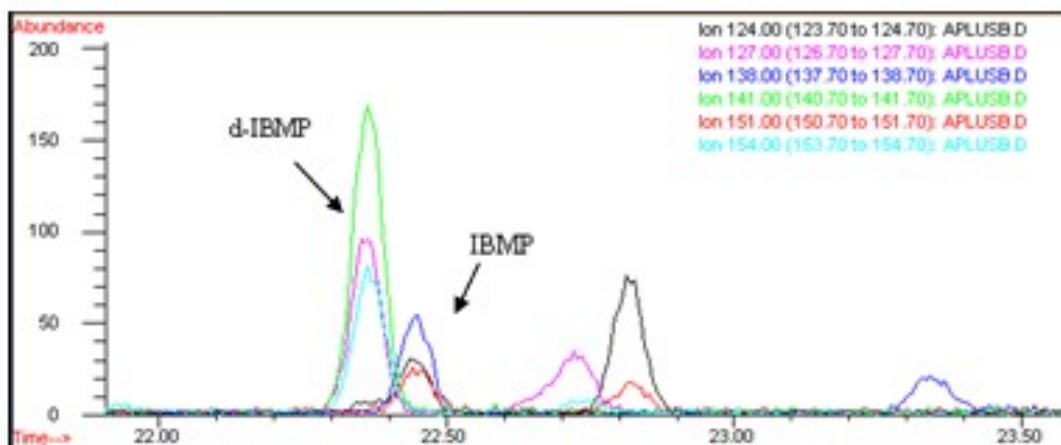
Φάσμα μάζας της secBMP.



Ιόντα προσδιορισμού secBMP και d3-secBMP.



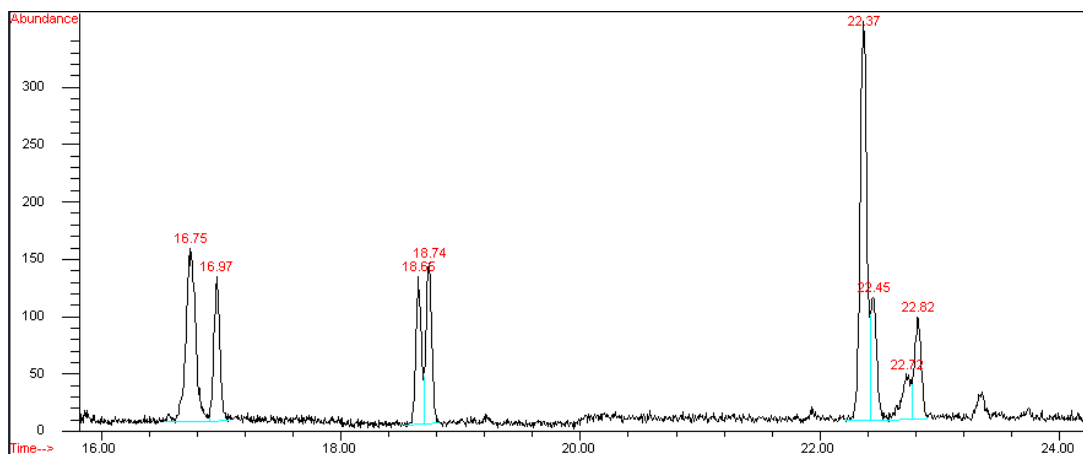
Φάσμα μάζας της IBMP.



Ιόντα προσδιορισμού IBMP και d3-IBMP.

3.2.2 ΧΡΟΝΟΙ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ

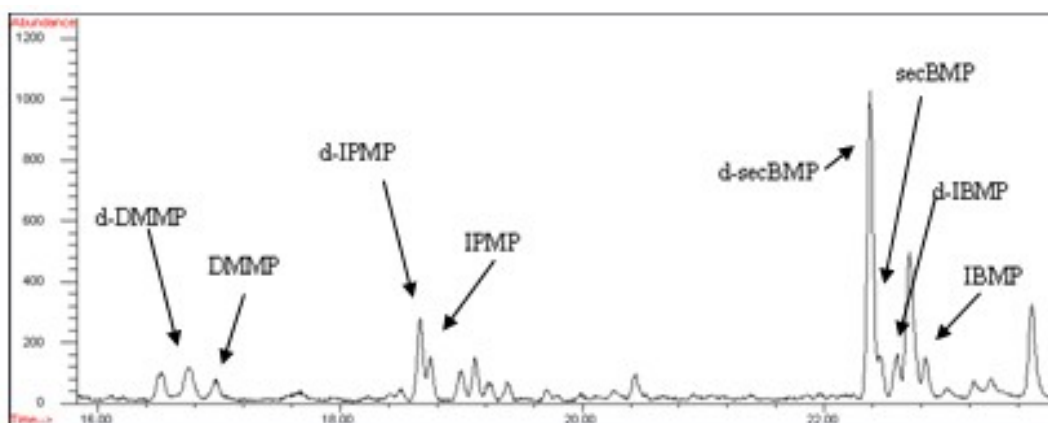
Για την εύρεση των χρόνων συγκράτησης των μεθοξυπυραζινών αναλύθηκε το διάλυμα AB (10μg/l) το οποίο περιείχε τις μεθοξυπυραζίνες διαλυμένες σε οξικό αιθυλεστέρα, ώστε να μην υπάρχουν επικαλύψεις κορυφών και ακαθαρσίες στο χρωματογράφημα. Επίσης ετοιμάστηκαν δείγματα model wine κρασιού και χυμού σταφυλής, με γνωστές συγκεντρώσεις μεθοξυπυραζινών ώστε να ελεγχθεί ποιά θα ήταν η συμπεριφορά τους στο περιβάλλον του κρασιού, αλλά και η επίδραση της αιθανόλης στο χρόνο συγκράτησης.



Χρωματογράφημα AB (10μg/l)

MP	d-DMMP	DMMP	d-IPMP	IPMP	d-secBMP	secBMP	d-IBMP	IBMP
t(min)	16,75	16,97	18,65	18,74	22,37	22,45	22,72	22,82

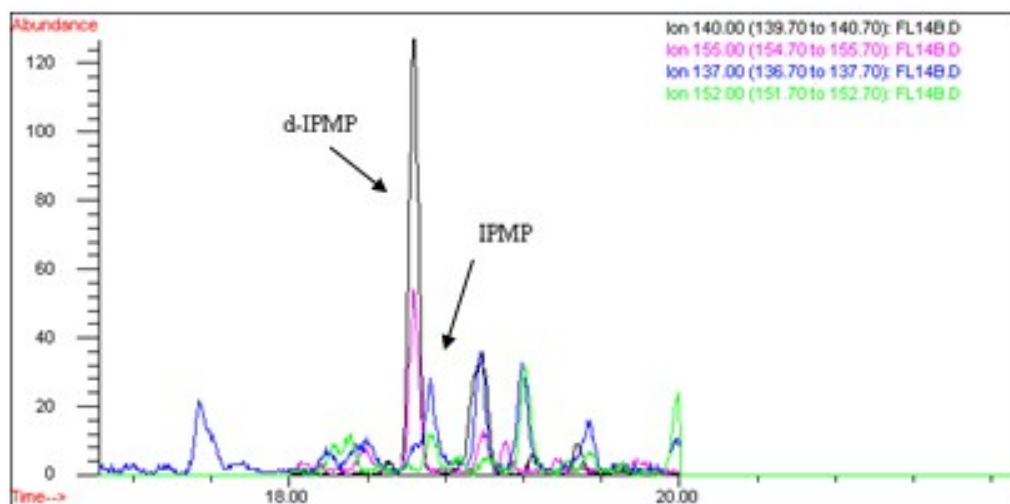
Μεθοξυπυραζίνες, επισημασμένα ισότοπα και χρόνοι συγκράτησης.



Χρωματογράφημα οίνου επιφορτισμένου (που έχει υποστεί προσθήκη) με 40ng/l MPs.

3.2.3 ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Η δυσκολία ανίχνευσης των μεθοξυπυραζινών και ιδιαίτερος της DMMP δεν άφησαν πολλές ελπίδες για την λήψη αποτελεσμάτων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να μην αναλυθούν δείγματα συγκέντρωσης μικρότερης των 15ng/l. Ωστόσο, όπως φαίνεται και από το παρακάτω σχήμα, η χρήση των Lichrolut-EN και οι διάφορες μετατροπές επί της μεθόδου των Ferreira et al., (2009)⁸⁰ συνετέλεσαν στην αύξηση της ευαισθησίας, με αποτέλεσμα τα 15ng/l, να δίνουν αρκετά καθαρές κορυφές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι το κατώφλι ανίχνευσης της μεθόδου μπορεί να είναι αρκετά χαμηλότερο. Ο λόγος των εμβαδών κορυφής (15ng/L) και θορύβου είναι 10,6 για την IPMP, 7,7 για τη secBMP και 7,6 για την IBMP.



Χρωματογράφημα για την IPMP σε συγκέντρωση 15ng/l (d-IPMP 100ng/l).

3.2.4 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Στήλες Lichrolut-EN	
Μεθοξυπυραζίνη	RSD (%)
IPMP	7,1
secBMP	4,1
IBMP	3,8

Στήλες C-18	
Μεθοξυπυραζίνη	RSD (%)
IPMP	8,7
IBMP	9,3

3.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΚΡΑΣΙΑ

Από τα κρασιά στα οποία έγιναν αναλύσεις μόνο σε ένα (Ξινόμαυρο Καρυδά 1997) ανιχνεύθηκαν μεθοξυπυραζίνες, και πιο συγκεκριμένα μόνο η IPMP, σε συγκέντρωση 40ng/l.

Δείγμα/MP	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ			
	DMMP (ng/l)	IPMP (ng/l)	secBMP (ng/l)	IBMP (ng/l)
Κρασιά				
Ροδίτης		Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται
Μαυρούδι		Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	<15 <15
Βλάχικο		Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται
Ντεμπίνα		Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται
Ξινόμαυρο Κ		40,85	Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται
ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΑΖΙΝΕΣ		41,24	Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται
Ξινόμαυρο Φ		<15 <15	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται Δεν ανιχνεύεται

3.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι

M₁, M₂, M₃: Δείγματα μάρτυρας, χωρίς πυραζίνες, χωρίς θέρμανση

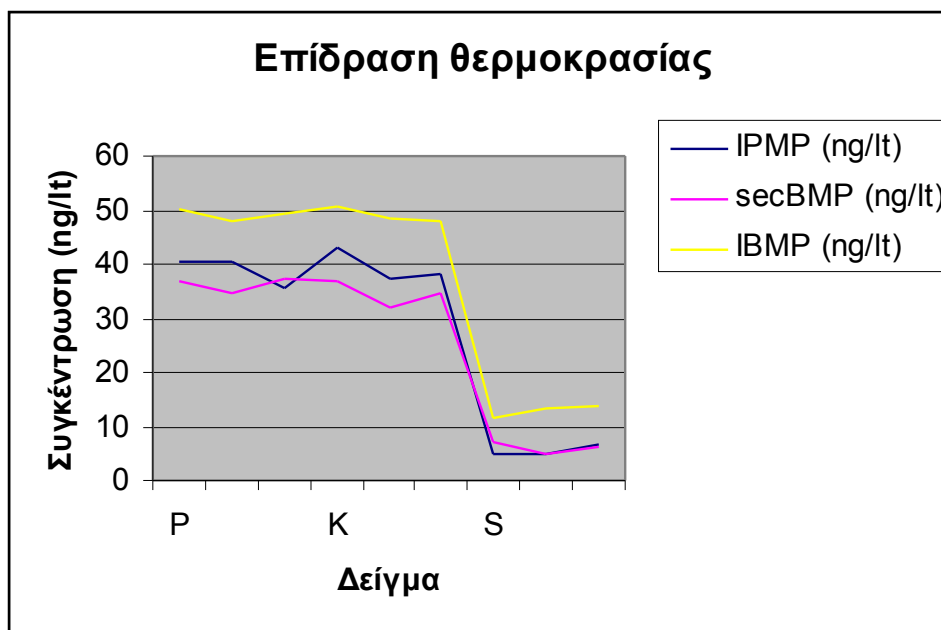
P₁, P₂, P₃: Δείγματα με 40ng/lit MPs, χωρίς θέρμανση

K₁, K₂, K₃: Δείγματα με 40ng/lit MPs, θέρμανση στους 60°C με καπάκι

S₁, S₂, S₃: Δείγματα με 40ng/lit MPs, θέρμανση στους 60°C χωρίς καπάκι

Ο χυμός που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση έδειξε να έχει IBMP σε συγκέντρωση μικρότερη από 15ng/L που είναι και το κατώφλι ανίχνευσης της μεθόδου.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ				
Χυμός				
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	DMMP (ng/lit)	IPMP (ng/lit)	secBMP (ng/lit)	IBMP (ng/lit)
M1		Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται	<15
M2		Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται	<15
M3		Δεν ανιχνεύεται	Δεν ανιχνεύεται	<15
P1		40,4	36,9	50,1
P2		40,3	34,6	47,8
P3		35,5	37,5	49,2
K1		43,3	36,7	50,8
K2		37,4	32,1	48,4
K3		38,2	34,5	48,1
S1		<15	<15	11,4
S2		<15	<15	13,1
S3		<15	<15	13,9



Διάγραμμα επίδρασης θερμοκρασίας στις MPs, όπου P: θερμοκρασία περιβάλλοντος. K: δείγματα που θερμάνθηκαν με καπάκι, S: δείγματα που θερμάνθηκαν χωρίς καπάκι.

3.5 SPE ΜΕ ΣΤΗΛΕΣ C-18

Η μέθοδος SPE με στήλες Isolute C-18 (Biotage) που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

Ενεργοποίηση

1ml οξικός αιθυλεστέρας

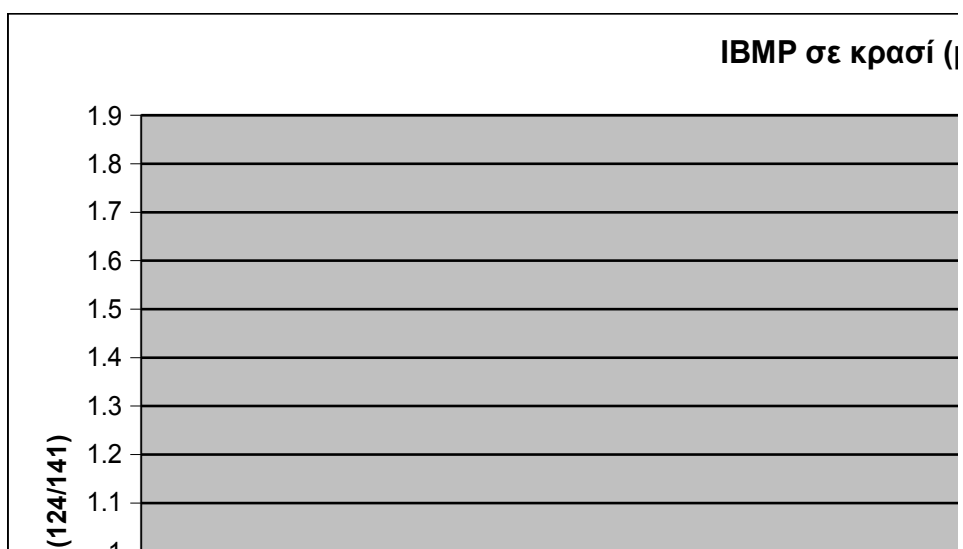
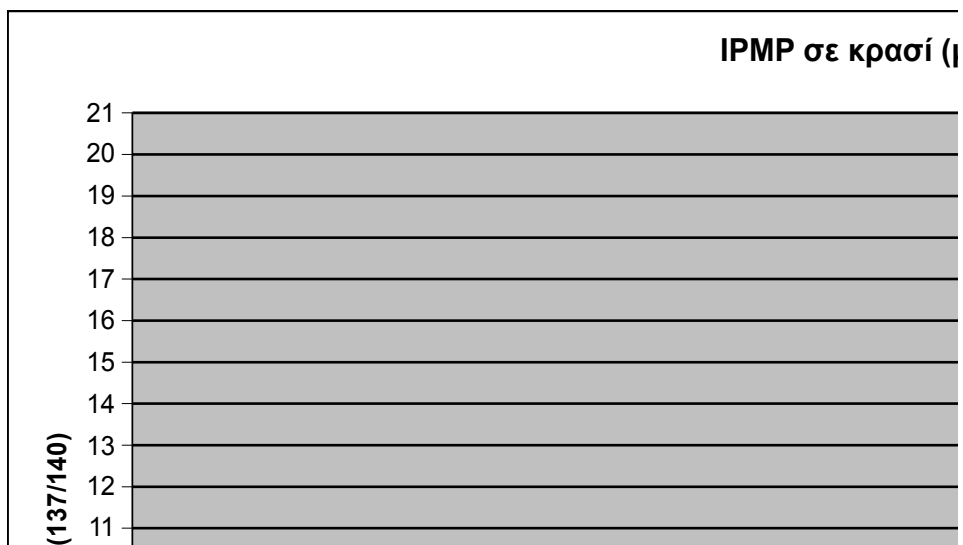
1ml αιθανόλη 95%

1ml αιθανόλη 10%

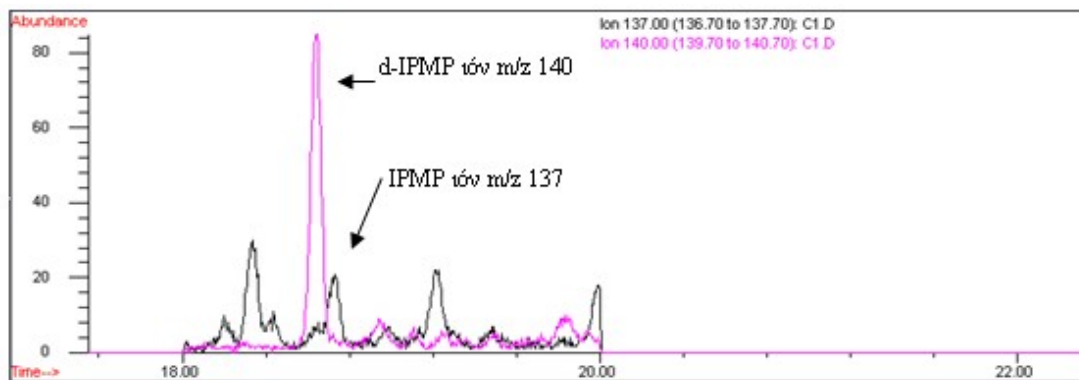
Εισαγωγή 100ml φιλτραρισμένου δείγματος με pH=8 (ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH 1N)

Έκλουση με 1ml διχλωρομεθάνιο και συμπύκνωση με ρεύμα N₂ σε τελικό όγκο 100μl.

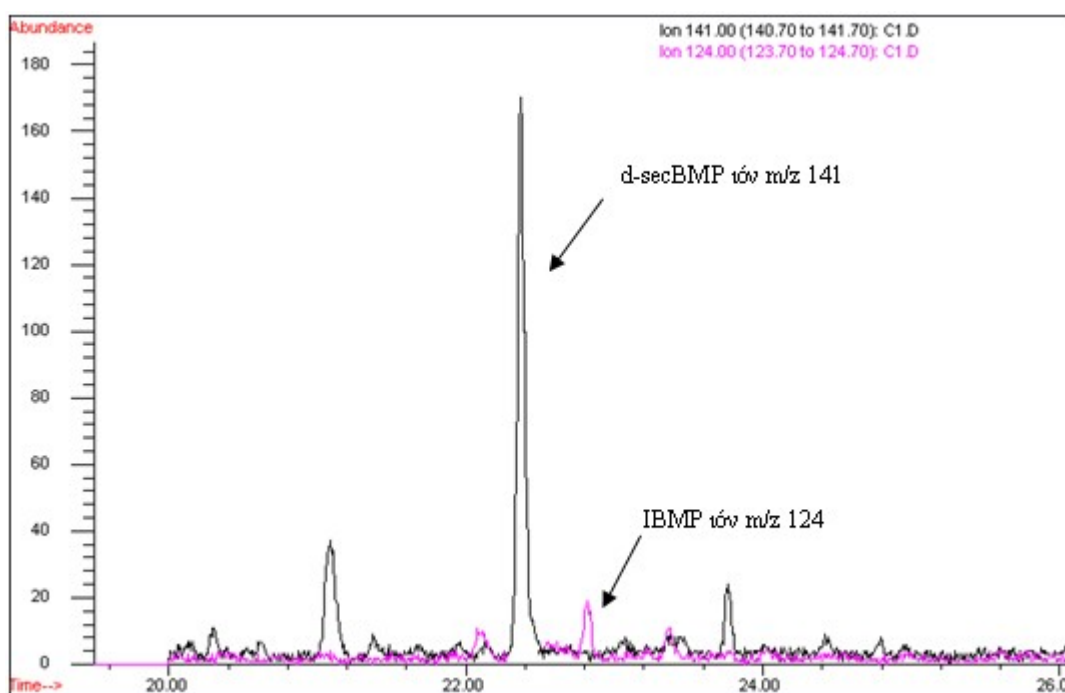
Με τη βοήθεια της παραπάνω μεθόδου ανιχνεύονται και προσδιορίζονται ποσοτικά οι IPMP και IBMP.



Το κατώφλι ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου τόσο για την IPMP όσο και για την IBMP είναι τα 5ng/lit, ενώ το θεωρητικό κατώφλι αντίληψης είναι χαμηλότερο.



IPMP σε συγκέντρωση 5ng/lit



IBMP σε συγκέντρωση 5ng/lit

3.5.1 ΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ ΜΕ ΤΙΣ C-18

Το κύριο πρόβλημα της αρχικής μεθόδου με τις στήλες C-18 ήταν η παρουσία πολλών κορυφών από ακαθαρσίες στο χρωματογράφημα, αλλά και η δυσκολία ανίχνευσης της DMMP. Οι μετατροπές που έγιναν επί της μεθόδου αναλύονται παρακάτω.

- Ενεργοποίηση

Οι αλλαγές στους διαλύτες ενεργοποίησης έγιναν έτσι ώστε να απομακρυνθούν από το φυσιγγίο της SPE τυχόν ακαθαρσίες. Έτσι δοκιμάστηκαν μεγαλύτεροι όγκοι των ήδη χρησιμοποιούμενων διαλυτών. Επειδή ο διαλύτης που χρησιμοποιείται πρώτος κατά την

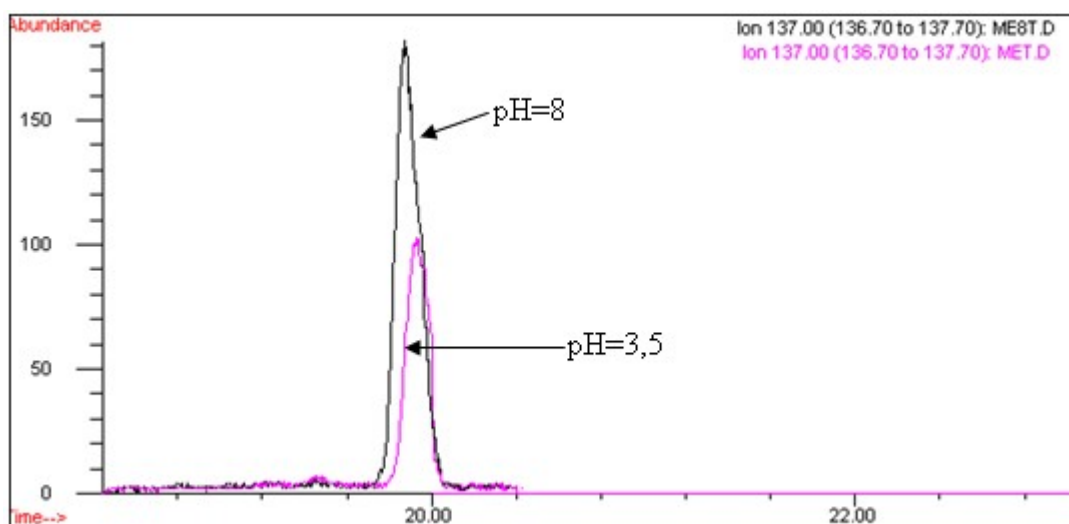
ενεργοποίηση συνήθως είναι ίδιος με το διαλύτη έκλουσης, δοκιμάστηκε τόσο ο οξικός αιθυλεστέρας όσο και το διχλωρομεθάνιο. Σαν διαλύτης που θα προετοιμάσει την πορώδη φάση χρησιμοποιήθηκε εκτός από αιθανόλη 95% και μεθανόλη, για να εξασφαλιστεί η διαβροχή του υλικού προσρόφησης από μεγαλύτερο όγκο δείγματος⁸².

Δεν υπήρξαν αξιόλογα αποτελέσματα.

- Όγκος, pH και περιεκτικότητα σε αλκοόλη του δείγματος

Η μεγαλύτερη συμπύκνωση του δείγματος κρίθηκε απαραίτητη καθώς ακόμη και σε συγκεντρώσεις 100ng/lit δεν φαίνονταν οι κορυφές των μεθοξυπυραζινών. Η αλλαγή του pH προωθεί τη συγκράτηση των μεθοξυπυραζινών οι οποίες είναι ελαφρά βασικές, (ή μήπως όλων των υπόλοιπων συστατικών του κρασιού) απο τις σιλανοειδείς ομάδες (Si-O-) του υλικού προσρόφησης⁸². Η αραιώση του δείγματος έχει σκοπό την μείωση της περιεκτικότητάς του σε αλκοόλη, ώστε να επιτρέπεται η καλύτερη κατακράτηση των ουσιών στη στήλη, καθώς η αλκοόλη είναι διαλύτης οπότε υπάρχει ανταγωνισμός στην κατακράτηση των ουσιών μεταξύ της C-18 και της αλκοόλης.

Εκτός της αραιώσης, τόσο η συμπύκνωση του δείγματος όσο και η αλλαγή του pH των δειγμάτων έδωσαν καθαρότερα χρωματογραφήματα με μεγαλύτερες κορυφές, άρα και χαμηλότερο κατώφλι ανίχνευσης.



Ενδεικτικό χρωματογράφημα της IPMP (ιόν προσδιορισμού 137) σε συγκέντρωση 100ng/L σε δείγματα με pH=3,5 και pH=8.

- Καθαρισμός

Για τον καθαρισμό της στήλης από ανεπιθύμητες ουσίες με μικρή ικανότητα συγκράτησης δοκιμάστηκε νερό διάφορων όγκων και σε διάφορα pH και διάλυμα 50% μεθανόλης με 1% NaHCO₃. Με τον τρόπο αυτό επιχειρήθηκε η απομάκρυνση ουσιών που εκλύονται μαζί με τη secBMP (βουτυρικό ή ισοβαλερικό οξύ) οι οποίες είναι διαλυτές στο νερό, ενώ το διάλυμα μεθανόλης και NaHCO₃ χρησιμοποιήθηκε λόγω της ικανότητάς του να δρα ως επαμφοτερίζουσα ουσία. Γενικά οι C-18 στήλες παρουσιάζουν προβλήματα λόγω ανεπαρκούς απομάκρυνσης πτητικών φαινολών.

- Έκλυση

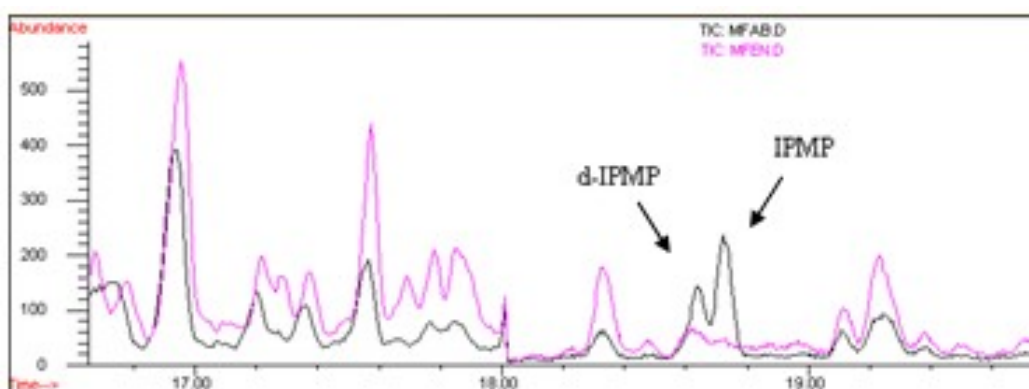
Εκτός από το διχλωρομεθάνιο που χρησιμοποιήθηκε σε όγκους 1 και 1,5ml, χρησιμοποιήθηκε και ο οξικός αιθυλεστέρας επίσης στους ίδιους όγκους λόγω μεγαλύτερης ικανότητας έκλυσης.

Δε φαίνεται να χρειάζεται μεγαλύτερος όγκος διαλύτη έκλυσης. Στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα λαμβάνονταν χρωματογραφήματα με μεγαλύτερες κορυφές.

- Συμπύκνωση

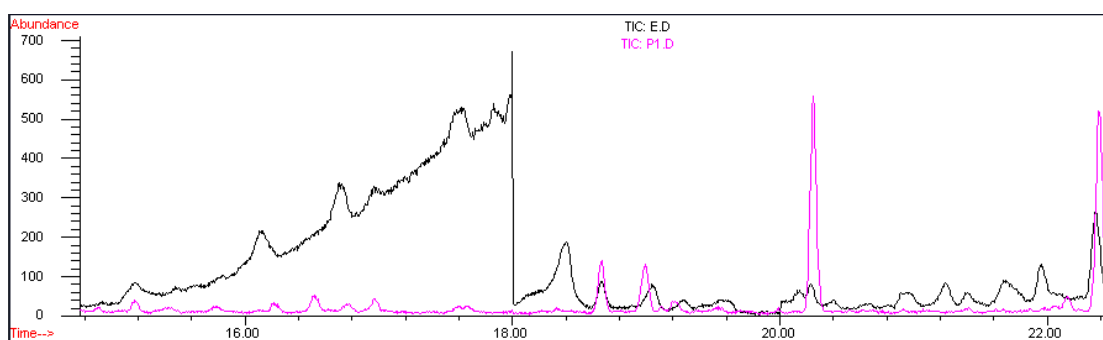
Για τη συμπύκνωση χρησιμοποιήθηκε εκτός από το ρεύμα N₂ θειικό νάτριο (Na₂SO₄), αλλά και συμπύκνωση μέχρι ξηρού με επαναδιάλυση με προσθήκη 100μl διαλύτη έκλυσης.

Η συμπύκνωση μέχρι ξηρού με επαναδιάλυση, και η συμπύκνωση με θειικό νάτριο (Na₂SO₄) δεν δίνουν αποτελέσματα, αντίθετα η συμπύκνωση με ρεύμα N₂ δίνει μεγαλύτερες κορυφές μεθοξυπυραζινών, μόνο όμως όταν ο διαλύτης έκλυσης είναι το διχλωρομεθάνιο (DM), καθώς στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα (EtAc) που είναι λιγότερο πτητικός φάνηκε πως συμπαρέσυρε και τις μεθοξυπυραζίνες.



Χρωματογράφημα δειγμάτων κρασιού. Με μαύρο φαίνεται δείγμα στο οποίο η έκλυση έγινε με DM ενώ στο ροζ με EtAc. Και τα δύο δείγματα συμπυκνώθηκαν σε ρεύμα N₂ σε τελικό όγκο 100μl.

Με βάση τη μέθοδο Ferreira η μόνη αλλαγή που χρειάστηκε να γίνει ήταν η αύξηση του όγκου του διαλύτη καθαρισμού από 25 σε 50ml, εφόσον από την αλλαγή χρώματος της στήλης ήταν εμφανές ότι διάφορες ανεπιθύμητες ουσίες δεν είχαν απομακρυνθεί (φαινόλες), και η συμπύκνωση του δείγματος σε ρεύμα αζώτου. Οι αλλαγές αυτές έδωσαν την τελική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.



Χρωματογράφημα δειγμάτων οίνου με προσθήκη 100ng/L MPs. Με μαύρο χρώμα φαίνεται δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκαν 25ml από το διαλύτη καθαρισμού, ενώ με ροζ δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκαν 50ml.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και των τεσσάρων μεθοξυπυραζινών, και τον ποσοτικό προσδιορισμό των IPMP, secBMP και IBMP, οι οποίες αποτελούν και τις συνηθέστερα συναντώμενες MPs σε γλεύκη και οίνους. Η δυνατότητα χρήσης στηλών με διαφορετικά υλικά πλήρωσης, αλλά και η πληθώρα διαλυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό των δειγμάτων, δείχνουν ότι υπάρχει περιθώριο βελτίωσης, και στη συγκεκριμένη περίπτωση οι προϋποθέσεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό και της DMMP, για την οποία άλλωστε δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά δεδομένα που θα βοηθήσουν στην αποτελεσματική μεταχείρισή της.

Από τις στήλες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην SPE, οι C-18 αποτελούν τις στήλες με το πιο δημοφιλές υλικό πλήρωσης, βάση του οποίου είναι το πυρίτιο, το περισσότερο υδροφοβικό υλικό. Η χρήση τους προτιμάται λόγω της εξαιρετικά συγκρατητικής φύσης του για μη πολικές ενώσεις, αλλά και εξαιτίας της προσιτής του τιμής. Οι C-18, αν και δεν επιτρέπουν την ανίχνευση των DMMP και secBMP, ωστόσο δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα για τις IPMP και IBMP, οι οποίες άλλωστε αποτελούν και τις μεθοξυπυραζίνες που απαντούν συνηθέστερα σε γλεύκη και οίνους. Το κύριο πρόβλημα είναι η έκλυση οξέων και πτητικών φαινολών. Το κατώφλι ανίχνευσης της μεθόδου είναι τα 5ng/lit, με δυνατότητα βελτίωσης, πολύ κοντά δηλαδή στα επίπεδα στα οποία οι MPs γίνονται αντιληπτές οργανοληπτικά στους οίνους.

Επομένως η μέθοδος αυτή μπορεί να αποδειχθεί αρκετά χρήσιμη σε προκαταρκτικές μελέτες στον αμπελώνα, οπότε και η οικονομική της τιμή θα μπορούσε να οδηγήσει στην καθιέρωση της ανάλυσης αυτής πρό του τρύγου. Οι υψηλές τιμές της IBMP πρό της ωρίμανσης, καθιστούν τη μέθοδο επαρκή.

Οι Lichrolut-EN που επίσης χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ανήκουν στις λεγόμενες στήλες νέας γενιάς. Το υλικό πλήρωσής τους είναι το αιθυλβινυλβενζένιο-διβινυλβενζένιο. Οι συγκεκριμένες στήλες φάνηκε ότι υπερέχουν των C-18, καθώς επέτρεψαν την ανίχνευση των secBMP και DMMP, αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό της secBMP. Ωστόσο ο ποσοτικός προσδιορισμός της DMMP δεν ήταν δυνατός λόγω παρεμβολών.

Το κατώφλι ανίχνευσης της μεθόδου είναι τα 15ng/lit, αλλά υπάρχουν οι προϋποθέσεις να φτάσει χαμηλότερα, εφόσον οι κορυφές που δίνουν οι MPs στα 15ng/lit είναι αρκετά καθαρές. Τα 200mg υλικού πλήρωσης επιτρέπουν εξάλλου τη χρήση μεγαλύτερου όγκου δείγματος, επομένως και μεγαλύτερη συμπύκνωση. Στην περίπτωση που η μέθοδος χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των MPs στον αμπελώνα είναι παραπάνω από επαρκής.

Από τους οίνους που αναλύθηκαν μόνο σε έναν ανιχνεύθηκαν μεθοξυπυραζίνες και συγκεκριμένα μόνο η IPMP σε συγκέντρωση 40ng/lit. Η απουσία της IBMP η οποία αποτελεί τη μεθοξυπυραζίνη που συντίθεται στα σταφύλια σε μεγαλύτερο ποσοστό, αποτελεί ένδειξη ότι υπεύθυνη για την παρουσία μεθοξυπυραζίνης στο κρασί είναι κάποια πασχαλίτσα. Πράγματι, η IPMP απαντά σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις MPs στην αιμολέμφο των Coccinellidae, ενώ η μη ανίχνευση των secBMP και IBMP οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πασχαλίτσα που είναι υπεύθυνη για την επιμόλυνση είναι πιθανόν η πιο συχνά απαντώμενη στην Ελλάδα, η *Coccinella septempunctata*. Πράγματι, το κρασί στο οποίο ανιχνεύθηκε η IPMP είναι Ξινόμαυρο του 1997, και παράγεται από έναν μόνο

αμπελώνα 6 στρεμμάτων στη Νάουσα. Οινοποιεία της περιοχής ακολουθούσαν τις αρχές της βιολογικής γεωργίας από τότε, αλλά ακόμη και χωρίς τη βιολογική καλλιέργεια πολλοί οινοποιοί θεωρούν αρκετά σημαντικό το μικρόκοσμο του αμπελιού (πασχαλίτσες, αράχνη) καθώς αποτελεί ένδειξη ισορροπίας, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα παρουσίας της *Coccinella septempunctata* στον αμπελώνα. Άλλωστε, η πασχαλίτσα στη χώρα μας θεωρείται γούρι, πράγμα που αντιτίθεται την απομάκρυνσή της από τον αμπελώνα. Το υψηλό κατώφλι ανίχνευσης της μεθόδου δεν αποκλείει τυπικά την ύπαρξη και των secBMP και IBMP οι οποίες θα αποτελούσαν ένδειξη ότι οι MPs προέρχονται από την *Harmonia axyridis*.

Στην περίπτωση του χυμού σταφυλής, ανιχνεύθηκε IBMP σε συγκέντρωση μικρότερη των 15ng/l, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από τη σύνθεση των ποικιλιών από τις οποίες παράχθηκε: Syrah, Merlot, Cabernet Frank Αγιωργίτικο και Μανδηλαριά.

Η θέρμανση των δειγμάτων χυμού έδειξε μείωση των συγκεντρώσεων και των τεσσάρων μεθοξυπυραζινών, πράγμα που θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην απομάκρυνσή τους με τη βοήθεια της θερμοοινοποίησης. Συγκεκριμένα, με θέρμανση των δειγμάτων στους 60°C χωρίς καπάκι παρατηρείται μείωση των συγκεντρώσεων των MPs κατά 87,5% (IPMP), 80% (secBMP) και 74% (IBMP), ενώ στην περίπτωση που τα δείγματα θερμανθούν με κλειστό το καπάκι, οι συγκεντρώσεις τους παραμένουν στα ίδια επίπεδα. Φαίνεται λοιπόν πως η αιτία της μείωσης δεν είναι η διάσπαση, αλλά η εξάτμιση των μεθοξυπυραζινών. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει μελέτη⁷³ που έγινε στην IBMP, στην οποία το αέριο κλάσμα συλλέχθηκε, αναλύθηκε με τη βοήθεια αέριου χρωματογράφου και βρέθηκε να περιέχει την IBMP που εξετασθήκε.

Τέλος, όσον αφορά την DMMP, προσδιορίζεται ποσοτικά μόνο σε οξικό αιθυλεστέρα, καθώς τόσο σε κρασί, σε χυμό, όσο και σε model wine, παρατηρήθηκε ταυτόχρονη εμφάνιση κορυφών από άγνωστες ουσίες.

5 ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Οι μεθοξυπυραζίνες έχουν ιδιαίτερη σημασία για τον κόσμο του κρασιού, λόγω της επίδρασης που έχουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Εκτός της θερμοοινοποίησης που όπως φάνηκε και στην παρούσα εργασία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων τους, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η εύρεση μιας μεθόδου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί καθολικά σε όλους τους τύπους των οίνων τόσο κατά την οινοποίηση όσο και στο τελικό προϊόν. Η παρουσία τους στην πρώτη ύλη, και σε συγκεκριμένες ποικιλίες αφήνει περιθώρια για μελέτη σχετικά με τη βιοσύνθεση και τη λειτουργία τους. Η αδυναμία ποσοτικού προσδιορισμού της DMMP στην παρούσα μελέτη αλλά και η έλλειψη βιβλιογραφίας σχετικά με την απομόνωσή της με τη βοήθεια της SPE αποτελούν ένα ακόμη τομέα για μελλοντική έρευνα, όπως επίσης και το αν είναι δυνατός ο διαχωρισμός της από την ισομερή της MDMP με την οποία παρουσιάζουν σχεδόν το ίδιο φάσμα μάζας και η οποία έχει συνδεθεί με το «άρωμα φελλού» στους οίνους. Τέλος, η πιθανότητα χρήσης των μεθοξυπυραζινών από τις πασχαλίτσες ως φερομόνης «συνάθροισης» θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο του πληθυσμού τους αλλά και της παρουσίας τους στους αμπελώνες κατά τη διάρκεια του τρύγου.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1: Μέσες συγκεντρώσεις IBMP, IPMP και secBMP που έχουν αναφερθεί σε **σταφύλια** (ng/L)⁶

Ποικιλία	Προέλευση	Στάδιο	Έτος Τρύγου	Μ.Μ.Θ.	IBMP	IPMP	secBMP
Sauvignon Blanc	Αυστραλία				0,5-79		
	Αυστραλία			19,8	8-16		
	Αυστραλία			23,9	<3		
	Ιαπωνία	30α	1997		101,2	48,7	
	Αυστραλία	ε	1987	22,2	35,4	1,1	
	Αυστραλία	ε	1988	27,0	30,7	1,6	
	Αυστραλία	ε	1987	19,4	78,5	6,8	0,6
	Αυστραλία	ε	1987	20,2	8,6	0,6	
	Αυστραλία	ε	1987	19,6	12,1	0,6	0,1
	Αυστραλία	ω	1987	22,2	1,3	1,0	
	Αυστραλία	ω	1988	27,0	0,6	0,3	
	Αυστραλία	ω	1987	19,4	13,4	1,3	
	Αυστραλία	ω	1987	20,2	11,5	0,5	
Αυστραλία	ω	1987	19,6	9,5	0,5	0,5	
Ιαπωνία	τ	1997		0,5	0,2		
Cabernet Sauvignon	Αυστραλία			23,9	0,5-189		
	Ιαπωνία	10α	1997		18,6	6,9	
	Ιαπωνία	30α	1997		96,2	16,2	
	Ιαπωνία	50α	1997		143,0	2,7	
	Ιαπωνία	70α	1997		23,0	0,6	
	Ισπανία	κ	1998	23,5	18,4-42,5	<5,4	4,0-9,6
	Γαλλία	ε	1997		100		
	Γαλλία	ε	1996		30-45		
	Ισπανία	ε	1998	23,5	10,9-20,0	<8,0	2,4-13,0
	Ισπανία	μ	1998	23,5	5,6-18,0	<15,0	3,0-18,2
	Γαλλία	ω	1996		10-20		
	Ισπανία	ω	1998	23,5	3,7-7,0	<3,0	2,3-4,6
	Ιαπωνία	τ	1995		17,5		
	Ιαπωνία	τ	1997		1,5	<0,2	
	Ισπανία	τ	1998	23,5	<3,9	<4,7	<4,1
Γαλλία	μούστος	1996		4-20			
Ισπανία	μούστος	1998	23,5	4,3-10,0	<2,8	<3,4	
Merlot Noir	Ιαπωνία	30α	1997		227,3	15,4	
	Γαλλία	ε	1997		60		
	Ισπανία	ε	1998	23,5	21,7	15,8	11,2
	Ισπανία	ω	1998	23,5	10,4	10,7	6,3
	Γαλλία	ω	1997		20		
	Ισπανία	τ	1998	23,5	5,6	2,7	2,1
	Ιαπωνία	τ	1997		0,9	<0,2	
	Γαλλία	μούστος	1996		5-12,9		
Ισπανία	μούστος	1998	23,5	19,4	18,1	8,2	
Pinot Noir	Ιαπωνία	30α	1997	1,4	0,4±0,2		
	Ιαπωνία	τ	1997	<0,2	<0,2		
Muscat Baley A	Ιαπωνία	30α	1997	0,3	<0,2		
	Ιαπωνία	τ	1997	<0,2	<0,2		

Δ.Π.Μ.Σ. ΑΜΠΕΛΟΥΡΓΙΑ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ

Semillon	Ιαπωνία	30α	1997	307,0	40,3
	Ιαπωνία	τ	1997	2,6	0,3
Chardonnay	Ιαπωνία	30α	1997	33,3	2,3
	Ιαπωνία	τ	1995	5,3	
	Ιαπωνία	τ	1997	0,2	<0,2
Riesling	Ιαπωνία	30α	1997	54,7	6,4
	Ιαπωνία	τ	1997	0,3	<0,2

ΜΜΘ: Μέση μηνιαία θερμοκρασία κατά την ωρίμανση (°C)

10α, 30α, 50α και 70α:10, 30 ,50 και 70 μέρες μετά την άνθηση, αντίστοιχα

κ: καρπόδεση, ε: έναρξη ωρίμανσης, μ: μέση ωρίμανσης, ω: τέλος ωρίμανσης, τ: τρύγος

Πίνακας 2: Μέσες συγκεντρώσεις IBMP, IPMP και secBMP που έχουν αναφερθεί σε **οίνους** (ng/L) ⁶






Ποικιλία	Προέλευση	Έτος τρύγου	Μ.Μ.Θ.	IBMP	IPMP	secBMP
Sauvignon Blanc	Αυστραλία		19,4-27,0	6,8	1,3	<1
	Αυστραλία & Νέα Ζηλανδία	1984/85		4,7		
	Γαλλία			6-38	2-4	0-2
	Νέα Ζηλανδία	1985		25,9	4,4	
Cabernet Sauvignon	Νέα Ζηλανδία			35	<6	<0,5
	Αυστραλία		18,0	3,6-56,3		
	Γαλλία			5-30		
	Γαλλία	1995		11-15,4		
	Γαλλία	1996		8-19		
	Ιαπωνία	1975-1988		5-28		
	Ιαπωνία	1989	23,5	17		
	Ιαπωνία	1990	23,3	4		
	Ιαπωνία	1991	23,2	10		
	Ιαπωνία	1992	22,6	9		
	Ιαπωνία	1993	21,7	35		
	Ιαπωνία	1994	23,6	3		
	Ιαπωνία	1995		25,3		
	Ιαπωνία	1996		6,5	0,2	
Ισπανία	1998	23,5	3,4-15,3		<1	<5,8
>80% Cabernet Sauvignon	Αυστραλία		22,7	3,6		
	Αυστραλία		23,6	6,2-7,6		
	Αυστραλία		21,2	9,1		
	Αυστραλία		19,8	11,2		
	Αυστραλία		20,0	12,3		
	Αυστραλία		22,7	17,1		
	Αυστραλία		18,0	26,1		
	Νέα Ζηλανδία		17,9-18,8	27,6-28,6		
Merlot Noir	Γαλλία			4-23		
	Γαλλία			5,1-10,8		
	Γαλλία	1993		9-16		
	Γαλλία	1994		6,5-13		
	Γαλλία	1995		3,7-7,5		
	Γαλλία	1996		3-16		
	Γαλλία	1996		6-12		
	Ιαπωνία	1989-1994		11		
	Ιαπωνία	1996		0,8	0,2-0,3	
	Ισπανία	1998	23,5	25,2-27,3	3,9-4,5	9,8-10,3
Cabernet Franc	Γαλλία			6-34		
	Γαλλία			8,5-12,1		
	Γαλλία	1995		4-5		
	Γαλλία	1996		2-11		
	Ιαπωνία	1987-1992		14		
Pinot Noir	Γαλλία	1983		<0,7		0,12-0,26

Muscat Baley A	Ιαπωνία	1989-1994	1
Chardonnay	Ιαπωνία	1995	11,6
Zweigeltrebe	Ιαπωνία	1983-1991	3
Ξινόμαυρο	Ελλάδα	1995	15-33

ΜΜΘ: Μέση μηνιαία θερμοκρασία κατά την ωρίμανση (°C)

Πίνακας 3: Στοιχεία ασφάλειας IBMP, IPMP και secBMP.

Table 1
Identity and exposure data for pyrazine derivatives

Flavoring ingredient	FEMA no.	CAS no. and structure	Most recent annual volume (kg)	Daily per capita intake ("eaters only")		Annual volume in naturally occurring foods (kg)	Consumption ratio
				μg/day	μg/kg bw/day		
23. 2-Isobutyl-3-methoxypyrazine	3132	24683-00-9 	7	1	0.02	110	16
31. 2-Methoxy-(3 or 5 or 6)-isopropylpyrazine	3358	25773-40-4  56891-99-7  68039-46-3 	0.5	0.01	0.001	1	2
32. 2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazine	3433	24168-70-5 	1	0.1	0.002	+	NA

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. H. Heymann, A.C. Noble, R.B. Boulton, Analysis of Methoxypyrazines in Wines. Development of a Quantitative Procedure. *J. Agric. Food Chem.* 34 (268-271), 1986.
2. Sala C, Bustoa O., Guasch J. Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines: a review.
3. Lingshuang Cai, Jacek A. Koziel and Matthew E. O'Neal, Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry *Journal of Chromatography A*, Volume 1147, Issue 1, 13 April 2007, Pages 66-78
4. Chemistry of Wine Flavor (ACS Symposium Series, No. 714) (31-39) Publisher Andrew L. Waterhouse, Susan E. Ebeler 1999
5. G.J. Pickering , A. Karthik , D. Inglis , M. Sears , K. Ker Determination of Ortho- and Retronasal Detection Thresholds for 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazine in Wine. *Journal of Food Science* Volume 72 Issue 7, Pages S468 - S472
6. Sala C, Bustoa O., Guasch J, Zamora F. Factors affecting the presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes and wines. A review.
7. Shimazaki K., Inoue T., Shikata H., Sakakibara K., Evaluation of the odor activity of pyrazine derivatives using structural and electronic parameters derived from conformational study by molecular mechanics (MM3) and ab initio calculations. *Journal of Molecular Structure* 749 (2005) 169-176
8. Chemistry of Wine Flavor (ACS Symposium Series, No. 714) (31-39) Publisher Andrew L. Waterhouse, Susan E. Ebeler 1999
9. Seifert R. M., Buttery R. G., Guadagni D. G., Black D. R., Harris J. G., Synthesis of Some 2-Methoxy-3-Alkylpyrazines with Strong Bell Pepper-Like Odors. *J. Agr. Food Chem.*, Vol. 18, No.2, 1970
10. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=2%2C5-dimethyl+3-methoxypyrazine&Units=SI>
11. <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1008681.html>
12. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-flav/index.html#M>
13. Fragrance raw materials monographs, 2-Isobutyl-3- Methoxypyrazine
14. WHO Technical Report Series 909 EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS Fifty-seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives World Health Organization Geneva 2002
15. Lund S. T., Bohlmann J., The Molecular Basis for Wine Grape Quality- A Volatile Subject. www.sciencemag.org
16. Conde C., Silva P., Fontes N., Dias A. C.P., Tavares R. M., Sousa M. J., Agasse

A., Delrot S., Geros H., Biochemical Changes throughout Grape Berry Development and Fruit and Wine Quality. Food 1(1), 1-22, 2007, Global Science Books.

17. Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology Second Edition Edited by Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis University of Crete, Heraklion, Greece Springer

18. D.R. Boubée, A.M. Cumsille, M. Pons, D. Dubourdieu, Location of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon grape bunches and its extractability during vinification. Am. J. Enol. Vitic. 53:1, 2002.

19. Roujou de Boubée, D., 2003 Amorim Academy Grand Prix.

20. D.R. Boubée, C.V. Leeuwen, D. Dubourdieu, Organoleptic impact of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine on red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. J. Agric. Food Chem. 48 (4830-4834), 2000.

21. Kennedy J., Understanding grape berry development. Winegrowing July/August 2002.

22. Hunter J. J., Volschenk C. G., Marais J., Fouche G. W., Composition of Sauvignon blanc Grapes as Affected by Pre-veraison Canopy Manipulation and Ripeness Level. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 25, No.1, 2004.

23. www.nysaes.cornell.edu/fst/faculty/sacks/index.html#MP

24. Ryona I., Pan BS., Intrigliolo DS., Lakso AN., Sacks GL. Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Franc). J Agric Food Chem. 2008 Nov 26;56(22):10838-46

25. Sala C., Busto O., Guasch J., Zamora F., Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety cabernet sauvignon. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, vol. 52, no11, pp. 3492-3497.

26. M.S. Allen, M.J. Lacey, Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. Vitic. Enol. Sci. 48 (211-213), 1993.

27. Falcao L. D., Revel G., Perello M. C., Moutsiou A., Zanus M. C., Bordignon-Luiz M. T., A Survey of Seasonal Temperatures and Vineyard Altitude Influences on 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine, C₁₃-Norisoprenoids and the Sensory Profile of Brazilian Cabernet Sauvignon Wines. J. Agric. Food Chem., 55, (3605-3612) 2007

28. Sala C., Busto O., Guasch J., Zamora F., Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: influence of irrigation and plantation density, J. Sci. Food Agric. 85 (1131-1136) 2005.

29. C. Prouteau, R. Sxhneider, Y. Lucchese, F. Nepveu, R. Renard, C. Vaca-Garcia, Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric analysis of wine. Analytica Chimica Acta 513 (223-227), 2004.

30. Lamorte S. A., Gambutti A., Genovese A., Moio L. Volatile components of *Vitis vinifera* L. cvs. Uva di Troia, Aglianico and Fiano at different stages of ripening. www.oiv2007.hu/documents/viticulture/Lamorte_oiv_2007_paper.pdf

31. Roujou de Boubée, Dominique, "Research on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in grapes and wine." School of Oenology, University of Bordeaux II 2004.

32. Genovese A., Dimaggio R., Lisanti M.T., Piombino P and Moio L., Aroma

composition of red wines by different extraction methods and Gas Chromatography-SIM/Mass Spectrometry analysis. *Annali di Chimica*, 95, Societa Chimica Italiana, 2005.

33. Romero R., Chason J., Garcia E., Martinez J., Pyrazine contents in four red grape varieties cultivated in a warm climate. *International Journal of Vine and Wine Sciences*, 40 (4)203-207, 2006.
34. Y.S. Tao, Y. Liu, H. Li, Sensory characters of Cabernet Sauvignon dry red wine from Changli County (China). *Food Chemistry* 114 (565-569), 2009.
35. W.V. Parr, J.A. Green, K.G. White, R.R. Sherlock, The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon Blanc: Sensory characterisation by wine professionals. *Food Quality and Preference* 18 (849-861), 2007.
36. K. Hashizume, N. Umeda, Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60:5 (802-805), 1996.
37. G.J. Pickering, A. Karthik, D. Inglis, M. Sears and K. Ker, Detection Thresholds for 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazine in Concord and Niagara grape juice, *Journal of Food Science* Vol. 73, Nr 6 (262-266) 2008.
38. Y. Kotseridis, A. Anocibar Beloqui, A. Bertrand , and J. P. Doazan, An Analytical Method for Studying the Volatile Compounds of Merlot noir Clone Wines *Am. J. Enol. Vitic.* 49:1:44-48 (1998)
39. Falcao L.D., Revel G., Rosier J., Bordignon-Luiz M., Aroma impact components of Brazilian Cabernet Sauvignon wines using detection frequency analysis (GC-olfactometry), *Food Chemistry* 107 (497-505) 2008.
40. Kennedy J., Understanding grape berry development. *Winegrowing July/August* 2002.
41. Ware R. L., Majerus M. E.N., Monitoring the spread of an invasive alien. *Proceedings of the International Symposium for the Biological Control of Aphids & Coccids*, 102-108, 2005.
42. www.chemistry.org/news
43. C. Ross, K. Weller, Sensory evaluation of suspected *Harmonia axyridis*-tainted red wine using untrained panelists. *Journal of Wine Research*, Vol. 18, No. 3, pp. 187-193, 2007.
44. Abassi S. Al., Birkett M. A., Petterson j., Pickett J. A., Woodcock C. M., Ladybird beetle odour identified and found to be responsible for attraction between adults. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54 (1998) 876-879.
45. Cudjoe E., Wiederkehr T. B., Brindle I. B., Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst*, 2005, 130, 152-155.
46. www.littlefatwino.com/awonews26.html , Amateur Winemakers of Ohio.
47. T. L. Galvan, E. C. Burkness, Z.Vickers, P. Stenberg, A. K. Mansfield, W. D. Hutchison Sensory-Based Action Threshold for Multicolored Asian Lady Beetle-Related Taint in Winegrapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:4 (518-522) 2007.
48. *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.* R.G. Berger (Ed.), Springer 2007.
49. Campo E., Ferreira V., Escudero A., Cacho J., Prediction of the Wine Sensory Properties Related to Grape Variety from Dynamic-Headspace Gas

Chromatography-Olfactometry Data. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 5682-5690

50. Ryan D., Prenzel P. D., Saliba A. J., Scollary G. R., The significance of low impact odorants in global odour perception. Trends in Food Science & Technology 19 (2008) 383-389.

51. R. Godelmann, S. Limmert, T. Kuballa, Implementation of headspace solid-phase-microextraction–GC–MS/MS methodology for determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine. Eur Food Res Technol 227 (449–461), 2008.

52. Aronson J., Ebeler S. E., Effect of Polyphenol Compounds on the Headspace Volatility of Flavors. Am. J. Enol. Vitic. 55:1 (2002)

53. Hartmann P. J., Mc Nair H. M., Zoecklein B. W., Measurement of 3-Alkyl-2-Methoxypyrazine by Headspace Solid-Phase Microextraction in Spiked Model Wines. Am. J. Enol. Vitic. 53:4 (2002).

54. Gary J. Pickering, Yong Lin, Andrew Reynolds, George Soleas, Roland Riesen, Ian Brindle, The Influence of *Harmonia axyridis* on Wine Composition and Aging. Journal of Food Science Volume 70, Issue 2, Pages S128 - S135 2005

55. Treloar, J.D. and Howell, G.S. (2006) Influence of yeast and malolactic bacteria strain choice on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine concentration in Cabernet Sauvignon and Franc wines. Abstracts of WineMakingWorkshop, Vegetable & FarmMarket EXPO, Great Lakes Fruit, Grand Rapids, MI, USA: <http://www.glexpo.com/abstracts/2006abstracts/WineMaking2006.pdf> .

56. J.H. Swiegers, R.L. Kievit, T. Siebert, K.A. Lattey, B.R. Bramley, I.L. Francis, E.S. King, I.S. Pretorius, The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. Food Microbiology 26 (204-211), 2009.

57. Howell S., Treloar J., Beaudry R. Cellar Methods to Reduce Methoxypyrazine Levels in Cabernet franc & Cabernet Sauvignon. Wine Department of Horticulture Michigan State University

58. Andras Salamon, Techniques to achieve moderate alcohol levels in South African wines, Cape Wine Master Diploma 2006.

59. K. Hashizume, S. Kida, T. Samuta, Effect of steam treatment of grape cluster stems on the Methoxypyrazine, Phenolic, Acid and Mineral content of red wines fermented with stems. J. Agric. Food Chem., 46 (4382-4386), 1998.

60. Wilson K., Boreham D., Moran G., Applications of radiation within the wine industry. Canadian Undergraduate Physics Journal Vol. I, Issue 2 (17-19) 2003.

61. G. Pickering, J. Lin, A. Reynolds, G. Soleas, R. Riesen, The evaluation of remedial treatments for wine affected by *Harmonia axyridis*. International Journal of Food Science and Technology, 41 (77-86), 2006.

62. A. Blake, Y. Kotseridis, I.D. Brindle, D. Inglis, M. Sears, G.J. Pickering, Effect of closure and packaging type on 3-alkyl-2-methoxypyrazines and other impact odorants of Riesling and Cabernet Franc wines. J. Agric. Food Chem. 57 (4680-4690), 2009.

63. <http://www.fst.vt.edu/extension/enology/EN/143.html>

64. A. Reynolds, M. Cliff, B. Girard, T.G. Kopp, Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. Am. J. Enol. Vitic. 52:3, 2001.

65. Sala C, Bustoa O., Guasch J. Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grapes, musts and wines: a review.

66. S.J. Bell, P.A. Henschke, Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* II (242-295), 2005.
67. D.M. Chapman, J.H. Thorngate, M.A. Matthews, J.X. Guinard, S.E. Ebeler, Yield Effects on 2-Methoxy-3-Isobutylpyrazine Concentration in Cabernet Sauvignon Using a Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method. *J. Agric. Food Chem.* 52 (5431-5435), 2004.
68. www.vines.org
69. Σταυρακάκης, Ν.Μ., 2000. Γενική Αμπελουργία.
70. Σταυρακάκης, Ν.Μ., 2004. Ειδική Αμπελουργία ΙΙ, Φυσιολογία και Οικολογία της Αμπέλου
71. A. Blake, Y. Kotseridis, I.D. Brindle, D. Inglis, G.J. Pickering, Effect of light and temperature on 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentration and other impact odourants of Riesling and Cabernet Franc wine during bottle aging. *Food Chemistry* Vol. 119, Issue 3 (935-944), 2010.
72. Dominique Roujou De Boubée, Research on 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in grapes and wines. School of Enology, University of Bordeaux II 2003.
73. Roujou de Boubée, D., 2003 Amorim Academy Grand Prix.
74. Practical Winery & Vineyard Magazine (March/April 2006): Persistence of vegetal characters in winegrapes and wine. K. Bogart, L. Bisson, Department of Enology & Viticulture University of California, Davis.
75. K. Hashizume, K. Tozawa, M. Endo, I. Aramaki, S-Adenosyl-methionine-dependent O-methylation of 2-hydroxy-3-alkylpyrazine in wine grapes: a putative final step of methoxypyrazine biosynthesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (795–801) 2001.
76. Allen, M. 2001. Viticultural Control of Grape Flavour in Cabernet Sauvignon, Sauvignon blanc and Semillon Vines. Final Report. National Wine & Grape Industry, Australia.
77. Ταραντίλης Π., Πολυσίου Μ., Ενόργανη Ανάλυση Φυσικών Προϊόντων, 2007.
78. Σύγχρονες Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση, Δεύτερη Έκδοση, Pecksook, Shields, Cairns, McWilliam, Εκδόσεις Γ.Α. Πνευματικός 1980.
79. http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_Aerioxrwmatoграфия2%20_2.pdf
80. Laura Culleré, Ana Escudero, Eva Campo, Juan Cacho and Vicente Ferreira Multidimensional gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods *Journal of Chromatography A*, Volume 1216, Issue 18, 1 May 2009, Pages 4040-4045
81. Kotseridis, Y.; Baumes, R.; Skouroumounis, G. K. Synthesis of labelled [2H4] β-damascenone, [2H2] 2-methoxy-3-isobutylpyrazine, [2H3] α-ionone, and [2H3] β-ionone, for quantification in grapes, juices and wines. *J. Chromatogr. A.* 1998, 824, 71-78.

82. www.biotage.com
83. Κοτσερίδης Γ., Σημειώσεις/Εργαστηριακές Ασκήσεις Οινολογίας Ι, 2005.
84. Michael Czerny, Ph.D. thesis, Technical University Munich, 1999.
85. G. Pickering, J. Lin, R. Riesen, A. Reynolds, I. Brindle, G. Soleas Influence of *Harmonia axyridis* on the Sensory Properties of White and Red Wine Am. J. Enol. Vitic. 55:2:153-159 (2004).
86. J. R. Aldrich, W. S. Leal, R. Nishida, A. P. Khrimian, C.-J. Lee & Y. Sakuratani Semiochemistry of aposematic seed bugs. Entomologia Experimentalis et Applicata 84: 127–135, 1997.
87. J.R. Aldrich, J.W. Avery, C.J. Lee, J.C. Graf, D.J. Harisson, F. Bin, Semiochemistry of Cabbage Bugs (Heteroptera: Pentatomidae: Eurydema and Murgantia). J. Entomol. Sci. 31 (2): 172-182, 1996.
88. Topics in Current Chemistry, The Chemistry of Pheromones and other Semiochemicals II, Springer 2004.
89. J. Pettersson, V. Ninkovic, R. Glinwood, M.A. Birkett, J.A. Pickett, Foraging in a complex environment – semiochemicals support searching behaviour of the seven spot ladybird Eur. J. Entomol. 102: 365–370, 2005.
90. E. Lucas, I Gagne, D. Coderre, Impact of the arrival of *Harmonia axyridis* on adults of *Coccinella septempunctata* and *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). Eur. J. Entomol. 99: 457-463, 2002.
91. M. Kenis, H.E. Roy, R. Zindel, M.E.N. Majerus, Current and potential management strategies against *Harmonia axyridis*. BioControl 53(1): 235-252, 2008.
92. Y. Kotseridis, R. L. Baumes, Al. Bertrand, G.K. Skouroumounis ,Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. Journal of Chromatography A, 841 (1999) 229–237.